

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la evolución clínica de la hipertensión y desarrollo de
albuminuria mediante estrategias ómicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura González Calero

Directores

Gloria Álvarez Llamas
Fernando Vivanco Martínez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA
HIPERTENSIÓN Y DESARROLLO DE
ALBUMINURIA MEDIANTE ESTRATEGIAS
ÓMICAS.**

Tesis Doctoral

Laura González Calero

Madrid 2016

Directores: Dra. Gloria Álvarez Llamas

Dr. Fernando Vivanco Martínez

Resumen

RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es causa fundamental de enfermedad (riesgo) cardiovascular (CV) y renal. El sistema renina-angiotensina (SRA), es un sistema vasoconstrictor esencial que en condiciones patológicas participa en la producción de daño orgánico, y en su inhibición se centra la terapia más comúnmente empleada en el tratamiento de los pacientes hipertensos. Sin embargo, se ha observado que tanto la enfermedad CV como la renal progresan en un número no despreciable de individuos, a pesar de estar bajo supresión crónica de SRA. En los pacientes con hipertensión esencial y función renal normal, el aumento de la excreción urinaria de albúmina (albuminuria) se considera marcador de progresión de la enfermedad cardiovascular y de empeoramiento de la función renal, independientemente de la coexistencia de diabetes. La albuminuria es, parcialmente, una consecuencia de la presión arterial (PA) alta. Además, otros factores tales como la inflamación sistémica y la disfunción endotelial también participan en su aparición, así como en la disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular (del inglés, “estimated glomerular filtration rate” eGFR).

Actualmente, no es posible predecir qué individuos con valores dentro del rango de normalidad (normoalbuminuria), progresarán negativamente desarrollando albuminuria. Igualmente, se desconocen los mecanismos que subyacen a ese desarrollo.

En esta tesis hemos planteado un estudio de carácter traslacional empleando varios abordajes ómicos (2D-DIGE, iTRAQ, RMN y SRM-LC-MS/MS) en orina y exosomas de orina de pacientes hipertensos con supresión crónica de SRA con el primer objetivo de identificar perfiles moleculares (proteínas y metabolitos) asociados al desarrollo de albuminuria. En un estudio prospectivo, identificamos potenciales dianas (proteínas y metabolitos) predictoras, es decir, capaces de predecir qué pacientes normoalbuminúricos progresarán y cuáles no.

Una serie de 1533 pacientes fueron seguidos durante cinco años para investigar la evolución de la albuminuria. Los pacientes se clasifican en: a) pacientes normoalbuminúricos que se han mantenido así durante el seguimiento clínico, b) pacientes que desarrollan albuminuria de novo durante el seguimiento clínico, y c) individuos con microalbuminuria mantenida, que se han mantenido microalbuminúricos durante el seguimiento. Al final del seguimiento, se recogió la orina de sujetos no hipertensos (grupo control) y una cohorte representativa total de 131 pacientes para el análisis proteómico y metabolómico. Los patrones moleculares de interés fueron identificados en una primera fase de descubrimiento por diferentes técnicas, según el tipo de análisis. Para la identificación de proteínas significativamente alteradas en orina se empleó la técnica diferencial en geles bidimensionales 2D-DIGE, mientras que el análisis proteómico diferencial de los exosomas, se realizó mediante la estrategia cuantitativa de marcaje iTRAQ. El análisis metabolómico se realizó por resonancia magnética nuclear (RMN) y la confirmación de las moléculas consideradas de interés por su respuesta asociada a la hipertensión y/o al desarrollo de albuminuria, se realizó por espectrometría de masas de monitorización por reacción seleccionada (o SRM, del inglés “selected reaction monitoring”) (SRM-LC-MS/MS). La combinación de varias metodologías y aproximaciones técnicas, así como el empleo de cohortes independientes de individuos en las fases de descubrimiento

inicial y de confirmación, garantizan una mayor cobertura en la identificación de dianas de interés.

Posteriormente, y una vez identificadas las proteínas y los metabolitos con mayor variación en este contexto clínico, se evaluó su potencial predictor de desarrollo de albuminuria. En un estudio prospectivo, se siguió clínicamente durante al menos un año desde la toma de muestras de orina a un subgrupo de pacientes normoalbuminúricos. Las moléculas de interés se analizaron en las muestras recogidas al inicio, cuando los pacientes eran normoalbuminúricos, siendo estos clasificados en progresores o no según su evolución posterior.

En el análisis de la orina completa obtuvimos tres proteínas alteradas significativamente: glicoproteína CD59 (CD59), alfa-1 antitripsina (AAT) y tetranectina (TNA). CD59 y AAT aparecieron alterados en pacientes que desarrollan albuminuria de novo, con una respuesta similar en los pacientes con albuminuria mantenida, TNA, en cambio, apareció variada en la condición de hipertensión per se. Estas respuestas alteradas apuntan a una vinculación con trastornos moleculares relacionados con la disfunción vascular, progresión de la aterosclerosis y el riesgo cardiovascular y renal. Por otra parte, el estudio metabolómico mostró nueve metabolitos de la orina alterados de manera significativa, los cuales se agruparon en paneles respondedores a HTA en sí misma (guanidoacetato, pantotenato, 3-ureidopropionato, oxalacetato y piruvato), a microalbuminuria mantenida (3-hidroxiacetato y piruvato) y a albuminuria de novo (guanidoacetato, glutamato y pantotenato). Estas firmas metabólicas unen el metabolismo de la arginina y prolina, el metabolismo de β -alanina y el ciclo del ácido tricarbóxico.

Por otro lado, el estudio prospectivo reveló dos proteínas (CD59 y AAT) y tres metabolitos (guanidoacetato, glutamato y pantotenato) capaces de predecir el desarrollo de la albuminuria. Es decir, su alteración en la muestra recogida cuando los pacientes aún presentan niveles normales de albúmina indica un posterior desarrollo de la misma en el futuro, siendo así predictores de daño vascular y mayor riesgo CV y constituyendo un método de evolución diagnóstica “temprana”. Así, estos resultados contribuyen a identificar los pacientes en riesgo de desarrollar albuminuria, incluso cuando este predictor clásico se encuentra todavía en el rango normal, lo que constituye una estrategia novedosa para una intervención terapéutica rápida y más eficiente con mejor resultado particularmente en pacientes con peor pronóstico cardiovascular

De manera complementaria, el estudio diferencial de proteínas exosomales permitió la identificación de un total de 1839 proteínas, 487 de ellas con más de tres péptidos. De modo general, 100 proteínas se identificaron por primera vez en exosomas de orina (Exocarta). Por otro lado, marcadores exosomales como Tsg101, CD63, anexinas A3, A4, A5, A6, A7, Flotillin-1, Clathrin1, y LAMP1 no mostraron diferencias significativas relacionadas con la hipertensión bajo supresión crónica de SRA como era de esperar, mientras que 48 proteínas mostraron un patrón significativamente alterado en respuesta a la hipertensión y/o albuminuria. Estas alteraciones apuntan principalmente a una respuesta inflamatoria, a la

regulación del sistema del complemento, al estrés oxidativo, y a la degradación de glicosaminoglicanos. Si bien los estudios realizados en fluidos biológicos como la orina permiten la identificación de marcadores de uso potencial en diagnóstico/pronóstico, los exosomas permiten aproximarse a lo que realmente está sucediendo a nivel del riñón, pudiendo reflejar cambios patológicos que tienen lugar directamente en el tejido renal. Estas proteínas en particular constituyen objetivos potenciales en el desarrollo de fármacos y pueden ayudar a definir estrategias terapéuticas para evitar la progresión de la albuminuria en hipertensos bajo tratamiento crónico.

SUMMARY

Hypertension (HTA) is one of the main risk factors for cardiovascular (CV) and renal disease. The renin-angiotensin system (RAS) is an essential vasoconstrictor pathway, but its inhibition is the most commonly therapy used in the treatment of hypertensive patients to control blood pressure (BP). However, it has been observed that both the renal and cardiovascular disease progress in a significant number of individuals, despite being under chronic suppression of RAS. In patients with essential hypertension and normal renal function, an increase in urinary albumin excretion (albuminuria) is considered a progression marker of cardiovascular disease and worsening renal function regardless of the coexistence of diabetes. Albuminuria is partly a result of high BP. In addition, other factors such as systemic inflammation and endothelial dysfunction are also involved in their appearance, as well as the progressive decline in glomerular filtration rate (eGFR).

The mechanisms underlying this development are unknown and, currently, it is not possible to predict who of those individuals with values within the normal range (normoalbuminuria) will progress negatively developing albuminuria.

In this PhD Thesis we have carried out a study of translational character using various omics approaches (2D-DIGE, iTRAQ, NMR and SRM-LC-MS/MS) in urine and urinary exosomes of hypertensive patients with chronic suppression of RAS. The main objective was to identify molecular profiles (proteins and metabolites) associated with the development of albuminuria. In a prospective study, we identified potential predictor targets (proteins and metabolites), able to predict who of the normoalbuminuric patients will progress and who not.

A cohort of 1533 patients was followed for five years to investigate the evolution of albuminuria. Patients were classified as: a) normoalbuminuric patients which remained as such during clinical follow-up, b) patients who develop *de novo* albuminuria during clinical follow-up, and c) individuals with maintained albuminuria, which remained albuminuric during follow-up. At the end of follow-up, the urine of non-hypertensive subjects (control group) and a representative cohort of 131 patients for proteomic and metabolomic analysis were collected. The molecular patterns of interest were identified in a first discovery phase by different techniques depending on the type of analysis. For identification of significantly altered urine proteins a bidimensional differential in gel electrophoresis technique (2D-DIGE) was used, while the differential proteomic exosomes analysis was performed by quantitative iTRAQ labeling strategy and LC-MS/MS analysis. Metabolomic analysis was performed by nuclear magnetic resonance (NMR). Confirmation of these molecules to be associated with hypertension and/or development of albuminuria was performed by selected reaction monitoring targeted analysis (SRM-LC-MS/MS). The combination of different methodologies and technical approaches, and the use of independent individuals cohorts in the initial discovery and confirmation phases, ensure greater coverage in identifying targets of interest.

Three proteins were significantly altered after complete urine analysis: glycoprotein CD59 (CD59), alpha-1 antitrypsin (AAT) and tetranectin (TNA). CD59 and AAT were altered in patients which developed albuminuria de novo, with a similar response in patients with maintained microalbuminuria. However, TNA varied in the condition of hypertension per se. These responses point to a link between molecular disorders related to vascular dysfunction, progression of atherosclerosis and cardiovascular and renal risk. Moreover, the metabolomic study showed nine urine metabolites altered significantly, which were grouped into three responders panels: HTA itself (guanidoacetate, pantothenate, 3-ureidopropionate, oxaloacetate and pyruvate), a maintained microalbuminuria (3- hydroxybutyrate and pyruvate) and de novo albuminuria (guanidoacetate, glutamate and pantothenate). These metabolic signatures bind arginine and proline metabolism, β -alanine metabolism and the tricarboxylic acid cycle (TAC).

Once proteins and metabolites with greater variation in this clinical context, were identified its potential predictor of albuminuria development was evaluated. In a prospective study, a subset of normoalbuminuric patients was clinically followed for at least 1 year from urine sampling and classified in progressors or not. The molecules of interest were analyzed in samples collected at baseline when patients were still normoalbuminuric.

The prospective study revealed that two proteins (CD59 and AAT) and three metabolites (guanidoacetate, glutamate and pantothenate) were able to predict the development of albuminuria. Alteration in the collected samples, when patients still have normal levels of albumin, shows a further development in the future, being a predictor of vascular damage and increased CV risk. Analysis of these molecules provides a method of “early” diagnostic evolution. Thus, these results help to identify patients at risk of developing albuminuria, even when this classic predictor is still in a normal range. These set the basis for new strategies for a more efficient therapeutic intervention with better data results, particularly in patients with worse cardiovascular prognosis.

Complementarily, the differential study of exosomal proteins allowed the identification of 1839 total proteins, 487 were detected with more than three peptides. 100 proteins were identified for the first time in urinary exosomes (Exocarta). Exosomal markers as Tsg101, CD63, annexin A3, A4, A5, A6, A7, Flotillin-1, Clathrin1, and LAMP1 showed no significant differences related to hypertension under chronic RAS suppression as expected, while 48 proteins showed a significantly altered pattern in response to hypertension and/or albuminuria. These changes pointed primarily to an inflammatory response, complement system regulation, oxidative stress, and glycosaminoglycans degradation. While studies in biological fluids such as urine allow identification of markers for potential use in diagnostic or prognostic, exosomes allow approximate what is really taking place in the kidney and can reflect pathological changes taking place directly into the renal tissue. Particularly, these proteins are potential targets in drug development and can help to define therapeutic strategies to prevent albuminuria progression in hypertensive patients under chronic treatment.

Índice

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 3 |
| RESUMEN | 5 |
| SUMMARY | 9 |
| ABREVIATURAS | 17 |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 23 |
| HIPERTENSIÓN ARTERIAL: PREVALENCIA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO | 25 |
| HIPERTENSIÓN ARTERIAL: SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA | 28 |
| ALBUMINURIA COMO INDICADOR CLÍNICO: RIESGO CV Y DAÑO RENAL | 31 |
| REALIDAD CLÍNICA DESDE LA UNIDAD DE HIPERTENSIÓN | 35 |
| DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN HTA CONTROLADA DESDE UN ABORDAJE ÓMICO | 36 |
| I. LAS ÓMICAS EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD | 36 |
| II. ÓMICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN Y AL DESARROLLO DE ALBUMINURIA (DAÑO ORGÁNICO) | 38 |
| III. LA ORINA Y LOS EXOSOMAS DE LA ORINA: MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD CARDIO-RENAL (HTA Y DESARROLLO DE ALBUMINURIA) | 42 |
| IV. APROXIMACIONES ÓMICAS APLICADAS EN LA TESIS | 45 |
| A. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL. | 45 |
| B. APROXIMACIÓN METABOLÓMICA AL ESTUDIO DE LA HTA. | 46 |
| C. VALIDACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES POR SRM-LC-MS/MS CON QQQ | 47 |
| HIPÓTESIS | 49 |
| NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE LA HTA Y SU EVOLUCIÓN. | 51 |
| OBJETIVOS | 53 |
| OBJETIVO GENERAL | 55 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 55 |
| CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS | 57 |
| 1. SELECCIÓN DE PACIENTES | 59 |
| 2. FLUJO DE TRABAJO GENERAL: APROXIMACIONES ÓMICAS | 60 |
| 3. RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA | 62 |
| 4. EXTRACCIÓN PROTEICA Y AISLAMIENTO DE EXOSOMAS | 63 |
| 4.1. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE ORINA: CONCENTRACIÓN Y DESALINIZACIÓN PREVIA A SU ANÁLISIS POR 2D-DIGE Y SRM-LC-MS/MS | 63 |
| 4.2. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS DE LA ORINA | 65 |
| 5. ESTUDIO ÓMICO DIFERENCIAL DE LA HTA Y DEL DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN PACIENTES CON SUPRESIÓN CRÓNICA DE SRA | 67 |

| | |
|--|----|
| 5.1. ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE ORINA HUMANA POR 2D-DIGE DE MARCAJE MÍNIMO: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN PACIENTES HTA BAJO INHIBICIÓN DEL SRA QUE DESARROLLAN O NO ALBUMINURIA. | 67 |
| 5.1.1. MARCAJE DE LAS MUESTRAS DE ORINA. | 71 |
| 5.1.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL. | 72 |
| 5.1.3. DIGITALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES. | 73 |
| 5.1.4. TINCIÓN DE LOS GELES Y ESCISIÓN DE MANCHAS PROTEICAS. | 74 |
| 5.1.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS MANCHAS PROTEICAS DIFERENCIALES MEDIANTE MALDI-TOF MS. | 74 |
| 5.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA EXOSOMALES EN HIPERTENSOS BAJO SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA: ANÁLISIS DIFERENCIAL ÍTRAQ | 75 |
| 5.2.1. CONCENTRACIÓN EN SDS-PAGE, DIGESTIÓN TRÍPTICA Y MARCAJE ISOBÁRICO | 78 |
| 5.2.2. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DIFERENCIAL CUANTITATIVO DE PROTEÍNAS POR SRM-LC-MS/MS | 79 |
| 5.2.3. ANÁLISIS DE DATOS Y BIOLOGÍA DE SISTEMAS | 80 |
| 5.3. ANÁLISIS METABOLÓMICO DE LA ORINA POR RMN | 80 |
| 5.3.1. ANÁLISIS ¹ H RMN. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES EN ORINA EN RESPUESTA A HTA Y DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN INDIVIDUOS CON TRATAMIENTO CRÓNICO DE INHIBICIÓN DEL SRA | 82 |
| 5.3.2. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS MEDIANTE RMN BIDIMENSIONAL (RMN 2D) | 84 |
| 5.4. CONFIRMACIÓN DE LAS VARIACIONES IDENTIFICADAS (PROTEÍNAS Y METABOLITOS) EN ORINA Y EXOSOMAS | 85 |
| 5.4.1. ANÁLISIS DIRIGIDO POR SRM-LC-MS DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN ORINA GLOBAL | 85 |
| 5.4.2. ANÁLISIS DIRIGIDO DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EXOSOMALES DE ORINA POR SRM-LC-MS/MS | 90 |
| 5.4.3. ANÁLISIS DIRIGIDO DE LAS RESPUESTAS ALTERADAS DE METABOLITOS DE ORINA POR SRM-LC-MS/MS | 92 |

CAPÍTULO 3: RESULTADOS **99**

| | |
|---|------------|
| ESTUDIO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN ORINA DE PACIENTES HTA | 101 |
| ANÁLISIS DIFERENCIAL PROTEÓMICO POR 2D-DIGE | 101 |
| ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (SRM-LC-MS/MS) EN UNA COHORTE DE CONFIRMACIÓN. | 105 |
| ESTUDIO PROSPECTIVO EN ORINA. PREDICCIÓN DE DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN HTA CONTROLADA. | 107 |
| EXOSOMAS EN ORINA REVELAN DIANAS PROTEICAS EN PACIENTES HTA BAJO l-SRA QUE DESARROLLAN ALBUMINURIA | 111 |
| PROTEÍNAS EXOSOMALES IDENTIFICADAS EN HIPERTENSOS BAJO LA SUPRESIÓN CRÓNICA SRA | 111 |
| PROTEÍNAS ALTERADAS EN RESPUESTA A LA ALBUMINURIA EN EXOSOMAS. | 113 |
| IDENTIFICACIÓN DE UN PANEL CON RESPUESTA A LA CONDICIÓN DE ALBUMINURIA DESARROLLADA <i>DE NOVO</i> POR SRM-LC-MS/MS | 116 |
| REDES DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS Y PROCESOS BIOLÓGICOS | 117 |
| FIRMA METABÓLICA ESPECÍFICA EN ORINA EN HTA TRATADA | 121 |
| ANÁLISIS DE UNA HUELLA METABÓLICA RESPONDEDORA A HIPERTENSIÓN Y ALBUMINURIA POR RMN | 121 |
| CONFIRMACIÓN Y SELECCIÓN DE METABOLITOS CON RESPUESTA ALTERADA EN HTA Y/O ALBUMINURIA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DIRIGIDA SRM-LC-MS/MS | 125 |
| PATRÓN METABÓLICO QUE PREDICE EL DESARROLLO ESPECÍFICO DE LA ALBUMINURIA EN PACIENTES HIPERTENSOS CON VALORES NORMALES DE ALBÚMINA EN ORINA | 132 |

| | |
|--|------------|
| PANELES MULTI-MOLECULARES LIGADOS A LA HIPERTENSIÓN, ALBUMINURIA MANTENIDA Y PREDICCIÓN DE PROGRESIÓN. | 133 |
| CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN | 139 |
| DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS DE FORMA CRÓNICA | 141 |
| PERFIL PROTEÓMICO DE LA ORINA DE PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON I-SRA | 143 |
| PERFIL PROTEÓMICO EXOSOMAL DE LA ORINA DE PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON I-SRA | 147 |
| PERFIL METABOLÓMICO DE ORINA EN PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON I-SRA | 155 |
| ALTERACIONES EN ORINA EN RESPUESTA A UN DAÑO RENAL AGUDO: INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA) | 159 |
| CONCLUSIÓN GENERAL | 161 |
| CONCLUSIONES | 165 |
| LIMITACIONES | 169 |
| PERSPECTIVAS FUTURAS | 173 |
| ANEXOS | 177 |
| ANEXO 1 | 179 |
| ANEXO 2 | 180 |
| ANEXO 3 | 184 |
| ANEXO 4 | 203 |
| ANEXO 5 | 207 |
| ANEXO 6 | 216 |
| BIBLIOGRAFÍA | 220 |

Abreviaturas

| | |
|-----------|---|
| 2D-DIGE | Bidimensional differential in gel electrophoresis |
| A1BG | Alpha-1B-glycoprotein |
| A2M | Alpha-2-macroglobulin |
| AAT | Alfa-1-antitripsina |
| ACN | Acetonitrilo |
| ACR | Relación albúmina/creatinina (albumin creatinine ratio) |
| ADH | Hormona antidiurética (antidiuretic hormone) |
| AGL | Ácidos grasos libres |
| AMBP | “Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor” |
| AMPA | Automedición de la PA en el domicilio |
| Ang I | Angiotensina I |
| Ang II | Angiotensina II |
| Ang III | Angiotensina III |
| Ang-(1-7) | Angiotensina (1-7) |
| ANXA1 | Anexina A1 |
| ANXA2 | Anexina A2 |
| APOD | Apolipoproteína D |
| ARA II | Antagonista del receptor de angiotensina II |
| Arg y Pro | Arginina y prolina |
| ARM | Antagonista del receptor de mineralocorticoides |
| ARSA | Arylsulfatasa A |
| AT1 R | Receptores de angiotensina II tipo 1 (angiotensin type 1 receptor) |
| AT3 | Antitrombina III |
| AUC | Área bajo la curva (area under the curve) |
| AZGP1 | Zinc-alpha-2-glycoprotein |
| BVA | Biological variation analysis |
| C | Control |
| C16orf89 | UPF0764 protein c16orf89 |
| C3 | Componente 3 del sistema de complemento (Complement component C3) |
| C4A | Componente 4A del sistema de complemento (Complement component C4-A) |
| C4B-1 | Componente 4B-1 del sistema de complemento (Complement component C4B) |
| CA1 | Anidrasa carbónica 1 (Carbonic anhydrase 1) |
| CAM | Complejo de ataque a la membrana |
| CAT | Ciclo del ácido tricarbóxico (Ciclo de Krebs) |
| CD14 | Monocyte differentiation antigen CD14 |
| CD59 | Glicoproteína CD59 |
| CE | "Collision energy" |
| CETP | Células epiteliales del túbulo proximal |
| CK | Creatin quinasa (creatine kinase) |
| CKB | Creatine kinase B-type |
| COSY | Espectroscopia de correlación homonuclear |
| CP | Ceruloplasmin |
| CRYAB | Alpha-crystallin B chain |
| CSPG4 | Chondroitin sulfate proteoglycan 4 |
| CTSD | Cathepsin D |
| CV | Cardiovascular |
| D2O | Agua deuterada |
| DAF | Factor acelerador de la degradación |
| DIA | Diferential In-gel Analysis |

| | |
|-------|--|
| DM | Diabetes mellitus |
| dnA | De novo albuminúricos |
| DO | Daño orgánico |
| DTT | Ditiotreitol |
| ECA | Enzima convertidora de angiotensina |
| ECV | Enfermedad cardiovascular |
| EDA | Extended data analysis |
| EGF | Pro-epidermal growth factor |
| eGFR | Ratio del filtrado glomerular estimado (estimated glomerular filtration rate) |
| ERC | Enfermedad renal crónica |
| ESC | Sociedad Europea de Cardiología |
| Fc | Fold change |
| FDR | "False discovery rate" |
| FRCV | Factores de riesgo cardiovascular |
| FRR | Factor de riesgo renal |
| FUCA1 | Tissue alpha-L-fucosidase |
| FUCA2 | Plasma alpha-L-fucosidase |
| GAA | Lysosomal alpha-glucosidase |
| GAGs | Glucosaminoglicanos |
| GALNS | N-acetylgalactosamine-6-sulfatase |
| GLB1 | Beta-galactosidase |
| GNS | N-acetylglucosamine-6-sulfatase |
| GUSB | Beta-glucuronidase |
| HCOOH | Ácido fórmico |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| HMDB | Human metabolome data base |
| HPLC | Cromatografía líquida de alto rendimiento (High-performance liquid chromatography) |
| HSP | Proteínas "heat shock" |
| HSQC | Correlación single-quantum heteronuclear |
| HTA | Hipertensión arterial |
| HVI | Hipertrofia ventricular izquierda |
| i-SRA | Inhibidores del sistema renina-angiotensina |
| IAA | Iodoacetamida |
| IAM | Infarto agudo de miocardio |
| IC | Insuficiencia cardíaca |
| IDR | Inhibidor directo de renina |
| iECA | Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina |
| IEF | Isoelectroenfoque |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IGHG1 | Ig gamma-1 chain C region |
| IGHG2 | Ig gamma-2 chain C region |
| IGLL5 | Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 |
| ILV | Vesículas intraluminales |
| IMC | Índice de masa corporal |
| IR | Insuficiencia renal |
| IRA | Insuficiencia renal aguda |
| ITIH4 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 |
| iTRAQ | "Isobaric tags for relative and absolute quantitation" |

| | |
|-----------|---|
| KNG1 | Kininógeno1 |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| LRG1 | Leucine-rich alpha-2-glycoprotein |
| MALDI | Iodización/desorción por láser asistido por matriz "Matrix-assisted laser |
| MAM | Microalbuminuria mantenida |
| MAPA | Monitorización ambulatoria de la PA |
| MASP2 | Mannan-binding lectin serine protease 2 |
| MBG | Membrana basal glomerular |
| MCCV | Validación cruzada de Monte-Carlo |
| mmHg | Milímetros de mercurio |
| MPO | Mieloperoxidasa |
| MS | Espectrometría de masas (Mass spectrometry) |
| MVB | "Multivesicular bodies" |
| N | Normoalbuminúricos |
| NAG | N-acetilglicosamina |
| nLC | <i>Nano liquid chromatography</i> |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| NT-PNB | N-terminal péptido natriurético tipo B |
| OLFM4 | <i>Olfactomedin-4</i> |
| PA | Presión arterial |
| PAD | Presión arterial diastólica |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| PAI-1) | Activador de plasminogeno |
| PAS | Presión arterial sistólica |
| PCA | Análisis de componentes principales (Principal components análisis) |
| PCR | Proteína C reactiva |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PLG | Plasminogen |
| PLS | Cuadrados mínimos parciales |
| ppm | Partes por millón |
| QQQ | Triple cuadrupolo |
| R Mas | Receptor Mas |
| RBP4 | Proteína de unión al retinol 4 |
| RM | Receptor de mineralocorticoides |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| ROC | Característica Operativa del Receptor (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| S100A8 | Protein S100-A8 |
| S100A9 | Protein S100-A9 |
| SCORE | " <i>Systematic coronary risk evaluation</i> " |
| SCr | Creatinina sérica |
| SD | Desviación estándar (<i>Standard deviation</i>) |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SERPINA1 | Alpha-1-antitrypsin |
| SERPINA3 | Alpha-1-antichymotrypsin |
| SERPINA5 | Plasma serine protease inhibitor |
| SERPINA7 | Thyroxine-binding globulin |
| SERPINB12 | Serpin B12 |
| SERPINC1 | Antithrombin-III |

| | |
|--------|---|
| SGSH | N-sulphoglucosamine sulphohydrolase |
| SHR | Ratas hipertensas espontáneas |
| SLC4A1 | Band 3 anion transport protein |
| SRA | Sistema renina angiotensina |
| SRM | Selected reaction monitoring |
| TF | Serotransferrin |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TGM4 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4 |
| THP | Proteína Tamm Horsfall |
| TNA | Tetranectina |
| TOCSY | Espectroscopia de correlación total |
| TOF | Tiempo de vuelo |
| TSP | Trimetilsilil propionato de sodio |
| uPA | Activador del plasminógeno urinario |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |

Capítulo 1

Introducción

HIPERTENSIÓN ARTERIAL: PREVALENCIA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

La presión arterial (PA) es producto de la fuerza con que la sangre presiona contra las paredes de los vasos sanguíneos (arterias) a medida que es bombeada por el corazón. La hipertensión arterial (HTA) es una afección en la cual la presión en los vasos sanguíneos es continuamente alta. Cuanto más alta es la tensión arterial, más tiene que trabajar el corazón para bombear la sangre al cuerpo, lo que produce daños en diferentes órganos como el propio corazón, el riñón y el cerebro.

La presión arterial se mide en milímetros de mercurio (mmHg) y se define mediante dos mediciones, la primera es la presión arterial sistólica (PAS), la más alta, que se produce cuando el corazón se contrae. La segunda corresponde a la presión arterial diastólica (PAD), la más baja, que se produce cuando el músculo cardíaco se relaja entre un latido y otro [1][2].

El establecimiento de los puntos de corte para la definición de HTA es especialmente complicado debido a la relación continua entre PA y eventos cardiovasculares (CV) y daño renal. Su uso se justifica para poder realizar una aproximación de diagnóstico y establecer una pauta terapéutica. La PA normal en un adulto se define como una tensión sistólica de 120 mmHg y una tensión diastólica de 80 mmHg. Sin embargo, los beneficios cardiovasculares de la PA normal se extienden incluso por debajo de esos niveles de PAS (105 mmHg) y de PAD (60 mmHg) [1]. La hipertensión se define como una PAS igual o superior a 140 mmHg y una PAD igual o superior a 90 mmHg en adultos (Figura 1); a los niños se les aplican diferentes criterios (percentiles).

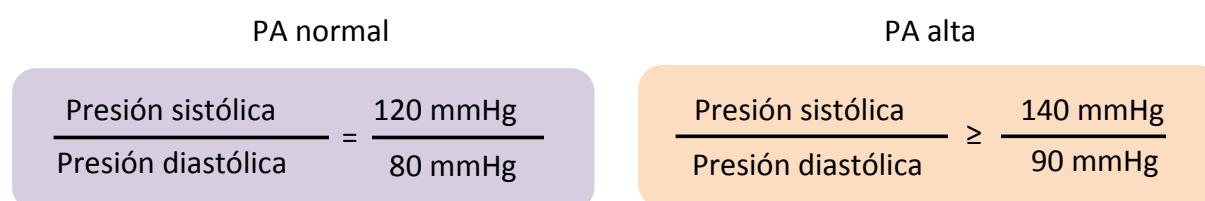


Figura 1. Valores de la presión arterial (PA) que se considera normal o patológica, la cual si se mantiene en el tiempo puede causar hipertensión.

La hipertensión arterial, esta asociada a tasas elevadas de morbimortalidad, por lo que es considerada uno de los problemas más importantes de salud pública, especialmente en los países desarrollados. Entre el 16 y el 37% de la población en el mundo tiene presión arterial alta, aproximadamente mil millones de personas a nivel mundial [3]. Particularmente en Europa la prevalencia se estima entre un 30-45% de la población general, incrementándose con la edad [1]. Además, la HTA es el factor de riesgo prevenible más importante de muerte prematura en todo el mundo. En 2010 se observó que el 18% (9,4 millones) de las muertes eran causa de la hipertensión [1][4]. En Europa la primera causa de mortalidad es la de origen CV, suponiendo la HTA la causa de un porcentaje importante de estas muertes. Así mismo, la HTA es el problema médico crónico más común que impulsa mayor número de visitas a

centros de salud. La Asociación Americana del Corazón estimó en el 2010 los costes directos e indirectos debido a la hipertensión en 76.6 millones de dólares [5] ya que el tratamiento puede llegar a abarcar intervenciones costosas como la cirugía de revascularización miocárdica, la endarterectomía carotídea o la diálisis, además de los fármacos empleados. La detección temprana y el tratamiento apropiado para el control de la hipertensión suponen importantes beneficios sanitarios y de índole económica [6].

Tradicionalmente, para el diagnóstico de la HTA, se recomiendan tres mediciones por esfigmomanómetro separadas en intervalos mensuales. La prueba de electrocardiograma se hace para verificar si el corazón está bajo tensión debido a la HTA, si existe engrosamiento del corazón (hipertrofia ventricular izquierda, HVI) o si el corazón ha experimentado una perturbación menor anterior como un ataque silencioso de corazón. La evaluación inicial debe incluir una historia completa y un examen físico, además, disponer de la monitorización ambulatoria de la PA (MAPA) de 24 horas y de la automedición de la PA en el domicilio (AMPA) lo que ha evitado el diagnóstico erróneo de hipertensión de bata blanca [1] [7].

La hipertensión generalmente no presenta síntomas de advertencia, por lo que muchas personas no se dan cuenta de que la padecen [2] pero con el tiempo se convierte en un factor de riesgo importante. Si no se controla, la hipertensión puede provocar infarto agudo de miocardio (IAM), hipertrofia ventricular izquierda (HVI) y, finalmente, insuficiencia cardíaca (IC) e insuficiencia renal (IR) [8], [9]. En los vasos sanguíneos, la presión alta puede provocar dilataciones (aneurismas) y zonas de debilidad en la pared vascular, lo que aumenta las probabilidades de obstrucción y rotura, lo que puede causar fugas de sangre en el cerebro y esto puede causar accidentes cerebrovasculares. Además, puede causar ceguera y deterioro cognitivo (Figura 2) [1] [4].

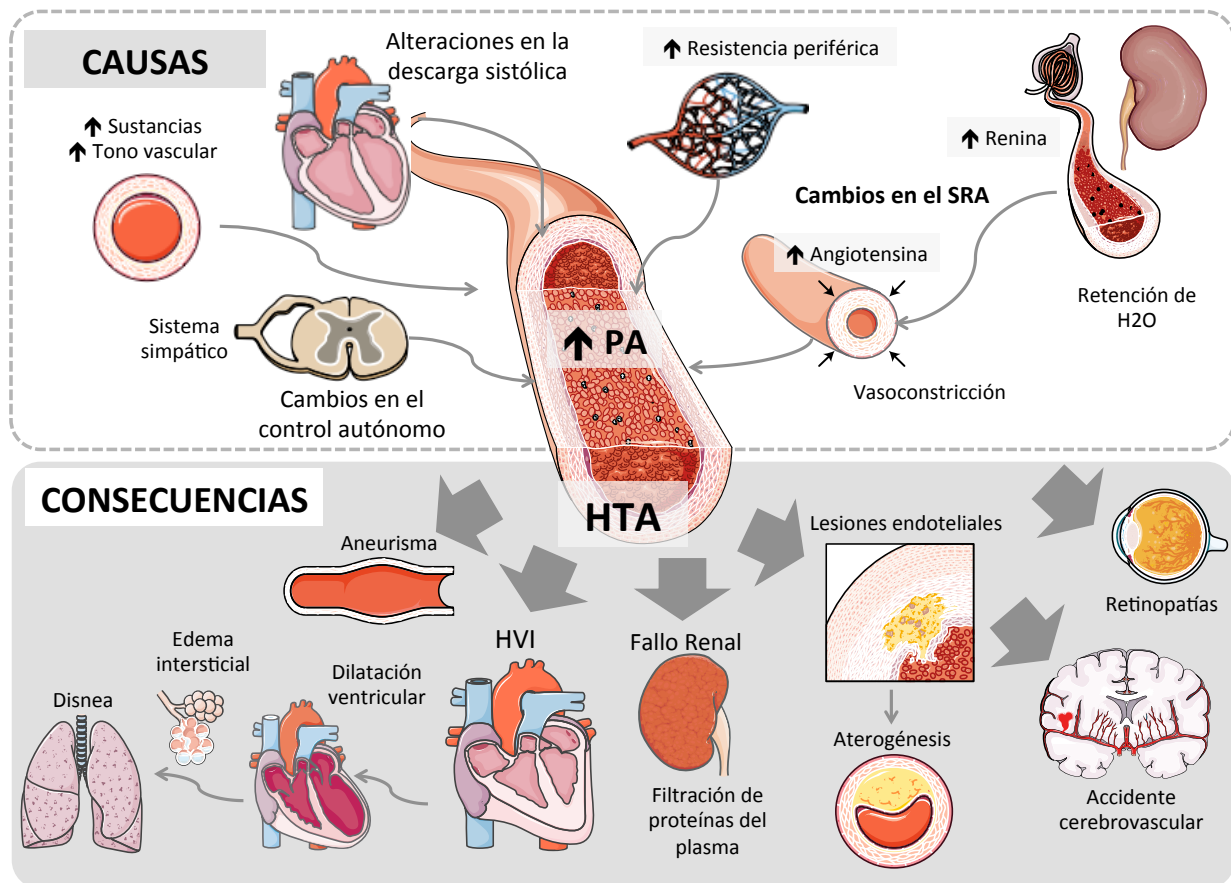


Figura 2. Causas principales de la hipertensión esencial y sus potenciales consecuencias. PA presión arterial, HTA hipertensión arterial, SRA sistema renina angiotensina, HVI hipertrofia ventricular izquierda.

La hipertensión se clasifica como hipertensión esencial o hipertensión secundaria. El 90-95% de los casos se clasifican como hipertensión esencial, que se define como la presión arterial alta sin una causa subyacente obvia, y que en la mayoría de los casos tiene una gran influencia hereditaria. El 5-10% restante se clasifica como hipertensión secundaria, hipertensión debido a una causa identificable y más fácil de tratar, como por ejemplo debida a enfermedad renal crónica, estrechamiento de la aorta o de las arterias del riñón, o a un trastorno endocrino [3].

La hipertensión esencial, es el resultado de una compleja interacción de genes y factores ambientales. Aunque se han identificado numerosas variantes genéticas con efecto sobre la presión arterial, la base genética de la hipertensión es poco conocida aún. Varios factores ambientales influyen en la presión arterial como la ingesta elevada de sal, la falta de ejercicio, la obesidad, y el estrés. Otros factores de riesgo pueden ser eventos que suceden en la vida temprana, como bajo peso al nacer, el tabaquismo materno, y la falta de la lactancia materna, aunque los mecanismos que vinculan estos factores a la hipertensión adulta siguen sin estar claros.

HIPERTENSIÓN ARTERIAL: SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Cuando se produce HTA existe un aumento en la resistencia del flujo sanguíneo (resistencia periférica total) que es atribuible al estrechamiento de pequeñas arterias y/o a una reducción en el número de capilares del sistema venoso periférico lo que aumenta el retorno venoso, aumenta la precarga cardíaca y, en última instancia, causa disfunción diastólica [10], [11]. Se ha sugerido que la disfunción endotelial y la inflamación vascular pueden contribuir también al aumento de dicha resistencia periférica y daño vascular en la hipertensión [12], [13]. La alta presión en personas de edad avanzada, además, se explica por el aumento de rigidez arterial, que acompaña al envejecimiento normalmente [14].

La mayor evidencia que contribuye en la mayoría de los casos a la hipertensión esencial implica anomalías en el sistema renina-angiotensina (SRA) que se encarga del manejo de la homeostasis en los riñones [15]. El SRA es un sistema hormonal que regula la presión arterial, el volumen intravascular y, a nivel local, la reparación de tejidos a través de mecanismos inflamatorios y proliferativos [16]. A pesar de su papel protector durante una respuesta aguda al estrés, la estimulación crónica de este sistema tiene efectos perjudiciales incluyendo la vasoconstricción, la proliferación del músculo liso vascular, la disfunción endotelial, la inflamación, la fibrosis, y la trombosis [17].

La activación de la cascada del SRA comienza cuando las células renales yuxtaglomerulares secretan renina en respuesta a una hipoperfusión renal (disminución del volumen en la arteriola aferente), a una disminución de la liberación de sodio, que conlleva a un aumento de la osmolaridad del plasma y/o a una activación del sistema nervioso simpático [18]. Como ilustra la figura 3, la renina plasmática convierte el angiotensinógeno inactivo producido en el hígado a angiotensina I (Ang I). La enzima convertidora de angiotensina (ECA), secretada por las células endoteliales de los pulmones fundamentalmente y de los riñones, rompe Ang I para generar angiotensina II (Ang II). La Ang II es un vasoconstrictor muy potente activando los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1 R) de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos y estimulando la actividad del sistema nervioso simpático. Además, Ang II, activa la secreción por parte de la neurohipófisis, de ADH (también llamada vasopresina, u hormona antidiurética) la cual, estimula la reabsorción de agua a nivel renal y produce la sensación de sed. Por otro lado, la Ang II activa la secreción en la corteza suprarrenal de aldosterona, hormona mineralocorticoide, que aumenta la reabsorción de sodio a nivel renal junto con una mayor excreción de potasio. Finalmente, la retención de sodio y de agua producirá un incremento del volumen sanguíneo el cual tiene como resultado un aumento en la presión arterial [19]. El SRA sugiere ser un mecanismo patogénico común esencial entre la producción del daño renal y el desarrollo de insuficiencia cardíaca [20] por lo que puede ser, entre otros, uno de los mecanismos que expliquen el daño que la HTA produce sobre los órganos diana (corazón, riñón, cerebro).

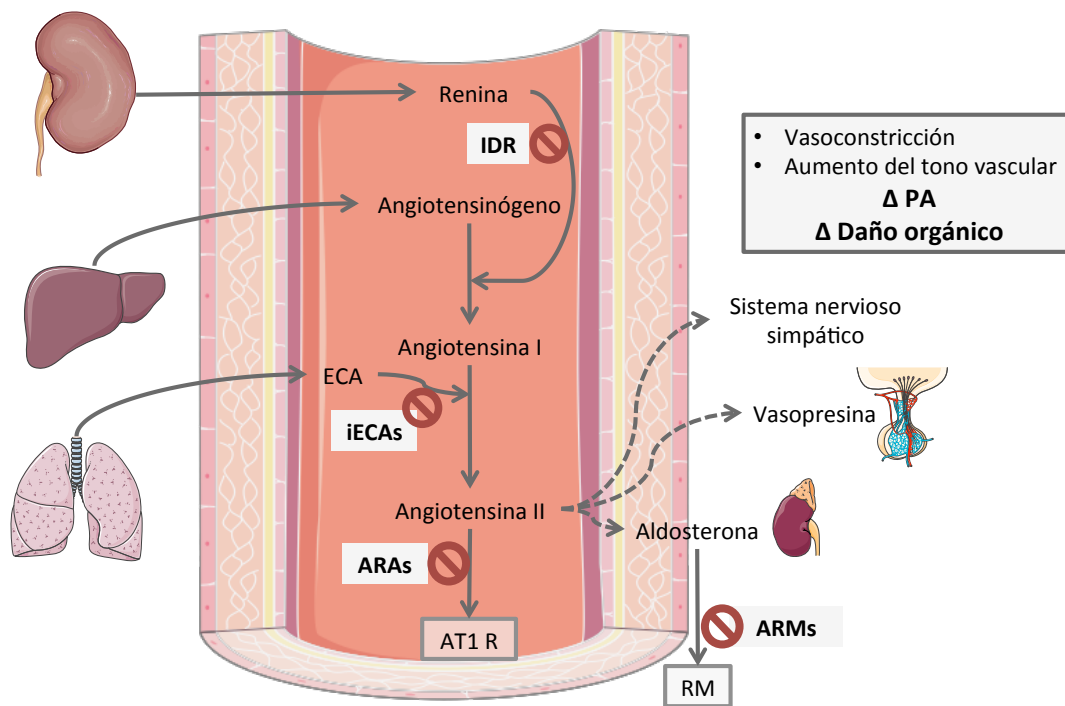


Figura 3. El sistema renina angiotensina y sus dianas terapéuticas. La figura ilustra la secuencia de activación del SRA con sus consecuencias y los principales fármacos dirigidos: iECA (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina), ARA (antagonista del receptor de angiotensina II), ARM (antagonista del receptor de mineralocorticoides) e IDR (inhibidor directo de renina). AT1 R: receptor de angiotensina II tipo 1, RM: receptor de mineralocorticoides, Δ : incremento, PA: presión arterial.

La primera línea de tratamiento para la hipertensión es cambiar la forma de vida, incluyendo cambios en la dieta (bajo contenido de sodio), el ejercicio físico y la pérdida de peso. Estos cambios han demostrado reducir significativamente la PA [21]. Si la hipertensión es lo suficientemente alta como para justificar el uso inmediato de medicamentos, estos se recomiendan en conjunción con el cambio de estilo de vida.

Existe una gran variedad de fármacos antihipertensivos que incluyen diuréticos, antagonistas del calcio, beta bloqueantes, alfa bloqueantes y, puesto que el SRA interviene de forma decisiva en la regulación del volumen y la presión sanguínea, gran parte de los tratamientos actuales para la hipertensión tienen como objetivo este sistema. Las tres clases principales de inhibidores del SRA que actualmente se utilizan en la práctica clínica son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECAs), antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II) y antagonistas del receptor de mineralocorticoides (ARMs) con una cuarta clase de agentes, los inhibidores directos de la renina (IDR), bajo investigación activa (Figura 3). Los iECAs disminuyen la formación de angiotensina II e inhiben la degradación de la bradiquinina con la formación de óxido nítrico y otros vasodilatadores [22]. Para los pacientes intolerantes a los iECAs, ARA II como el valsartán, pueden representar una alternativa. ARA II se une competitivamente y hace que se disocie la angiotensina II lentamente de los receptores AT1 (AT1 R) [23]. Por otro lado, ARM reduce el número de los canales de sodio epiteliales disponibles en el túbulo renal distal a través de la inhibición competitiva del receptor de mineralocorticoides (RM). La eplerenona es un antagonista de los receptores de

mineralocorticoides más selectivo con menor afinidad por los receptores de progesterona y andrógenos que la espironolactona [24]. Los IDR inhiben el SRA en el escalón más próximo, específico y limitante de la velocidad de la cascada de acción en este sistema [25]. Aliskiren es el IDR con aprobación pero sólo está disponible actualmente para su uso en pacientes con hipertensión.

Los bloqueadores del sistema renina-angiotensina (SRA), se aplican sobre todo en pacientes con alta actividad del SRA en el plasma sanguíneo. Sin embargo, ahora se acepta que también son eficaces en pacientes con actividad de baja a media del SRA. Por otra parte, después de una supresión inicial de Ang II y/o aldosterona, los niveles plasmáticos de estos 2 compuestos, a menudo, vuelven a la normalidad o incluso se elevan por encima de los niveles previos al tratamiento: el llamado “escape” Ang II/aldosterona. Sin embargo, sorprendentemente, el efecto bloqueador de SRA permanece, al menos parcialmente. Estas observaciones desconcertantes han llevado al concepto de un SRA local en diversos órganos, es decir, el sitio real de la acción de los bloqueadores del SRA. Según algunos investigadores, este SRA local se produce enteramente de forma intracelular (SRA intracrino). La generación de angiotensina de tejido se produce extracelular y depende de la renina derivada de riñón y del angiotensinógeno hepático, y es seguido por una rápida unión al receptor AT y su internalización. Ang II generada localmente afecta al equilibrio constrictor/relajante, al remodelado vascular y a la inflamación. La generación de angiotensina de tejido no necesariamente va en paralelo con la generación de angiotensina en la circulación, y esto explica por qué los efectos beneficiosos de los bloqueadores del SRA no pueden ser explicados simplemente sobre la base de los cambios en el SRA circulante. El sexo, el origen étnico, la ingesta de sal, la variación genética, y el uso de fármacos antihipertensivos determinan el grado de actividad del SRA. Además, durante la aplicación de los inhibidores del SRA, se produce una regulación de múltiples metabolitos de la angiotensina que incluso contribuyen a los efectos beneficiosos del bloqueo. Ejemplos de estas vías de protección (vasodilatadoras) incluyen la vía angiotensinasa tipo A-Ang III-receptor AT₂ y la vía ACE2-Ang-(1-7) receptor Mas. El conocimiento en este área podría conducir a nuevos medicamentos [26].

Ensayos iniciales han demostrado ventajas del bloqueo del SRA en la insuficiencia cardíaca, la proteinuria, y en nefropatía diabética. Como consecuencia de ello, el bloqueo del SRA se ha convertido en un tratamiento de primera línea para todas estas indicaciones [1] [27]. Fármacos, entre los que destacan iECAs/ARA II, además, han demostrado reducir la albuminuria más que otros fármacos antihipertensivos independiente de la reducción de la PA [28][29] y mejoran, así, el pronóstico de los pacientes hipertensos.

La mayoría de las personas requieren más de un medicamento para el control de su hipertensión. No obstante a pesar de estar en tratamiento adecuado con estos fármacos (hasta utilizar, a la vez, tres medicamentos antihipertensivos pertenecientes a diferentes clases), un número no despreciable de pacientes con HTA, desarrollan enfermedad renal y/o cardiovascular con un aumento de excreción de albuminuria, o una vez desarrolladas

continúan progresando en la enfermedad [26], [30], [31]. Todo ello abre la posibilidad de que en algunos pacientes exista un cierto grado de resistencia al efecto beneficioso del bloqueo del SRA sobre la progresión de la enfermedad y sugiere así que, si el tratamiento falla, el daño sobre todos los órganos diana se pondrá de manifiesto. La albuminuria es un indicador de daño orgánico diana en el continuo cardio-renal [28].

ALBUMINURIA COMO INDICADOR CLÍNICO: RIESGO CV Y DAÑO RENAL

Como hemos visto, la HTA es la expresión clínica de un proceso fisiopatológico complejo que se asocia a un riesgo superior de mortalidad en los individuos que la padecen. Aislado o asociado a otros factores de riesgo, en condiciones patológicas supone una causa fundamental de enfermedad cardiovascular [32] y renal [33], y puede derivar en la producción del daño a órganos diana [20].

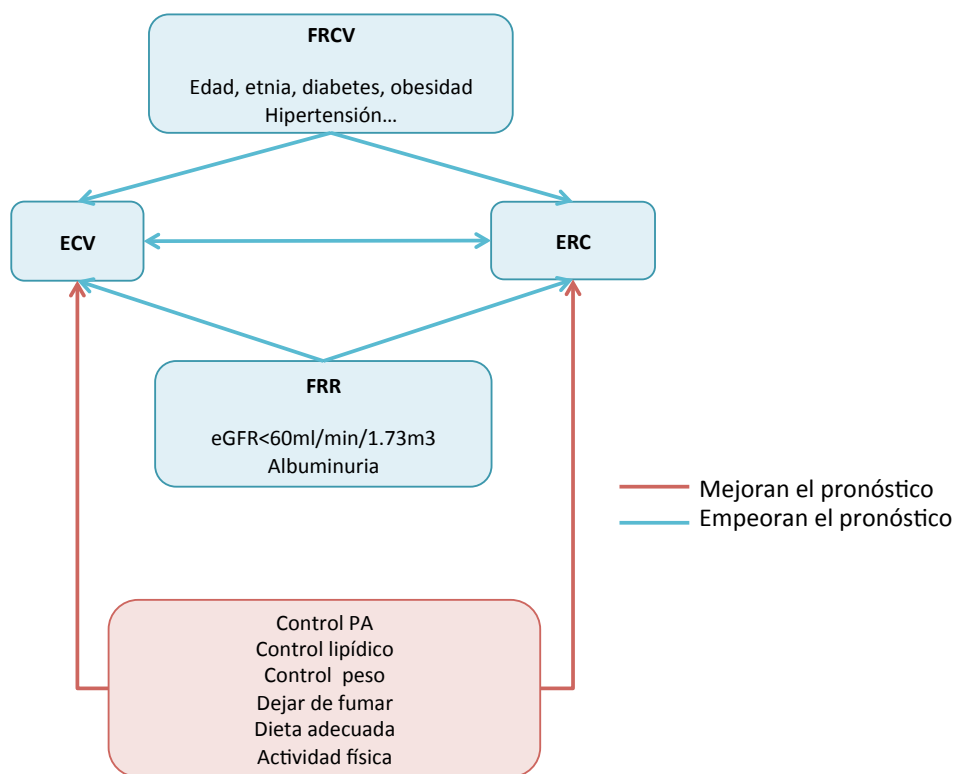


Figura 4. Mecanismos involucrados en el diálogo entre el sistema CV y el riñón. FRCV, factores de riesgo cardiovascular, ECV enfermedad cardiovascular, ERC enfermedad renal crónica, eGFR ratio del filtrado glomerular estimado, FRR factor de riesgo renal. Basado en [28].

La figura 4 resume el diálogo entre la enfermedad CV y renal a través de factores de riesgo. El daño simultáneo en ambos sistemas (CV y renal) se debe a la presencia de un origen similar que está facilitado por factores de riesgo similares como son la hipertensión y la albuminuria además de otros (Figura 4) [28]. En la inhibición de estos factores de riesgo se centra la terapia farmacológica más comúnmente empleada en la práctica clínica actual en los pacientes con hipertensión, el bloqueo del SRA, como ya hemos visto. Sin embargo, a pesar

de estar en tratamiento, estos pacientes progresan negativamente en la enfermedad, desarrollando un aumento de excreción de albúmina de forma patológica [26], [30], [31] tal y como detallaremos en un apartado posterior.

La albúmina es la principal proteína de plasma sanguíneo humano. Su función principal es regular la presión osmótica coloidal de la sangre. La albuminuria es una condición patológica en la que la albúmina es excretada de forma abundante en la orina. Los riñones normalmente no filtran grandes moléculas, por lo que la albuminuria es un indicador de daño renal. Dado que las proteínas de suero son reabsorbidas de la orina primitiva a partir del túbulo contorneado proximal de la nefrona, la presencia de exceso de proteína en orina (proteinuria) indica, bien una insuficiencia de la reabsorción o una filtración deteriorada. Los mayores determinantes de la presencia de albuminuria son la presión intraglomerular y el aumento de la permeabilidad de la barrera glomerular debido a procesos hemodinámicos e inflamatorios [34], [35]. Esta situación parece ser el desencadenante inicial, permitiendo el escape de albúmina desde el espacio intra al espacio extravascular.

La microalbuminuria, más recientemente llamada albuminuria elevada (“high albuminuria”), se define como la presencia de albúmina en orina con niveles en el rango 20-200 mg/g (ratio albúmina/creatinina, “ACR”) en varones y 30-300 mg/g en mujeres, como se muestra en la tabla 1. Niveles superiores a 200 ó 300 mg/g, respectivamente, se consideran macroalbuminuria o albuminuria muy elevada (“very high albuminuria”). Existe un nivel basal de albúmina en orina la cual se considera no patológica, con valores de albúmina <20mg/g ACR (varones) o <30mg/g ACR (mujeres), lo que sería normoalbuminuria [36].

Tabla 1. Clasificación de la excreción anormal de albúmina en orina, donde AO (albúmina en orina) se expresa en mg/L y ACR (ratio albúmina/creatinina) en mg/mol de creatinina o en mg/g de creatinina teniendo diferentes rangos siendo varón (V) o mujer (M).

| | Orina | | Ratio Albumina/creatinina | |
|-------------------------|-----------|--------|---------------------------|-----------|
| | AO (mg/L) | Género | mg/mol | mg/g |
| Normal | <10 | V | <1.25 | <10 |
| | | M | <1.75 | <15 |
| Normal-alta | 10 a <20 | V | 1.25 a <2.5 | 10 a <20 |
| | | M | 1.75 a <3.5 | 15 a <30 |
| Microalbuminuria | 20 a <200 | V | 2.5 a <25 | 20 a <200 |
| | | M | 3.5 a <35 | 30 a <300 |
| Macroalbuminuria | >200 | V | >25 | >200 |
| | | M | >35 | >300 |

Como se ha dicho anteriormente, la albuminuria es un marcador de riesgo cardiovascular, en particular de infarto agudo de miocardio e ictus, con independencia de la co-existencia o no de diabetes mellitus [37]–[39]. También lo es de aparición y desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC). En concreto, las guías clínicas recomiendan un control de los niveles de albuminuria anual o semestral en individuos diabéticos o con ERC [40], [38], [41][42].

En la práctica clínica los métodos más comúnmente empleados en la estratificación por riesgo cardiovascular se basan en la función de Framingham y en las tablas SCORE (“Systematic Coronary Risk Evaluation”) que básicamente tienen en cuenta la edad, los niveles de colesterol, la PA, el tabaquismo y la diabetes. Sin embargo, estas guías no tienen en cuenta indicadores de daño orgánico subclínico y, en este sentido, estudios recientes apuntan al valor añadido que pueden tener dichos marcadores en la predicción individual del riesgo cardiovascular [43], [44]. Las guías de prevención de la enfermedad CV del 2012 de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) también realizan una estratificación del riesgo CV basado en PA, pero añadiendo factores de riesgo CV (FRCV, de 1 a 3 factores), la presencia de daño orgánico (DO), la diabetes (DM), la enfermedad CV sintomática o la enfermedad renal crónica (ERC) (figura 5) [1].

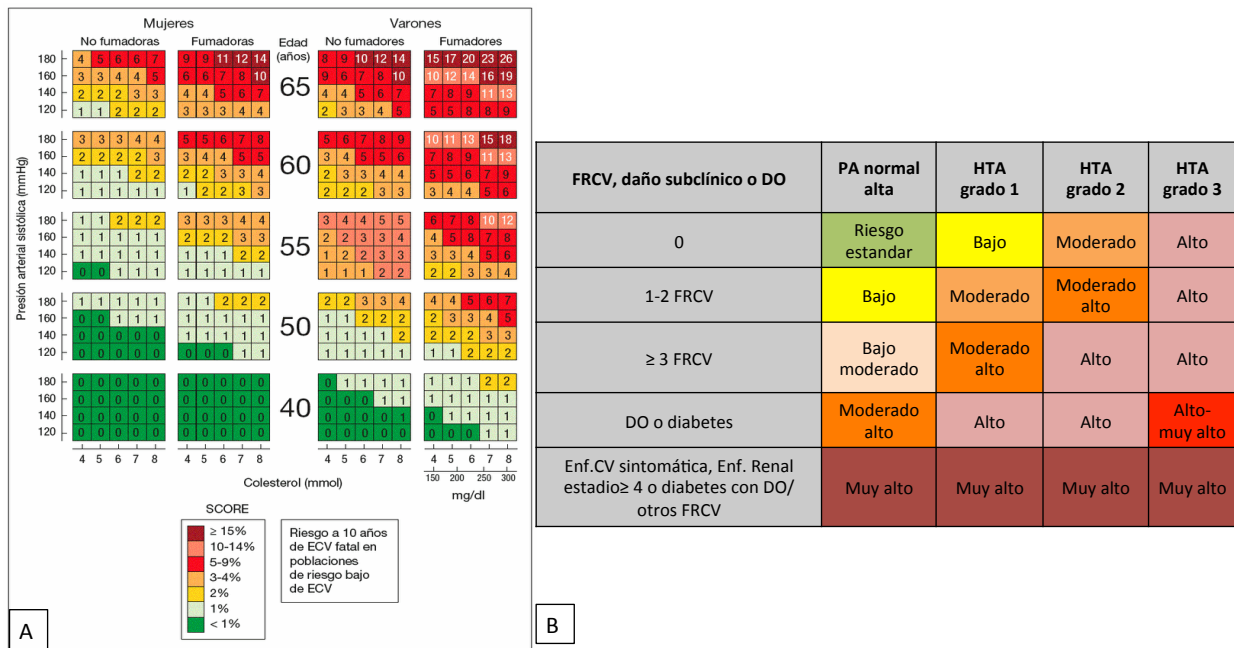


Figura 5. La tabla SCORE representada en la figura A, evalúa el riesgo CV a 10 años expresado en porcentaje (de 0 a >15%) teniendo en cuenta la edad, el sexo, el nivel de colesterol, la PAS y el tabaquismo. En el cuadro B se observa la tabla de estratificación por la ESC del riesgo CV (rango de bajo a muy alto) basado en PA, factores de riesgo CV (FRCV) (de 1 a >3), la presencia de daño orgánico (DO), la diabetes (DM), la enfermedad CV sintomática o la enfermedad renal crónica (ERC).

Uno de los indicadores de daño orgánico, como hemos dicho, es la albuminuria. En pacientes hipertensos se ha demostrado que el desarrollo de albuminuria de novo, un aumento progresivo de los niveles de albúmina excretada en orina, o bien el mantenimiento prolongado de microalbuminuria, conllevan a un mayor riesgo cardiovascular. Estudios recientes de seguimiento a 4,7 años en un total de 17028 pacientes por año, muestran el valor pronóstico de la medida de albúmina excretada en orina [45] y varias guías clínicas ya recomiendan incluir este parámetro en la estratificación del riesgo cardiovascular no sólo en pacientes diabéticos sino también en individuos hipertensos [46], [47]. Su capacidad de biomarcador se basa en el hecho de que hay daño microvascular presente en el riñón y como tal, la microalbuminuria tiene que ser considerada más como un marcador de daño que como un factor de riesgo [48]. Una desventaja de utilizar la albuminuria como marcador de daño orgánico es que, al aparecer la albúmina en orina, ya hay lesión, por lo que no es útil como predictor de desarrollo de la patología. Por lo tanto, se requiere la necesidad de descubrir predictores del desarrollo de albuminuria y el ulterior empeoramiento CV y del pronóstico renal [49], [50]. Varios marcadores urinarios, tales como IgG y N-acetilglucosaminidasa (NAG), se han asociado al desarrollo de la albuminuria en los pacientes diabéticos [51]. Por otra parte, α -2-HS-glicoproteína se ha relacionado con la inflamación y el daño tubular y con una asociación al aumento de la albuminuria también en pacientes diabéticos [52]. Desafortunadamente, hasta la fecha, ninguna de estas moléculas urinarias han demostrado ser igual o superior del estándar actual utilizado de aumento de albuminuria y no mejoran la predicción del riesgo de desarrollar albuminuria en HTA controlada.

Los mecanismos subyacentes a la aparición de albuminuria en pacientes hipertensos tratados, no se conocen en su totalidad, y en la práctica clínica diaria no es posible predecir qué individuos progresarán negativamente desarrollando albuminuria. De hecho, serán éstos los que probablemente presenten un mayor riesgo cardiovascular y daño renal y, por tanto, los que más se beneficiarían de potenciales tratamientos farmacológicos específicos adaptados y de su acción temprana. Idealmente hay que evitar ese desarrollo de albuminuria y para ello debemos comprender las bases moleculares subyacentes.

REALIDAD CLÍNICA DESDE LA UNIDAD DE HIPERTENSIÓN

Se ha demostrado la efectividad de la supresión crónica del sistema renina-angiotensina (SRA) no sólo en el control de la PA sino también en la disminución de los niveles de albúmina en orina en pacientes hipertensos, ya desde las primeras etapas del continuo cardiovascular, cuando sólo se detectan factores de riesgo CV en ausencia de lesión de órganos diana asintomática. [42], [47], [53][54].

Está descrito que determinados pacientes con tratamiento crónico de SRA presentan una alta prevalencia de microalbuminuria, incluso en un elevado porcentaje aparece albuminuria de novo, en individuos que eran normoalbuminúricos [55][45][56]. Se sabe que la albuminuria es un marcador de daño cardiovascular, y la albuminuria mantenida o el desarrollo de novo durante el tratamiento es indicador de que existe una progresión de la enfermedad CV y, potencialmente, del empeoramiento de la función renal [42][33], [36].

Sirviendo de antecedentes a esta tesis, en la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre, se elaboró un estudio en pacientes que habían recibido tratamiento para la supresión crónica del SRA (durante más de 5 años). Encontraron una alta prevalencia de albuminuria (20,3%), e incluso pacientes con niveles normales de albuminuria (normoalbuminúricos) desarrollaron de novo albuminuria en un 16.1%, y el 0,9% desarrolló macroalbuminuria durante los tres años de seguimiento en la unidad [30]. Por otro lado, el paso de normo a microalbuminuria ha sido clásicamente reconocido que se produzca en torno al 2% de los pacientes diabéticos por año [57]. Los datos presentados en el estudio, con una minoría de los pacientes con diabetes, demostraron que este porcentaje puede ser mayor al 5% y que la aparición de albuminuria de novo es particularmente alta en los pacientes que presentan enfermedad CV establecida (18,9% frente a 10,7%), en el que la enfermedad progresa más rápido de lo esperado aunque se esté utilizando una supresión "adecuada" del SRA.

Por otra parte, se ha visto que el desarrollo de albuminuria de novo está acompañado por una prevalencia mayor de nuevos episodios CV, lo que indicó que la albuminuria *de novo*, a pesar de la supresión del SRA, sigue siendo un buen predictor de morbilidad y mortalidad CV [58]. En el estudio llevado a cabo en la unidad de hipertensión del Hospital 12 de Octubre, se ha visto que, en los individuos sin un evento CV anterior a la llegada a la unidad de hipertensión, el porcentaje de desarrollar albuminuria de novo fue del 10%.

En resumen, y como antecedentes clínicos de esta Tesis Doctoral, se vio que la supresión crónica del SRA parece no tener la capacidad para mantener la protección sobre el desarrollo y evolución de la albuminuria tanto en pacientes hipertensos diabéticos como en no diabéticos. Hasta la fecha poco se ha estudiado sobre este tipo de pacientes que no responden al tratamiento con inhibidores del SRA (i-SRA) y menos aún sobre qué tratamiento darles debido a que los mecanismos fisiopatológicos no se conocen en profundidad como para evitar la progresión de albuminuria. Por este motivo la prevención de la albuminuria es de gran relevancia y un área de gran interés que debe ser estudiada. La búsqueda de nuevas dianas pronósticas (proteínas y/o metabolitos) a través de nuevas estrategias que puedan ayudarnos a identificar posibles pacientes normoalbuminúricos como individuos de riesgo para desarrollar una enfermedad renal y/o cardiovascular, a pesar de estar en tratamiento con i-SRA, es necesaria para poder tener una rápida intervención a nivel clínico y evitar su desarrollo.

En esta tesis, realizaremos un análisis comparativo entre pacientes hipertensos crónicamente tratados con i-SRA y previamente clasificados en la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre en:

- Normoalbuminúricos que se mantienen como tal a lo largo del seguimiento (N).
- Normoalbuminúricos que evolucionan a microalbuminúricos, es decir, de novo albuminúricos (dnA)
- Microalbuminúricos que se mantienen como tal (MAM)

DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN HTA CONTROLADA DESDE UN ABORDAJE ÓMICO

I. LAS ÓMICAS EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Las ómicas son el conjunto de estrategias que engloban las áreas de la genómica, la proteómica o la metabolómica. La "biología de sistemas" se basa en la integración de los datos ómicos (genómica, proteómica, metabolómica...) para obtener una visión (información) completa (holística) del individuo o de lo que se este estudiando. Las ómicas tienen como objetivo la caracterización y cuantificación colectiva del conjunto de moléculas biológicas que se traducen en una estructura, función y dinámica de un organismo u organismos.

Las técnicas ómicas han experimentado un gran desarrollo en los últimos años y se han establecido como una importante estrategia en la búsqueda de nuevos indicadores moleculares de procesos fisiopatológicos, en parte gracias al desarrollo de nuevas tecnologías. Estas aproximaciones no hacen pre-selección de candidatos, por lo que proporcionan un abordaje de las alteraciones que ocurren a nivel molecular sin sesgo y en un momento fisiológico concreto. Por otro lado, son útiles no sólo en la búsqueda de marcadores sino además en la evaluación de mecanismos subyacentes de una enfermedad, tanto conocidos como aquellos que aún son desconocidos, a la vez que es posible la identificación de nuevas moléculas implicadas en el desarrollo de los mismos. Los enfoques basados en estrategias ómicas son

poderosos para investigar nuevos marcadores de la enfermedad de cara a mejorar el diagnóstico actual, predecir el pronóstico del paciente o definir nuevas dianas terapéuticas [59]–[61].

Durante el desarrollo de la enfermedad, el genoma permanece en gran medida sin cambios (a excepción de cambios epigenéticos producidos por factores ambientales), mientras que es evidente que la mayoría de las proteínas de los tejidos y órganos cambia sustancialmente. Por tanto, si bien los factores genéticos definen un organismo o un riesgo potencial en la vida, el transcriptoma, proteoma y metaboloma son más adecuados para definir en un organismo la posición real en el continuo de una enfermedad (Figura 6) [62].

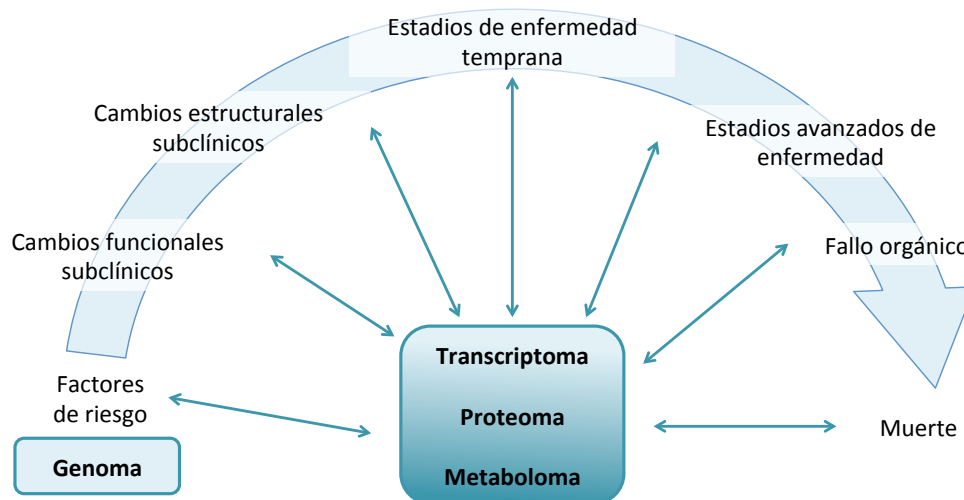


Figura 6. La biología de sistemas en el continuo de una enfermedad. La enfermedad progresa desde factores de riesgo en etapas tempranas a daño orgánico real en estadios avanzados de la enfermedad. Los factores genéticos no cambian durante este desarrollo (a excepción de cambios epigenéticos) y por lo tanto son adecuados para predecir el riesgo potencial ya en las primeras etapas de la vida. El transcriptoma, proteoma y metaboloma, en cambio, cambian en paralelo a los procesos de enfermedad y son adecuados para caracterizar el estado actual de la enfermedad e incluso anteponerse a una evolución fatal, en el mejor de los casos [62].

La proteómica es la disciplina que estudia de manera dinámica todas las proteínas expresadas por un organismo, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente, lo que se denomina proteoma. Como hemos avanzado anteriormente, debido a su naturaleza dinámica, el proteoma no sólo va a cambiar debido a los procesos de enfermedad, sino también en respuesta a las medidas terapéuticas y por lo tanto puede ser utilizada para monitorizar los efectos del tratamiento. Además se añade complejidad por el hecho de que los estudios de proteómica se pueden realizar en una amplia gama de muestras biológicas, incluyendo muestras de todo el tejido, pero también las células, microvesículas y fluidos biológicos (orina, plasma, suero, etc.) [63]–[65]. Como resultado, se consigue la identificación de nuevas proteínas indicadoras de enfermedad, y permite establecer nuevos

mecanismos de acción implicados en el desarrollo, progresión o regresión de un determinado desorden fisiológico [66].

Por otra parte, la metabolómica centra su estudio en el conjunto de moléculas de bajo peso molecular, metabolitos (<2000-3000 Dalton), que se pueden encontrar en los diferentes fluidos biológicos (suero/plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) y en tejidos [67][64], [68] y ofrece una vista única del fenotipo asociado con enfermedades, así como la influencia de los factores ambientales (por ejemplo, dieta, actividad, conducta, enfermedad y del tratamiento médico/quirúrgico) [69]. La metabolómica engloba la identificación y cuantificación de un elevado número de metabolitos que son sustratos, intermediarios y productos finales de la actividad celular. Los metabolitos varían profundamente en la polaridad, el tamaño y la concentración, que van desde metabolitos hidrofílicos, polares con un peso molecular bajo (por ejemplo, aminoácidos), a hidrófobos, no polares de alto peso molecular (por ejemplo lípidos).

Existe también el estudio del “interactoma” que describe la interacción de las proteínas (y otras moléculas que incluyen genes o metabolitos) expresadas diferencialmente y los agrupa en grupos funcionales y vías en un todo. El análisis de redes para estudiar las interacciones molécula-molécula ayudará a predecir los efectos de los cambios en la expresión de gran número de proteínas y metabolitos.

II. ÓMICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN Y AL DESARROLLO DE ALBUMINURIA (DAÑO ORGÁNICO)

Los enfoques tradicionales para mejorar la comprensión de la fisiopatología de la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares asociadas están basadas en hipótesis, centrándose en rutas biológicas individuales, tales como el sistema renina-angiotensina-aldosterona o el sistema nervioso simpático. Debido a que la hipertensión es una enfermedad compleja y activa en la que se está produciendo la interacción de múltiples moléculas, células (proinflamatorias, endoteliales, epitelios de la nefrona, etc.) y órganos (corazón, riñones, etc.) el empleo de técnicas ómicas es más que adecuado ya que permite una evaluación conjunta de todos los sistemas y moléculas simultáneamente, entendido como un todo y enmarcado en lo que podemos llamar estudio de biología de sistemas.

Claramente, el diagnóstico de la hipertensión se hará siempre por medición de la PA, pero las estrategias ómicas ayudan a dilucidar los factores que contribuyen a la hipertensión y desarrollo de albuminuria en pacientes individuales y a descubrir las primeras evidencias de daño orgánico.

El análisis ómico, como hemos visto, proporciona una información global de los cambios moleculares que ocurren en los procesos fisiopatológicos, por lo que se está convirtiendo en una de las estrategias con mayor potencial para el descubrimiento de biomarcadores diagnóstico en las fases tempranas de las enfermedades, como detección de los primeros signos de daño a órganos diana. Por otro lado, obtenemos información del pronóstico, acerca

de su desarrollo y/o en la evaluación de la respuesta a un tratamiento farmacológico concreto, ya que produce firmas distintivas en los perfiles moleculares, incluso antes de que se observen síntomas de la enfermedad [69].

El descubrimiento de marcadores moleculares mediante proteómica y metabolómica es una herramienta útil para encontrar moléculas con valor pronóstico en las primeras etapas de la enfermedad cardiovascular [70]. En particular, diferentes estudios han demostrado que el análisis del proteoma o del metaboloma de orina permite definir potenciales marcadores específicos de diagnóstico y pronóstico de enfermedad renal crónica [71][72], [73], nefropatía diabética [74], [75], [76] [63] y fracaso renal agudo [77].

El número de estudios proteómicos en hipertensión es actualmente muy limitado. Thongboonkerd et al. ponen de relieve el potencial de la proteómica para identificar marcadores individuales y vías de la hipertensión, estudiando el proteoma renal de ratas Sprague-Dawley con hipertensión inducida por hipoxia. Identificaron alteraciones en la vía de la kaliceína renal con hipoxia episódica (un modelo de la apnea obstructiva del sueño) asociada con una alteración de la vasodilatación mediada por kaliceína-kallistatin [78]. Reid et al. detectan la angiotensina I y la evalúa de forma precisa por la actividad de la renina plasmática por *Immuno MALDI* [79]. Otros estudios abordaron el daño orgánico consecuencia de la hipertensión. En este contexto Grussenmeyer et al. estudiaron las diferencias en el proteoma del ventrículo izquierdo entre las cepas Dahl sensibles a la sal y resistentes a la sal. En general, los autores encontraron una buena correlación en el proteoma entre las dos cepas, pero una serie de marcadores expresados diferencialmente podrían ser candidatos interesantes para futuros estudios en hipertrofia ventricular izquierda e insuficiencia cardíaca [80]. En un trabajo anterior con ratas SHR (espontáneamente hipertensas) y ratas Wistar-Kyoto se estudió la expresión de proteínas cardíacas en hipertensión [81], concluyendo que la expresión modulada de 7 proteínas es secundaria a la hipertensión ya establecida, mientras que 13 proteínas de expresión temprana afectan a la remodelación ventricular en SHR. Curiosamente se encontró un número de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en este modelo, incluyendo glutatión transferasa omega 1. Otros autores también han analizado el proteoma cardíaco en estudios sobre la prevención y la regresión de la hipertrofia ventricular izquierda por tratamiento antihipertensivo en modelos de hipertensión [82], [83]. Otro fenotipo asociado con la hipertensión es la remodelación de la pared arterial. Delbosc et al. [84] estudiaron los patrones de proteínas de la aorta en dos cepas de ratas, Fischer y Brown-Noruega, en hipertensión inducida. Los autores identificaron diferencias de las cepas con una mayor remodelación de la pared arterial en ratas Fischer que fue acompañado de cambios en la ubiquitina, músculo liso 22 α , timosina β 4, y el fragmento C-terminal de filamina A expresados en el secretoma aórtico.

Los estudios anteriores fueron realizados en modelos animales; por el contrario la preeclampsia se utiliza como enfermedad modelo para los estudios proteómicos en la hipertensión esencial en humanos [85]. Esta condición se caracteriza por hipertensión materna y proteinuria. Afecta a un 3-5% de los embarazos al año y es uno de las principales causas de morbilidad fetal y materna y mortalidad en todo el mundo [86]. La hipertensión esencial y la

preeclampsia incluyen numerosas características de daño renal y disfunción endotelial con origen multifactorial y factores de riesgo para el desarrollo futuro de las enfermedades cardiovasculares [86]. También se han utilizado modelos humanos de sensibilidad a la sal para observar alteraciones en la orina en respuesta a la hipertensión [87]. En este estudio, se observaron diferentes niveles de uromodulina en la orina de pacientes hipertensos en comparación con individuos sanos. Los pacientes con mayor nivel de uromodulina mostraron una disminución del nivel de excreción de sal, destacando su papel esencial en la regulación de la reabsorción de sal en la hipertensión. Además, encontraron que la nefrina 1 urinaria, un marcador de la barrera de filtración renal, puede predecir un fenotipo sensible a la sal y la correlación positiva con el aumento de albuminuria asociado con este tipo de hipertensión.

En cuanto a análisis metabolómico de la hipertensión, la combinación de espectroscopía de RMN con espectrometría de masas (MS) ha demostrado ser particularmente eficaz. Hasta la fecha, sin embargo, hay relativamente pocos estudios que hayan empleado metabolómica en el estudio de la hipertensión [69]. Ha sido utilizado principalmente en modelos animales tales como ratas SHR (hipertensas espontáneas), ya que sus procesos fisiopatológicos han sido reconocidos como similares a los de la hipertensión esencial [88]. Akira et al. analizaron muestras de orina SHRs en la etapa de desarrollo de la hipertensión con niveles urinarios reducidos de citrato y α -cetoglutarato, presumiblemente como resultado de primeras perturbaciones metabólicas del ciclo del ácido cítrico, una vía metabólica común para la oxidación de hidratos de carbono, lípidos y proteínas en las que estos dos metabolitos son intermediarios [88]. También se observaron en SHR machos alteraciones metabólicas en el ciclo del ácido cítrico con niveles altos de succinato en comparación con los animales sanos normotensos [89] que podría tener un papel influyente en la modulación de la homeostasis de fluidos corporales y PA a través de la activación de receptores de succinato GPR91 en las células de la mácula densa en los riñones. Un conjunto de profundas diferencias metabólicas entre los modelos de rata hipertensas y normotensas también se refleja en las muestras de sangre. Se detectaron cambios relacionados con la edad en muchos compuestos metabólicos (por ejemplo, un aumento de serina, metionina, ornitina, fenilalanina y lisina, y disminución de ácidos amino). Sin embargo, un aumento de los ácidos grasos libres (AGL), incluyendo oleico, linoleico, hexadecanoide y esteárico, se observaron en SHR junto con el aumento de los niveles de PA, lo que indica un posible papel del metabolismo de AGL perturbado [90]. El estudio metabolómico de Aa et al. muestra que la terapia antihipertensiva estándar (iECA, bloqueo del canal de calcio, bloqueo α 1-adrenérgicos y diuréticos) redujo significativamente la presión arterial en SHR, como se esperaba, pero el tratamiento tuvo efectos sobre el aumento de los niveles de AGL [91] y en consonancia con un mayor riesgo CV de estos individuos.

Al igual que en el caso de modelos en animales, el número de estudios de metabolómica relacionados con la hipertensión en los seres humanos es limitada. Entre los primeros está un análisis de RMN diseñado para investigar si era posible distinguir entre diferentes categorías de PA en función del perfil metabólico [92] donde regiones de los espectros de RMN atribuibles a diferentes lípidos (en particular, las lipoproteínas asociadas con el colesterol de

muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad) (LDL)) distingue claramente las categorías de alta PA de la categoría de baja/normal PA (siendo mayores los lípidos en las categorías de mayor PA) [93].

El análisis basado en metabolómica en pacientes ancianos con hipertensión arterial ha mostrado un aumento significativo de los niveles de AGL en suero (heptanoico, oleico, nanoico, eicosanoico y ácidos hexanoico) en comparación con controles normotensos de la misma edad [94]. Los AGL puede promover efectos adversos sobre el tono neurovascular mediante el aumento de la sensibilidad de los receptores adrenérgicos teniendo efectos inhibitorios sobre la vasodilatación dependiente del endotelio y la óxido nítrico sintasa endotelial [95]. Además, el aumento de los niveles de AGL pueden cambiar la fluidez de la membrana que conduce a un aumento del tono vascular y, por consiguiente a un aumento de PA [96]. Además el aumento de los niveles de AGL, alteran el metabolismo de los hidratos de carbono en los pacientes con hipertensión [94], lo que confirma la alta prevalencia de intolerancia a la glucosa en pacientes con hipertensión esencial.

También estudios de metabolómica de PA han proporcionado algunas pruebas del papel de la inflamación como un factor que contribuye en el desarrollo de la hipertensión. La proteína inflamatoria de fase ácida aguda a-1 glicoproteína estaba en un mayor nivel en un grupo de pacientes con hipertensión en comparación con controles [97].

Por otro lado, hay algunos indicios de que los metabolitos asociados con la actividad microbiana intestinal y la dieta también podrían estar vinculados a la regulación de la PA [98]. En un estudio de hombres y mujeres de raza negra normotensos, el metabolito 4-hidroxihipurato en suero (también un producto final del metabolismo de polifenol por la microflora del intestino) se asoció con 17% más de riesgo de desarrollar hipertensión [99].

Varios estudios de metabolómica se han llevado a cabo también en preeclampsia, donde los hallazgos implican el metabolismo anormal de lípidos en la patogénesis [100]–[103].

Cabe destacar, en cuanto a la utilización de técnicas proteómicas y metabolómicas para diagnosticar el desarrollo de albuminuria en daño renal el estudio de Pena et al. en pacientes con diabetes tipo 2 hipertensos. En el estudio proteómico en plasma predecían la transición a albuminuria más allá de los marcadores de riesgo renales establecidos en la hipertensión o la diabetes tipo 2 aunque necesitan de una validación externa para evaluar la reproducibilidad. [104], [105]. En cuanto a los metabolitos, Pena et al. descubrieron que en individuos con diabetes mellitus tipo 2, dos metabolitos en plasma y tres en orina fueron capaces de predecir el desarrollo de la nefropatía diabética [49]. En otro estudio de Marracheli et al. un perfil metabolómico en suero fue evaluado por 1H RMN para identificar los factores relacionados con el riesgo de desarrollar microalbuminuria usando datos genómicos y metabolómicos combinados de un estudio de población general. Un perfil metabolómico característico, que incluye productos de metabolismo mitocondrial, aminoácidos y derivados, se observaron en microalbuminuria como comparación a los sujetos normoalbuminúricos [106].

Los estudios referidos hasta la fecha mayormente se centran básicamente en el estudio de la HTA per sé y/o utilizando modelos animales sin distinguir o prestar especialmente atención al desarrollo de albuminuria a excepción de estudios en diabetes mellitus tipo 2. En esta Tesis nos centraremos en el estudio por técnicas ómicas de pacientes con HTA que se encuentran bajo supresión crónica del SRA y que a pesar de ello desarrollan albuminuria, tal y como se refleja en la realidad clínica de las unidades de hipertensión.

III. LA ORINA Y LOS EXOSOMAS DE LA ORINA: MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD CARDIO-RENAL (HTA Y DESARROLLO DE ALBUMINURIA)

Las muestras analizadas mediante estrategias ómicas pueden ser células, tejidos, fluidos (plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) o microvesículas (micropartículas, exosomas, secretoma, etc.).

Los estudios en tejido permiten la evaluación de los mecanismos subyacentes en la enfermedad y se han refinado enormemente estos últimos años incluyendo estudios de secretoma como subproteoma del tejido [107], [108]. Teniendo en cuenta la limitación que supone la falta de acceso a los órganos diana en muchas enfermedades, resulta necesario buscar muestras alternativas para la búsqueda de potenciales marcadores pronósticos y dianas terapéuticas. El fluido biológico donde mayor número de estudios proteómicos se han realizado es el plasma, con una gran aplicabilidad en el diagnóstico clínico de rutina. Sin embargo tiene una limitación importante en el estudio de las proteínas ya que su composición proteica es en su mayoría albúmina y moléculas IgG. Eso hace que sea difícil evaluar los cambios en el resto de las proteínas presentes y que por ello sea imprescindible reducir el rango dinámico de concentración incluyendo un paso de depleción de dichos componentes mayoritarios.

En esta tesis los estudios se harán en muestras de orina que, junto con el plasma, es una de las principales fuentes para realizar dichos análisis proteómicos y/o metabolómicos, además, proporciona una visión global de la respuesta del cuerpo humano, y se obtiene de forma no invasiva (www.eurokup.org).

Las proteínas y metabolitos de la orina no se originan exclusivamente desde la filtración glomerular, sino también desde la secreción tubular, células epiteliales desprendidas desde el riñón y desde el tracto urinario, exosomas secretados y secreciones seminales [109]. La orina es el fluido biológico idóneo para el análisis proteómico y metabolómico, ya que es relativamente “estable”, debido al hecho de que se almacena durante horas en la vejiga; por lo tanto la degradación proteica producida por proteasas endógenas, uno de los factores limitantes en los estudios realizados en sangre [110], podría ser completa en el momento de la micción [111].

En general, la orina se ha investigado, para el estudio de la fisiología renal y de enfermedades renales como complemento de plasma o suero, ya que es una rica fuente de posibles

marcadores de enfermedad. La composición de la orina no sólo refleja función renal normal, sino que también contiene moléculas producidas específicamente del riñón que pueden ser alteradas en respuesta a una fisiopatología subyacente [112]. En particular, nuestro grupo y otros han centrado su investigación en orina en la búsqueda de nuevas dianas moleculares de uso potencial en el ámbito clínico desde un punto de vista diagnóstico o pronóstico en el contexto de la enfermedad cardiovascular [70]. La albuminuria es también un factor de daño renal y se han aplicado ómicas en orina en nefropatía diabética [74], lesión renal aguda [77][113], y la enfermedad renal crónica [71] entre otros [73].

Como hemos comentado, en la orina se encuentran presentes micropartículas y exosomas, que se comportan como contenedores de potenciales marcadores de la enfermedad al originarse en órganos concretos afectados [114], [115], y cuyo estudio presenta un gran interés ya que suma como un abordaje complementario a la orina global, como se muestra a continuación donde explicaremos de forma más detallada estas microvesículas.

Los exosomas se definen como vesículas membranosas de 40-100 nm de diámetro, de origen endocítico, y con una densidad de flotación en gradiente de sacarosa de 1,10 a 1,19 g/cm³. A parte de proteínas, contienen ARN y microARN pero están desprovistos de ADN. Estas vesículas son liberadas al espacio extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas por diversos tipos celulares (células dendríticas, reticulocitos, linfocitos B, varios tipos de células madre, células epiteliales o endoteliales) [116]–[120][121]. Es posible aislar exosomas desde cultivos celulares así como de distintos fluidos biológicos como sangre, orina, semen, líquido amniótico o líquido pleural.

Como hemos dicho, la generación de exosomas se produce por vía endocítica donde tanto moléculas de la membrana plasmática (lípidos, proteínas transmembrana y receptores), como solutos y ligandos se internalizan mediante procesos de invaginación, dando lugar a endosomas tempranos [122]. Estos endosomas tempranos pueden tener distintos destinos: pueden ser reciclados volviendo a la superficie celular, pueden ser trasladados a la red transgolgi o para la formación del exosoma pueden ser dirigidos a la ruta de endosomas tardíos y lisosomas. En este caso, los endosomas tempranos dan lugar a invaginaciones de su membrana, formando vesículas intraluminales (ILV) dentro de los endosomas, lo que llamamos cuerpos multivesiculares (MVB). Durante la invaginación de la membrana plasmática, proteínas transmembrana quedan incorporadas en la membrana invaginada mientras que componentes citosólicos (como proteínas solubles, micro ARN y ARNm) quedan englobados en las ILV [123], [124]. Este proceso es responsable también de la orientación de las membranas lipídicas de los exosomas, idéntica a la de las células [125]. Se piensa que además de los componentes citoplasmáticos englobados de manera aleatoria existen proteínas y moléculas de ARN que pueden ser incorporadas a los exosomas de manera selectiva [126].

Dependiendo de sus características bioquímicas, los MVB tienen dos posibles destinos, derivar en la formación de MVB degradativos con destino lisosomal o en MVB exocíticos,

cuya membrana se volverá a fusionar con la membrana plasmática liberando exosomas al medio extracelular (Figura 7).

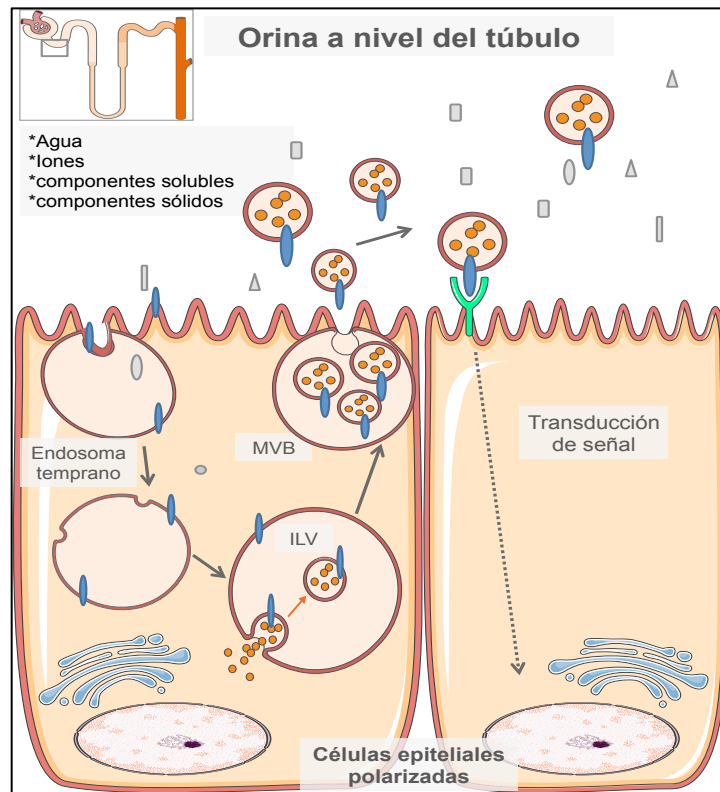


Figura 7. Representación esquemática del proceso de formación y secreción de los exosomas de orina. Vesículas intraluminales ILV, cuerpos multivesiculares MVB.

Los exosomas por un lado son responsables de la eliminación de proteínas y lípidos en exceso o por senescencia; por otro, existen importantes evidencias sobre el papel de los exosomas en la señalización celular de una manera selectiva, como en la regulación de la respuesta inmune, transferencia de ARN y proteínas, y señalización intercelular [127]. Los exosomas pueden provocar efectos en células diana a través de la unión a la superficie a través de receptores específicos, llevando a la regulación de la señalización celular [128]. De manera hipotética los exosomas pueden fusionarse directamente con las células diana o pueden ser incorporados a la célula diana tras la endocitosis de los exosomas. [129]–[132].

Podemos afirmar que los exosomas son una importante fuente de información y una prometedora apuesta en la búsqueda de marcadores para diversas enfermedades [133][134] además de reflejar cambios en el tejido sin la necesidad de realizar una biopsia. Por todo ello, en la última década han sido estudiados en una gran variedad de procesos patológicos para una mejor comprensión de los mismos, así como para encontrar nuevas dianas terapéuticas y marcadores tempranos de enfermedad. Varios estudios de exosomas de la orina han permitido una mejor comprensión de distintas enfermedades renales tales como estudios previos de nuestro laboratorio que han demostrado un perfil proteico diferencial en exosomas de orina de pacientes con nefropatía diabética [75] [74].

Como conclusión, claramente la orina y los exosomas son una fuente ideal para el estudio proteómico y metabolómico en la enfermedad CV y/o renal, como además demostraremos mas adelante en el análisis ómico realizado en pacientes HTA con supresión del SRA que desarrollan albuminuria.

IV. APROXIMACIONES ÓMICAS APLICADAS EN LA TESIS

En esta tesis se llevó a cabo análisis proteómico y metabolómico diferencial en orina y exosomas de la orina para investigar los cambios moleculares asociados a la progresión de la albuminuria en pacientes hipertensos diabéticos y no diabéticos con supresión crónica del SRA, más allá de los marcadores de riesgo tradicionales. Además, se han identificado cambios moleculares, capaces de predecir dicha progresión, en individuos con valores normales de albúmina excretada en orina, lo que es muy importante ya que podría representar una estrategia para una intervención más temprana y un mejor resultado en pacientes.

A continuación se resumen los métodos empleados en la tesis.

a. Análisis Proteómico diferencial.

En este caso utilizaremos la proteómica potencialmente para permitir la detección precoz de los pacientes en riesgo de desarrollar albuminuria. La posibilidad de predecir el desarrollo de albuminuria, y la evaluación de la dinámica de proteínas en la orina puede ofrecer evidencia anterior en una situación inadecuada a la respuesta terapéutica.

2D-DIGE: La metodología 2D-DIGE se basa en el marcaje específico de las muestras con tres fluoróforos que se unen covalentemente a los residuos de lisina (Cy2, Cy3 y Cy5) en los grupos N-terminal y ϵ -amino (marcaje mínimo), que presentan espectros de excitación y emisión distinguibles, sin apenas alterar la masa molecular y el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas. Dichos fluorocromos están diseñados para igualar su masa y carga entre sí, de tal manera que moléculas de la misma proteína marcadas con diferente fluorocromo migran conjuntamente en el gel. El fluorocromo Cy2 se emplea siempre para marcar un estándar interno, que se obtiene realizando una mezcla en iguales proporciones de todos los proteomas del experimento y que estará presente en cada gel. Este diseño permite la separación de distintas muestras marcadas en un único gel bidimensional, lo que disminuye notablemente la variabilidad experimental. Así mismo, este marcaje al ser un método de fluorescencia proporciona una mayor sensibilidad y linealidad que otros métodos de tinción y tiene un rango dinámico lineal de 4 ó 5 órdenes de magnitud. Además, permite la identificación de isoformas y modificaciones postraduccionales [135].

Análisis Cuantitativo diferencial de proteínas con marcaje (iTRAQ): Este método se basa en el uso de isótopos estables con los que se marcan las proteínas de uno o varios de los grupos de estudio. Las propiedades químicas de los compuestos marcados con los isótopos estables son idénticas a las de sus homólogos no marcados, excepto en masa, lo que permite emplearlos como estándares internos o referencias relativas en un análisis por espectrometría de masas [136]. El marcaje permite distinguir los péptidos derivados de dos o más muestras

(hasta ocho) mediante cromatografía líquida (LC-MS/MS). Se trata de un método semicuantitativo. La cuantificación diferencial de proteínas entre las muestras se realiza mediante la comparación de la intensidad de MS de los péptidos derivados de las proteínas mediante iones “reportero”. Este análisis diferencial requiere un fraccionamiento previo adecuado de acuerdo con la complejidad de la muestra seguido de LC-MS/MS que permite la identificación y cuantificación de miles de péptidos en un experimento único. El método de cuantificación está basado en el área de los picos en el espectro de masas, de tal forma que el área resultante es equivalente a su abundancia en la muestra. El resultado final es la consecución de un perfil proteómico diferencial de las muestras analizadas, con la información cualitativa (identificación de proteínas) y cuantitativa de los niveles de las proteínas que se alteran o se han mantenido estables en respuesta a situaciones diferentes.

b. Aproximación metabolómica al estudio de la HTA.

En este proyecto realizaremos una estrategia de huella metabólica (metabolic fingerprint) para comparar perfiles metabólicos de orina entre pacientes hipertensos albuminúricos y normoalbuminúricos frente a grupos de individuos no hipertensos con la finalidad de identificar aquellos metabolitos que de forma significativa varíen en respuesta a la HTA y/o al desarrollo de albuminuria bajo supresión crónica de SRA. Para ello emplearemos la resonancia magnética nuclear (RMN).

RMN: La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una espectroscopia de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. El principio es que los núcleos atómicos emiten una señal característica, ya que tienen que relajarse desde el estado inducido y volver al equilibrio [137]. Esta señal es una fuente rica de información con respecto a la composición de la muestra irradiada, incluyendo datos sobre la estructura química y la abundancia [137]. Así, la intensidad de los picos espectrales obtenidos se correlaciona con el número de protones que han causado la señal y, por tanto, con la concentración relativa de los compuestos presentes en la muestra. La espectroscopia por RMN es de naturaleza cuantitativa y además ofrece información estructural precisa que permite la identificación de metabolitos [138].

Los espectros de RMN unidimensionales típicos de las muestras biológicas en general y de la orina en particular, presentan gran número de señales que pueden aparecer solapadas, de tal manera que los metabolitos de baja abundancia, pueden ser enmascarados por metabolitos de alta abundancia o por una sustancia química similar, dificultando su identificación. Por ello, la confirmación de dichas identificaciones se realiza mediante experimentos bidimensionales (2D RMN) los cuales proporcionan información adicional sobre la proximidad de los átomos de H en términos de enlace químico.

c. Validación de Potenciales Biomarcadores por SRM-LC-MS/MS Con QQQ

A la vista de todas las técnicas que se han descrito hasta el momento, hay que destacar en este punto que los resultados obtenidos por cualquiera de estas metodologías deben ser confirmados por otras técnicas complementarias. El SRM es una aproximación idónea para confirmar los marcadores moleculares previamente identificados por otras técnicas, debido a su gran sensibilidad y selectividad [139] así como por la gran capacidad de muestreo y análisis proteico y metabólico que permite analizar por ensayo (teóricamente hasta 1000 moléculas/ensayo). Utilizaremos el SRM para la verificación de las proteínas y metabolitos diferencialmente expresados que hayan sido identificados en orina y exosomas mediante los experimentos cuantitativos iTRAQ, DIGE y RMN.

Single Reaction Monitoring (SRM, monitorización por reacción seleccionada): Tras una primera fase de descubrimiento de potenciales biomarcadores, donde se estudia un número no muy elevado de muestras, se procede a una segunda fase de confirmación. Se basa en el análisis por espectrometría de masas, empleando un equipo que permita una previa selección de las transiciones específicas asociadas a los péptidos de las proteínas de interés, que permita que éstas sean detectadas y cuantificadas, pudiéndose validar así las diferencias encontradas previamente en la fase de descubrimiento entre controles y grupos de pacientes. Esta técnica requiere habitualmente del empleo de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QQQ) acoplado en línea a nano cromatografía líquida (nLC). En el que el primer cuadrupolo del equipo, Q1, se emplea para seleccionar un ión precursor de masa conocida. Este ión pasa al Q2, donde es fragmentado. Los fragmentos resultantes son analizados en el Q3, y las transiciones precursor-fragmento seleccionadas de antemano se emplean para cuantificar el péptido [140] y consecuentemente la proteína (Figura 8) [140]. Para realizar una cuantificación por SRM debemos conocer la/s proteína/s de interés, motivo por el cual, no permite su empleo para análisis diferencial en la fase de descubrimiento de marcadores moleculares. Sin embargo, esta técnica, que lleva empleándose desde hace décadas para cuantificar compuestos de bajo peso molecular (principalmente en la industria farmacéutica), se está imponiendo como técnica de validación de moléculas, debido a su gran selectividad y sensibilidad, así como por el manejo de un alto número de muestras que permite [141].

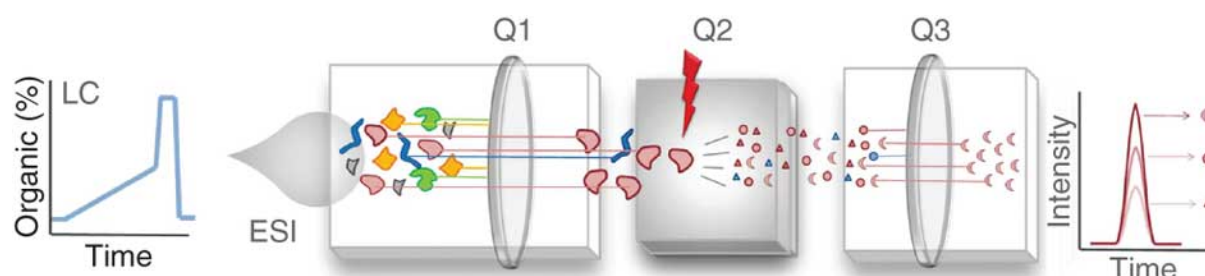


Figura 8. Figura esquemática en la que podemos observar los componentes y funcionamiento de un triple cuadrupolo (QQQ), llevando a cabo un análisis de SRM.

Hipótesis

NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE LA HTA Y SU EVOLUCIÓN.

Es necesario llevar a cabo nuevas estrategias experimentales que permitan obtener datos nuevos que aporten luz al proceso de formación de albuminuria en pacientes hipertensos tratados con fármacos inhibidores del SRA. Por un lado, el abordaje directo sobre las muestras de orina nos permitirá conocer el mapa proteico y metabolómico de estos pacientes, así como la detección e identificación de posibles dianas terapéuticas y/o marcadores pronósticos que nos indiquen la posibilidad de desarrollar albuminuria en pacientes hipertensos normoalbuminúricos.

Nuestra hipótesis es que el distinto comportamiento clínico de los pacientes hipertensos con distintos grados de afectación renal y distinta respuesta al tratamiento farmacológico con inhibidores del SRA debe tener su reflejo en el proteoma y metaboloma de la orina de estos pacientes. Estudiaremos en profundidad a nivel molecular los cambios subyacentes que puedan predecir el desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos con supresión crónica de SRA. En línea con nuestros estudios anteriores, emplearemos un abordaje multi-ómico en muestras de orina (incluyendo exosomas) mediante la aplicación de novedosas técnicas complementarias entre sí que incrementan notoriamente nuestro conocimiento a nivel molecular (2D-DIGE, RMN, iTRAQ, SRM) y su integración mediante herramientas bioinformáticas que permitan un mayor conocimiento a nivel molecular del continuo cardio-renal patológico presente en nuestra cohorte de pacientes. Teniendo en cuenta el carácter complejo del conjunto de interacciones fisiopatológicas que subyacen al desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos bajo supresión crónica del SRA, el abordaje multidisciplinar y sin sesgo que caracteriza a las estrategias ómicas, a diferencia del enfoque clásico de verificar o no una hipótesis, constituye una potente herramienta para investigar, sin preselección de moléculas diana, todas aquellas proteínas y metabolitos, cuyos niveles de expresión se vean alterados de modo incipiente y puedan constituir un perfil molecular (patrón) de pronóstico. Por el contrario, estas estrategias nos permiten identificar aquellas diferencias más significativas entre los distintos grupos de pacientes estudiados. Ahí reside su gran potencial de obtención de datos que no pueden lograrse por otras estrategias. Si además se utilizan un conjunto de técnicas distintas y complementarias para abordar un mismo problema (la aparición de microalbuminuria en pacientes hipertensos tratados con i-SRA) podemos esperar que el estudio aporte datos de gran relevancia, lo que planteamos a llevar a cabo en esta tesis.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es la identificación de cambios moleculares cuantificables, a nivel de proteínas y metabolitos, asociados al desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos bajo supresión crónica de SRA mediante estrategias ómicas, así como esclarecer qué procesos fisiopatológicos pueden influir en la resistencia a la acción beneficiosa de los fármacos bloqueantes del SRA.

OBJETIVOS PARTICULARES

Para este objetivo general, planteamos los siguientes objetivos particulares:

1. Identificación de proteínas de la orina que muestren alteración en respuesta al desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos con supresión crónica de SRA. Estudio de la expresión proteica diferencial cuantitativa mediante 2D-DIGE de la orina de pacientes normoalbuminúricos (N), pacientes que han desarrollado albuminuria de novo (dnA) y pacientes con microalbuminuria mantenida (MAM) . Confirmación mediante SRM-LC-MS/MS.
2. Identificación de cambios proteicos en los exosomas de la orina como fuente de aproximación a procesos fisiopatológicos que ocurren directamente en el riñón. Estudio diferencial cuantitativo por marcaje iTRAQ (LC-MS/MS) de la orina de los grupos de pacientes descritos en el objetivo 1. Confirmación mediante SRM-LC-MS/MS.
3. Identificación de huellas metabólicas asociadas al grado de afectación renal por hipertensión/desarrollo de albuminuria en los grupos de pacientes indicados en el objetivo 1. Comparación de perfiles metabólicos en orina mediante RMN bajo supresión crónica de SRA.
4. Identificación de un panel específico de proteínas y metabolitos en orina con poder predictor de desarrollo de albuminuria. Estudio prospectivo en pacientes hipertensos normoalbuminúricos.
5. Integración de los datos proteómicos y metabolómicos obtenidos en orina y exosomas (redes de interacción).

Capítulo 2

Material y Métodos

1. SELECCIÓN DE PACIENTES

La selección de pacientes, procedentes de la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre, se basó en un estudio anterior que muestra el desarrollo de albuminuria *de novo* en los individuos hipertensos bajo supresión crónica del SRA [30]. En ese estudio, se analizó la evolución de 1533 pacientes de la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre que habían estado bajo la supresión crónica con i-SRA durante al menos cinco años (dos antes de la llegada a la Unidad y tres de seguimiento posterior). Los datos basales se registraron después de un período de estabilización de tres meses, durante el cual los pacientes recibieron el mejor control posible de los factores de riesgo cardiovascular, y la dosis para la supresión del SRA se les aumentó hasta la máxima tolerada. Al inicio del estudio, 1141 pacientes eran normoalbuminúricos, mientras que los restantes 392 (27,3%) presentaron albuminuria persistente. Posteriormente, los pacientes se siguieron durante un período de tres años en los que se evaluó la progresión de la albuminuria cada seis meses; la PA se estimó mediante un dispositivo semiautomático OMRON validado en condiciones estandarizadas y la supresión del SRA se mantuvo durante todo el seguimiento. De los pacientes con normoalbuminuria al inicio del estudio, el 16,1% desarrolló albuminuria *de novo* (es decir, ausente al inicio del estudio y desarrollada posteriormente) durante el período de tres años. El desarrollo de albuminuria *de novo* se definió como una nueva aparición de microalbuminuria (ACR de 20 a 200 mg/g de creatinina en hombres y 30 a 300 mg/g de creatinina en mujeres) o de macroalbuminuria (> 200 mg/g de creatinina en hombres y > 300 mg/g de creatinina en mujeres) confirmado en al menos una segunda ocasión entre las 3 determinaciones anuales llevadas a cabo en tres diferentes muestras de orina de la mañana.

Al final del tercer año de seguimiento, se seleccionó una cohorte representativa que fue clasificada de acuerdo con el desarrollo de albuminuria bajo supresión del SRA en 3 grupos:

- a) Pacientes que permanecieron normoalbuminúricos durante los tres años del seguimiento (N);
- b) Pacientes que desarrollan la albuminuria *de novo* durante el seguimiento (dnA);
- c) Pacientes con microalbuminuria mantenida durante todo el seguimiento (MAM).

Se excluyó la presencia de formas secundarias de hipertensión arterial y pacientes con enfermedades renales.

Para identificar potenciales diferencias en las características clínicas de cada grupo de individuos o tratamiento farmacológico administrado, los tres grupos (N, dnA y MAM) se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. Las **tablas** clínicas individuales de cada estudio elaborado no mostraron valores dentro del rango patológico en ninguna de las variables entre los grupos de pacientes. La diabetes se diagnosticó como glucemia en ayunas >126 mg/dL, nivel de glucosa sérica >198 mg/dl después de una prueba de tolerancia oral a la glucosa, o por el uso de fármacos

antidiabéticos orales (32 pacientes con fármacos anti-diabéticos). En los tres estudios realizados se hizo la comparación con un grupo control de muestras de orina de individuos normotensos sanos (C) para evaluar las diferencias potenciales atribuidas a la hipertensión en sí misma bajo supresión crónica de SRA.

A lo largo de esta tesis se han reclutado un total de 131 muestras que se clasificaron en colaboración con los especialistas del servicio de Nefrología del Hospital 12 de Octubre, según los siguientes criterios: 62 pacientes hipertensos normoalbuminúricos (de los cuales 59 se siguieron clínicamente al menos un año), 35 pacientes que han desarrollado microalbuminuria *de novo* y 34 pacientes hipertensos con microalbuminuria mantenida. Adicionalmente se han recogido 44 muestras de controles sanos. Las cohortes representativas de pacientes utilizadas para cada estudio con los respectivos controles se detallan a continuación:

Análisis proteómico diferencial de la orina de pacientes HTA: se reclutaron 105 pacientes hipertensos (66 no diabéticos y 39 diabéticos) y 24 controles.

Análisis diferencial de exosomas de orina de pacientes HTA: Fueron reclutados un total de 40 pacientes hipertensos no diabéticos y 16 controles.

Análisis diferencial metabolómico de la orina de pacientes HTA: Un grupo de 118 pacientes hipertensos fueron seleccionados (75 no diabéticos y 43 diabéticos) además de 30 sujetos sanos.

2. FLUJO DE TRABAJO GENERAL: APROXIMACIONES ÓMICAS

Estos estudios cumplen los requisitos de un estudio de ómicas en términos de tamaño del grupo y de flujo de trabajo técnico. Una representación esquemática general, para todos los estudios, del flujo de trabajo seguido en todos los estudios ómicos realizados se muestra en la **Figura 9**. Al final de los tres años de seguimiento en la unidad de hipertensión y una vez clasificados los pacientes según el desarrollo de albuminuria, se realizaron los estudios ómicos, por 2D-DIGE (proteínas de la orina completa), iTRAQ (proteínas de la fracción exosomal de la orina) y RMN (metabolitos de la orina). Posteriormente se confirmaron los resultados obtenidos en la primera aproximación ómica mediante la técnica SRM-LC-MS/MS obteniendo como resultados una huella específica de moléculas correspondientes a la HTA *per se* y al desarrollo de albuminuria en pacientes tratados con i-SRA.

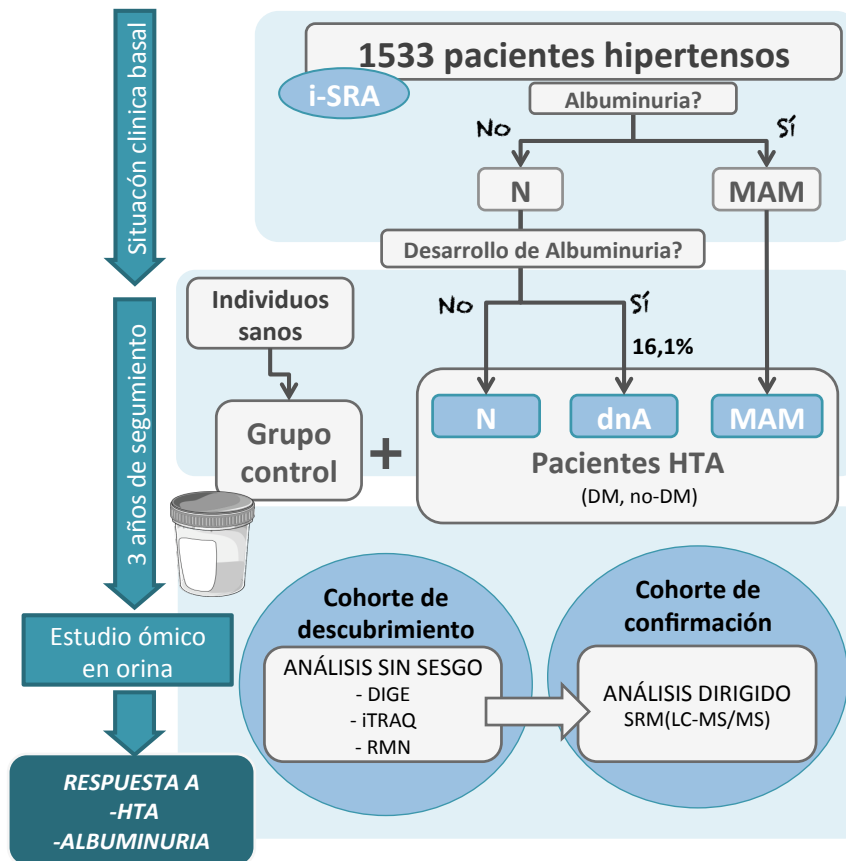


Figura 9. Representación esquemática general del flujo de trabajo seguido en todos los estudios ómicos realizados. i-SRA: inhibidores del sistema renina-angiotensina, C: controles, N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

Los estudios prospectivos se llevaron a cabo para evaluar la capacidad predictiva de desarrollo futuro de albuminuria *de novo* de las moléculas que muestran alguna respuesta relacionada con la hipertensión o la albuminuria. Para ello, pacientes normoalbuminúricos de la cohorte de confirmación se siguieron clínicamente durante al menos un año adicional desde el muestreo de la orina. Se clasificaron en no progresores (permanecieron como N) o progresores a dnA en cuanto al incremento del ratio albúmina creatinina (ACR) como se muestra la **figura 10**. Basándonos en los datos de confirmación por SRM-LC-MS/MS, pudimos obtener un panel de moléculas predictoras de desarrollo de albuminuria *de novo*.

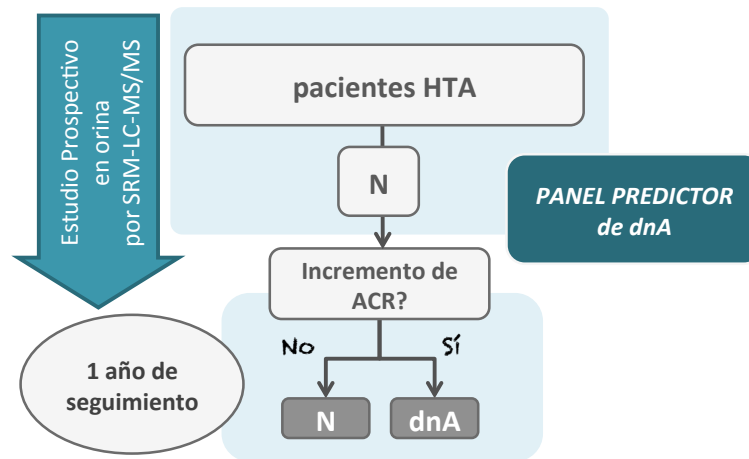


Figura 10. Esquema del trabajo realizado para los estudios prospectivos en esta tesis. ACR: ratio albúmina-creatinina, N: normoalbuminuria (sin progresión), dnA: *de novo* albuminuria (pacientes con progresión).

El estudio clínico fue aceptado por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre y se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los individuos que participaron en este estudio firmaron consentimientos informados por escrito antes de su inclusión.

3. RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA

Las muestras de orina se obtuvieron de pacientes en seguimiento de la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre (Madrid), donde se recogió la segunda orina de la mañana de cada paciente en un recipiente estéril y fue transportada inmediatamente a temperatura ambiente al laboratorio de Inmunoalergia y Proteómica del IIS-Fundación Jiménez Díaz (Madrid) en un tiempo no superior a tres horas.

El almacenaje de las muestras previo alicuotado se realizó tal y como se detalla a continuación en función de su análisis posterior [109][www.eurokup.org] y según estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio:

- Análisis del metaboloma de la orina por RMN y SRM-LC-MS/MS

Se tomaron 4 ml de orina y se centrifugaron a 13.000 x g, 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 1ml que se guardaron a -80°C hasta su análisis.

- Análisis del proteoma de la orina por 2D-DIGE y SRM-LC-MS/MS

Se centrifugaron 20 ml de la muestra para eliminar restos celulares a 3000 x g, 10 minutos a 4°C; se alicuotaron en fracciones de 20 ml y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

- Análisis de exosomas de la orina por iTRAQ (LC-MS/MS) y SRM-LC-MS/MS proteínas exosomales

En el caso de disponer de cantidad suficiente de muestra, se separaron al menos 60 ml de orina, al cual se le añadieron 0,05% de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich Protease Inhibitor Cocktail ref:P8340) y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Los pacientes con daño renal presentan elevadas cantidades de proteínas, en general, y de albúmina, en particular, en orina dado que se ven alteradas las capacidades de filtración respecto a un riñón sano. Este hecho deriva en un problema fundamental como es la presencia de albúmina en exceso, que impide una resolución correcta de las manchas proteicas mediante análisis por 2D-DIGE, y disminuye la detección de proteínas minoritarias, limitando el descubrimiento de nuevas moléculas marcadores que habitualmente se encuentran en concentraciones muy inferiores.

En estudios previos [74] realizamos una depleción de albúmina para evitar un efecto deletéreo. En este caso, como paso previo, se procedió a hacer un análisis bioquímico de cada muestra de orina obteniéndose los valores de albúmina (mg/L) y de proteína total (mg/dL). Así, en función del dato de albúmina pudimos seleccionar las muestras para evitar el paso de depleción con un valor de albúmina de 300 mg/L máximo.

4. EXTRACCIÓN PROTEICA Y AISLAMIENTO DE EXOSOMAS

La preparación de la muestra para su análisis proteómico o metabolómico es un paso crítico que va a limitar la cantidad y la calidad de los datos obtenidos. Es fundamental que las estrategias de extracción, purificación, concentración, limpieza, etc. sean compatibles con el tipo de análisis posterior seleccionado. En este apartado se indican los procedimientos empleados previos al análisis proteómico.

4.1. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE ORINA: CONCENTRACIÓN Y DESALINIZACIÓN PREVIA A SU ANÁLISIS POR 2D-DIGE y SRM-LC-MS/MS

Debido a la gran cantidad de sales que hay en la orina es necesario llevar a cabo un proceso de desalinización antes de iniciar el análisis por electroforesis bidimensional en general y 2D-DIGE en particular, ya que de otro modo interfieren en el electroenfoque haciendo imposible la correcta separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Previamente en el laboratorio establecimos las condiciones de análisis por geles de electroforesis bidimensional (2-DE) y evaluamos métodos que permitían la limpieza y desalinización de las muestras de orina de un modo satisfactorio por cartuchos HLB Oasis® (Waters) [142].

Las muestras (20 ml) se descongelaron en un baño de agua a 37 °C unos minutos. Después de una agitación vigorosa, se filtraron a través de filtros de jeringa de 0,2 µm de poro y se ultrafiltraron por centrifugación a 3.000 x g para la concentración de las proteínas con filtros

Amicon (10 kDa de corte, deseamos fracción peptídica <10kDa), hasta un volumen final de 300-350 μ l, como muestra la **figura 11**.

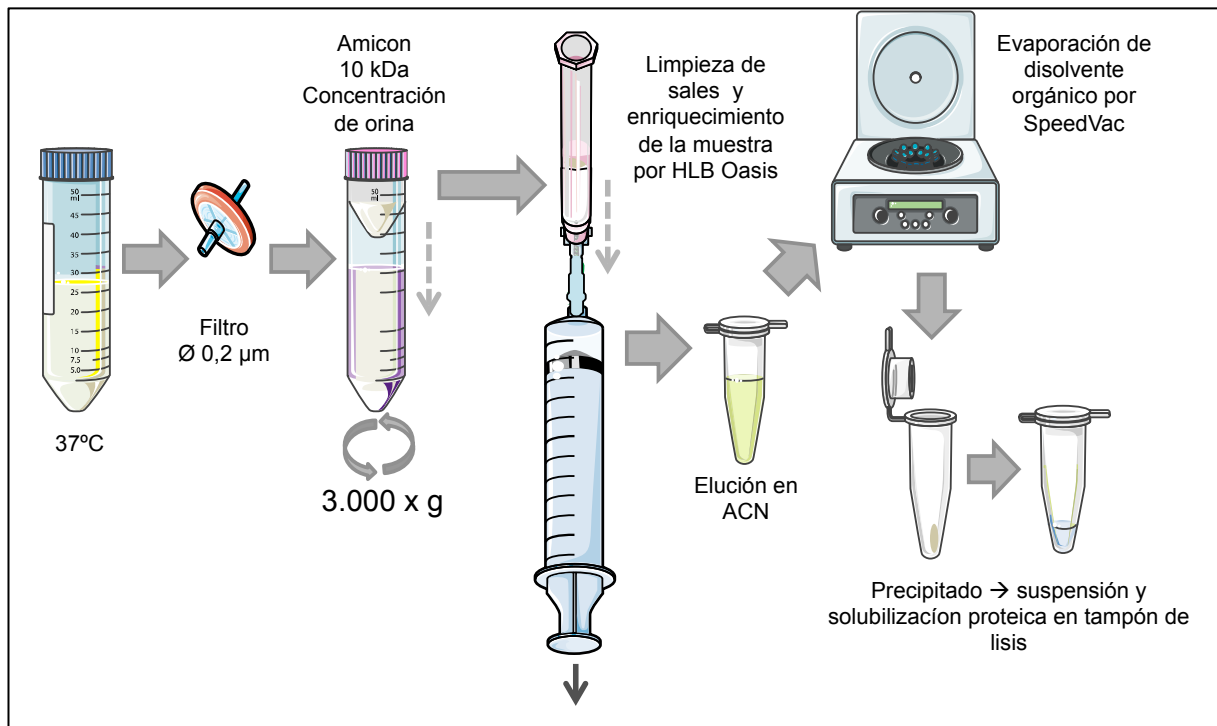


Figura 11. Representación esquemática del protocolo seguido para la extracción de proteínas de la orina. La muestra diluida en H_2O Milli-Q después de su concentración por unidades Amicon se pasó manualmente por medio de succión (jeringa) por cartuchos HLB Oasis y se recogió en tubos Eppendorf una vez limpias y eluidas en acetonitrilo (ACN).

La orina concentrada se diluye con agua Milli-Q a un volumen final de $500\ \mu\text{l}$ y se carga en cartuchos Oasis® HLB previamente acondicionados con $1\ \text{ml}$ de acetonitrilo (ACN) 100% y con una disolución de $1\ \text{ml}$ de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Tras un lavado con una disolución de $1\ \text{ml}$ de TFA al 0,1%, las proteínas retenidas se eluyeron en $0,5\ \text{ml}$ de fase orgánica compuesta por ACN al 99%. Se eliminó el disolvente en un concentrador con vacío (SpeedVac) hasta llevarlo a sequedad y el precipitado se resuspendió en un volumen total de $50\ \mu\text{l}$ de tampón de lisis compatible con el isoelectroenfoque (IEF) (7M urea, 2M tiourea, 4% de CHAPS, Tris-HCl $30\ \text{mM}$). El contenido total de proteína se midió por el método de Bradford antes del análisis por 2D-DIGE.

Para el análisis proteómico dirigido por SRM LC-MS/MS, se tomó un volumen de muestra correspondiente a $30\ \mu\text{g}$ de proteína total, calculado en base al análisis bioquímico. En este caso, se emplearon columnas de desalinización (Thermo®) que admiten un volumen máximo de $120\ \mu\text{l}$. Por ello, el volumen correspondiente a $30\ \mu\text{g}$ de proteína total se concentró en dispositivos Amicon de $3\ \text{kDa}$ de corte de $0,5\ \text{ml}$ (centrifugación a $4.000\ \text{x g}$) o $4\ \text{ml}$ (centrifugación a $14.000\ \text{x g}$) según el volumen de partida. La muestra concentrada se acondiciona previamente a la tripsinización con columnas *Protein Desalting Spin Columns* de

Thermo Scientific tal como indica el fabricante, en el cual se equilibra la columna, y se pasa la muestra centrifugando a $1.500 \times g$ durante 2 minutos. Posteriormente estas muestras se pudieron congelar a -80°C hasta su utilización.

4.2. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS DE LA ORINA

Las muestras de orina, con inhibidores de proteasas y congeladas a -80°C se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora, se descongelaron en un baño a 37°C unos 15 minutos y se agitaron vigorosamente empleando un vortex durante al menos 1 minuto para solubilizar bien las muestras. Este paso afectará al rendimiento final en la recuperación de exosomas [109]. En la **figura 12** se detallan esquemáticamente representados los pasos del protocolo utilizado, previamente puesto a punto en nuestro laboratorio [74], [75]. Se necesitan al menos 60 ml de orina para un buen rendimiento de extracción de exosomas sobre todo en individuos normoalbuminúricos, en cuyo defecto se hicieron mezclas (“*pools*”) de muestras para obtener la cantidad de proteína necesaria para cada análisis.

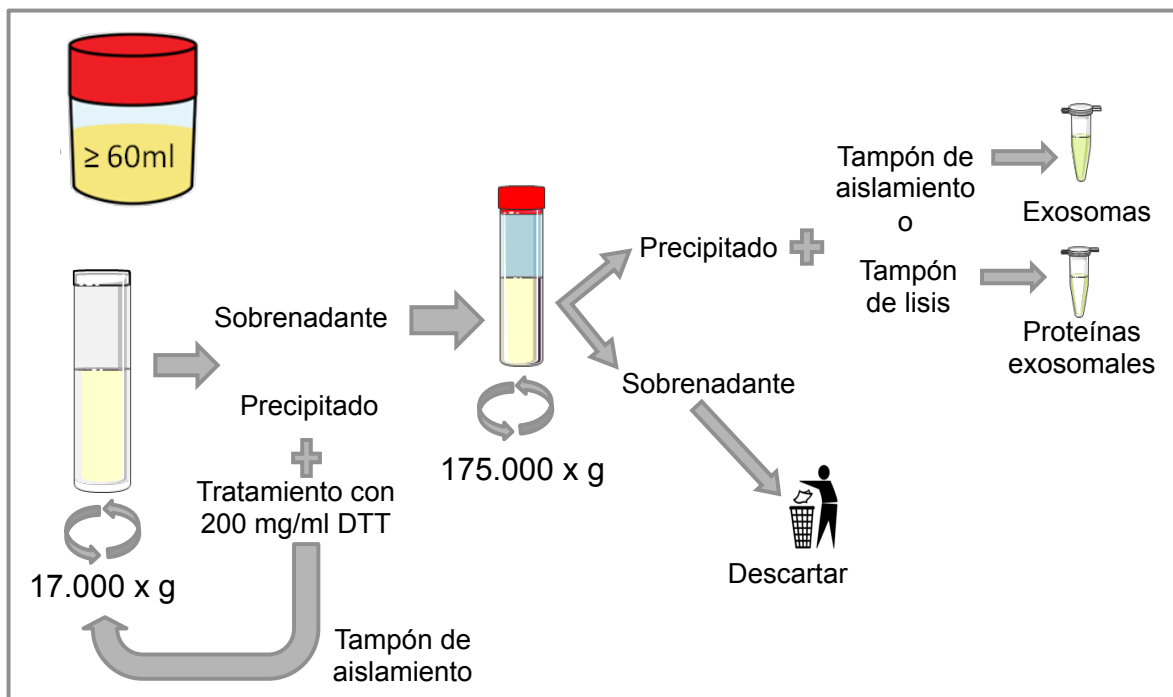


Figura 12. Representación esquemática del protocolo seguido para el aislamiento de exosomas y proteínas exosomales para su posterior análisis proteómico, previamente puesto a punto en nuestro laboratorio.

El aislamiento de los exosomas se realizó por ultracentrifugación. En un primer paso, las muestras fueron sometidas a un primer paso de centrifugación a velocidad baja, $17.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Se recomienda llevar a cabo este paso en frío para minimizar la formación de agregados de la proteína uromodulina, también llamada proteína Tamm Horsfall (THP). El propósito de este paso de centrifugación es eliminar restos celulares y de membrana y recuperar el sobrenadante. Los agregados de THP dan lugar a redes que pueden atrapar exosomas disminuyendo el rendimiento. Por ello, se resuspende el precipitado resultante en

500 µl de solución de aislamiento (10 mM trietanolamina y 250 mM sacarosa en H₂O-milliQ, pH 7,6) con ditioterol (DTT) (200 mg/ml) y se calienta a 37°C durante 10 minutos. Así se consigue disgregar estas redes y recuperar los exosomas atrapados en ellas [143]. Para separar los exosomas de los restos celulares del precipitado (“*pellet*”) tratado con DTT se centrifugó de nuevo en 10 ml de solución de aislamiento a 17.000 x g. Se recupera el sobrenadante y se une al obtenido en la primera centrifugación. Esta vez se descartó definitivamente el precipitado.

El sobrenadante de estas centrifugaciones se llevó a tubos de policarbonato especiales para la ultracentrifugación (Bottle, with Cap Assembly, Polycarbonate, Beckman Coulter). Por cada 100 ml de sobrenadante se utilizaron 4 tubos de 25 ml de capacidad máxima cada uno y se sometieron a ultracentrifugación a 175.000 x g durante 70 minutos a 4°C.

Se emplearon el menor número de tubos posible por muestra para aumentar el rendimiento en la extracción. Descartado el sobrenadante, se resuspendió el precipitado del primer tubo en 50 µl de solución de aislamiento si se van a almacenar los exosomas sin lisar o, si es para utilizarlo directamente, en tampón de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% de CHAPS, Tris-HCl 30 mM). Esta suspensión se transfirió al segundo tubo para resuspender el segundo precipitado de exosomas y así sucesivamente, hasta resuspender los cuatro precipitados exosomales en un mismo volumen de aproximadamente 50 µl.

La solubilización del precipitado exosomal generalmente es complicado, debido a que el precipitado en ocasiones no se resuspende fácilmente en un volumen tan pequeño. Además, es necesario secar bien las paredes del tubo y eliminar completamente los residuos de orina. Para una correcta solubilización del precipitado, se pipetea la solución una y otra vez sobre el precipitado, tratando de tocar lo menos posible las paredes del tubo y realizándolo lentamente, intentando no formar espuma.

Los exosomas solubilizados en solución de aislamiento o buffer de lisis se congelaron a -80°C. La cuantificación de proteína se hizo mediante el ensayo de Bradford. En este caso, directamente se procederá a su procesamiento específico para su análisis por iTRAQ o SRM-LC-MS/MS como se detallará a continuación.

5. ESTUDIO ÓMICO DIFERENCIAL DE LA HTA Y DEL DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN PACIENTES CON SUPRESIÓN CRÓNICA DE SRA

5.1. ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE ORINA HUMANA POR 2D-DIGE DE MARCAJE MÍNIMO: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN PACIENTES HTA BAJO INHIBICIÓN DEL SRA QUE DESARROLLAN O NO ALBUMINURIA.

En este análisis por 2D-DIGE se utilizaron muestras de orina de un total de 15 pacientes y seis sujetos sanos (5-6 muestras individuales por grupo (C, N, dnA y MAM)). Todos los sujetos eran no diabéticos para evitar la diabetes como una patología de fondo que pudiera ser un factor de confusión en esta primera fase de descubrimiento.

La **tabla 2** recoge las características basales y la medicación de los pacientes incluidos en esta fase, que muestran grupos sin diferencias significativas en ninguna de las variables entre los grupos de pacientes, siendo comparables excepto en ACR, dada la propia definición de los grupos clínicos según desarrollen o no albuminuria (**Tabla 3** muestra la información de los controles).

Tabla 2. Características clínicas y medicación de los pacientes utilizados en el análisis por 2D-DIGE. Valores expresados como media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). Las diferencias estadísticas entre los tres grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo). IMC: Índice de masa corporal, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, eGFR: estimación de la tasa del filtrado glomerular, ACR: Ratio albúmina/creatinina, iECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA: antagonistas de los receptores de la angiotensina. N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

| Características basales | N (n=5) | dnA (n=5) | MAM (n=5) | p-valor |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| Edad (Años) | 58 \pm 7 | 58 \pm 7 | 62 \pm 5 | 0.463 |
| Sexo masculino, % | 60 | 60 | 60 | >0.999 |
| IMC (kg / m ²) | 30 \pm 3 | 29 \pm 1 | 28 \pm 4 | 0.650 |
| Fumar en la actualidad, % | 0 | 40 | 20 | 0.725 |
| Colesterol total (mg / dl) | 188 \pm 32 | 157 \pm 15 | 175 \pm 18 | 0.159 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 114 \pm 43 | 112 \pm 68 | 90 \pm 27 | 0.765 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 49 \pm 12 | 51 \pm 23 | 58 \pm 12 | 0.497 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 116 \pm 34 | 83 \pm 13 | 99 \pm 12 | 0.150 |
| Glucemia (mg / dl) | 91 \pm 11 | 101 \pm 7 | 92 \pm 8 | 0.190 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 5.6 \pm 1.7 | 6.1 \pm 1.8 | 4.6 \pm 1.2 | 0.330 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 87 \pm 24 | 112 \pm 61 | 89 \pm 28 | 0.876 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 83 \pm 10 | 87 \pm 28 | 88 \pm 17 | 0.536 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 132 \pm 16 | 138 \pm 8 | 126 \pm 15 | 0.390 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 84 \pm 14 | 83 \pm 10 | 81 \pm 7 | 0.869 |
| ACR (mg / g) | 3.8 \pm 1.7 | 74 \pm 33 | 75 \pm 90 | 0.001 |
| Diabetes Mellitus, % | 0 | 0 | 0 | >0.999 |
| Medicación | | | | |
| Antihipertensivos, % | | | | |
| iECAs | 0 | 0 | 40 | 0.286 |
| ARA | 100 | 100 | 60 | 0.286 |
| Diurético | 100 | 80 | 60 | 0.725 |
| Bloqueante de los canales de calcio | 40 | 20 | 40 | >0.999 |
| Agente bloqueante beta | 40 | 0 | 40 | 0.450 |
| Agente bloqueante alfa | 0 | 20 | 0 | >0.999 |
| Otros tratamientos, % | | | | |
| Agente anticoagulante | 0 | 20 | 20 | >0.999 |
| Agentes reductores de lípidos | 60 | 60 | 80 | >0.999 |
| Agente antidiabético | 0 | 0 | 0 | >0.999 |
| Antialdosterónicos | 0 | 20 | 0 | >0.999 |
| Hipouricémicos | 0 | 20 | 0 | >0.999 |

Tabla 3. Características basales de los controles utilizados en el análisis por 2D-DIGE. Valores expresados como media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). IMC: Índice de masa corporal, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, eGFR: estimación de la tasa del filtrado glomerular, ACR: Ratio albúmina/creatinina.

| Características basales | C (n=6) |
|---------------------------------------|--------------|
| Edad (Años) | 56 \pm 2 |
| Sexo masculino), % | 50 |
| IMC (kg / m ²) | 29 \pm 3 |
| Colesterol total (mg / dl) | 217 \pm 28 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 90 \pm 22 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 60 \pm 35 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 139 \pm 10 |
| Glucemia (mg / dl) | 83 \pm 7 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 4.4 \pm 1 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 104 \pm 10 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 86 \pm 16 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 139 \pm 23 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 82 \pm 8 |
| ACR (mg / g) | 4 \pm 2 |
| Diabetes Mellitus, % | 0 |
| Antihipertensivos, % | 0 |

Se llevó a cabo un análisis proteómico diferencial por electroforesis bidimensional empleando la técnica de DIGE mínimo (GE Healthcare) que permite el análisis de 50 μ g de proteína total por muestra (**figura 13**) como en nuestro caso.

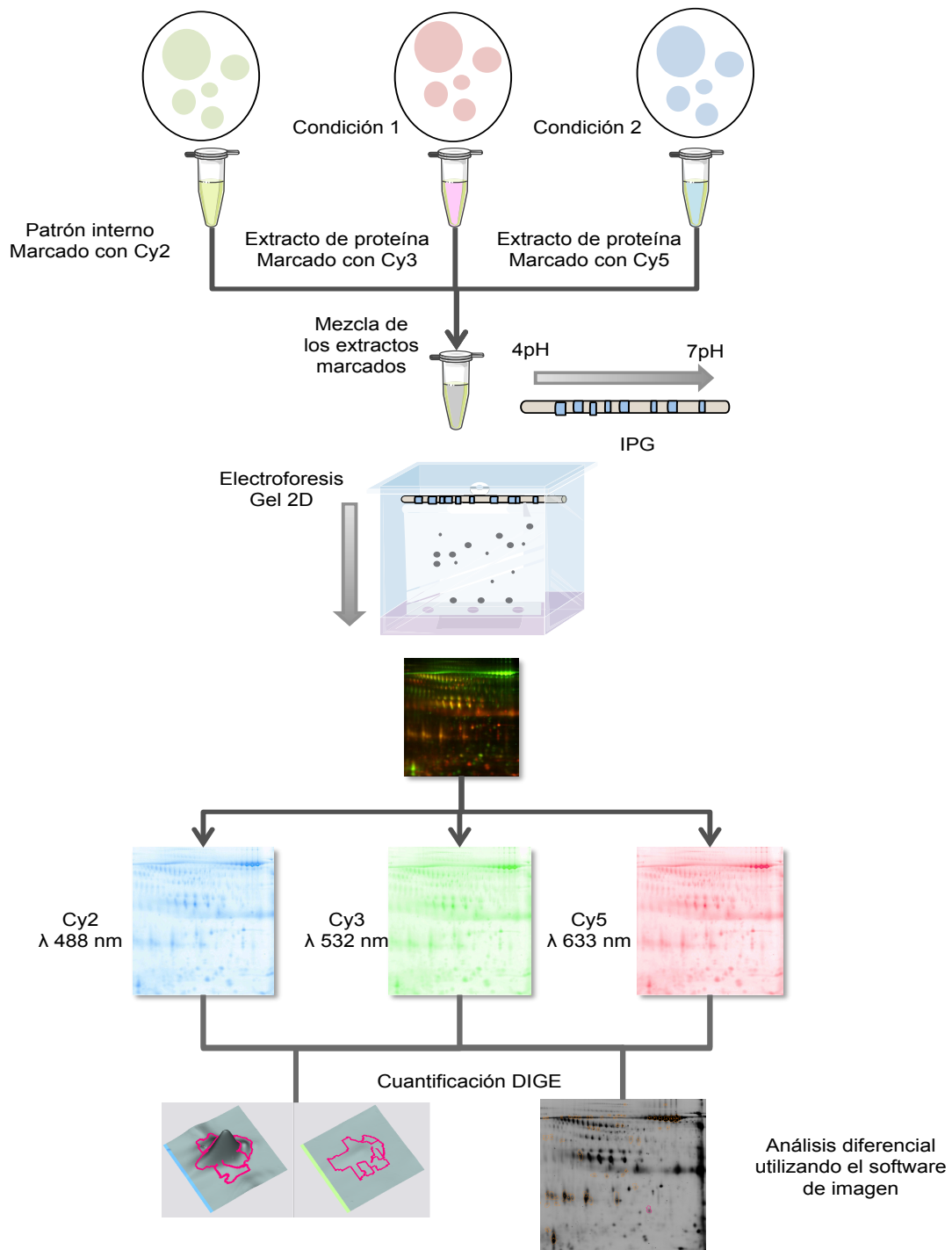


Figura 13. Representación esquemática de la técnica 2D-DIGE. La técnica DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) esta basada en el marcaje de las proteínas previo a la 2D con fluorocromos y en la separación de una mezcla de proteínas en dos dimensiones. En la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoeléctrico en una tira de poliacrilamida con un gradiente inmovilizado de pH. A continuación, la tira se coloca en la parte superior de un gel SDS-PAGE, y se separan las proteínas en base a su masa molecular (segunda dimensión). Por medio de un escáner de fluorescencia se visualizan los fluorocromos según su longitud de onda de emisión.

5.1.1. Marcaje de las muestras de orina.

Antes de llevar a cabo el isoelectroenfoque, es necesario marcar covalentemente las proteínas de las muestras con el fluorocromo correspondiente. Para ello, las muestras se resuspendieron en 50 μ l de tampón de lisis tras el paso de limpieza y desalinización como hemos visto en el apartado anterior. Para que la reacción de marcaje se produzca adecuadamente es necesario que el pH de las muestras se encuentre entre 8,0 y 9,0 por lo que, una vez resuspendidas en este tampón, se comprobó que el pH de cada muestra continuaba dentro de este rango. El pH se midió aplicando 1 μ l de cada muestra sobre papel indicador de pH (Merck) y se ajustó con disolución NaOH 1M cuando era necesario.

Los fluorocromos, se suministran como polvo sólido formando parte del kit DIGE (CyDye DIGE Fluor, minimal labeling kit (5nmol), GE Healthcare) y se reconstituyeron en dimetilformamida anhidra (Sigma-Aldrich), creando una solución madre a una concentración de 1mM. Para su utilización, la cantidad que se iba a emplear se diluyó (de nuevo en dimetilformamida) hasta la concentración de la solución de trabajo (400 pmol/ μ l). Se añadió a cada muestra, constituida por 50 μ g de proteína total, 1 μ l (400 pmol/50 μ g proteína) de la solución de trabajo del fluorocromo correspondiente (Cy3 ó Cy5 según el diseño experimental, **ver tabla 4**). Por otra parte se preparó una mezcla tomando una alícuota de todas las muestras del experimento (32 μ g de cada muestra) que fue marcada con Cy2. Esta mezcla se empleó como estándar interno ya que en ella están representadas todas las muestras y la cargaremos en cada uno de los geles del estudio. El diseño experimental incluyó 5 muestras por grupo de pacientes y 6 muestras control, marcadas de manera alterna con Cy3 o Cy5, para evitar un marcaje preferencial de uno de los grupos en caso de que uno de los fluorocromos diera lugar a un marcaje más eficiente, como se muestra en la siguiente **tabla 4**.

Tabla 4. Diseño experimental para el estudio comparativo por 2D-DIGE. C: controles, N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

| GEL | Cy3 | ul/50ug | Cy5 | ul/50ug | Cy2 | ul Pool 50ug |
|--------|-------|---------|-------|---------|------|--------------|
| GEL 1 | C-1 | 28,1 | N-3 | 23,2 | Pool | 20,7 |
| GEL 2 | C-2 | 17,6 | dnA-4 | 6,3 | Pool | 20,7 |
| GEL 3 | C-3 | 14,8 | MAM-3 | 14,4 | Pool | 20,7 |
| GEL 4 | N-1 | 34,4 | C-4 | 28,0 | Pool | 20,7 |
| GEL 5 | MAM-1 | 6,7 | C-5 | 22,2 | Pool | 20,7 |
| GEL 6 | dnA-1 | 7,3 | C-6 | 16,0 | Pool | 20,7 |
| GEL 7 | dnA-2 | 44,3 | MAM-4 | 8,2 | Pool | 20,7 |
| GEL 8 | dnA-3 | 9,9 | N-4 | 53,0 | Pool | 20,7 |
| GEL 9 | MAM-2 | 7,8 | N-5 | 32,3 | Pool | 20,7 |
| GEL 10 | N-2 | 62,3 | MAM-5 | 19,6 | Pool | 20,7 |
| GEL 11 | - | - | dnA-5 | 6,9 | Pool | 20,7 |

Una vez añadidos los fluorocromos, las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos para permitir la reacción de marcaje. Para detener la reacción se añadió 1 μ l de lisina 10 mM por cada 50 μ g de muestra y se volvieron a incubar las muestras en hielo durante 10 min. Todo

el proceso de incubación se llevó a cabo en oscuridad para evitar la degradación de los fluorocromos.

5.1.2. Electroforesis bidimensional.

Isoelectroenfoque (1ª dimensión)

Para llevar a cabo el isoelectroenfoque (IEF), se combinaron aleatoriamente una muestra marcada con Cy3 con una marcada con Cy5 y se añadió el volumen correspondiente a 50 µg del estándar interno marcado con Cy2. Se le añadió el volumen necesario hasta 450 µl de tampón IEF para obtener la composición final adecuada para el IEF (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, Tris-HCl 30 mM, anfolitos pH 4-7 1% (GE Healthcare), DTT 10mM y azul de bromofenol). Las muestras se cargaron empleando la técnica de “rehidratación en gel” con tiras IPG de pH 4-7 de 24 cm. Las tiras IPG y la muestra se cubrieron con aceite mineral para así evitar que estas se secasen durante el proceso.

El IEF se llevó a cabo en una fuente PROTEAN IEF CELL (BioRad) empleando el siguiente programa de enfoque: rehidratación a 50V 12h, subida rápida a 500 V durante 1h, de forma lineal a 3500V durante 3h, rápido a 3500V durante 3h, 5000 V rápido hasta que se acumularon 45000V/h totales. Ponemos un paso de seguridad a 500V durante 12h.

SDS-PAGE (2ª dimensión).

En un paso de equilibrado previo a la segunda dimensión, se trataron las tiras IPG durante 15 minutos con 1% DTT y 3,5% de yodoacetamida (IAA), sucesivamente, en tampón de equilibrado (Tris-Cl 1M pH 8,8, urea 6M, glicerol 40%, dodecil sulfato sódico SDS 2% en H₂O-MilliQ). La segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE de poliacrilamida al 14%, con cristales de baja fluorescencia en los que sólo se polimeriza el gel separador y la tira IPG se coloca directamente en contacto con la región superior de éste. Se llevó a cabo empleando el sistema EttanDalt Six System (GE Healthcare) a 1W durante toda la noche, con un pequeño aumento de voltaje al final.

En detalle, el gel separador empleado contenía un 14% de acrilamida/bisacrilamida (ProtoGel), Tris-HCl 1M pH 8,8, SDS al 10%, N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina (TEMED, BioRad), y una solución de persulfato amónico (APS, BioRad) al 10% preparada en el momento en H₂O-MilliQ. El tampón en el que se llevó a cabo la electroforesis está compuesto por Tris (Biorad) 0,03M, glicina (Biorad) 0,2M y SDS 0,1% (Biorad). En la cámara superior del sistema EttanDalt Six, el tampón con el que se llenó tenía el doble de concentración de tampón de electroforesis por lo tanto también de SDS lo que ayuda a que las proteínas pasen de la tira al gel de forma más eficiente.

5.1.3. Digitalización y análisis de las imágenes.

Las imágenes de los geles 2D-DIGE se digitalizaron empleando un escáner de fluorescencia (Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare). Se consiguieron las imágenes emitidas de cada fluorocromo por separado (aplicando las longitudes de onda de excitación y emisión específicas de cada fluorocromo, **figura 13**) con una resolución de 100 μm . Las imágenes fueron entonces importadas a los diferentes módulos del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare), versión 6.5, con el que se realizó el procesamiento y análisis estadístico de las mismas. Se realizó un test de ANOVA con los datos de expresión de cada mancha proteica.

La aplicación informática de análisis de imagen DeCyder consta de varios módulos: Image Loader, DIA (Differential In-gel Analysis), BVA (Biological Variation Analysis), EDA (Extended Data Analysis) y XML (Toolbox), cada uno de los cuales desempeña una función en el análisis de las imágenes digitalizadas de los geles 2D-DIGE.

Mediante el módulo “Image Loader”, se generó un proyecto en el que se incluyeron las imágenes de los geles, haciéndolas accesibles al resto de los módulos. A continuación, todos los mapas proteicos de un mismo proyecto se analizaron mediante el módulo “DIA (Differential In-gel Analysis)”, que detecta y cuantifica las manchas proteicas de las tres imágenes (Cy2, Cy3, Cy5) correspondientes a cada gel. El algoritmo que emplea este módulo para la detección de las manchas se basa en la co-detección de las tres señales fluorescentes (2 muestras y 1 control interno, mezcla de todas las muestras en estudio) y permite diferenciar las señales de manchas verdaderas de los artefactos del gel. Por su parte, la cuantificación se basa en el cálculo de las relaciones entre las señales fluorescentes Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2, lo que permite tener un valor de intensidad de fluorescencia normalizado para cada mancha. Una vez completada esta fase, los datos generados mediante DIA fueron importados al módulo “BVA (Biological Variation Analysis)”, que permite el emparejamiento de las manchas detectadas entre las imágenes de los diferentes geles del proyecto para obtener después datos estadísticos sobre los niveles de expresión de las manchas en los diferentes grupos de estudio. Se concluyó que existe variación cuando los niveles de expresión estaban variados en al menos $\pm 1,3$ veces y dicha variación se consideró estadísticamente significativa cuando se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95% ($p\text{-valor} < 0,05$) determinado por la prueba t-Student. Por último, los datos contenidos en los archivos generados por BVA se analizaron en el módulo “EDA (Extended Data Analysis)” que ofrece un análisis estadístico avanzado. Éste, se empleó para llevar a cabo el Análisis de Componentes Principales (PCA); es un método estadístico cuyo objetivo es la simplificación y reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos con numerosas variables [144], lo que trata de encontrar una serie de componentes capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de las variables originales. Así, se obtiene una imagen simplificada del conjunto de datos inicial, que resulta más sencilla a la hora de interpretarlos y puede usarse para ver la agrupación de los datos y encontrar valores atípicos dentro de los mismos.

5.1.4. Tinción de los geles y escisión de manchas proteicas.

Después de la digitalización, los geles del experimento se tiñeron con *PageBlue Protein Staining Solution* (Thermo) para poder cortar las manchas proteicas expresadas de manera diferencial e identificarlas.

Para llevar a cabo la tinción el gel se lavó durante 5 minutos con H₂O-MilliQ (tres lavados) se añadió después la tinción de Coomassie y se dejó tiñendo el gel durante toda la noche. Al día siguiente se destiñó el gel en H₂O-MilliQ (tantos lavados como fueran necesarios para tener un fondo limpio). Una vez teñido el gel, se procedió a la escisión de las manchas con expresión diferencialmente alterada.

5.1.5. Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF MS.

Las manchas proteicas de los geles fueron digeridas automáticamente empleando un Ettan Digester (GE Healthcare). El protocolo de digestión empleado fue descrito por Shevchenko et al. [145] con mínimas variaciones: los fragmentos de gel fueron sometidos a reducción empleando 10 mM de DTT en 50 mM de bicarbonato amónico y posterior alquilación con 50 mM de IAA en 50 mM de bicarbonato amónico, después se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM en metanol 50% (grado HPLC, Scharlau) y acetonitrilo 50% y se secaron en un Speedvac. A continuación, se añadió tripsina porcina modificada a una concentración de 20 ng/ul en bicarbonato amónico 20 mM para llevar a cabo la digestión a 37°C durante una noche. La extracción de los péptidos se realizó empleando acetonitrilo 60% y ácido trifluoroacético 0,5% (99,5% pureza; Sigma Aldrich).

Se depositó 0,5 µl de la solución de digestión en una placa 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI (Applied Biosystems). La misma cantidad de matriz con la muestra se aplicó en cada punto de la placa de MALDI (ácido α-ciano-4-hidroxi-cinámico (CHCA) (Sigma Aldrich) en 0,1% ácido trifluoroacético y 50% de acetonitrilo). Los espectros de MS y MS/MS se obtuvieron en un equipo 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems). Los espectros fueron adquiridos en modo reflector de ion positivo con un láser Nd: YAG, 350 nm de longitud de onda, a 200 Hz de frecuencia y se promediaron de 1000 a 2000 espectros.

Los experimentos fueron adquiridos de manera uniforme con intensidad de láser fija. Para el modo de análisis de MS/MS, los precursores fueron acelerados en la fuente 1 a 8 kV, seleccionados con una resolución relativa de 200 (FWHM) y supresión metaestable. Los iones fragmento generados por colisión con el aire en una cámara CID fueron acelerados hasta 15kV en la fuente 2. Para el análisis automático de los espectros de masa obtenidos se empleó el paquete informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (Applied Biosystems). La calibración interna de espectros de masas del MALDI-TOF se llevó a cabo empleando dos iones resultantes de la autodigestión de la tripsina, con una relación masa carga (m/z), m/z=843,510 y m/z=2211,105. Para las calibraciones de MALDI-MS/MS se emplearon espectros de iones fragmento obtenidos para Glub-fibrinopéptido (4700 Cal Mix, Applied

Biosystems). Los datos de MS y MS/MS fueron combinados mediante el paquete informático GPS Explorer Software versión 3.6 (Applied Biosystems); así, se realizó una búsqueda frente a una base de datos de proteínas no redundante (NCBIInr o SwissProt) empleando Mascot versión 2.2 (Matrix Science) [146], con una tolerancia de precursor de 50 ppm, una tolerancia de masa 0,6 Da en los fragmentos de MS/MS y permitiendo la presencia máxima de un único punto de corte fallido. Los espectros de MS y MS/MS y los resultados de las búsquedas fueron inspeccionados en detalle manualmente empleando los paquetes informáticos antes comentados. Las identificaciones, en base a espectros de fragmentación (MS/MS), fueron aceptadas cuando su intervalo de confianza (C.I.%), proporcionado por el programa GPS era mayor o igual a 95%. La puntuación obtenida a partir de los distintos buscadores no puede ser directamente comparada; por este motivo el programa GPS calcula este C.I.%, que permite combinar los resultados de la búsqueda en las distintas bases de datos realizadas para los fragmentos de MS y MS/MS. Este valor de C.I.% indica que la probabilidad de que la identidad de la secuencia sea un suceso casual es menor al 5%. Para el espectro de huella peptídica (MS), las identificaciones fueron aceptadas cuando el C.I.% proporcionadas por el programa GPS era igual a 99% o mayor. La puntuación de probabilidad de las proteínas identificadas, era mayor que el fijado por Mascot como significativas, es decir, un valor de p menor de 0,05.

5.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA EXOSOMALES EN HIPERTENSOS BAJO SUPRESIÓN CRÓNICA del SRA: ANÁLISIS DIFERENCIAL iTRAQ

Un total de 23 sujetos no diabéticos fueron reclutados para el análisis diferencial cuantitativo del proteoma exosomal por LC-MS/MS (ver **tabla 5** y **tabla 6**). La **tabla 6** recoge las características basales de esta cohorte de descubrimiento además de mostrar la información adicional de la medicación de los pacientes. Los tres grupos son comparables con la diferencia marginal para la glucemia y el ACR siendo esta variable lo que da la diferencia entre los grupos. El análisis se realizó por medio de marcaje con etiquetas isobáricas para experimentos de cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ, 8-plex), incluyendo dos repeticiones biológicas por condición (C, N, dnA, MAM).

Tabla 5. Diseño experimental para el estudio comparativo de proteínas exosomales de orina por iTRAQ. Se realizaron pooles según los grupos; C: control, N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

| Muestra | ul totales/pool | ug/muestra | ug totales/pool | POOL |
|------------------|------------------------|-------------------|------------------------|------------------|
| C1 | | 50 | | |
| C2 | 19.86 | 50 | 100 | Pool-C1 |
| C3+C4 | | 50 | | |
| C5 | 42.82 | 50 | 100 | Pool-C2 |
| N1 | | 33.3 | | |
| N2 | 18.68 | 33.3 | 100 | Pool-N1 |
| N3 | | 33.3 | | |
| N4 | | 33.3 | | |
| N5 | 18.38 | 33.3 | 100 | Pool-N2 |
| N6 | | 33.3 | | |
| dnA1+dnA2 | | 33.3 | | |
| dnA3 | 26.70 | 33.3 | 100 | Pool-dnA1 |
| dnA4 | | 33.3 | | |
| dnA5 | | 50 | | |
| dnA6 | 16.87 | 50 | 100 | Pool-dnA2 |
| MAM1 | | 33.3 | | |
| MAM2 | 14.24 | 33.3 | 100 | Pool-MAM1 |
| MAM3 | | 33.3 | | |
| MAM4 | | 33.3 | | |
| MAM5 | 8.98 | 33.3 | 100 | Pool-MAM2 |
| MAM6 | | 33.3 | | |

Tabla 6. Características clínicas y medicación de los pacientes utilizados en el análisis por iTRAQ. Valores expresados como media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). Las diferencias estadísticas entre los tres grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo). IMC: Índice de masa corporal, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, eGFR: estimación de la tasa del filtrado glomerular, ACR: Ratio albúmina/creatinina, IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA: antagonistas de los receptores de la angiotensina. N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida. Los controles fueron elegidos sin valores clínicos patológicos, posteriormente todas las muestras se incluyeron en el estudio por SRM-LC-MS/MS.

| Características basales | N (n=6) | dnA (n=6) | MAM (n=6) | p-valor |
|--|---------------|---------------|---------------|----------|
| Edad (Años) | 59 \pm 10 | 64 \pm 5 | 61 \pm 5 | 0,409 |
| Colesterol total (mg / dl) | 208 \pm 4 | 166 \pm 13 | 177 \pm 19 | 0,233 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 122 \pm 31 | 116 \pm 65 | 113 \pm 47 | 0,66 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 52 \pm 13 | 52 \pm 26 | 50 \pm 11 | 0,666 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 132 \pm 42 | 88 \pm 9 | 106 \pm 18 | 0,066 |
| Glucemia (mg / dl) | 105 \pm 6 | 99 \pm 12 | 92 \pm 5 | 0,024* |
| Ácido úrico (mg / dl) | 4,7 \pm 2,7 | 5,9 \pm 1,8 | 5,6 \pm 1,8 | 0,739 |
| eGFR (ml / min / 1,73m²) | 87 \pm 14 | 88 \pm 9 | 79 \pm 24 | 0,894 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 142 \pm 15 | 134 \pm 9 | 132 \pm 15 | 0,352 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 87 \pm 14 | 79 \pm 10 | 81 \pm 12 | 0,625 |
| ACR (mg / g) | 5 \pm 2 | 67 \pm 36 | 108 \pm 112 | 0,002** |
| Medications | | | | |
| Antihipertensivos, % | | | | |
| iECAs | 17 | 17 | 33 | > 0,9999 |
| ARA | 83 | 83 | 67 | > 0,9999 |
| Diurético | 50 | 33 | 50 | > 0,9999 |
| Bloqueante de los canales de calcio | 33 | 33 | 50 | > 0,9999 |
| Agente bloqueante beta | 17 | 17 | 50 | 0,527 |
| Otros tratamientos, % | | | | |
| Agente anticoagulante | 33 | 50 | 17 | 0,818 |
| Agentes reductores de lípidos | 83 | 67 | 100 | 0,735 |
| Agente antidiabético | 0 | 0 | 0 | > 0,9999 |
| Antialdosterónicos | 50 | 16 | 17 | 0,527 |
| Hipouricémicos | 0 | 0 | 0 | > 0,9999 |

El análisis se realizó en un espectrómetro de masas Orbitrap Elite (Termo-Fisher). La técnica con marcaje isobárico iTRAQ fue la elegida para llevar a cabo el análisis cuantitativo ya que es una técnica que permite el análisis diferencial cuantitativo por espectrometría de masas. Esto tiene como principales ventajas una mayor sensibilidad y poder de resolución, lo que permite aumentar el número de proteínas identificadas, y disminuir el límite de detección. Además el marcaje de múltiples péptidos por proteína aumenta la confianza en la identificación y cuantificación.

5.2.1. Concentración en SDS-PAGE, digestión triptica y marcaje isobárico

Las exosomas aislados por ultracentrifugación se lisaron como se detalla en el apartado 4. El esquema de análisis por iTRAQ se resume en la **figura 14**, donde 100 µg de proteína total de cada réplica biológica (dos por grupo) se cargaron en un gel SDS-PAGE. La electroforesis se realizó hasta que las muestras superaron el gel concentrador y alcanzaron el gel separador. En ese momento se paró la electroforesis y se tiñó el gel con Coomassie coloidal. De este modo todas las proteínas se concentran en una única banda que se recortará, se digerirá y se marcará tal y como se detalla a continuación en su totalidad.

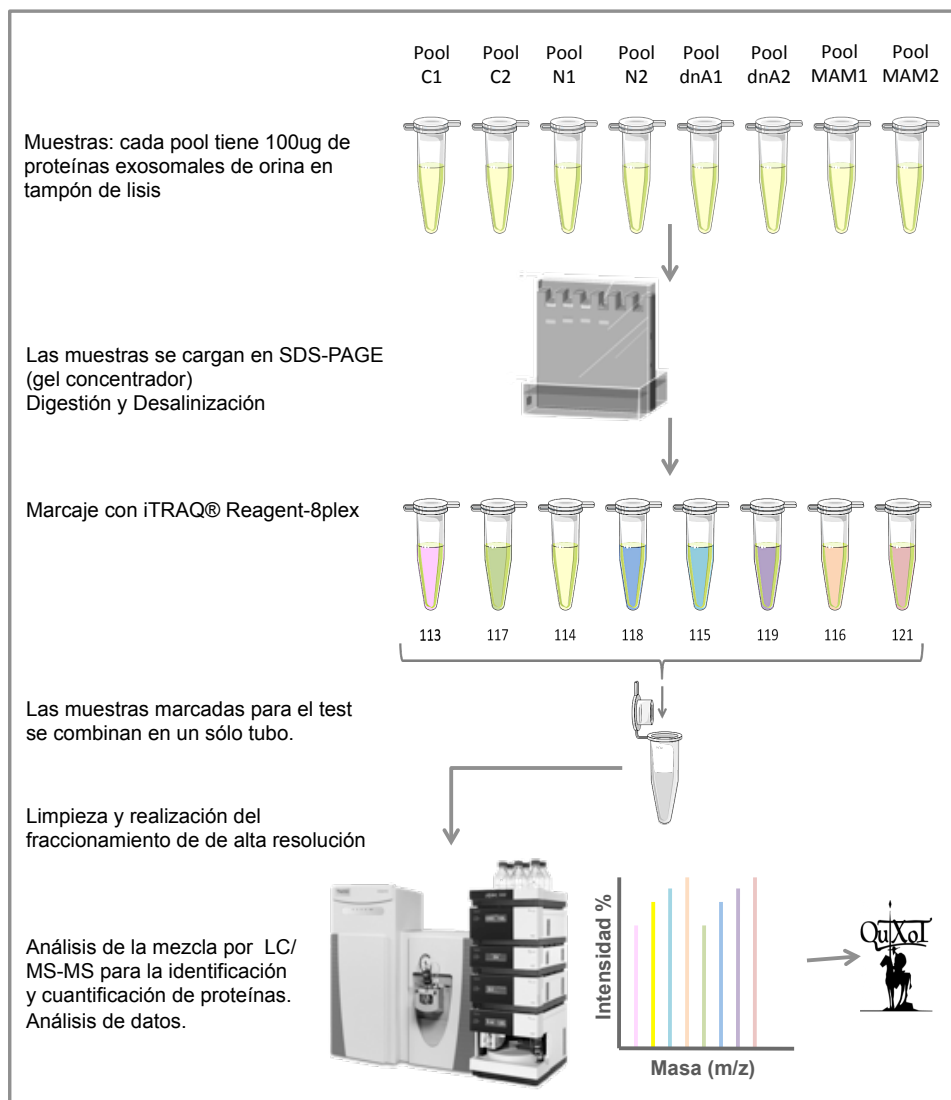


Figura 14. Workflow de experimentación y diseño experimental para el etiquetado iTRAQ. Cada grupo está compuesto por 2-4 muestras individuales. Dos repeticiones biológicas se analizaron por condición (C, N, dnA, MAM).

Tras la reducción de los puentes disulfuro con 10mM DTT y la posterior alquilación con 50mM IAA se llevó a cabo la digestión con 60 ng/ml tripsina porcina modificada (Promega) durante toda la noche a 37°C, en bicarbonato amónico 50 mM (grado HPLC, Scharlau), pH

8,5. Para parar la reacción se empleó 1 μ l de ácido trifluoroacético (Merck). Se recogió la disolución y se llevó a un tubo limpio para llevar a sequedad en un SpeedVac (Thermo-Fisher). La mezcla peptídica se disolvió en ácido acético (Merck) (1% en H₂O destilada), para el análisis LC-MS/MS. Los péptidos tripticos resultantes se desalinizaron en cartuchos C18 Oasis-HLB y se secaron para su posterior análisis. Para el marcaje isobárico estable, los péptidos tripticos resultantes se disolvieron en tampón de bicarbonato de trietilamonio (TEAB), y la concentración de péptido se midió en el sistema de detección directa (Millipore). Cantidades iguales, previamente ajustadas, de cada muestra de péptido se marcaron usando el kit de reactivos iTRAQ Multiplex 8-plex (Applied Biosystems) según el protocolo del fabricante. Se prepara el reactivo iTRAQ® - 8plex añadiendo 50 μ l de isopropanol a cada vial a temperatura ambiente y se transfiere el contenido del reactivo recién preparado a un tubo con la muestra digerida. Y así sucesivamente añadiendo cada marca al pool de muestras correspondiente. Se comprueba el pH y si es necesario, añadir hasta 5 μ l de disolución tamponante para ajustar el pH a 8,5 (mantener la concentración orgánica en un mínimo de 60%) para un marcaje óptimo. Incubamos los tubos a temperatura ambiente durante 2 horas y finalmente combinamos el contenido de los tubos con las muestras marcadas con los reactivos iTRAQ®-8plex en un único tubo.

Las muestras se concentraron por SpeedVac, se limpiaron en cartuchos C18 Oasis-HLB y se secaron para su posterior análisis. Para aumentar la cobertura del proteoma, las muestras marcadas se fraccionaron por cromatografía de intercambio de cationes mixtos (columnas Oasis HLB-MCX) en seis fracciones para su posterior análisis.

5.2.2. Identificación y análisis diferencial cuantitativo de proteínas por SRM-LC-MS/MS

Los péptidos marcados se analizaron por LC-MS/MS usando una nano-columna C-18 de fase reversa (75 μ m de diámetro interno x 50 cm de longitud, partículas de 2 μ m de tamaño, Acclaim PepMap RSLC, 100 C18; Thermo Fisher Scientific) en un gradiente continuo de acetonitrilo que consiste en 0-30% de B en 360 min, 50-90% de B en 3 min (A = ácido 0,5% fórmico; B = 90% de acetonitrilo, 0,5% de ácido fórmico). Se utilizó una velocidad de flujo de 200 nL/min para eluir los péptidos de la nano-columna a una aguja de “*nano-spray*” emisora para la ionización en tiempo real y la fragmentación del péptido en un espectrómetro de masas Orbitrap Elite (Thermo Fisher). A lo largo de la carrera cromatográfica se adquirieron espectros de resolución mejorada mediante transformada de Fourier (resolución=70.000) y los espectros de MS/MS de los 15 iones precursores de mayor intensidad. La exclusión dinámica se fijó en 40 segundos. Para la identificación de las proteínas, se lanzaron búsquedas con los espectros de fragmentación en SEQUESTTM (Thermo Fisher Scientific), empleando el paquete informático Proteome Discoverer (versión 1.4.0.29, Thermo Fisher Scientific).

Para la búsqueda en la base de datos Uniprot, (06 de marzo de 2013; 70024 entradas), se seleccionaron los parámetros de búsqueda de la siguiente manera: digestión con tripsina con 2 sitios de escisión perdidos como máximo, tolerancias de 2 Da y 0,02 Da de masa de

precursores y fragmentos respectivamente, carbamidometil cisteína, modificaciones del iTRAQ en los residuos N-terminal y Lys como modificaciones fijas, y oxidación de metionina como modificación dinámica.

La identificación de péptidos se validó utilizando el método por tasa de probabilidades [147]; la tasa de falsos-positivos (false discovery rate, FDR) se calculó utilizando las bases de datos invertidas, y el método de refinado [148] con un filtrado adicional para precursor de tolerancia de masa de 15 ppm [149].

La cuantificación diferencial de proteínas según intensidades del ion reportero y el análisis estadístico de los datos cuantitativos para identificar proteínas significativamente alteradas se realizaron utilizando QuiXoT, basado en un modelo estadístico descrito previamente [150].

Hemos aplicado criterios estrictos, considerando proteínas expresadas diferencialmente, aquellas identificadas con más de tres péptidos, y log₂-ratios expresados en forma de las variables estandarizadas (Z_q) ≥ 1.4 (valor absoluto) con p-valor $\leq 0,05$, siendo Z_q la media de las dos réplicas en comparación con el grupo control.

5.2.3. Análisis de Datos y Biología de Sistemas

Las proteínas identificadas fueron comparadas con la base de datos ExoCarta, un repositorio que comprende proteínas previamente identificadas en exosomas [151]. La expresión y la localización de las proteínas en el túbulo renal y glomérulo fueron asignados por medio de *Human Protein Atlas* [152] y por la literatura. Las bases de datos PANTHER (análisis de proteínas a través de la base de datos de relaciones evolutivas) [153] y DAVID (versión 6.7) [154], se utilizaron para la clasificación funcional de las proteínas. El análisis de redes entre las proteínas significativamente alteradas se llevó a cabo mediante el software STRING 9.0 (puntuación mínima requerida de interacción: confianza más alta, y herramienta de agrupación MCL) [155].

5.3. ANÁLISIS METABOLÓMICO DE LA ORINA POR RMN

La primera fase de análisis se llevó a cabo en una cohorte de 50 pacientes hipertensos (17 diabéticos y 33 no diabéticos) (ver tabla 7) y 14 controles (ver tabla 8). Las tablas 7 y 8 recogen las características basales de esta cohorte de descubrimiento además de mostrar la información adicional de la medicación de los pacientes. Los tres grupos son comparables con las diferencias marginales para el colesterol total, el colesterol LDL, el ácido úrico y ACR siendo la variable que permite la separación de los grupos de pacientes.

Tabla 7. Características clínicas y medicación de los pacientes utilizados en el análisis por RMN. Valores expresados como media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). Las diferencias estadísticas entre los tres grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo). IMC: Índice de masa corporal, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, eGFR: estimación de la tasa del filtrado glomerular, ACR: Ratio albúmina/creatinina, IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA: antagonistas de los receptores de la angiotensina. N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

| Baseline characteristics | N (n=17) | dnA (n=18) | MAM (n=15) | p-valor |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| Edad (Años) | 61 \pm 4 | 66 \pm 6 | 65 \pm 8 | 0.023 |
| Sexo masculino), % | 47 | 67 | 60 | 0.499 |
| IMC (kg / m ²) | 29 \pm 4 | 29 \pm 5 | 32 \pm 5 | 0.219 |
| Fumar en la actualidad,% | 12 | 22 | 20 | 0.707 |
| Colesterol total (mg / dl) | 193 \pm 31 | 162 \pm 21 | 164 \pm 23 | 0.005 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 114 \pm 53 | 124 \pm 62 | 121 \pm 86 | 0.886 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 52 \pm 9 | 52 \pm 12 | 45 \pm 13 | 0.183 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 118 \pm 28 | 84 \pm 14 | 98 \pm 19 | 0.001 |
| Glucemia (mg / dl) | 106 \pm 25 | 122 \pm 28 | 109 \pm 24 | 0.066 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 4.6 \pm 1.6 | 6.1 \pm 1.7 | 5.9 \pm 1.6 | 0.032 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 95 \pm 28 | 92 \pm 53 | 91 \pm 35 | 0.691 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 81 \pm 10 | 72 \pm 20 | 74 \pm 24 | 0.551 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 135 \pm 16 | 132 \pm 16 | 134 \pm 16 | 0.968 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 83 \pm 11 | 80 \pm 12 | 81 \pm 9 | 0.676 |
| ACR (mg / g) | 7 \pm 9 | 230 \pm 404 | 215 \pm 379 | <0.0001 |
| Diabetes mellitus, % | 18 | 50 | 33 | 0.1015 |
| Medications | | | | |
| Antihipertensivos,% | | | | |
| iECAs | 24 | 22 | 13 | 0.7436 |
| ARA | 59 | 67 | 73 | 0.7967 |
| Diurético | 59 | 44 | 53 | 0.696 |
| Bloqueante de los canales de calcio | 35 | 50 | 60 | 0.3765 |
| Agente bloqueante beta | 12 | 33 | 40 | 0.1758 |
| Agente bloqueante alfa | 12 | 33 | 20 | 0.3055 |
| Otros tratamientos,% | | | | |
| Agente anticoagulante | 12 | 44 | 33 | 0.1071 |
| Agentes reductores de lípidos | 77 | 78 | 67 | 0.7428 |
| Agente antidiabético | 18 | 44 | 33 | 0.2411 |
| Antialdosterónicos | 6 | 17 | 27 | 0.2838 |

Tabla 8. Características clínicas de los controles utilizados en el análisis por RMN. Valores expresados como media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). IMC: Índice de masa corporal, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, eGFR: estimación de la tasa del filtrado glomerular, ACR: Ratio albúmina/creatinina.

| Baseline characteristics | C (n=14) |
|---------------------------------------|---------------|
| Edad (Años) | 54 \pm 3 |
| Sexo masculino), % | 50 |
| IMC (kg / m ²) | 26 \pm 4 |
| Fumar en la actualidad,% | |
| Colesterol total (mg / dl) | 213 \pm 24 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 96 \pm 42 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 60 \pm 22 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 134 \pm 27 |
| Glucemia (mg / dl) | 78 \pm 9 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 4.6 \pm 1.3 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 105 \pm 18 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 88 \pm 10 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 128 \pm 20 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 83 \pm 13 |
| ACR (mg / g) | 5 \pm 2 |
| Diabetes Mellitus,% | 0 |
| Antihypertensives, % | 0 |

5.3.1. Análisis 1H RMN. Identificación de alteraciones en orina en respuesta a HTA y desarrollo de albuminuria en individuos con tratamiento crónico de inhibición del SRA

El análisis de muestras de orina por RMN no precisa de tratamiento previo. Las muestras congeladas se descongelaron a 37°C y 300 μ l se diluyeron (1:1) con 300 μ l de solución tampón con 200 mM de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ en agua deuterada (D₂O 99,9% MerK), a pH 7,0 y 1% trimetilsilil propionato de sodio (TSP) (solución final a 0,01 mM, como referencia interna para la calibración espectros) (**figura 15**).

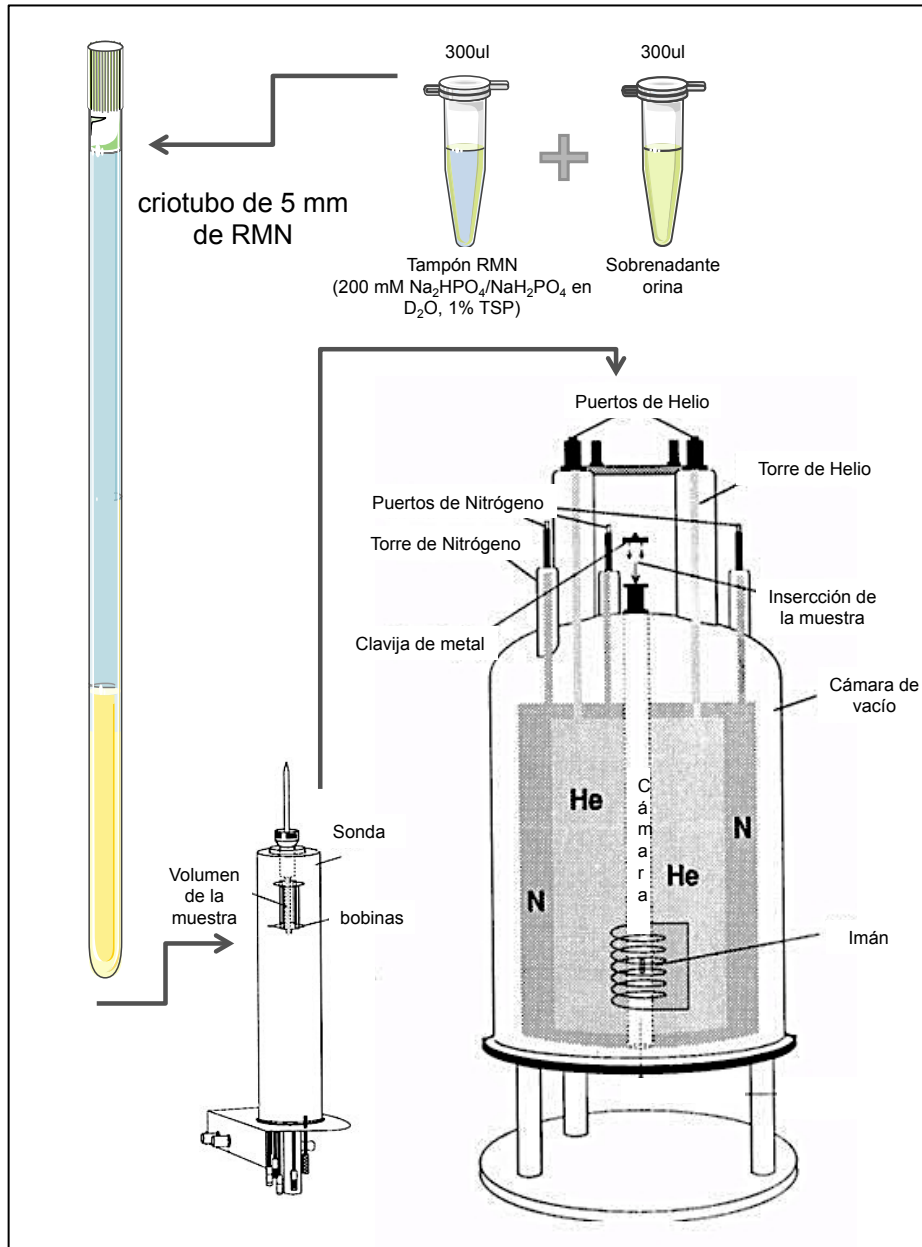


Figura 15. Representación esquemática de la técnica RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de orina. El sobrenadante de orina se debe diluir 1:1 con un tampón fosfato adecuado para la medición, además de tener un compuesto de referencia (TSP) para poder ajustar los espectros del experimento por igual en todas las muestras.

La adición de tampón fosfato permite compensar pequeñas variaciones en los desplazamientos químicos (δ) de metabolitos particulares como alanina, tirosina, citrato, o creatinina [156] por pequeñas diferencias de pH de las orinas. Seguidamente, se centrifugaron (13.000 rpm, 1 min), y la muestra se transfirió a un criotubo de cristal de RMN de 5 mm de diámetro.

Todos los experimentos de RMN se realizaron a 277K en un instrumento Bruker AVANCE 700 III equipado con bobina de gradiente z blindado que opera a la frecuencia de resonancia 700.17MHz ¹H en un criotubo de 5 mm. Los espectros RMN ¹H se midieron con 256

exploraciones en 32 K puntos de datos en una anchura espectral de 8417,51 Hz, lo que resulta en un tiempo de adquisición de 1,94 s. Un retraso de relajación de 2s aseguró la relajación-T1 entre exploraciones sucesivas.

La señal del disolvente fue suprimida por el uso de secuencia de pulsos noesypr1d (Bruker Biospin), en el que se irradia el pico de agua residual durante el retraso de relajación y durante el tiempo de mezcla de 150 ms. Todos los espectros fueron procesados mediante TOPSPIN (versión 1.3, Bruker Biospin). Antes de la transformada de Fourier, las FID se multiplicaron por una función de peso exponencial que corresponde a una ampliación de la línea de 0,3 Hz. Los espectros fueron organizados, corregidos en la base, y referenciados al singlete trimetilsilil propionato de sodio (TSP) en δ 0 ppm.

Los datos de los espectros de ^1H RMN se ajustaron usando el programa de software AMIX (Analysis of MIXtures versión 3.6.8, Bruker). Regiones integrales individuales se normalizaron a la suma total de la región integral (intensidad total del espectro), seguido de la exclusión de la resonancia del agua. Cada espectro en la región 10-0,1 ppm. fue dividido en pequeñas regiones espectrales de 0,04 ppm (*buckets*) antes del análisis estadístico, lo que reduce el número de variables totales y compensa las pequeñas desviaciones en los espectros. Así, se generó una tabla de “*buckets*” para cada muestra. La distribución de cada variable del bucket sobre el conjunto de espectros se evaluó y se seleccionaron los valores de desplazamiento químico de las estadísticas de *loading plot* y de *buckets* en función de su aparente respuesta a la hipertensión y a la albuminuria.

5.3.2. Identificación de metabolitos mediante RMN bidimensional (RMN 2D)

Para la asignación inequívoca de los desplazamientos químicos seleccionados a los metabolitos correspondientes, los espectros de un pool de muestras previamente analizadas con señales intensas fueron analizados por ACD/NMR Processor Academic Edition (Versión 12.01, Advance Chemistry Development Inc) utilizando el “*peak peaking*” para etiquetar el desplazamiento químico exacto de cada pico. Comparándolo con los desplazamientos químicos alterados que previamente seleccionamos, obtuvimos una lista de valores (ppm) resultantes, que a través de la base de datos *Metabohunter*, pudimos relacionar con una lista de metabolitos posibles según los datos de desplazamiento químico e intensidad obtenidos experimentalmente y teniendo como referencia los datos de *Human Metabolome Data Base* (HMDB) donde podemos ver la espectroscopía teórica de cada metabolito [157]. Para el análisis de orina por 2D-RMN que nos permitiera identificar los metabolitos de interés, se realizaron *pooles* de referencia a partir de muestras de orina de sanos y de individuos con HTA seleccionando aquellas muestras que su 1D-RMN dieran espectros con señales abundantes. Los metabolitos fueron identificados por los siguientes datos experimentales de 2D-RMN: espectroscopía correlación homonuclear (COSY) 1H-1H a un átomo de distancia, espectroscopía de correlación total (TOCSY) entre H a 1, 2 ó 3 átomos de distancia, incluyendo algún heteroátomo, es decir, N, P...y espectroscopía de correlación *single-quantum* heteronuclear (HSQC 1H-13C), entre el C y el H que estén unidos.

Adicionalmente, los metabolitos se midieron en una cohorte independiente por un enfoque basado en la espectrometría de masas cuantitativa, como se describe en la siguiente sección.

5.4. CONFIRMACIÓN DE LAS VARIACIONES IDENTIFICADAS (PROTEÍNAS Y METABOLITOS) EN ORINA Y EXOSOMAS

La metodología “*selected reaction monitoring*” (SRM) resulta idónea por su poder de resolución, especificidad y sensibilidad en la cuantificación dirigida de proteínas y metabolitos de interés. Fue elegida técnica del año 2012 por *Nature Methos* [158] y previamente en nuestro grupo ha sido ampliamente utilizada en la confirmación de dianas moleculares de interés [70], [74].

5.4.1. Análisis Dirigido por SRM-LC-MS de las Proteínas Identificadas en Orina Global

Para el análisis por SRM-LC-MS/MS en orina completa, se recogieron muestras de orina de una cohorte de individuos diferente a la utilizada en la fase inicial, compuesta en este caso por 90 pacientes (39 diabéticos y 51 no diabéticos) y 18 sujetos sanos. La **tablas 9 y 10** recoge las características basales de esta cohorte de confirmación además de mostrar la información adicional de la medicación de los pacientes. Los tres grupos son comparables con las diferencias marginales para el colesterol total, el colesterol HDL y el ácido úrico. De 37 pacientes normoalbuminúricos se evaluó su progresión (evolución clínicamente en cuanto a potencial incremento en ACR).

Tabla 9. Características clínicas y medicación de los pacientes de referencia utilizados como cohorte de confirmación (SRM-LC-MS/MS). Valores expresados como media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). Las diferencias estadísticas entre los tres grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo). IMC: Índice de masa corporal, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, eGFR: estimación de la tasa del filtrado glomerular, ACR: Ratio albúmina/creatinina, IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA: antagonistas de los receptores de la angiotensina. N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

| Características basales | N (n=47) | dnA (n=20) | MAM (n=23) | p-valor |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| Edad (Años) | 65 \pm 11 | 69 \pm 7 | 65 \pm 12 | 0.382 |
| Sexo masculino, % | 34 | 70 | 61 | 0.012 |
| IMC (kg / m ²) | 31 \pm 5 | 30 \pm 4 | 31 \pm 5 | 0.796 |
| Fumar en la actualidad, % | 13 | 15 | 13 | 0.969 |
| Colesterol total (mg / dl) | 186 \pm 29 | 166 \pm 27 | 170 \pm 31 | 0.035 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 119 \pm 53 | 130 \pm 70 | 139 \pm 74 | 0.488 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 56 \pm 13 | 51 \pm 9 | 44 \pm 12 | 0.0003 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 106 \pm 28 | 90 \pm 19 | 100 \pm 24 | 0.088 |
| Glucemia (mg / dl) | 118 \pm 42 | 123 \pm 26 | 119 \pm 34 | 0.387 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 4.9 \pm 1.5 | 6.3 \pm 1.5 | 6.9 \pm 1.7 | <0.0001 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 101 \pm 40 | 97 \pm 47 | 76 \pm 41 | 0.138 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 81 \pm 18 | 68 \pm 19 | 64 \pm 29 | 0.024 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 138 \pm 18 | 139 \pm 22 | 140 \pm 28 | 0.975 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 81 \pm 11 | 81 \pm 11 | 82 \pm 17 | 0.993 |
| ACR (mg / g) | 11 \pm 13 | 211 \pm 388 | 662 \pm 910 | <0.0001 |
| Diabetes Mellitus, % | 32 | 60 | 52 | 0.066 |
| Medicación | | | | |
| Antihipertensivos, % | | | | |
| iECAs | 17 | 15 | 13 | 0.909 |
| ARA | 77 | 70 | 74 | 0.851 |
| Diurético | 49 | 45 | 56 | 0.738 |
| Bloqueante de los canales de calcio | 62 | 55 | 74 | 0.418 |
| Agente bloqueante beta | 26 | 30 | 26 | 0.929 |
| Agente bloqueante alfa | 15 | 35 | 26 | 0.173 |
| Otros tratamientos, % | | | | |
| Agente anticoagulante | 38 | 40 | 30 | 0.768 |
| Agentes reductores de lípidos | 79 | 65 | 78 | 0.464 |
| Agente antidiabético | 26 | 40 | 39 | 0.368 |
| Antialdosterónicos | 19 | 10 | 17 | 0.654 |
| Hipouricémicos | 6 | 20 | 22 | 0.129 |

Tabla 10. Características basales de los controles utilizados en la cohorte de confirmación (SRM-LC-MS/MS). Valores expresados como media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). IMC: Índice de masa corporal, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, eGFR: estimación de la tasa del filtrado glomerular, ACR: Ratio albumina/creatinina.

| Características basales | C (n=18) |
|---------------------------------------|---------------|
| Edad (Años) | 54 \pm 3 |
| Sexo masculino), % | 30 |
| IMC (kg / m ²) | 25 \pm 5 |
| Colesterol total (mg / dl) | 212 \pm 24 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 99 \pm 44 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 61 \pm 14 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 163 \pm 103 |
| Glucemia (mg / dl) | 81 \pm 11 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 4.6 \pm 1.3 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 98 \pm 17 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 89 \pm 8 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 118 \pm 17 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 84 \pm 21 |
| ACR (mg / g) | 7 \pm 5 |
| Diabetes Mellitus,% | 0 |
| Antihipertensivos, % | 0 |

Esta técnica se basa en el análisis por espectrometría de masas, empleando un equipo que permite una previa selección de las transiciones específicas (precursor \rightarrow fragmento) asociadas a los péptidos de las proteínas de interés, que permite que éstas sean detectadas y cuantificadas (**figura 16**).

Las transiciones teóricas se diseñaron empleando Skyline (v.1.1.0.2905) [159] y se revisaron manualmente. La especificidad de los péptidos para una proteína se confirmó mediante el uso del programa Blast® (Basic Local Alignment search tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se seleccionaron los péptidos proteotípicos para la medición.

En el análisis por SRM-LC-MS/MS, las muestras de orina individuales con un contenido de 30 μ g de proteína total, se concentraron y se pasaron por columnas de desalinización (Thermo®) como se ha descrito anteriormente. Las proteínas reducidas con DTT 10mM (30 minutos, 37°C, en agitación), alquiladas con IAA 55mM (15 minutos, 37°C, oscuridad y agitación) y diluidas en 50mM de bicarbonato amónico para reducir la concentración de urea de las muestras a 2M y digeridas con tripsina modificada en un ratio 1 μ g:25 μ g (tripsina:proteína) toda la noche a 37°C en oscuridad. La reacción de digestión se detuvo mediante la adición de 1 μ l de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla de péptidos trópicos obtenida se sometió a un proceso de limpieza con unas columnas C18 (“spin columns”) (Protea Bioesciences) siguiendo el protocolo comercial. La muestra se diluyó (1:1) en fase móvil A (ácido fórmico 0,1% en H₂O-MilliQ) para su inyección directa en el equipo.

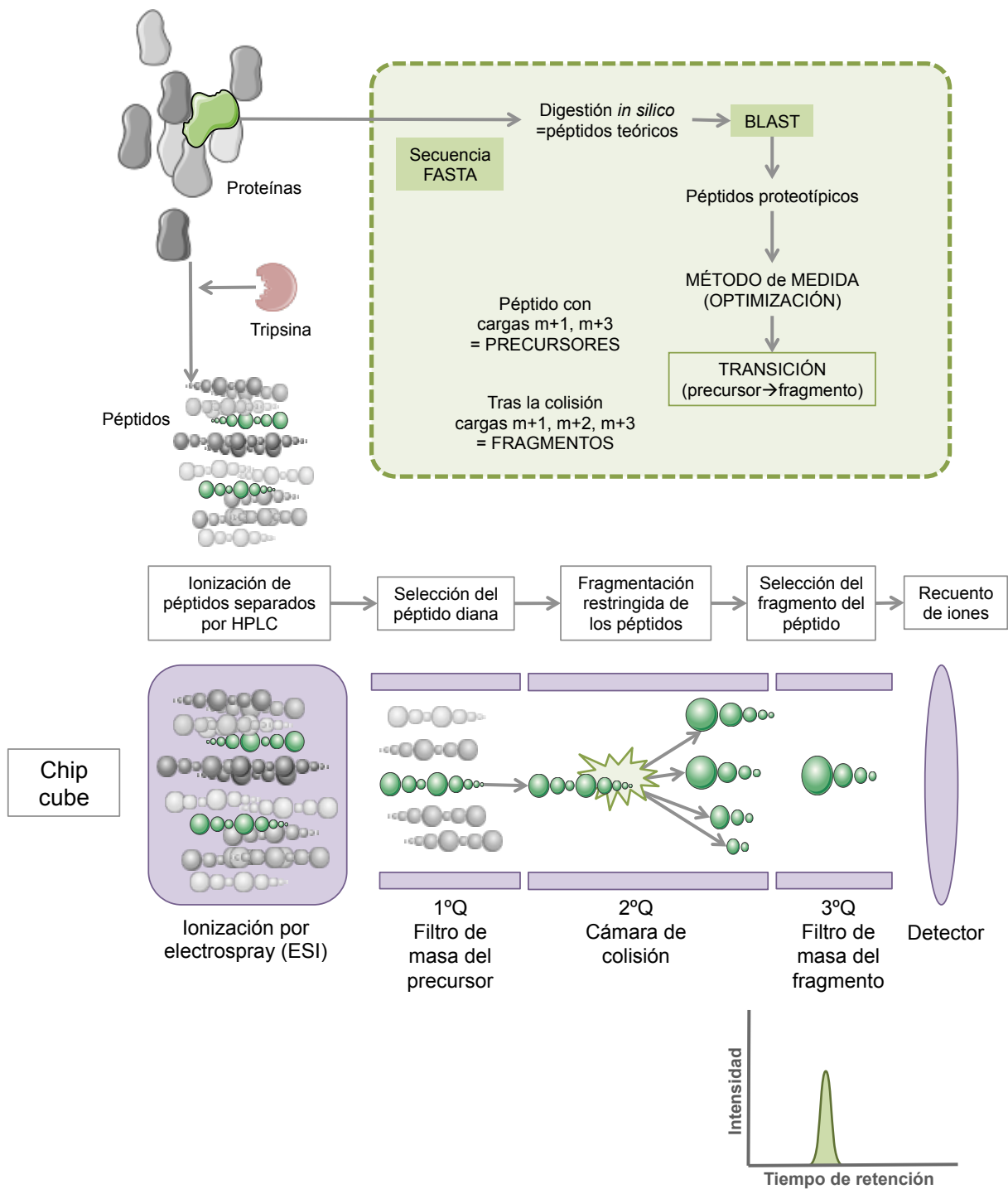


Figura 16. Representación esquemática de la técnica SRM-LC-MS/MS (del inglés “Selected Reaction Monitoring”) para la medición de péptidos, en el cual previamente se realiza una optimización de la medida de los péptidos proteotípicos de las proteínas elegidas.

Las muestras se analizaron en modo SRM empleando un triple cuadrupolo 6460 LC/MS/MS (Agilent Technologies) conectado en línea a un HPLC-chip cube (Agilent Technologies) y a módulos de cromatografía líquida (nano y capilar) de la serie 1200 (Agilent Technologies) con auto muestreador refrigerado. La separación de péptidos se llevó a cabo en un chip ProtID

Zorbax 300B-C18-5 μm con una columna analítica de 43x0,075-mm y una columna de enriquecimiento de 40 nL (Agilent Technologies). Se inyectaron dos microlitros de muestra y la separación se llevo a cabo a 0,4 $\mu\text{l}/\text{min}$ en un gradiente continuo de 5% de fase B durante un minuto, alcanzando el 40% a los 5 minutos y posteriormente el 95% de B a los 12 minutos hasta los 14 minutos, volviendo al 5% a los 15 minutos (fase B: 100% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico). El control del sistema se gestionó empleando el programa informático MassHunter Software (v4.0 Agilent Technologies). El espectrómetro de masas trabajó en modo de ion positivo con un voltaje capilar de 1960 V, la fuente de gas a una temperatura de 325°C y un flujo de 5 L/min. El fragmentador se fijó en 130V y un “dwell time” de 20 ms; el EMV a 400 V y la energía de colisión se optimizó para cada transición SRM. Las muestras se analizaron por duplicado. Las señales individuales se normalizaron en base al TIC (total ion current) y las áreas de los picos fueron calculadas para llevar a cabo el análisis diferencial.

Análisis estadísticos

Para identificar diferencias significativas en las características clínicas o medicamentos, los tres grupos (N, dnA y MAM) se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. Para el cálculo de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteínas entre los grupos (análisis de confirmación), se aplicó el método de ROUT para detectar valores atípicos en base a la tasa de falsos positivos (FDR), estableciendo el valor de Q al 5%. A continuación, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (**Tabla 11**) para calcular diferencias estadísticamente significativas de los valores entre los diferentes grupos o el test no paramétrico de Mann-Whitney, cuando se comparan sólo dos grupos (progresores y no progresores) con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron por medio de software GraphPad Prism 6 (versión 6.01). Para evaluar el rendimiento de los marcadores individuales o de los paneles, se construyeron las curvas de Característica Operativa del Receptor (ROC) mediante el servidor web Metaboanalyst (versión 3.0) [160]. Las curvas ROC se generaron mediante la validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV) usando submuestreo equilibrado. Las curvas ROC univariante se calcularon en primer lugar con puntos óptimos de corte definidos como el punto más cercano a la esquina superior izquierda.

Tabla 11. Condiciones de análisis SRM-LC-MS/MS para las proteínas confirmadas en la fase de validación con significación estadística (Kruskal Wallis p-valor <0,0001). Se incluyen los detalles de las transiciones de las péptidos precursores (y fragmentos de masas), la energía de colisión y las secuencias de péptidos proteotípicos. CE: del inglés “collision energy” Dwell: tiempo de adquisición.

| Fasta | Descripción del gen | Secuencia del péptido precursor | Precursor m/z | Masa del fragmento | | | | CE (V) | Fragmen tador (V) | Dwell (ms) |
|--------|---------------------------|--|---------------|--------------------|--------|--------|-------|--------|-------------------|------------|
| P13987 | Glicoproteína CD59 (CD59) | K.FEHCNFDVTR.L | 513.9 | 532.7 | 574.2 | 582.2 | 591.3 | 9.2 | 130 | 20 |
| | | | 770.3 | 632.3 | 688.3 | 705.4 | 835.3 | | | |
| P01009 | alfa-1 antitripsina (AAT) | K.ITPNLAEFASFSLYR.Q | 548.0 | 1064.4 | 1126.5 | 1163.5 | 23.7 | 130 | 20 | |
| | | | 515.9 | 552.8 | 685.4 | 734.4 | 903.5 | | | 10.5 |
| P05452 | Tetranectina (TNA) | K.NWETEITAQPDGGK.T MELWGAYLLCLFSLLTQ VTTEPPTQKPK.K | 515.9 | 537.2 | | | 9.3 | 130 | 20 | |
| | | | 1126.6 | 1207.7 | 1225.7 | 31.9 | 130 | | | 20 |

5.4.2. Análisis dirigido de Proteínas Identificadas Exosomales de Orina por SRM-LC-MS/MS

Las muestras de orina de 40 pacientes no diabéticos y 14 sujetos sanos se analizaron de modo individual por SRM-LC-MS/MS. La tabla 12 y 13 recoge las características basales de esta cohorte de confirmación mostrando además la información adicional de la medicación de los pacientes. Los tres grupos son comparables con las diferencias marginales para el colesterol total y el ACR propio de los diferentes grupos de pacientes.

Tabla 12. Características basales y medicamentos de los pacientes utilizados en la confirmación de las proteínas exosomales por SRM-LC-MS/MS. Los valores aparecen expresados como media \pm desviación estándar o como porcentajes (%). Las diferencias estadísticas entre los tres grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo). HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; ACR: ratio albúmina-creatinina en orina; eGFR: estimación tasa de filtración glomerular N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* la albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

| Características basales | N (n=19) | dnA (n=11) | MHA (n=10) | p-valor |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| Edad (Años) | 61 \pm 9 | 65 \pm 9 | 63 \pm 9 | 0.362 |
| Colesterol total (mg / dl) | 197 \pm 34 | 170 \pm 13 | 187 \pm 21 | 0.032 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 121 \pm 50 | 106 \pm 50 | 120 \pm 39 | 0.34 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 53 \pm 12 | 50 \pm 17 | 49 \pm 9 | 0.493 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 120 \pm 33 | 97 \pm 14 | 115 \pm 21 | 0.056 |
| Glucemia (mg / dl) | 105 \pm 12 | 99 \pm 9 | 100 \pm 12 | 0.321 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 5.1 \pm 1.8 | 6.1 \pm 1.6 | 5.7 \pm 1.5 | 0.373 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 88 \pm 11 | 81 \pm 17 | 79 \pm 20 | 0.464 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 137 \pm 15 | 131 \pm 20 | 137 \pm 19 | 0.616 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 83 \pm 9 | 77 \pm 10 | 84 \pm 12 | 0.273 |
| ACR (mg / g) | 8 \pm 7 | 83 \pm 38 | 125 \pm 125 | <0.0001 |
| Medications | | | | |
| Antihipertensivos,% | | | | |
| iECAs | 11 | 9 | 30 | 0.316 |
| ARA | 67 | 64 | 70 | 0.849 |
| Diurético | 43 | 36 | 50 | 0.793 |
| Bloqueante de los canales de calcio | 33 | 18 | 60 | 0.148 |
| Agente bloqueante beta | 19 | 18 | 60 | 0.061 |
| Otros tratamientos,% | | | | |
| Agente anticoagulante | 24 | 27 | 20 | 0.916 |
| Agentes reductores de lípidos | 68 | 55 | 80 | 0.467 |
| Agente antidiabético | 0 | 0 | 0 | > 0.9999 |
| Antialdosterónicos | 21 | 18 | 10 | 0.761 |
| Hipouricémicos | 0 | 18 | 0 | 0.067 |

Tabla 13. Características basales de los controles utilizados en la confirmación por SRM-LC-MS/MS. Los valores aparecen expresados como media \pm desviación estándar o como porcentajes (%). HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; ACR: ratio albúmina-creatinina en orina; eGFR: estimación tasa de filtración glomerular.

| Características basales | |
|---------------------------------------|---------------|
| Edad (Años) | 56 \pm 7 |
| Colesterol total (mg / dl) | 199 \pm 38 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 83 \pm 33 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 62 \pm 19 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 119 \pm 31 |
| Glucemia (mg / dl) | 91 \pm 13 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 4.4 \pm 1.3 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 93 \pm 14 |
| ACR (mg / g) | 4 \pm 3 |

Los exosomas se aislaron a partir de estas muestras de orina y se obtuvieron los extractos de proteínas individuales. Se digirieron 30 μ g de proteína total por muestra individual tal como se ha explicado en el apartado anterior y la mezcla de péptidos se analizó por SRM-LC-MS/MS de modo similar. La separación de péptidos se llevó a cabo en un chip ProtID Zorbax 300B-C18-5 μ m con 43 \times 0,075 mm de columna de análisis y 40 nL de columna de enriquecimiento (Agilent Technologies). Se inyectaron dos microlitros de muestra a 3 μ l/min y la separación se llevó a cabo en 0,4 μ l/min en un gradiente de acetonitrilo continuo: 70% B en 10 min, 95% B a 12 min hasta 14,2 min y 0% de B durante 2 min (B = 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo). El espectrómetro de masas fue operado en el modo ion positivo con un voltaje capilar de 1970V, la temperatura de la fuente de gas se mantuvo a 325 °C, y el flujo de la fuente de gas en 5 L /min. El fragmentador fue ajustado a 130V, tiempo Dwell a 20 ms, Delta EMV a 600V, y la energía de colisión se optimizó para cada transición SRM. Las transiciones teóricas fueron diseñadas utilizando el programa Skyline (v.1.1.0.2905) [159] y se inspeccionaron manualmente. La especificidad de las proteínas fue confirmada por Blast y los péptidos proteotípicos fueron seleccionados para el análisis SRM (**tabla**). Las señales individuales se normalizaron por el TIC (corriente iónica total) y las áreas de los picos normalizados fueron calculados para la comparación entre grupos.

Análisis estadísticos

Para identificar diferencias significativas en las características clínicas o medicamentos, los tres grupos (N, dnA y MAM) se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. Para el cálculo de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteína entre los grupos, se aplicó el método de ROUT para detectar y descartar valores atípicos en base a la tasa de falsos-positivos (FDR), ajustando el Q valor al 5%. A continuación, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn y nivel de confianza del 95% (**Tabla 14**). Para evaluar el rendimiento de los marcadores individuales, se construyeron las curvas ROC mediante el servidor web

Metaboanalyst (versión 3.0) [160]. Las curvas ROC se generaron mediante la validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV) usando submuestreo equilibrado. Las curvas ROC univariante se calcularon en primer lugar con puntos óptimos de corte definidos como el punto más cercano a la esquina superior izquierda.

Tabla 14. Condiciones de análisis SRM-LC-MS/MS de los péptidos proteotípicos, OLFM4, MPO, ANT3 con alteración en dnA. Se incluyen los detalles de las transiciones de las péptidos precursores (y fragmentos de masas), la energía de colisión y las secuencias de péptidos proteotípicos. CE: del inglés “collision energy” Dwell: tiempo de adquisición.

| Fasta | Descripción del gen | Secuencia del péptido precursor | Precursor m/z | Masa del fragmento | CE (V) | Fragmentador (V) | Dwell (ms) |
|--------|-----------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------|--------|------------------|------------|
| Q6UX06 | Olfactomedina-4 (OLFM4) | K.ESFGGSSEIVDQLEVEIR.N | 665.33 | 675.31 | 19.2 | 130 | 20 |
| P01008 | Antitrombina-III (SERPINC1) | K.SLTFNETYQDISELVYGAK.L | 726.69 | 779.42 | 21.4 | 130 | 20 |
| P05164 | Mieloperoxidasa (MPO) | R.AADYLHVALDLLER.K | 799.93 | 841.42 | 25.8 | 130 | 20 |

5.4.3. Análisis dirigido de las respuestas alteradas de Metabolitos de Orina por SRM-LC-MS/MS.

Se empleó una cohorte de muestras de orina de 68 pacientes (26 diabéticos y 42 no diabéticos) y de 14 controles. La **tablas 15 y 16** contienen las características basales de esta cohorte de confirmación, que muestran grupos perfectamente macheados, además de mostrar la información adicional de la medicación de los pacientes. Los tres grupos son comparables con las diferencias marginales para el ácido úrico. sin diferencias significativas en ninguna de las variables entre los grupos de pacientes, con excepción del ácido úrico. De 35 pacientes normoalbuminúricos se evaluó su progresión (evolución clínicamente en cuanto a potencial incremento en ACR) y las características basales se muestran en la **tabla 17** sin diferencias significativas.

Tabla 15.: Características y la medicación de los pacientes de referencia para la confirmación (SRM-LC-MS/MS). Valores expresados como la media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). Las diferencias estadísticas entre los tres grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo). IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad, ACR: ratio albúmina-creatinina en orina; eGFR: estimación tasa de filtración glomerular, IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueadores de los receptores de la angiotensina. N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* la albuminuria; MAM: microalbuminuria mantenida.

| Características basales | N (n=39) | dnA (n=13) | MAM (n=16) | p-valor |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| Edad (Años) | 65 \pm 12 | 68 \pm 11 | 63 \pm 14 | 0.581 |
| Sexo masculino), % | 36 | 62 | 69 | 0.052 |
| IMC (kg / m ²) | 30 \pm 5 | 31 \pm 4 | 29 \pm 4 | 0.505 |
| Fumar en la actualidad,% | 10 | 15 | 13 | 0.881 |
| Colesterol total (mg / dl) | 184 \pm 29 | 168 \pm 27 | 184 \pm 36 | 0.261 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 120 \pm 49 | 129 \pm 66 | 146 \pm 58 | 0.308 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 55 \pm 14 | 50 \pm 12 | 49 \pm 12 | 0.186 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 104 \pm 28 | 93 \pm 20 | 107 \pm 27 | 0.352 |
| Glucemia (mg / dl) | 115 \pm 33 | 116 \pm 27 | 123 \pm 39 | 0.894 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 5.4 \pm 1.7 | 6.4 \pm 1.7 | 7.2 \pm 1.7 | 0.003 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 183 \pm 437 | 96 \pm 36 | 75 \pm 42 | 0.238 |
| eGFR (ml / min / 1,73m ²) | 81 \pm 20 | 72 \pm 22 | 68 \pm 28 | 0.201 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 138 \pm 18 | 144 \pm 20 | 144 \pm 32 | 0.618 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 80 \pm 10 | 80 \pm 8 | 84 \pm 18 | 0.713 |
| ACR (mg / g) | 10 \pm 13 | 104 \pm 122 | 896 \pm 969 | <0.0001 |
| Diabetes mellitus, % | 33 | 39 | 50 | 0.5181 |
| Medications | | | | |
| Antihipertensivos,% | | | | |
| iECAs | 10 | 8 | 31 | 0.1029 |
| ARA | 85 | 70 | 63 | 0.1738 |
| Diurético | 54 | 54 | 56 | 0.9861 |
| Bloqueante de los canales de calcio | 62 | 46 | 75 | 0.2877 |
| Agente bloqueante beta | 36 | 23 | 13 | 0.1993 |
| Agente bloqueante alfa | 13 | 23 | 19 | 0.6551 |
| Otros tratamientos,% | | | | |
| Agente anticoagulante | 46 | 39 | 19 | 0.1691 |
| Agentes reductores de lípidos | 80 | 54 | 88 | 0.0861 |
| Agente antidiabético | 23 | 15 | 31 | 0.6162 |
| Antialdosterónicos | 21 | 8 | 6 | 0.2961 |

Tabla 16.: Características clínicas basales de los controles de referencia. Valores expresados como la media \pm desviación estándar (SD) o porcentajes (%). IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad, ACR: ratio albúmina-creatinina en orina; eGFR: estimación tasa de filtración glomerular.

| Características basales | C (n=16) |
|---|-----------------|
| Edad (Años) | 49 \pm 9 |
| Sexo masculino), % | 25 |
| IMC (kg / m²) | 24 \pm 3 |
| Fumar en la actualidad,% | |
| Colesterol total (mg / dl) | 194 \pm 24 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 74 \pm 30 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 64 \pm 13 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 106 \pm 17 |
| Glucemia (mg / dl) | 80 \pm 12 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 5.1 \pm 1.1 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 97 \pm 20 |
| eGFR (ml / min / 1,73m²) | 84 \pm 11 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 110 \pm 18 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 76 \pm 12 |
| ACR (mg / g) | 6 \pm 6 |
| Diabetes mellitus, % | 0 |
| Antihipertensivos,% | 0 |

Tabla 17. Características basales de los pacientes normoalbuminúricos incluidos en el estudio prospectivo. Las diferencias estadísticas entre los dos grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. N se refiere a los no progresores (se mantuvieron como N); dnA se refiere a individuos N que siguen avanzando. IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad, ACR: ratio albúmina-creatinina en orina; eGFR: estimación tasa de filtración glomerular, IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueadores de los receptores de la angiotensina.

| Características basales | N (n=26) | dnA (n=9) | p-valor |
|---|----------|-----------|---------|
| Edad (Años) | 64±13 | 67±10 | 0.846 |
| Sexo masculino), % | 42 | 22 | 0.431 |
| IMC (kg / m2) | 30±5 | 32±5 | 0.386 |
| Fumar en la actualidad,% | 15 | 0 | 0.330 |
| Colesterol total (mg / dl) | 182±32 | 195±21 | 0.128 |
| Triglicéridos (mg / dl) | 118±50 | 123±54 | 0.802 |
| Colesterol HDL (mg / dl) | 55±12 | 55±18 | 0.916 |
| Colesterol LDL (mg / dl) | 102±30 | 115±26 | 0.213 |
| Glucemia (mg / dl) | 118±31 | 106±43 | 0.746 |
| Ácido úrico (mg / dl) | 5,5±1,9 | 4,8±1,1 | 0.347 |
| Aclaramiento de creatinina (mg / ml) | 228±534 | 77±40 | 0.312 |
| eGFR (ml / min / 1,73m2) | 80±22 | 83±20 | 0.546 |
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 139±21 | 136±16 | 0.860 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 82±10 | 75±11 | 0.080 |
| ACR (mg / g) | 9±11 | 7±7 | 0.747 |
| Diabetes mellitus, % | 31 | 44 | 0.685 |
| Medications | | | |
| Antihipertensivos,% | | | |
| iECAs | 4 | 22 | 0.156 |
| ARA | 88 | 78 | 0.586 |
| Diurético | 58 | 33 | 0.264 |
| Bloqueante de los canales de calcio | 62 | 78 | 0.45 |
| Agente bloqueante beta | 42 | 22 | 0.431 |
| Agente bloqueante alfa | 15 | 11 | >0.9999 |
| Otros tratamientos,% | | | |
| Agente anticoagulante | 42 | 67 | 0.264 |
| Agentes reductores de lípidos | 77 | 89 | 0.648 |
| Agente antidiabético | 27 | 11 | 0.645 |
| Antialdosterónicos | 15 | 22 | >0.9999 |
| Hipouricémicos | 8 | 0 | 0.607 |

La orina se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C durante 15 min. Las proteínas se eliminaron mediante precipitación en 50% de ACN/ácido fórmico (HCOOH) al 0,1%. Después de la centrifugación (11.000 x g por 5 minutos), se recogió el sobrenadante para el análisis, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, y se mezcló 1:2 con fase móvil A (ácido fórmico al 0,1% en agua destilada Milli-Q) para el análisis por LC-MS/MS en el modo de SRM.

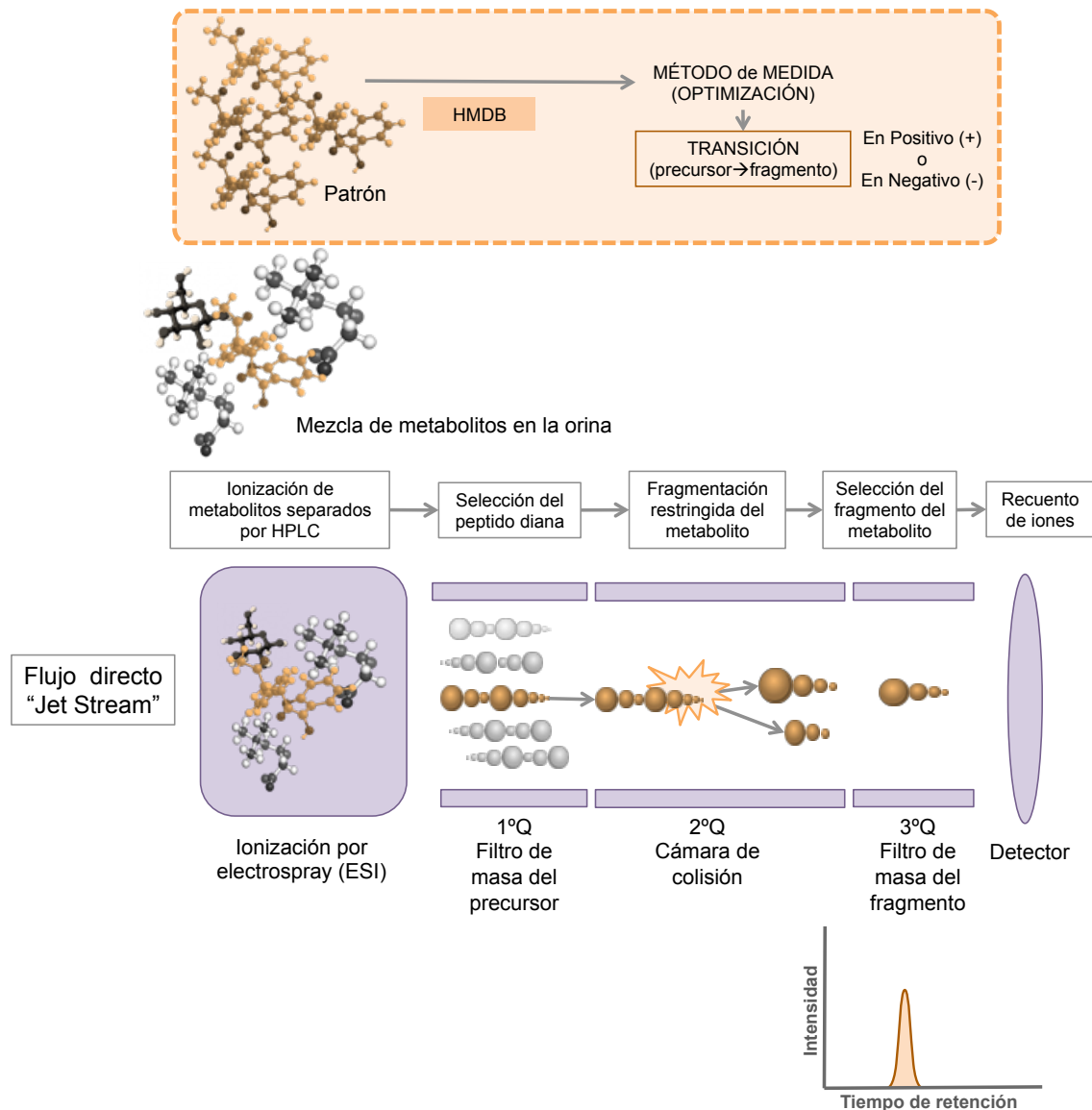


Figura 17. Representación esquemática de la técnica SRM-LC-MS/MS (del inglés “Selected Reaction Monitoring”) para la medición de metabolitos, en el cual previamente se realiza una optimización de la medida de los metabolitos elegidos mediante la medida de patrones comerciales y datos de ionización de la base de datos HMDB (Human Metabolites Data Base)

En este caso como muestra la **figura 17** varía el análisis en cuanto a la inyección de la muestra y su previa optimización de los parámetros de análisis (optimización por inyección de patrones). Las transiciones óptimas de SRM (**Tabla 18**) fueron seleccionados previamente en el modo de infusión directa mediante el análisis de los patrones comerciales de metabolitos (1µg/ml en faseA), inyectados por separado en mezclas de 3 o 4 metabolitos con pesos moleculares diferentes para sintonizarlos simultáneamente (el peso molecular del metabolito patrón se calculó por HMDB). El modo de ionización se ha optimizado para cada metabolito mediante el software Optimizer (Agilent Technologies).

Un volumen de muestra de 10 μ l se inyectó en una columna de fase reversa (Atlantis T3, 3 μ m, 2,1x 100mm², Waters) termostaticada a 40 °C. La separación se llevó a cabo a 0.4 ml/min en un gradiente de acetonitrilo: 0% de B durante 0,5 min, 95% de B para medición positiva y a 100% para negativa en 2,5 min, 0% de B hasta los 5 min, (fase B: 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo). Se utilizó el espectrómetro de masas 6460 de triple cuadrupolo (Agilent Technologies) acoplado en línea al sistema de HPLC y controlado por el software MassHunter (v4.0) en el modo de ión positivo Delta EMV a 400V y en modo ión negativo a 600V con 325 °C temperatura del gas fuente y el flujo de gas fuente a 11 L/min como se publicó anteriormente [70], [71], [158]. La energía de colisión (CE) y el fragmentador se optimizó para cada metabolito, el tiempo Dwell se fijó a 20 ms en positivo y a 50 ms en negativo. Las señales individuales se normalizaron en base al TIC (corriente iónica total) y se calcularon las áreas de los picos normalizadas para la posterior comparación.

Tabla 18. Transiciones optimizadas SRM para cada metabolito, precursor \rightarrow fragmento (m/z), donde se incluye la energía de colisión (CE) el fragmentador, y el modo de ionización. HMDB: código de la base de datos en *Human Metabolome data base*.

| HMDB | Metabolito | Modo de ionización | Precursor m/z | Masa del fragmento | CE (V) | Fragmentador (V) | Dwell (ms) |
|-----------|--------------------|--------------------|---------------|--------------------|--------|------------------|------------|
| HMDB00357 | 3-Hidroxitirato | (-) | 103.1 | 59.1 | 10 | 60 | 50 |
| HMDB00223 | Oxalacetato | (+) | 133.08 | 61.1 | 30 | 156 | 20 |
| HMDB00026 | 3-Ureidopropionato | (+) | 133.13 | 115.1 | 10 | 70 | 20 |
| HMDB00139 | Glicerato | (+) | 107.08 | 61.2 | 10 | 144 | 20 |
| HMDB00210 | Pantotenato | (+) | 220.24 | 90.1 | 14 | 80 | 20 |
| HMDB00148 | Glutamato | (+) | 147.9 | 102.1 | 18 | 175 | 20 |
| HMDB00128 | Guanidoacetato | (+) | 118.1 | 76.1 | 10 | 120 | 20 |
| HMDB00744 | Malato | (-) | 133 | 115.1 | 10 | 84 | 50 |
| HMDB00243 | Piruvato | (-) | 87.1 | 43.3 | 10 | 60 | 50 |

Análisis Estadístico

Para identificar diferencias significativas en las características clínicas o medicamentos, los tres grupos (N, dnA y MAM) se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. Para el cálculo de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metabolitos entre los grupos (análisis de confirmación), se aplicó el método de ROUT para detectar valores atípicos en base a la tasa de falsos positivos (FDR), estableciendo el valor de Q al 5%. A continuación, se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron por medio de software GraphPad Prism 6 (versión 6.01). Para evaluar el rendimiento de los marcadores individuales o de los paneles, se construyeron las curvas ROC mediante el servidor web Metaboanalyst (versión 3.0) [160]. Las curvas ROC se generaron mediante la validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV) usando submuestreo equilibrado. Las curvas ROC univariante se calcularon en primer lugar con puntos óptimos de corte definidos como el punto más cercano a la esquina superior izquierda. Por otro lado, el análisis multivariante ROC se realizó mediante la combinación de los metabolitos que muestran una respuesta similar (paneles). Las curvas ROC creadas se basan en el rendimiento de la validación cruzada de un algoritmo multivariante. El test *Random Forest* fue seleccionado como el

método de clasificación y método integrado característico. Las probabilidades de clase predichas se llevaron a cabo utilizando el mejor clasificador (basada en el área bajo la curva ROC (AUC)). Los metabolitos específicos contenidos en cada panel se detallan en la sección de Resultados.

Capítulo 3

Resultados

ESTUDIO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN ORINA DE PACIENTES HTA

Como se ha descrito en el apartado de introducción, pacientes hipertensos con tratamiento de inhibición del SRA pueden presentar elevadas cantidades de albúmina en orina (microalbuminuria). La albúmina es un marcador de daño orgánico, lo que indica que existe una progresión de la enfermedad cardiovascular y potencialmente, de la función renal [28]. La prevención de la microalbuminuria es de gran relevancia y la búsqueda de nuevas dianas de predicción ayudaran a la detección de pacientes hipertensos que progresan en la enfermedad a pesar de estar crónicamente tratados. Gracias a estrategias proteómicas y metabolómicas sin sesgo, en este estudio hemos obtenido resultados relevantes utilizando diferentes técnicas complementarias, como se muestran en los apartados siguientes.

Los grupos de muestras de pacientes HTA utilizados para este fin han sido clasificados según el desarrollo de albuminuria durante el seguimiento clínico: normoalbuminúricos (N), *de novo* albuminuria (dnA) y microalbuminuria mantenida (MAM). Para estudiar cambios moleculares en respuesta a la propia HTA en este contexto clínico, se recogieron muestras de individuos sanos como controles del análisis (C). En el apartado de material y métodos se detallan las características clínicas de los individuos utilizados en estos análisis.

Análisis diferencial proteómico por 2D-DIGE

En primer lugar, investigamos los cambios moleculares más significativos en la orina en respuesta al desarrollo de albuminuria que afecta a un número considerable de pacientes hipertensos con el SRA inhibido crónicamente mediante fármacos. Estos grupos han sido clasificados según la división detallada en la sección métodos: C, N, dnA, MAM (**Tablas 2 y 3 de material y métodos**) empleando 5 muestras por grupo de pacientes y 6 muestras de individuos sanos. En un estudio anterior observamos que cantidades muy elevadas de albúmina en orina dificultan el análisis por 2D-DIGE [74], por ello, en todas las muestras analizadas la albúmina no superó los 300mg/L visto por la bioquímica de las muestras recogidas, lo que nos permitió hacer el estudio sin deplecionar las muestras tal y como previamente ha sido descrito por nuestro grupo [142]. Elegimos la técnica 2D-DIGE ya que este diseño permite la separación de distintas muestras marcadas en un único gel, lo que disminuye la variabilidad por número de geles, además de introducir un patrón interno que compensa las variaciones mínimas experimentales. Por otro lado esta técnica es más sensible que otros métodos de tinción al basarse en detección por fluorescencia.

La orina previamente se concentró por Amicon de 10 kDa de corte y se limpió de sales por columnas HLB Oasis que como hemos publicado previamente enriquecen la fracción de bajo peso molecular y nos permite detectar proteínas de menor tamaño que podrían estar enmascaradas. Tal y como se indicó en material y métodos para llevar a cabo el análisis diferencial por 2D-DIGE, se empleó el kit de marcaje mínimo que permite el análisis de 50 µg de proteína por muestra. En la **figura 18A** podemos ver el gel master obtenido con las

manchas diferenciales marcadas y una imagen representativa de gel 2D-DIGE con los fluorocromos superpuestos (**Figura 18B**).

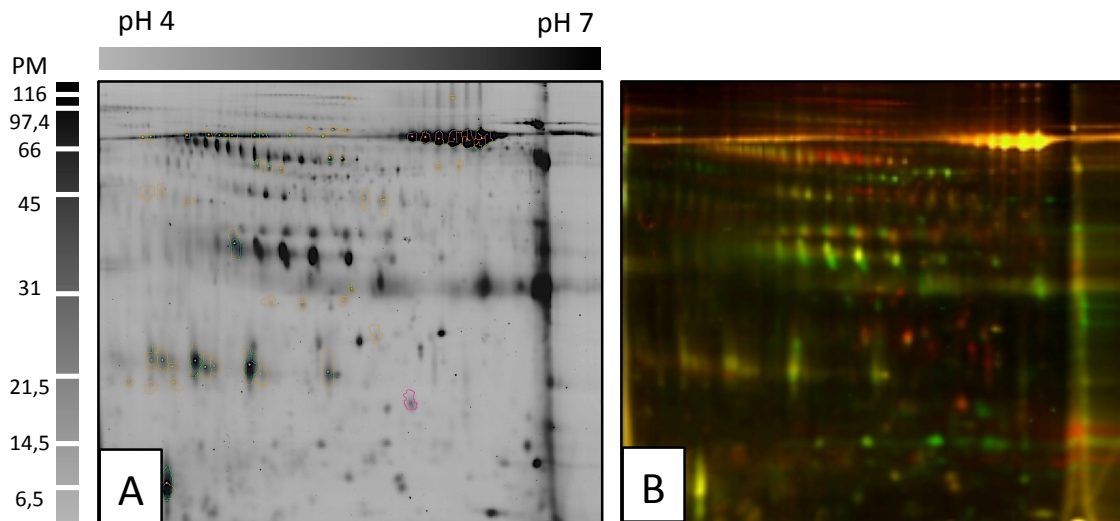


Figura 18. A) Gel representativo (gel master) del estudio 2D-DIGE donde las manchas proteicas diferenciales alteradas (p -valor $<0,05$) son señaladas. B) Imágenes superpuestas de los fluorocromos Cy3 y Cy5 en el gel de 2D-DIGE representativo. En este caso una muestra de control (en verde) se marcó con Cy3 y una muestra de paciente con MAM con Cy5 (rojo). El estándar interno compuesto por todas las muestras incluídas en el estudio se marcó con Cy2 y se cargó en todos los geles del experimento. PM: peso molecular.

En total obtuvimos 56 manchas proteicas alteradas (p -valor $<0,05$) (**Anexo 1**), 20 de ellas estaban en la zona de la albúmina. En total, pudimos identificar 12 manchas que correspondieron a 10 proteínas (**tabla 19**) de las cuales dos manchas proteicas contienen cada una, una mezcla de dos proteínas, por lo tanto, los cambios en la expresión de esas manchas no se pueden atribuir a ninguna de las dos proteínas inicialmente. La **tabla 19** muestra las tendencias observadas entre los grupos comparados, donde las flechas reflejan aumento o disminución en el grupo situado en la parte superior de la relación. Cuando una proteína se identificó en varias manchas proteicas, se puede observar que las variaciones entre grupos siguen la misma tendencia (por ejemplo, CD59 y alfa-1-antitripsina).

Tabla 19. Proteínas identificadas con alteración significativa (*one way ANOVA*) en respuesta a desarrollo de albuminuria o HTA *per se*, en el análisis 2D-DIGE. Las flechas reflejan el incremento/disminución del grupo colocado en la parte alta de la relación. La tabla muestra el número de péptidos únicos identificados, el % de cobertura de la secuencia y las tendencias observadas para cada proteína entre los grupos comparados (aumento o disminución en el grupo situado en la parte superior de la relación). C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

| Spot | N° de acceso (UniProt) | Nombre de la proteína | Gen | N/C | dnA/C | MAM/C | dnA/N | MAM/N | MAM/dnA | ANOVA | Péptidos únicos | Cobertura de la secuencia (%) |
|------|------------------------|---|---------------|-----|-------|-------|-------|-------|---------|---------|-----------------|-------------------------------|
| 1 | P04217 | alfa1-beta glicoproteína | A1BG | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | 0.00042 | 12 | 36 |
| 2 | P01009 | alfa1-antitripsina | AAT | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | 0.048 | 15 | 37 |
| 3 | P01009 | alpha1-antitripsina | AAT | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | 0.018 | 11 | 25 |
| 4 | P02671// P06870 | Fibrinogeno cadena alfa // Kalicreina1 | FGA // KLK1 | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | 0.021 | 5 // 6 | 8 // 16 |
| 5 | P05452 | Tetranectina | TNA | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | 0.033 | 10 | 58 |
| 6 | P02760 | proteína AMBP | AMBP | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | 0.012 | 12 | 29 |
| 7 | P13987 | CD59 glicoproteína | CD59 | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | 0.0024 | 5 | 21 |
| 8 | P13987 | CD59 glicoproteína | CD59 | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | 0.0022 | 5 | 21 |
| 9 | P13987 | CD59 glicoproteína | CD59 | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | 0.03 | 4 | 21 |
| 10 | P13987 | CD59 glicoproteína | CD59 | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | 0.0082 | 6 | 21 |
| 11 | P25311 | Zinc-alfa 2 glicoproteína | AZGP1 | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | 0.016 | 8 | 22 |
| 12 | Q8WVN6// P02766 | Proteína 1 transmembrana y secretada // Transtiretina | SECTM1 // TTR | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | 0.018 | 7 // 6 | 25 // 25 |

En el análisis estadístico (*one way ANOVA*) del estudio 2D-DIGE, obtuvimos seis proteínas alteradas significativamente (y dos spots con mezcla de dos proteínas cada uno). En la **figura 19**, se representa la tendencia del spot según el grupo : α -1-B glucoproteína (A1BG) (**figura 19A**), zinc- α -2-glicoproteína (AZGP1 o ZA2G) (**figura 19B**), CD59 glicoproteína (CD59) (**figura 19C**), proteína AMBP (**figura 19D**), tetranectina (TNA o CLEC3B) (**figura 19E**) y α -1 antitripsina (AAT o SERPINA1) (**figura 19F**). Estos datos representan los cambios moleculares que tienen lugar en la orina con diferentes respuestas a la hipertensión y a la progresión de la albuminuria donde las gráficas de la figura A, B y C responden a albuminuria (se separan C y N de dnA y MAM), D y E responden a HTA (C frente a los demás grupos N, dnA y MAM) y en la gráfica F aumenta en un estadio intermedio (dnA).

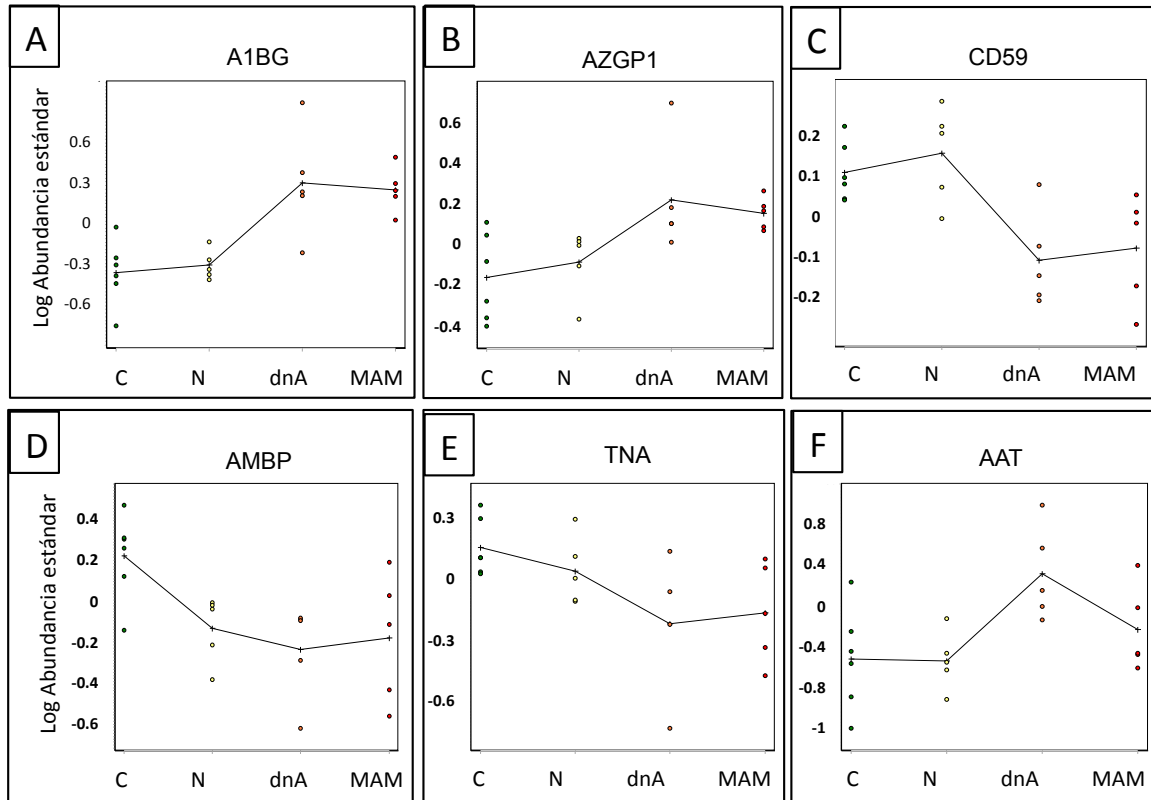


Figura 19. Tendencias de las proteínas con expresión diferencial en respuesta a HTA y albuminuria identificadas por diferenciales por 2D-DIGE (un spot una proteína). C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

El análisis de componentes principales (PCA) mostró una agrupación clara de las muestras de orina individuales de acuerdo con la condición sana (C), la hipertensión sin albuminuria (N), y la hipertensión con albuminuria (dnA o MAM). Curiosamente, los individuos en los que progresa la albuminuria (dnA) son los que se encuentran más separados del estado de normoalbuminuria y aun más que aquellos con microalbuminuria mantenida (MAM), lo que indica a una situación inestable en la condición dnA (**Figura 20**).

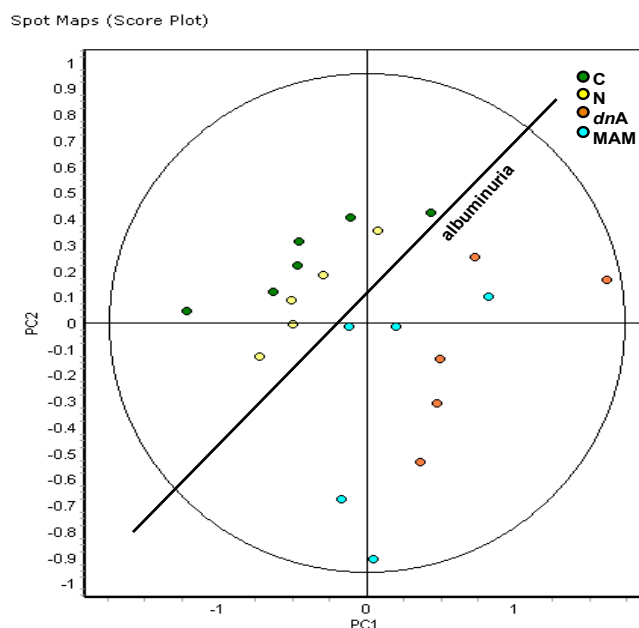


Figura 20. Gráfico de análisis de componentes principales (PCA). Cada punto representa una muestra de orina utilizada en la fase de descubrimiento (análisis DIGE), donde la diagonal muestra una separación entre los grupos con albuminuria de los que no la tienen. C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

Análisis por espectrometría de masas (SRM-LC-MS/MS) en una cohorte de confirmación.

La metodología de espectrometría de masas de reacción seleccionada (SRM-LC-MS/MS) permite la cuantificación específica de proteínas de interés en base a los péptidos proteotípicos de cada una de ellas. Este tipo de análisis es muy sensible y específico para la detección de proteínas candidatas y posibilita la monitorización simultánea de múltiples masas (proteínas) de una misma muestra al mismo tiempo [161]. Además supone una enorme ventaja en cuanto a capacidad de análisis de un elevado número de muestras (“high throughput”), automatización y reducción en el tiempo de análisis. En este estudio se desarrollaron métodos de análisis por un equipo de espectrometría de masas triple cuadrupolo, acoplado en línea con un sistema de nanocromatografía en modo chip (nLC-(SRM)-chip-QQQ-MS) para las proteínas previamente identificadas con alteración significativa (**Tabla 11 de material y métodos**).

La confirmación de los resultados obtenidos por 2D-DIGE mediante SRM se estudió en orinas obtenidas de una nueva cohorte de 108 individuos (**Tablas 9 y 10 de material y métodos**), 90 pacientes y 18 individuos control. En este caso se efectuaron dos pinchazos por muestra para analizar dos inyecciones réplicas técnicas además de normalizar los datos para evitar la variabilidad experimental.

Como muestra la **figura 21A-C**, las alteraciones moleculares que anteriormente se encontraron fueron confirmados para CD59, AAT y TNA (**Tabla 11 de material y métodos**).

Las proteínas CD59 y AAT mostraron una respuesta alterada ya en aquellos individuos que desarrollaron dnA (disminución (CD59) y aumento (AAT)) que, de acuerdo con estas dos proteínas, se comportan como los pacientes con MAM (**Anexo 2**). En cambio, TNA muestra una tendencia decreciente en respuesta a la condición correspondiente a la hipertensión (**Anexo 2**). Las curvas ROC se muestran para las tres proteínas en la **figura 21a-c**. CD59 y AAT muestran una buena sensibilidad y selectividad (AUC = 0,888 y 0,819, respectivamente) en la clasificación de individuos normoalbuminúricos y control frente a individuos con albuminuria (*de novo* o mantenida). Tetranectina, por otro lado, permite discriminar entre el control y los sujetos hipertensos (AUC = 0,732).

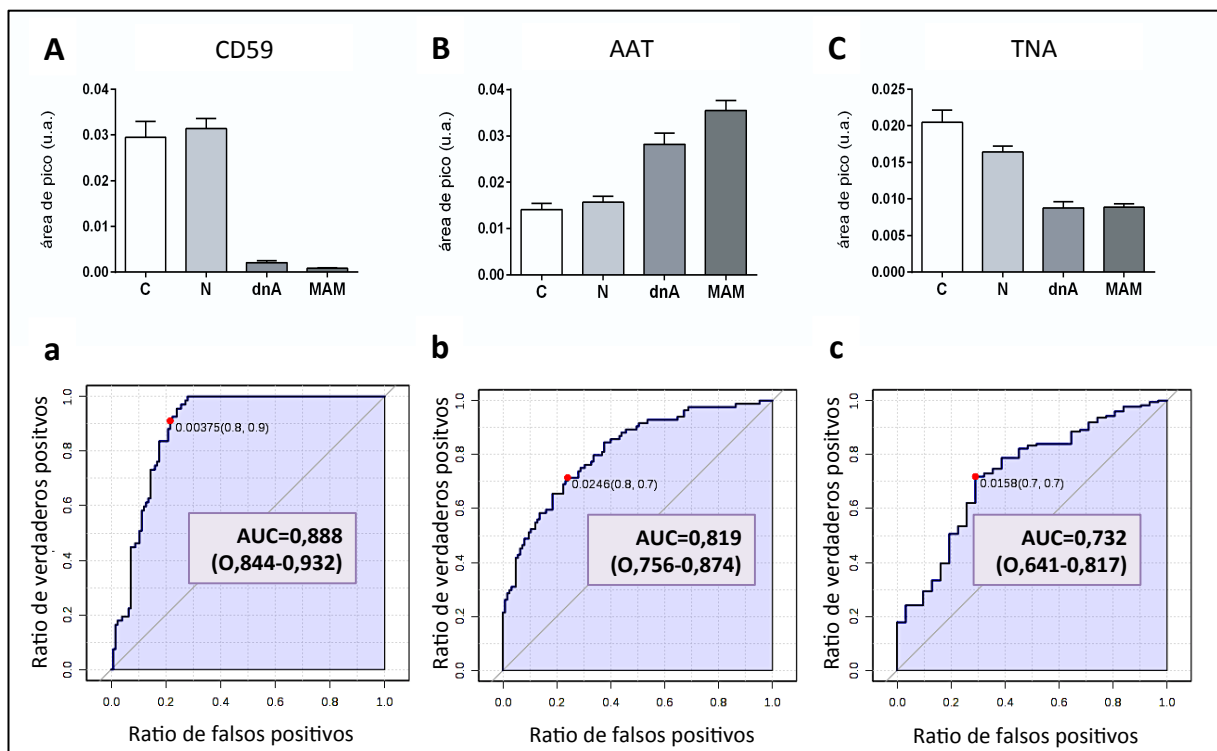


Figura 21. Respuesta en orina de CD59 (A, a), AAT (B, b) y TNA (C, c) en individuos sanos y pacientes hipertensos crónicamente tratados con inhibidores del SRA (i-SRA), en diferentes etapas de progresión de albuminuria (Kruskal Wallis ANOVA p-valor <0,0001). Los gráficos muestran datos obtenidos por SRM-LC-MS/MS frente a cada estado de albuminuria, con transiciones representativas: CD59 513,9→574,2, AAT 548,0→734,4 y TNA 515,9→537,2. Las curvas ROC evalúan la respuesta a la condición de albuminuria (CD59 y AAT) o a la hipertensión (TNA). C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

Cabe señalar que el descubrimiento de nuevos marcadores potenciales asociados a la progresión de la albuminuria en pacientes crónicamente tratados con inhibidores del SRA (i-SRA) fue estudiado incluyendo, exclusivamente, pacientes no diabéticos en el análisis por 2D-DIGE para así evitar la diabetes como factor influyente en la respuesta de las proteínas. El número de individuos reclutados fue aumentado en la fase de confirmación por SRM, incluyendo 36% de sujetos diabéticos (**Tabla 9 de material y métodos**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas atribuidas a la condición diabética, como puede verse

en la **figura 22**, únicamente una respuesta mas temprana de CD59 en individuos diabéticos, tal y como refleja esa disminución pronunciada ya en el grupo dnA asemejándose a la condición de MAM.

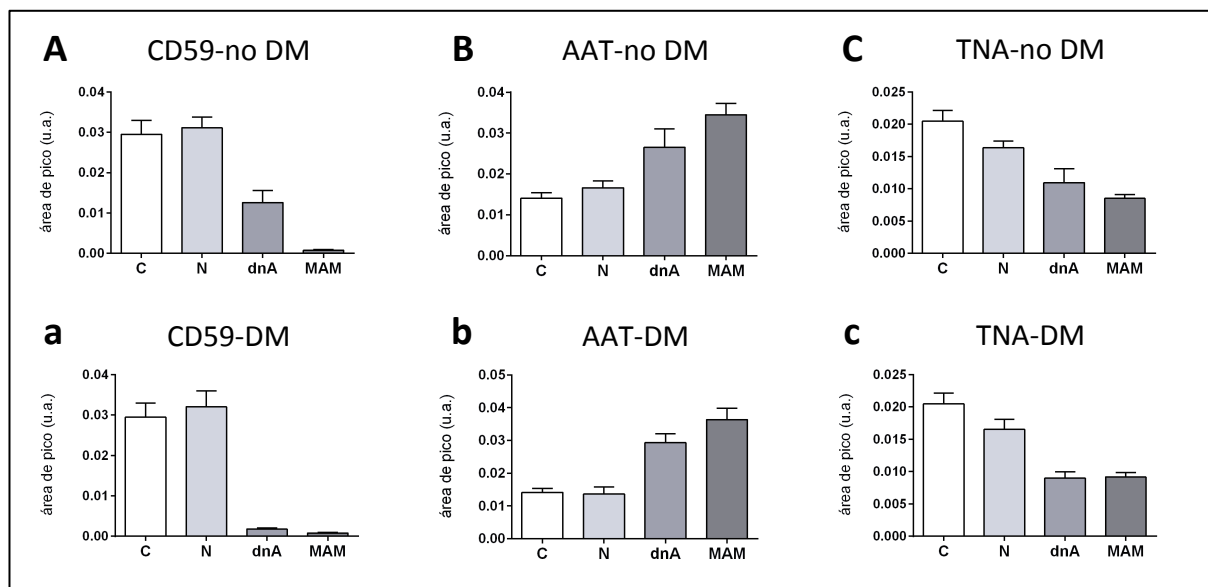


Figura 22. Efecto de la diabetes mellitus (DM) en CD59 (A, a), AAT (B, b) y TNA (C, c) en orina. Los pacientes diabéticos con dnA muestran niveles CD59 más cerca de los observados para los individuos con MAM. Los gráficos muestran datos de SRM-LC-MS/MS frente a cada estado de albuminuria, con transiciones para CD59 513,9→574,2, para AAT 548,0→734,4 y para TNA 515,9→537,2. C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

Estudio Prospectivo en orina. Predicción de desarrollo de albuminuria en HTA controlada.

En vista de los resultados anteriores y a fin de evaluar estas proteínas como predictores de desarrollo de dnA, se realizó un estudio prospectivo. Un subgrupo de estos pacientes hipertensos, que fueron clasificados como normoalbuminúricos durante la toma de muestras de orina para el estudio, fueron seguidos clínicamente durante al menos 1 año desde la recolección de muestras de orina, es decir cuando todos ellos mostraban valores normales de albuminuria. De 37 pacientes monitorizados, 25 permanecieron como normoalbuminúricos. En cambio, 12 evolucionaron a dnA (progresión) como aumento observado en al menos 10 unidades del ratio albúmina-creatinina (ACR). En la **figura 23**, se puede observar la evolución de albuminuria para individuos estables (N) y que progresan (dnA) (**figura 23a**), y donde también se muestran valores similares en el momento del estudio para todos ellos, independientemente de su progresión individual (**figura 23 b y c**).

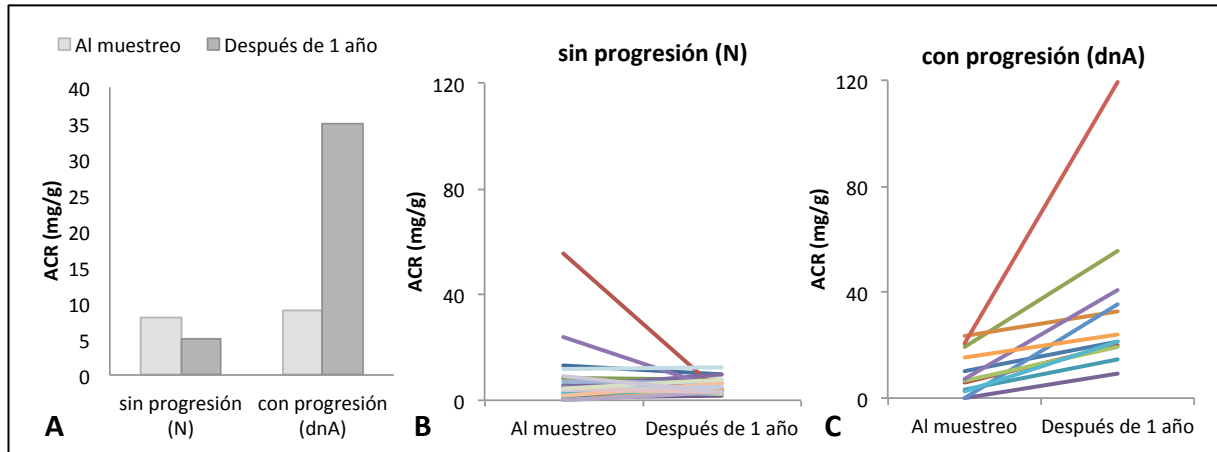


Figura 23. La albuminuria se evaluó en el momento del muestreo y después de al menos un año más tarde donde los individuos fueron clasificados como no progresores (N) o progresores (dnA) (A). En las graficas B y C podemos observar la progresión individual de los pacientes con progresión de los que no la tienen.

Los niveles de proteína CD59 y AAT se midieron en orina recogida cuando aún eran normoalbuminúricos y se detectó una variación significativa para ambas proteínas en aquellos individuos que posteriormente la desarrollarán, sirviendo como predictores del desarrollo futuro de albuminuria. Como podemos ver en la **figura 24A**, CD59 disminuye de forma significativa en los individuos normoalbuminúricos que progresaran en al menos 10 unidades de ACR, en cambio, AAT lo hace aumentando significativamente como se muestra en la **figura 24B**.

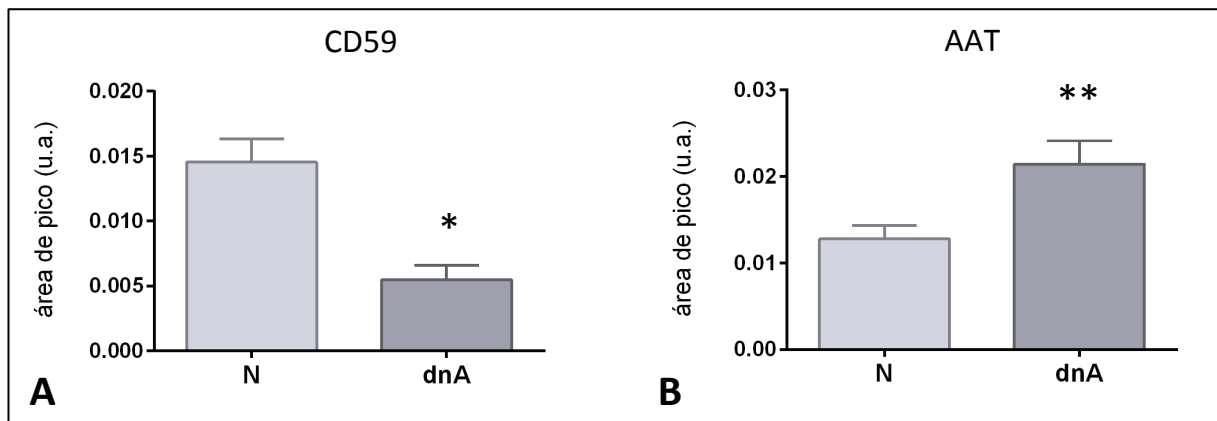


Figura 24. CD59 y AAT predicen la progresión de la albuminuria en pacientes normoalbuminúricos. Los niveles de CD59 (disminuyendo, A) y AAT (aumentando, B) en orina cuando estos individuos eran normoalbuminúricos pueden distinguir entre los individuos progresores de los que no lo son, anticipando el desarrollo o no de albuminuria (**: p-valor <0,01, *: p-valor <0,05).

En este apartado hemos confirmado un panel de tres proteínas significativamente alteradas TNA, CD59 y AAT en los pacientes hipertensos con desarrollo la albuminuria. CD59 y AAT son capaces de predecir, en individuos con normoalbuminuria, quienes de ellos van a desarrollar la albuminuria *de novo* en el futuro.

Los resultados de este estudio ha dado como resultado una publicación en la revista *Cardiovascular Diabetology 2016* [162] (**Anexo 6**).

EXOSOMAS EN ORINA REVELAN DIANAS PROTEICAS EN PACIENTES HTA BAJO i-SRA QUE DESARROLLAN ALBUMINURIA

Proteínas Exosomales Identificadas en Hipertensos Bajo la Supresión Crónica SRA

Como hemos visto en los resultados anteriores, la orina es una fuente rica de marcadores proteicos que además, se puede obtener de forma sencilla y no invasiva. Por otra parte las microvesículas exosomales aisladas a partir de la orina han adquirido gran relevancia en los últimos años como fuente de estudio al ser portadores de información con gran interés clínico [163]. Los exosomas representan un subproteoma cuyo análisis en comparación con el de la orina completa facilitaría la detección de proteínas minoritarias que se encuentran en esa fracción. Así, de forma complementaria y en relación al apartado anterior se investigaron los exosomas de orina y su posible papel en mecanismos fisiopatológicos responsables del desarrollo de la albuminuria en HTA bajo i-SRA, en una cohorte de 40 pacientes hipertensos no diabéticos y 16 controles (**Tablas 6, 12 y 13 de material y métodos**).

En trabajos anteriores obtuvimos un mayor rendimiento en el análisis exosomal por técnicas basadas en LC-MS que por 2D-DIGE [74], [75]. Por ello, en este trabajo, empleamos el análisis por la metodología cuantitativa iTRAQ-LC-MS/MS, de alta sensibilidad. La técnica iTRAQ, se trata de una metodología que requiere un marcaje con isótopos pesados lo que permite distinguir y comparar los péptidos pertenecientes a las diferentes muestras (hasta 8 en este caso) y mediante LC-MS/MS Q-Exactive permite además, identificar y cuantificar miles de péptidos en un experimento único. Partiendo de 23 muestras de individuos no diabéticos se formaron en pools de 2 o 3 muestras por grupo, dando un total de 8 pools, 2 pools por grupo clínico, lo que quiere decir dos réplicas biológicas de cada uno de los cuatro grupos (C, N, dnA y MAM). Esto permitió realizar una profunda cobertura del proteoma exosomal analizado en orina.

Previo al análisis LC-MS/MS, se cargó la misma cantidad de proteína total por muestra en un SDS-PAGE concentrando todas las proteínas en una sola banda que fue posteriormente digerida, marcada con etiquetas iTRAQ y fraccionada para aumentar la cobertura en la identificación de proteínas. Cada una de las fracciones se analizaron por LC-MS/MS en un equipo Orbitrap Elite (Thermo Fisher).

En la caracterización cualitativa del proteoma exosomal de los individuos analizados, identificamos un total de 487 proteínas en exosomas de orina con más de 3 péptidos (**Anexo 3**). Entre estas proteínas, 100 fueron identificadas por primera vez, según el repositorio de Exocarta (www.exocarta.org), en exosomas de orina (**Anexo 4**). El protocolo empleado en el aislamiento de los exosomas fue previamente puesto a punto en el laboratorio [74], [75]. En el análisis de iTRAQ se identificaron marcadores típicos de exosomas como Tsg101, CD9, CD63, anexinas A3, A4, A5, A6, A7, A11, Flotillin-1, Clathrin1, HSP70 y LAMP1 sin diferencias significativas observadas entre los grupos comparados (N, dnA, MAM). En estudios previos, algunas de las proteínas identificadas han sido asignadas específicamente a la cápsula de Bowman, al túbulo proximal, al asa de Henle, al túbulo distal, al conducto

colector del sistema urinario o a la vejiga, que de igual manera no muestran variación en la respuesta a la albuminuria o la hipertensión (**Tabla 20**).

Tabla 20. Proteínas identificadas en exosomas de orina de pacientes hipertensos bajo supresión crónica del SRA que, sin mostrar alteración en respuesta a la hipertensión y albuminuria, en trabajos previos, han sido aisladas de los exosomas de la orina y asignados a partes específicas del sistema urinario y de la nefrona.

| Fasta | Gen | Nombre de la proteína | ID Pépt. | Refs. |
|------------------------------------|------------|--|-----------------|---------------------|
| Cápsula de Bowman | | | | |
| O00592 | PODXL | Podocalyxin | 6 | [164], [165] |
| Podocitos | | | | |
| Q9NP85 | NPHS2 | Podocin | 4 | [166] |
| P17927 | CR1 | Complement receptor type 1 | 6 | [166] |
| Células parietales | | | | |
| P05787 | KRT8 | Keratin, type II cytoskeletal 8 | 7 | [167] |
| Túbulo contorneado proximal | | | | |
| P98164 | LRP2 | Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 | 59 | [164], [166] |
| O60494 | CUBN | Cubilin | 46 | [164], [166] |
| P15144 | ANPEP | Aminopeptidase N | 55 | [164] |
| O96009 | NAPSA | Napsin-A | 4 | [164] |
| Asa de Henle | | | | |
| P07911 | UMOD | Uromodulin | 44 | [164], [167] |
| Q9H6S3 | EPS8L2 | Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 | 7 | [167] |
| Q8TE68 | EPS8L1 | Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1 | 6 | [167] |
| Túbulo contorneado distal | | | | |
| Q8N271 | PROM2 | Prominin-2 | 6 | [167] |
| P55017 | SLC12A3 | Solute carrier family 12 member 3 | 12 | [164], [167], [168] |
| Túbulo colector | | | | |
| P38606 | ATP6V1A | V-type proton ATPase catalytic subunit A | 14 | [167] |
| P15313 | ATP6V1B1 | V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform | 9 | [167] |
| Q93050 | ATP6V0A1 | V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 | 5 | [167] |
| Q9UI12 | ATP6V1H | V-type proton ATPase subunit H | 4 | [167] |
| Q9HBG4 | ATP6V0A4 | V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 4 | 4 | [167] |
| Vejiga | | | | |
| O00526 | UPK2 | Uroplakin-2 | 4 | [166] |
| P08727 | KRT19 | Keratin, type I cytoskeletal 19 | 18 | [167] |

Proteínas alteradas en respuesta a la albuminuria en exosomas.

El análisis cuantitativo se llevó a cabo empleando el programa QuiXot y se basó en ratios- \log_2 expresados en forma de las variables estandarizadas (Z_q) (valor absoluto), siendo Z_q la media de las dos réplicas en comparación con el grupo control. Las proteínas diferencialmente significativas las elegimos con un $Z_q \geq 1.4$ (valor absoluto), con p -valor $\leq 0,05$. Entre las 487 proteínas identificadas, 48 mostraron una respuesta significativamente alterada en hipertensos bajo la supresión crónica del SRA en comparación con sujetos sanos (**Tabla 21**). Según la base de datos *Human Protein Atlas* en la que se muestra la expresión de las proteínas en diferentes tejidos humanos, obtuvimos que el 56% de estas proteínas tienen expresión en el riñón, principalmente en el túbulo (26 proteínas), pero también en el glomérulo (13 proteínas). En un estudio diferente, la mayoría de estas proteínas fueron identificadas al caracterizar el proteoma de los exosomas urinarios liberados por los podocitos [169] lo que nos asegura encontrarlas en el sistema urinario.

Los resultados obtenidos en el análisis por iTRAQ se visualizan en forma de “*heatmap*” (**Tabla 21**) que muestra con diferente grado de intensidad de color la magnitud de la variación de proteína en concordancia a cada grupo de pacientes frente al grupo control (rojo, incrementada; verde, disminuida). Según los valores de corte de significación empleados, se pueden observar tres tendencias principales con una regulación incrementada o disminuida en respuesta a: hipertensión sin albuminuria (N) (9 proteínas), microalbuminuria mantenida (MAM) (18 proteínas), y *de novo* albuminuria (respuesta temprana, dnA) (21 proteínas). Entre las 48 proteínas variadas significativamente aparecen tres proteínas ya variadas en la orina completa con la misma tendencia, alfa-1B glucoproteína (A1BG), zinc-alfa-2-glicoproteína (AZGP1) y alfa-1-antitripsina (SERPINA1 o AAT). A1BG y AZGP1, varían en microalbuminuria mantenida, aunque en orina completa la vemos ya aumentada en *de novo* albuminuria (dnA). En cambio, AAT sigue el mismo patrón visto en orina completa que además pudo ser confirmado por SRM-LC-MS/MS.

Tabla 21. Relación (“heatmap”) de las 48 proteínas identificadas en los exosomas urinarios de pacientes hipertensos bajo supresión crónica de SRA que muestran niveles significativamente alterados en respuesta a la albuminuria ($Zq \geq 1.4$, “fold change” $Fc > 1.5$ valor absoluto). La escala según el grado de color representa: rojo, incrementada; verde, disminuida. Expresión anotada en el riñón: Human Protein Atlas (HPA). Péptidos Identificados por LC-MS/MS. G: glomérulo; T: túbulo; -: sin datos; PTECs (células epiteliales de los túbulos proximales); I (intersticio); PEC (células epiteliales parietales); PT (túbulo proximal). C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

| Fasta | Gen | Descripción | ID Pept1 | Evidencia en el riñón (HPA,refs) | Zq N | Zq dnA | Zq MA M | Fc-N | Fc-dnA | Fc-MA M |
|---|----------|--|----------|----------------------------------|------|--------|---------|------|--------|---------|
| Proteínas respondedoras a microalbuminuria mantenida | | | | | | | | | | |
| P01859 | IGHG2 | Ig gamma-2 chain C region | 11 | - | | | | 1,2 | 1,4 | 3,7 |
| P02750 | LRG1 | Leucine-rich alpha-2-glycoprotein | 11 | T | | | | 1,5 | 1,1 | 3,7 |
| P04217 | A1BG | Alpha-1B-glycoprotein | 11 | - | | | | 1,3 | 1,1 | 3,7 |
| P25311 | AZGP1 | Zinc-alpha-2-glycoprotein | 10 | T | | | | 1,3 | 1,0 | 3,0 |
| P15586 | GNS | N-acetylglucosamine-6-sulfatase | 6 | G,T | | | | 1,6 | 1,1 | 3,2 |
| P04066 | FUCA1 | Tissue alpha-L-fucosidase | 5 | T | | | | 1,6 | 1,4 | 3,1 |
| P34059 | GALNS | N-acetylgalactosamine-6-sulfatase | 5 | G,T | | | | 1,7 | 1,3 | 2,8 |
| Q9BTY2 | FUCA2 | Plasma alpha-L-fucosidase | 4 | T | | | | 1,2 | 1,2 | 2,2 |
| P07355 | ANXA2 | Annexin A2 | 36 | G,T | | | | 1,6 | 1,3 | 2,0 |
| P04083 | ANXA1 | Annexin A1 | 29 | G | | | | 2,7 | 1,2 | 2,0 |
| P10253 | GAA | Lysosomal alpha-glucosidase | 30 | T | | | | 1,6 | 1,3 | 3,2 |
| P01011 | SERPINA3 | Alpha-1-antichymotrypsin | 14 | - | | | | | | |
| P08236 | GUSB | Beta-glucuronidase | 14 | G,T | | | | 1,5 | 1,2 | 1,9 |
| P15289 | ARSA | Arylsulfatase A | 11 | G,T | | | | 1,6 | 1,5 | 3,8 |
| P00747 | PLG | Plasminogen | 8 | T, I [170] | | | | 1,2 | 1,2 | 1,9 |
| P51688 | SGSH | N-sulphoglucosamine sulphohydrolase | 5 | T | | | | 1,6 | 1,2 | 2,4 |
| B9A064 | IGLL5 | Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 | 5 | T | | | | 1,2 | 1,4 | 2,3 |
| P05543 | SERPINA7 | Thyroxine-binding globulin | 11 | - | | | | 1,6 | 1,3 | 2,6 |

| Fasta | Gen | Descripción | ID Pept1 | Evidencia en el riñón (HPA,refs) | Zq N | Zq dnA | Zq MA M | Fc-N | Fc-dnA | Fc-MA M |
|---|-----------|---|----------|----------------------------------|------|--------|---------|------|--------|---------|
| Proteínas respondedoras a de novo albuminuria (respuesta temprana) | | | | | | | | | | |
| P00450 | CP | Ceruloplasmin | 35 | PECs [171] | | | | 1,5 | 1,6 | 4,0 |
| P01024 | C3 | Complement C3 | 57 | PT, I [172] | | | | 1,2 | 1,9 | 2,3 |
| P01009 | SERPINA1 | Alpha-1-antitrypsin | 32 | T | | | | 1,1 | 2,2 | 2,9 |
| P02787 | TF | Serotransferrin | 31 | PTECs [173] | | | | 1,2 | 1,6 | 3,0 |
| P49221 | TGM4 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4 | 16 | - | | | | 1,7 | 2,0 | 2,1 |
| P0C0L4 | C4A | Complement C4-A | 41 | T [172] | | | | 1,6 | 1,5 | 2,2 |
| P16278 | GLB1 | Beta-galactosidase | 14 | G,T | | | | 1,6 | 1,6 | 2,3 |
| P01857 | IGHG1 | Ig gamma-1 chain C region | 14 | - | | | | 1,3 | 1,7 | 2,7 |
| A2BHY4 | C4B-1 | Complement component C4B | 5 | T [172] | | | | 1,6 | 1,7 | 2,4 |
| P01620 | | Ig kappa chain V-III region SIE | 4 | - | | | | 1,7 | 1,6 | 3,6 |
| Q96P63 | SERPINB12 | Serpin B12 | 7 | T | | | | 1,6 | 2,1 | 1,8 |
| P07339 | CTSD | Cathepsin D | 13 | G,T | | | | 1,3 | 1,6 | 1,9 |
| Q6UX06 | OLFM4 | Olfactomedin-4 | 21 | T [174] | | | | 1,7 | 2,0 | 1,3 |
| P01008 | SERPINC1 | Antithrombin-III | 8 | G,T | | | | 1,2 | 1,8 | 1,4 |
| P02511 | CRYAB | Alpha-crystallin B chain | 7 | G,T | | | | 1,2 | 1,6 | 1,5 |
| P05164 | MPO | Myeloperoxidase | 11 | infiltrates [175] | | | | 1,3 | 1,8 | 1,3 |
| P08571 | CD14 | Monocyte differentiation antigen CD14 | 16 | - | | | | 1,1 | 1,5 | 2,2 |
| P00915 | CA1 | Carbonic anhydrase 1 | 9 | - | | | | 1,1 | 2,3 | 2,3 |
| O00187 | MASP2 | Mannan-binding lectin serine protease 2 | 9 | G,T | | | | 1,5 | 1,9 | 1,4 |
| P02730 | SLC4A1 | Band 3 anion transport protein | 8 | T | | | | 2,4 | 1,6 | 1,4 |
| P05090 | APOD | Apolipoprotein D | 7 | - | | | | 1,4 | 1,7 | 1,3 |
| Proteínas respondedoras a hipertensión con normoalbuminuria | | | | | | | | | | |
| P05154 | SERPINA5 | Plasma serine protease inhibitor | 21 | T | | | | 2,0 | 1,7 | 2,2 |
| P05109 | S100A8 | Protein S100-A8 | 18 | infiltrates [176] | | | | 2,7 | 3,6 | 5,2 |
| P06702 | S100A9 | Protein S100-A9 | 15 | infiltrates [176] | | | | 2,6 | 3,4 | 3,2 |
| Q6UVK1 | CSPG4 | Chondroitin sulfate proteoglycan 4 | 4 | G,T | | | | 2,0 | 1,7 | 2,0 |
| P12277 | CKB | Creatine kinase B-type | 12 | - | | | | 1,9 | 1,3 | 1,5 |
| P01133 | EGF | Pro-epidermal growth factor | 26 | T | | | | 1,7 | 1,1 | 2,0 |
| P01023 | A2M | Alpha-2-macroglobulin | 18 | G,T | | | | 1,7 | 1,1 | 1,3 |
| Q6UX73 | C16orf89 | UPF0764 protein C16orf89 | 4 | T | | | | 1,9 | 1,3 | 1,6 |
| Q14624 | ITIH4 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 | 14 | T | | | | 1,8 | 1,5 | 2,1 |

Identificación de un panel con respuesta a la condición de albuminuria desarrollada *de novo* por SRM-LC-MS/MS

En este estudio y a diferencia de la orina, no se encontraron proteínas con capacidad predictora del desarrollo de albuminuria. Sin embargo, nos pareció de interés identificar por SRM-LC-MS/MS un panel representativo de proteínas que respondieran a la condición de dnA, por ser una respuesta más temprana donde podrían estar desarrollándose mecanismos que no se dieran en pacientes con mejor pronóstico. Se evaluó un sub-conjunto de proteínas representativas que respondieron significativamente a dnA, con una técnica analítica dirigida, y sensible siguiendo el flujo de trabajo visto en el estudio anterior de la orina completa. Los exosomas se aislaron a partir de las muestras de orina de 40 pacientes no diabéticos y 14 sujetos sanos. Las proteínas analizadas fueron: mieloperoxidasa (MPO), olfactomedin-4 (OLFM4) y antitrombina-III (AT3). Cada proteína se analizó según se detalla en material y métodos (**Tabla 14 de material y métodos**). Los niveles alterados significativamente (p -valor $\leq 0,05$) se confirmaron para cada proteína: OLFM4 y AT3 aumentando y MPO disminuyendo (**Figura 25A-C**) además, las curvas ROC muestran una buena sensibilidad y especificidad para diferenciar los pacientes dnA del grupo control, AUC= 0,917 para la OLFM4, AUC= 0,862 para la AT3 y AUC= 0,754 para la MPO (**Figura 25a-c**). También existe diferencia significativa entre pacientes N y dnA aunque la sensibilidad y especificidad es más baja ($AUC_{MPO}= 0,669$ $AUC_{OLFM4}= 0,794$ $AUC_{AT3}= 0,711$)

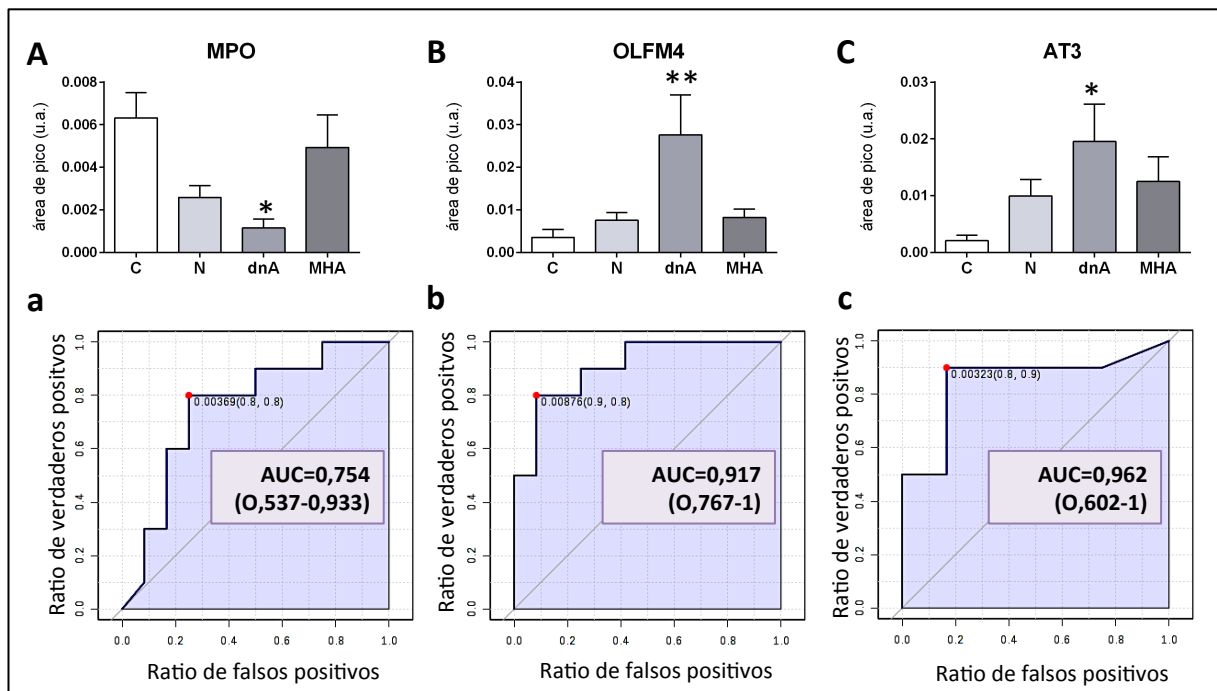


Figura 25. El análisis por SRM-LC-MS/MS confirmó las variaciones anteriores identificadas por iTRAQ para tres proteínas representativas que muestran una alteración significativa en respuesta a dnA (respuesta temprana): MPO (A), AT3 (B) y OLFM4 (C). Los paneles (a-c) muestran curvas ROC para estas proteínas, respectivamente. Se realizó test no paramétrico de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn y el nivel de confianza del 95% entre cada condición patológica (N,

dnA, MAM) y control (C). **: p-valor \leq 0,01, *p-valor \leq 0,05. C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

Redes de interacción de proteínas y procesos biológicos

Las diferencias encontradas a nivel proteico en exosomas de la orina de pacientes hipertensos tratados con i-SRA se analizaron a nivel funcional, procesos biológicos en los que participan y redes de interacción. La **figura 26** muestra la clasificación funcional molecular y los procesos enriquecidos de manera significativa (p-valor $<0,05$) detrás de las alteraciones observadas de las proteínas en respuesta a la hipertensión y a la progresión de albuminuria. Las respuestas, inflamatoria, de defensa y de reparación fueron identificadas como los principales mecanismos biológicos implicados relacionados con las 48 proteínas. En particular, los patrones alterados son agentes activos en la respuesta inmune, la activación del complemento, la proteólisis y los procesos metabólicos, relacionados principalmente con el metabolismo de compuestos de sulfuro, lípidos y polisacáridos, además de una actividad inhibidora de enzimas de tipo serina. Por otro lado la última gráfica de la figura 25 muestra la relación de estas proteínas con los componentes celulares donde se observa una alta relación con el espacio extracelular y vesículas membranosas como vacuolas de lisis relacionadas también con exosomas.

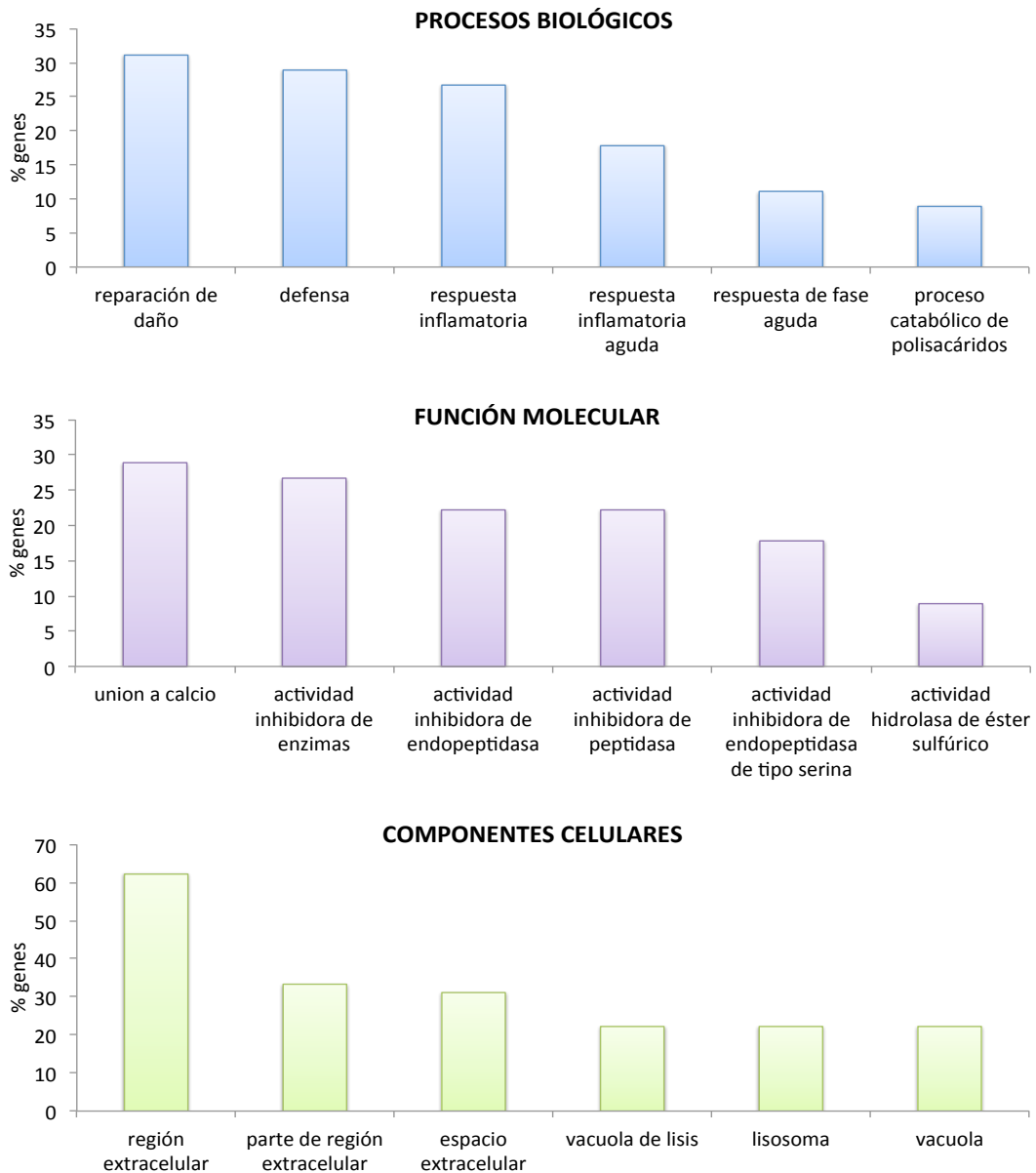


Figura 26. La gráfica muestra los procesos significativamente enriquecidos (p -valor $<0,05$) identificados para todo el conjunto de las 48 proteínas alteradas en respuesta a la hipertensión y albuminuria. Está representado el % de genes asociado a cada proceso biológico, función molecular y relación con los componentes celulares.

El análisis de redes de interacción permite visualizar las conexiones existentes entre proteínas por comparación con una base de datos de interacciones proteicas conocidas y predecibles, tanto directas (físicas) e indirectas (funcionales). Este análisis reveló que 21 de esas 48 proteínas interactúan en conjunto, y participan en tres principales grupos funcionales, como se resume gráficamente en la **figura 27**: "degradación de glicosaminoglicanos (GAGs)", "coagulación y sistema del complemento" y "estrés oxidativo". Para la comparación se empleó el filtro de confianza más alto (0,900).

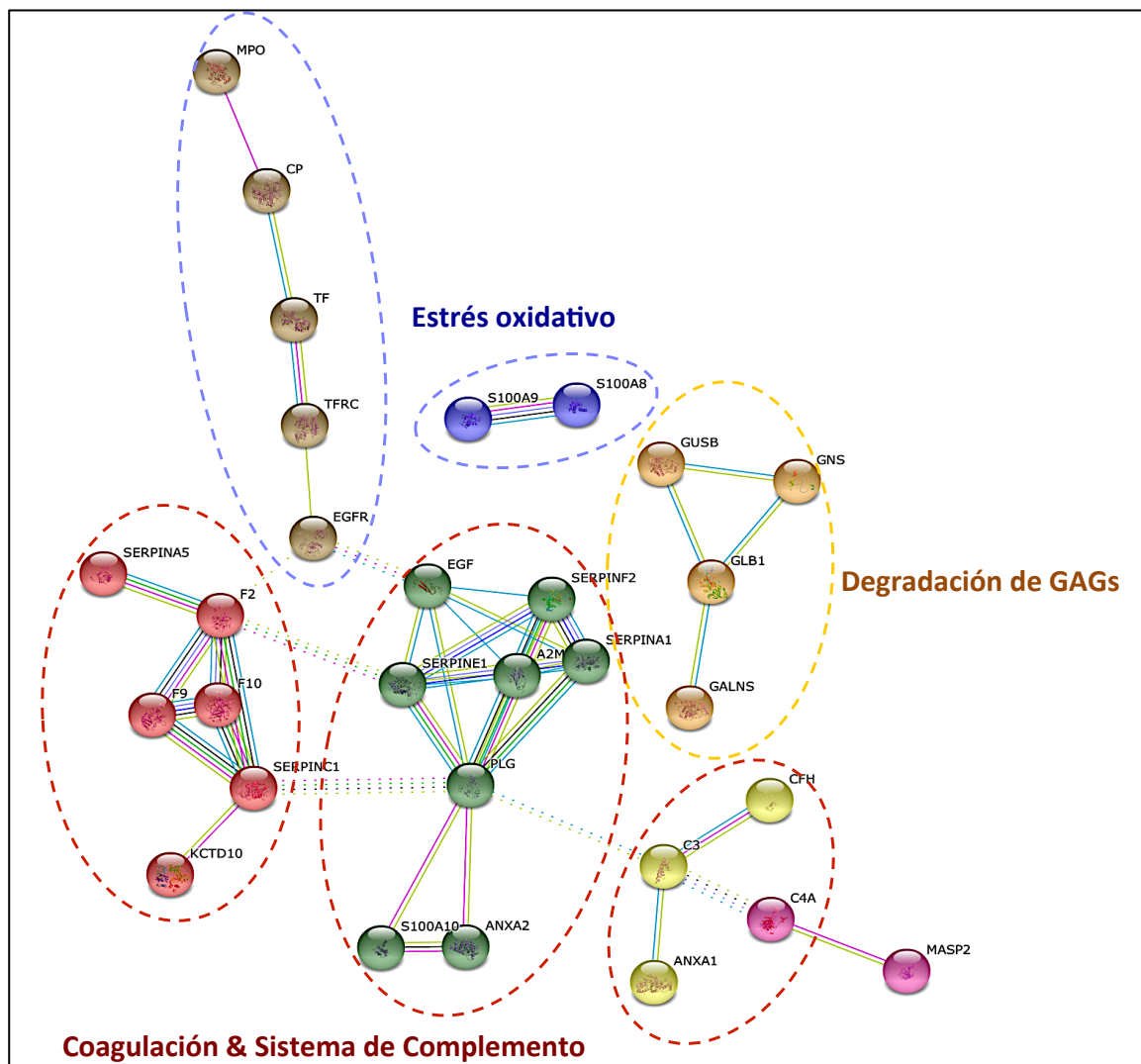


Figura 27. Análisis de redes por STRING que reveló tres grupos principales de interacción, apuntando a la degradación de glicosaminoglicanos (GAGs), a la coagulación y sistema de complemento y al estrés oxidativo como principales procesos fisiopatológicos detrás de hipertensión bajo supresión crónica del SRA y el desarrollo de albuminuria. Los nodos de interacción son proteínas y las líneas representan las asociaciones funcionales predichas entre ellas, según el tipo de evidencia en la que se basan; línea verde: proximidad en el genoma, línea azul: co-ocurrencia de genes en el genoma, línea morada: evidencia experimental, línea amarilla: evidencia extraída del análisis intensivo de datos (Text-mining), línea azul claro: evidencia en bases de datos, línea negra: evidencia de co-expresión.

48 proteínas mostraron un patrón alterado en los pacientes, incrementados o disminuidos en respuesta a: hipertensión sin albuminuria (9 proteínas), microalbuminuria mantenida (18 proteínas), y *de novo* la albuminuria (respuesta temprana) (21 proteínas). Este panel de proteínas alterado apunta a la inflamación, a la regulación del sistema del complemento, al estrés oxidativo, y a la degradación de glicosaminoglicanos.

Los resultados de este estudio han sido recientemente enviados a la revista científica *Hypertension* a la espera de una respuesta (**Anexo 6**).

FIRMA METABÓLICA ESPECÍFICA EN ORINA EN HTA TRATADA

Análisis de una Huella metabólica respondedora a hipertensión y albuminuria por RMN

Adicionalmente al perfil proteómico en orina y en exosomas aislados de orina, realizamos un estudio metabolómico basado en el análisis por RMN. Se analizó el metaboloma de la orina de pacientes hipertensos tratados con fármacos inhibidores del SRA. Los metabolitos (<2000 Da) representan los productos finales de los procesos celulares y nos proporcionan información de los cambios metabólicos que están ocurriendo como respuesta última del organismo, una serie de procesos fisiopatológicos, por lo que es una estrategia con alto potencial para el descubrimiento de marcadores y para la detección de los primeros signos de daño orgánico y respuesta a un tratamiento. Por medio de la metodología RMN obtenemos información de la composición de la muestra que nos sirve como primera aproximación para el estudio de marcadores moleculares en una muestra biológica compleja, como es la orina.

El estudio RMN (fase de descubrimiento) se realizó con 64 muestras de orina (14 controles y 50 pacientes HTA) (**Tablas 7 y 8 de material y métodos**). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico identificando regiones del espectro (desplazamientos químicos, ppm) diferenciales y con mayor contribución a la separación entre grupos.

Elegimos la evaluación de la variación de cada bucket para seleccionar los desplazamientos (δ) diferenciales en alguno de los grupos de pacientes analizados (diabéticos y no diabéticos) lo que nos permitió seleccionar un total de 130 metabolitos posibles (según δ y su intensidad) que se evaluarán mediante un análisis de 2D RMN. En la **figura 28** se muestran unos ejemplos correspondientes a los distintos tipos de tendencias encontradas, mostrando variaciones de desplazamientos químicos representativos.

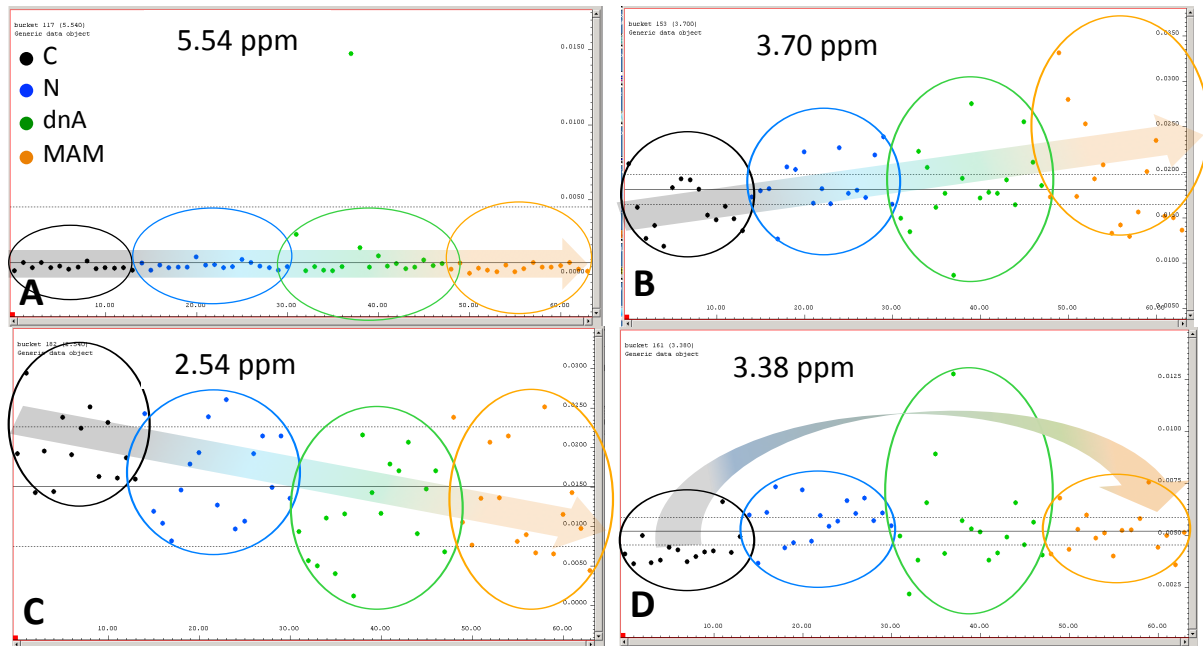


Figura 28. Ejemplos de estadística de los desplazamientos (buckets) donde se puede ver que no hay una diferencia grande entre los grupos pero sí una tendencia clara de evolución de la enfermedad en sus distintos estadios de proteinuria. A: desplazamientos químicos sin variación aparente en la tendencia entre grupos, éstos no fueron seleccionados para la identificación y el análisis por SRM-LC-MS/MS. B-D: desplazamientos químicos representativos que muestran la variación en la tendencia entre los grupos, B: Progresión de la enfermedad aumentando, C: Progresión de la enfermedad disminuyendo, D: estadios intermedios. C control. N normoalbuminúricos. dnA *de novo* albuminuria. MAM microalbuminuria mantenida.

Concluida una primera fase de identificación de señales “indicadoras” (desplazamientos químicos) de la propia enfermedad, su estadio o evolución, se procedió a la búsqueda de los metabolitos correspondientes a dichas señales. Para ello, se registraron espectros de segunda dimensión (2D RMN) (ver **Figura 29**) midiendo un pool de muestras de pacientes y controles con una señal RMN rica. Los espectros 2D nos da información acerca de las relaciones entre las moléculas presentes según el tipo de espectro que se adquiriera como la espectroscopia de correlación, COSY (relación entre protones distantes a un enlace), la espectroscopia de correlación total, TOCSY (relación entre protones de una especie a uno, dos e incluso tres enlaces de separación) y el espectro HSQC (relación entre los Hidrógenos y los Carbonos de un mismo enlace).

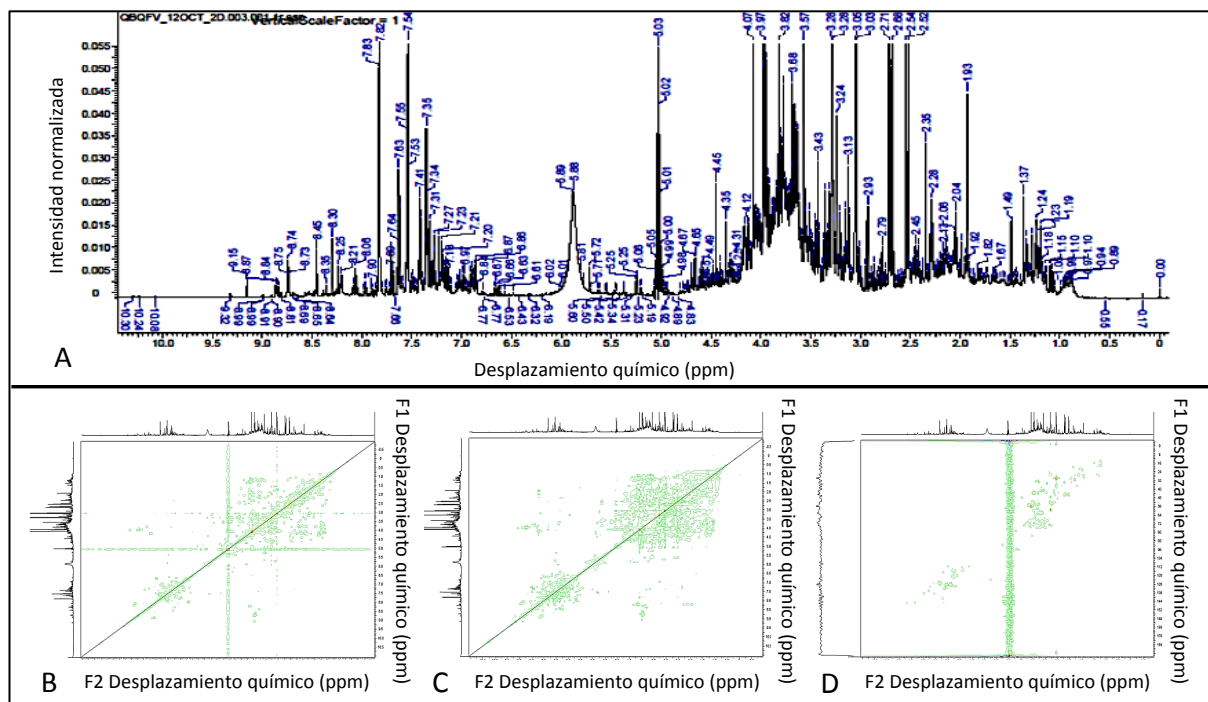


Figura 29. Espectros de RMN realizados. A: muestra un espectro de primera dimensión (1D) para una orina mezcla de pacientes y controles con mayor número e intensidad de señal. B, C y D son espectros de segunda dimensión (2D) COSY, TOCSY y HSQC por ese orden. Así, se confirma la asignación de los metabolitos a cada una de las señales recogidas en los espectros de primera dimensión y a las que contribuyen principalmente a la separación entre los distintos grupos. De este modo, se lleva a cabo la identificación inequívoca de los metabolitos implicados.

Como primer acercamiento, de una lista de 130 metabolitos posibles seleccionados según desplazamiento e intensidad, 30 correspondieron a los desplazamientos diferenciales de interés, como moléculas vinculadas a la hipertensión con inhibición del SRA y a la albuminuria alterada (**Tabla 22**)

Tabla 22. Metabolitos identificados en la primera fase de descubrimiento (RMN) como posibles respondedores a la hipertensión o la albuminuria. Estos metabolitos fueron evaluados posteriormente por SRM-LC-MS/MS. La clasificación y los desplazamientos químicos que aparecen en la tabla se basaron en la base de datos HMDB.

| METABOLITO | DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (ppm) y MULTIPLICIDAD |
|--------------------------------|--|
| Aminoácidos y derivados | |
| Ácido 2,3-diaminopropiónico | 3.38 (dd); 3.92(dd) |
| 5-oxoprolina | 2.02 (m); 2.39 (m); 2.50 (m); 4.17(dd) |
| alfa-N-fenilacetil-L-glutamina | 7.42 (t); 7.36 (t); 4.18 (m); 3.66 (q); 2.26 (t); 2.11 (m); 1.92 (m); 1.55 (m); 1.33 (m); 0.89 (m) |
| Betaina | 3.89 (s); 3.25 (s) |
| Glicina | 3.54 (s) |
| Ácido guanidinoacético | 3.78 (s) |
| L-alanina | 1.46 (d); 3.76 (q) |
| Ácido L-glutámico | 2.04 (m); 2.12 (m); 2.34 (m); 3.75 (dd) |
| L-serina | 3.83 (dd); 3.96 (m) |
| Ácido pantoténico | 0.88 (s); 0.92 (s); 2.41 (t); 3.39 (d); 3.43 (q); 3.51 (d); 3.98(s) |
| Azúcares | |
| Galactitol | 3.68 (m); 3.97 (t) |
| Ácido glucónico | 3.66 (m); 3.76 (m); 3.82 (m); 4.03 (t); 4.12 (d) |
| Gluconolactona | 3.66 (dd); 3.76 (m); 3.82 (dd); 4.03 (t); 4.12 (t) |
| Ácido glicérico | 3.78 (m); 4.13(m) |
| L-Arabitol | 3.57 (dd); 3.66 (m); 3.75(td); 3.83(dd); 3.93(m) |
| Colinas | |
| Acetilcolina | 2.16 (s); 3.23 (s); 3.75 (t) |
| Colina | 3.19 (s); 3.51 (dd); 4.06 (ddd) |
| Ácidos grasos | |
| Ácido 3-hidroxiбутírico | 1.20 (d); 2.31 (m); 2.41 (m); 4.16 (m) |
| Ácido málico | 2.36 (dd); 2.66 (dd); 4.29 (dd) |
| Otros | |
| Ácido 3-ureidopropiónico | 2.36 (t); 3.29 (q) |
| Ácido cítrico | 2.53 (d); 2.65 (d) |
| Dimetilamina | 2.50 (s) |
| Histamina | 3.03 (m); 3.29 (t); 7.14 (s); 7.99 (s) |
| Mioinositol | 3.27 (t); 3.52(dd); 3.61 (t); 4.05 (t) |
| N-metilhidantoína | 2.92 (s); 4.08(s) |
| Fosfoetanolamina | 3.24 (t); 4.01 (td) |
| Ácido oxalacético | 2.38 (s) |
| Ácido pirúvico | 2.46 (s) |
| Taurina | 3.25 (t); 3.42(t) |
| Trimetilamina N-óxido (TMAO) | 3.25 (s) |

Confirmación y selección de metabolitos con respuesta alterada en HTA y/o albuminuria por espectrometría de masas dirigida SRM-LC-MS/MS

Para la confirmación y la selección final de una firma metabólica, esos 30 metabolitos fueron analizados en una cohorte independiente de 68 pacientes y 14 sujetos sanos (**Tablas 15 y 16 de material y métodos**), utilizando la metodología cuantitativa basada en la medición de masas específicas correspondientes al metabolito de interés (SRM-LC-MS/MS) que previamente se optimizó por medio de la inyección directa de patrones comerciales (1ug/ml) y tal y como habíamos realizado en estudios previos [70], [71], [177]. De este modo, se eligió la transición (precursor→fragmento), la energía de colisión, el potencial fragmentador y el modo de ionización que mejor resultado daba en cuanto a intensidad de pico (**Tabla 18 de material y métodos**).

Finalmente, se confirmaron las diferencias significativas para un total de nueve metabolitos urinarios (**Tabla 23**): glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato y 3-ureidopropionato con valores disminuidos en comparación con los individuos sanos (**Figura 30 y tabla 24**), y 3-hidroxiacetato, malato y piruvato, con un aumento de respuesta en hipertensión bajo i-SRA o en condición de albuminuria (**Figura 31 y tabla 24**).

En la **tabla 23** se muestran las comparaciones estadísticas entre los grupos correspondientes a cada metabolito y que responden a la hipertensión en sí misma, o a la hipertensión con dnA o MAM y en la **tabla 24** los valores medios y error medio estándar (SEM) de la estadística.

Tabla 23. Metabolitos que muestran alteración significativa en respuesta a hipertensión (HTA), *de novo* albuminuria (dnA), y microalbuminuria mantenida (MAM). En la tabla se muestran el p-valor. Las diferencias estadísticas entre dos grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (p-valor <0,05 fue considerado significativo). C: control. N: normoalbuminúricos. ns: no significativo.

| METABOLITO (tendencia) | C/N | C/dnA | C/MAM | N/dnA | N/MAM | dnA/MAM |
|---------------------------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|
| Glutamato ↓ | 0.0034 | 0.0128 | <0.0001 | ns | <0.0001 | 0.0005 |
| Glicerato ↓ | <0.0001 | 0.0005 | <0.0001 | ns | 0.0068 | 0.0318 |
| 3-Ureidopropionato ↓ | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | ns | ns | ns |
| 3-Hidroxiacetato ↑ | ns | ns | <0.0001 | ns | <0.0001 | <0.0001 |
| Piruvato ↑ | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0299 | <0.0001 | 0.0001 |
| Guanidoacetato ↓ | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | ns | <0.0001 | 0.0150 |
| Oxalacetato ↓ | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0226 | <0.0001 | 0.0062 |
| Pantotenato ↓ | 0.0004 | 0.0002 | <0.0001 | ns | <0.0001 | <0.0001 |
| Malato ↑ | 0.0058 | 0.003 | <0.0001 | ns | <0.0001 | <0.0001 |

Tabla 24. Valor medio y error medio estándar (SEM) correspondientes a la **Figura 30 y 31**. Los valores pertenecen al área de pico medido por espectrometría de masas normalizado por el TIC (del inglés *total ion current*). C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: *de novo* albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida.

| Metabolito | | C | N | dnA | MAM |
|---------------------------|------------------|----------|----------|------------|------------|
| Glutamato | | | | | |
| | Promedio | 0,00283 | 0,00193 | 0,00187 | 0,00103 |
| | Est. error media | 0,00027 | 0,00012 | 0,0002 | 0,00006 |
| Glicerato | | | | | |
| | Promedio | 0,00069 | 0,00036 | 0,00035 | 0,00025 |
| | Est. error media | 0,00007 | 0,00003 | 0,00004 | 0,00002 |
| 3-Ureidopropionato | | | | | |
| | Promedio | 0,0092 | 0,003 | 0,0024 | 0,0025 |
| | Est. error media | 0,0008 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0002 |
| Guanidoacetato | | | | | |
| | Promedio | 0,066 | 0,034 | 0,024 | 0,02 |
| | Est. error media | 0,005 | 0,002 | 0,001 | 0,002 |
| Pantotenato | | | | | |
| | Promedio | 0,426 | 0,24 | 0,206 | 0,082 |
| | Est. error media | 0,044 | 0,016 | 0,021 | 0,007 |
| Oxalacetato | | | | | |
| | Promedio | 0,00146 | 0,00068 | 0,00048 | 0,00024 |
| | Est. error media | 0,00015 | 0,00004 | 0,00007 | 0,00003 |
| 3-Hidroxibutirato | | | | | |
| | Promedio | 0,0023 | 0,0023 | 0,0021 | 0,0061 |
| | Est. error media | 0,0002 | 0,0001 | 0,0002 | 0,0006 |
| Piruvato | | | | | |
| | Promedio | 0,00061 | 0,00076 | 0,00084 | 0,00109 |
| | Est. error media | 0,00001 | 0,00001 | 0,00003 | 0,00005 |
| Malato | | | | | |
| | Promedio | 0,0098 | 0,0129 | 0,0141 | 0,0235 |
| | Est. error media | 0,0007 | 0,0006 | 0,0011 | 0,0018 |

La **Figura 30** muestra cómo el glutamato (**Figura 30A**), glicerato (**Figura 30B**), guanidoacetato (**Figura 30C**), pantotenato (**Figura 30D**) y oxalacetato (**Figura 30E**) disminuyen significativamente en la orina de pacientes hipertensos en comparación con sujetos sanos. 3-Ureidopropionato también disminuye significativamente en respuesta a la hipertensión (HTA) (**Figura 30F**), pero sin mostrar un efecto de empeoramiento con MAM.

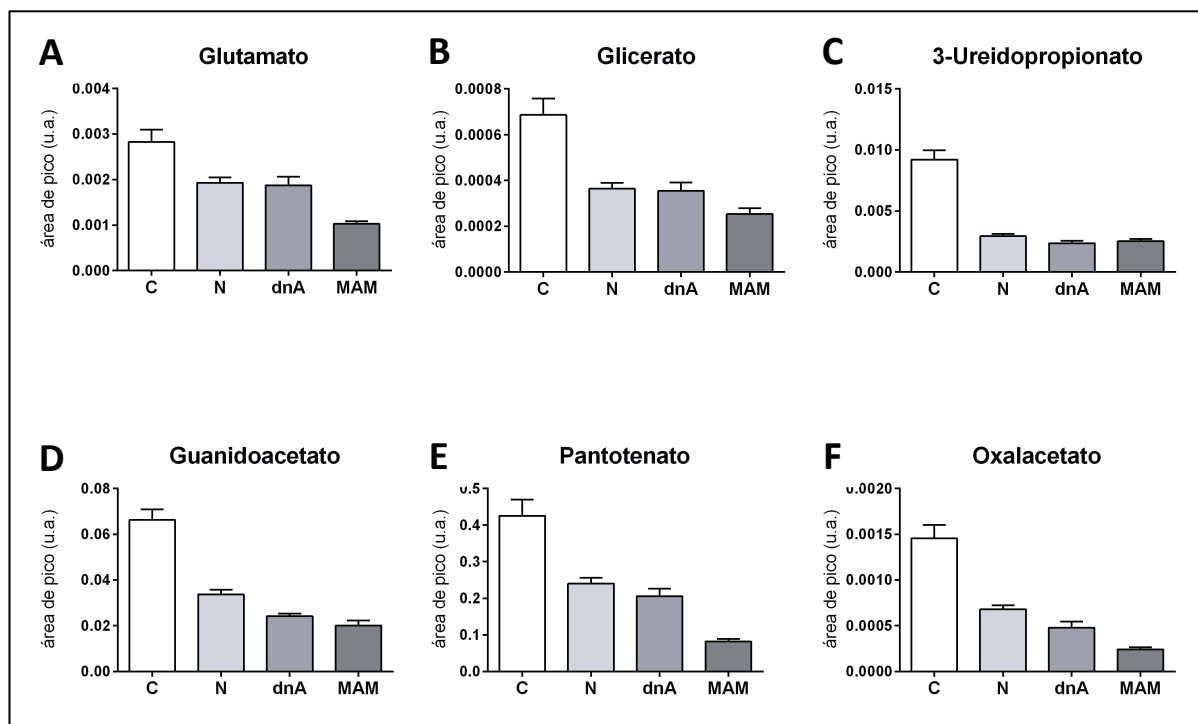


Figura 30. Metabolitos en orina que responden a HTA. Se observaron tendencias decrecientes en pacientes hipertensos con supresión crónica de SRA para el glutamato (A), glicerato (B), 3-ureidopropionato (C), guanidoacetato (D), pantotenato (E) y oxalacetato (F) en respuesta a HTA. Los gráficos representan el análisis SRM-LC-MS/MS de los metabolitos urinarios en una cohorte de 68 pacientes y 14 sujetos sanos. Las señales individuales se normalizaron por la corriente iónica total (TIC) y las áreas de los picos normalizados fueron calculados para la comparación entre grupos. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. Para mayor claridad, los detalles de los valores medios y el error medio se incluyen en la Tabla 24. C: control, N: normoalbuminuria, dnA: *de novo* albuminuria, MAM: microalbuminuria mantenida

Exhibiendo una tendencia opuesta, 3-hidroxiacetato (**Figura 31A**) y malato (**Figura 31C**) responde de manera significativa a MAM, por su parte piruvato aumenta progresivamente con la hipertensión y la albuminuria (**Figura 31B**).

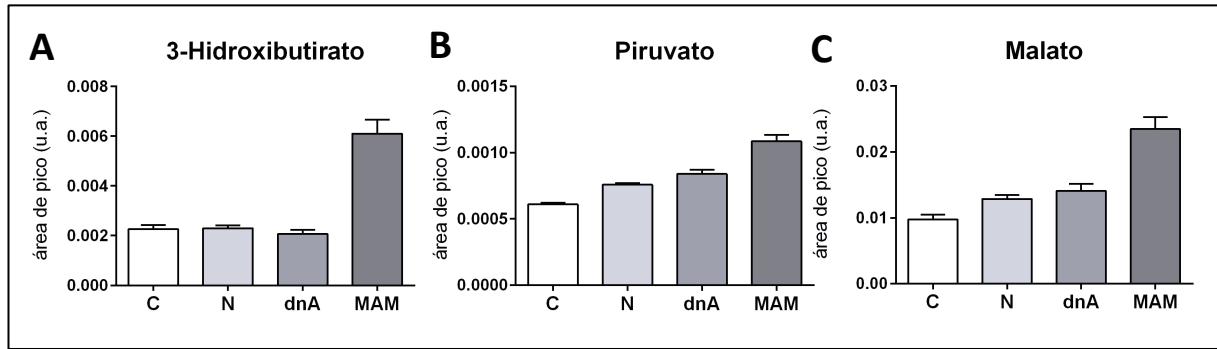


Figura 31. Metabolitos urinarios que responden a la albuminuria. Se observaron tendencias crecientes en pacientes hipertensos bajo i-SRA para 3-hidroxiacetato (A), piruvato (B), y malato (C) en respuesta a la albuminuria. Los gráficos representan el análisis SRM-LC-MS/MS de los metabolitos urinarios en una cohorte de 68 pacientes y 14 sujetos sanos. Las señales individuales se normalizaron por TIC y las áreas de los picos normalizados fueron calculados para la comparación entre grupos. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. Para mayor claridad, los detalles de importancia se incluyen en la **Tabla 24** y más detalles se incluyen en el análisis estadístico. C: control, N: normoalbuminuria, dnA: *de novo* albuminuria, MAM: microalbuminuria mantenida.

En este estudio los pacientes con enfermedades renales fueron excluidos como posible causa de la hipertensión, los valores de creatinina sérica (SCr) en promedio, fueron de 1,03 y los valores promedio de tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) de 75 ml/min^{1,73m2}, sin diferencias significativas entre los grupos de pacientes. Investigamos alteraciones relacionadas con el desarrollo o el mantenimiento de albuminuria donde se sabe que a menor eGFR, mayor es la posibilidad de desarrollar albuminuria y la microalbuminuria es más frecuente [178]. La conjunción de enfermedad renal crónica (ERC) avanzada y la macroalbuminuria difiere de la situación investigada en este estudio como hemos visto en un estudio previo desarrollado en el laboratorio [71]. La hipertensión, la ERC, la albuminuria y la diabetes son frecuentemente coincidentes, por lo tanto los predictores de la albuminuria podrían mostrar cierto grado de correlación con los factores que tan comúnmente acompañan y aumentan la excreción urinaria de albúmina. De hecho, de forma adicional, se analizó la respuesta de estos metabolitos a la disminución del eGFR, el cual mostró una correlación (r entre 0,23 y 0,52 valor absoluto) en estos pacientes (**Figura 32**) aunque la tendencia de los metabolitos según el estudio en algunos casos es diferente a lo observado en cuanto a la separación por los grupos de pacientes, como es en caso de 3-ureidopropionato y 3-hidroxiacetato.

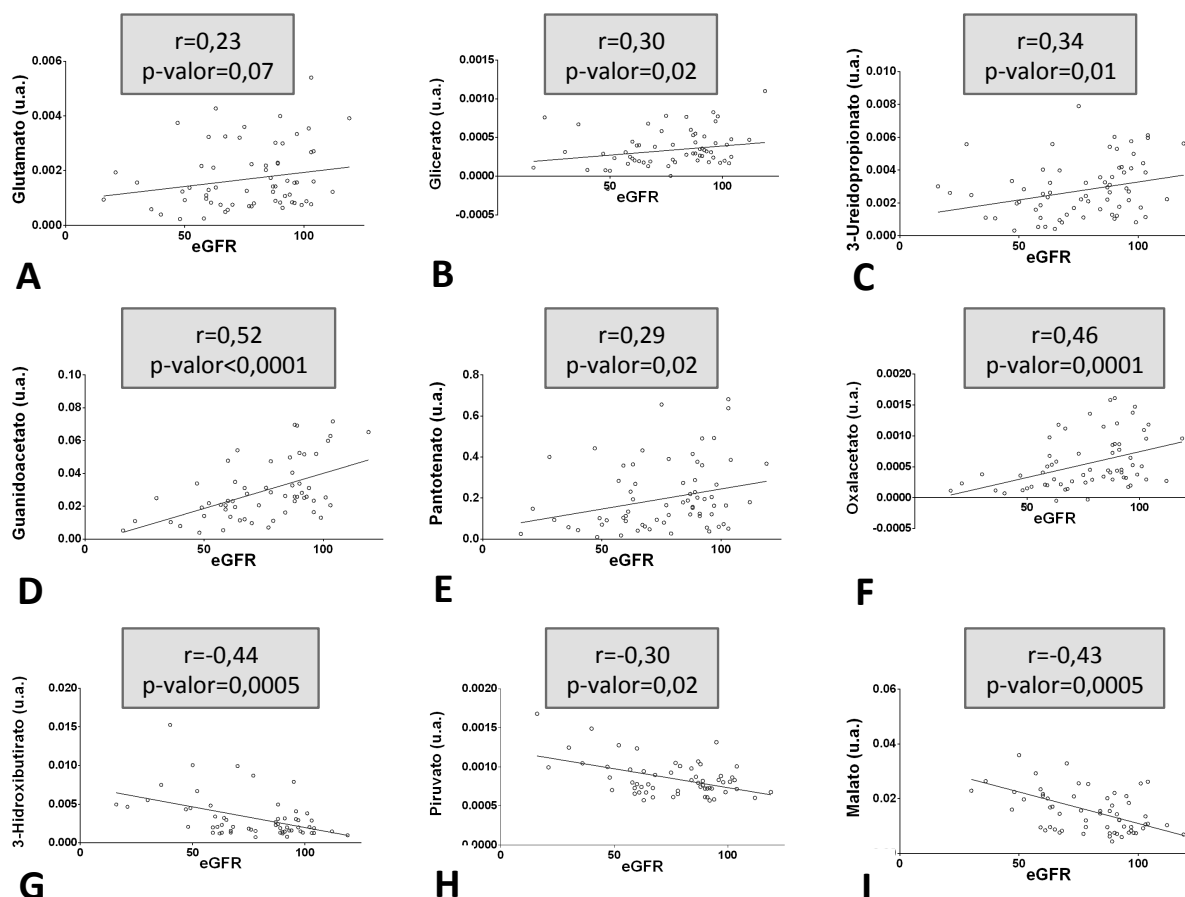
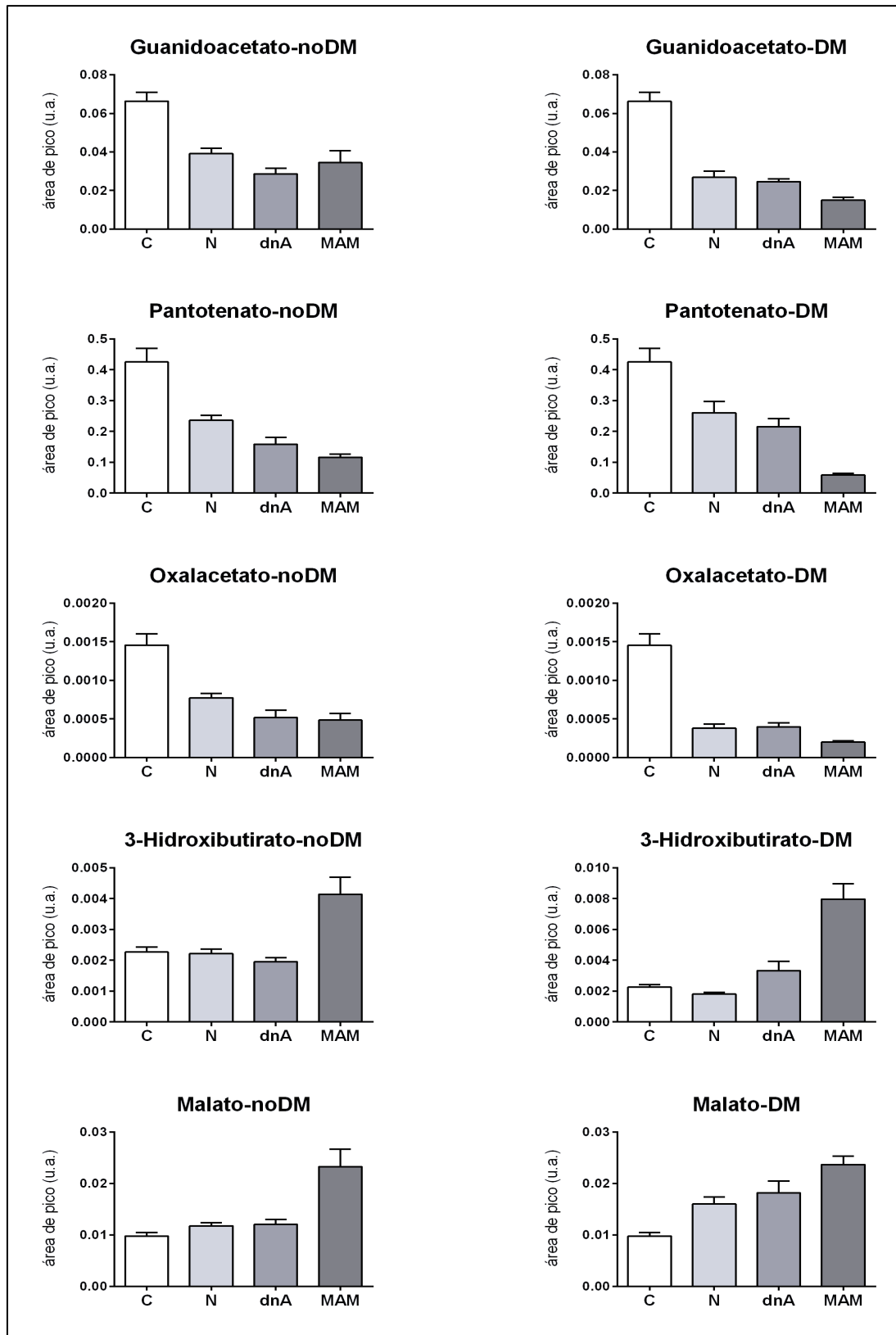
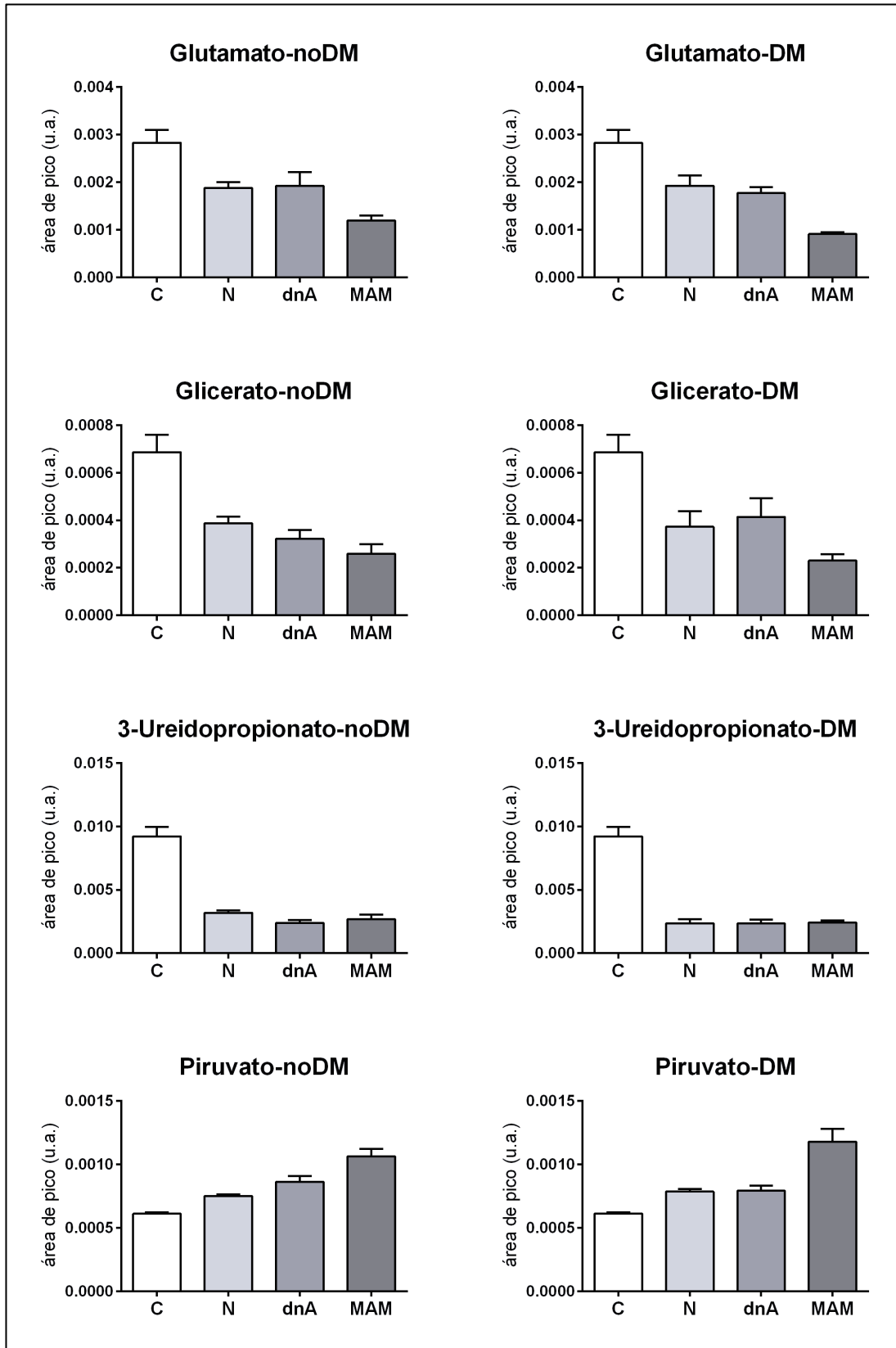


Figura 32. Correlación entre las respuestas de los metabolitos y la disminución de eGFR (tasa de filtración glomerular) en los pacientes hipertensos bajo supresión crónica de SRA. Correlación de Spearman no paramétrico: r+ (correlación positiva) (A-F), r- (correlación negativa o inversa) (G-I).

Las tendencias anteriores de los metabolitos muestran una respuesta global para los individuos diabéticos y no diabéticos. La contribución específica de la diabetes se evaluó mediante el análisis por separado de las respuestas metabólicas. Las tendencias del guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato, 3-hidroxi butirato y malato en pacientes diabéticos comparado con los no diabéticos, reflejan una influencia agravante, ya sea mediante la adición de un efecto que se suma a la albuminuria (dnA, MAM) o anticipando el daño en el riñón antes de un aumento medible de albúmina en orina (N) (**Figura 33**).

Figura 33. Influencia de la diabetes mellitus en la respuesta de los metabolitos variados significativamente. noDM: pacientes sin diabetes, DM pacientes con diabetes, C: control, N: normoalbuminuria, dnA: *de novo* albuminuria, MAM: microalbuminuria mantenida.





Patrón metabólico que predice el desarrollo específico de la albuminuria en pacientes hipertensos con valores normales de albúmina en orina

Una vez identificados los perfiles de los metabolitos con alteración de su respuesta en este escenario clínico, se realizó un estudio prospectivo para evaluar su potencial capacidad significativa para predecir el desarrollo futuro de albuminuria en individuos hipertensos normoalbuminúricos. Para ello, se analizó la orina de un subgrupo de 35 pacientes HTA normoalbuminúricos (véase la **tabla 17 de material y métodos** para las características iniciales). Posteriormente a la recolección de orina para este estudio, estos pacientes normoalbuminúricos fueron seguidos clínicamente durante al menos un año. El resultado fue que, 26 permanecieron como normoalbuminúricos (N) (no progresaron), mientras que 9 se convirtieron en dnA (sí progresaron). En la **tabla 17** se recogen los factores de riesgo clínicos de estos 35 individuos, sin diferencias significativas entre los progresores (dnA) y no progresores (mantenidos como N). En la orina, cuando todos los individuos mostraron niveles normales de albuminuria, guanidoacetato, glutamato y pantotenato mostraron niveles significativamente más altos en aquellos individuos que más tarde se convertirían en dnA (**Figura 34**). Esto significa que estos tres metabolitos ya muestran una alteración en sus niveles urinarios cuando la situación clínica de los pacientes sigue siendo de normoalbuminuria.

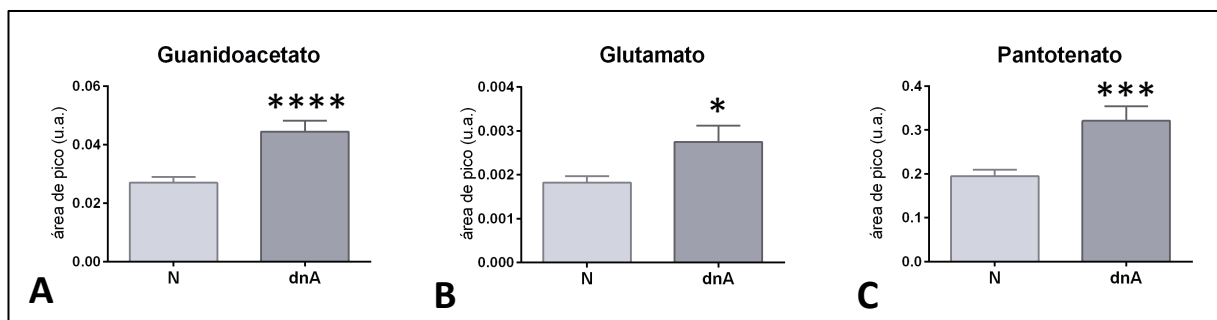


Figura 34. Metabolitos urinarios con potencial predictivo. Un panel específico compuesto de tres metabolitos (guanidoacetato (A), glutamato (B), y pantotenato (C)) predice el desarrollo de albuminuria cuando se analizan en orina de pacientes con normoalbuminuria. Los gráficos representan el análisis SRM-LC-MS/MS de los metabolitos urinarios en una cohorte de 35 pacientes normoalbuminúricos (**Tabla 17 de material y métodos**, la confirmación de cohortes) que durante el seguimiento de al menos un año a partir de la recolección de las muestras de orina para el estudio, permanecieron como N o progresaron a dnA. Las señales individuales se normalizaron por TIC y las áreas de los picos normalizados fueron calculados para la comparación estadística entre grupos. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. C: control, N: normoalbuminuria, dnA: *de novo* albuminuria. ****: p-valor <0,0001, ***: p-valor <0,001, *: p-valor <0,05).

Paneles multi-moleculares ligados a la hipertensión, albuminuria mantenida y predicción de progresión.

Teniendo en cuenta las respuestas individuales de los metabolitos que muestran alteraciones significativas entre los grupos de pacientes (**Figuras 30 y 31**), nos propusimos evaluar el valor añadido que puede tener el empleo de paneles metabólicos frente al uso de marcadores individuales. Metabolitos con respuestas similares (tendencias de variación) se agruparon y se evaluó el rendimiento de los paneles a través de curvas ROC (representación gráfica de la sensibilidad frente a 1-especificidad) y capacidad de predicción de clase. Se realizaron análisis por curvas ROC multivariante, basados en los datos de espectrometría de masas, y los resultados de estos estudios se recogieron como muestra la **Figura 35**. La visión general de predicción muestra las probabilidades de predicción de clase (eje x) de cada muestra (eje y). Las puntuaciones de probabilidad van desde 0 a 1, lo que significa que menos del 0,5 pertenecerá a un grupo, y más de 0,5 pertenecen a otro grupo, así, la probabilidad predicha para cada muestra de pertenecer a un grupo u otro puede ser visualizado.

Definimos un panel molecular relacionado con la hipertensión ("met-HTN") incluyendo las respuestas de guanidoacetato, pantotenato, 3-ureidopropionato, oxalacetato y piruvato, y que muestra un área bajo la curva (AUC) de 0,942 (**Figura 35A**). Un panel compuesto por 3-hidroxiacetato y piruvato, denominado "met-MAM", identifica MAM, con un valor de AUC de 0,892 (**figura 35B**).

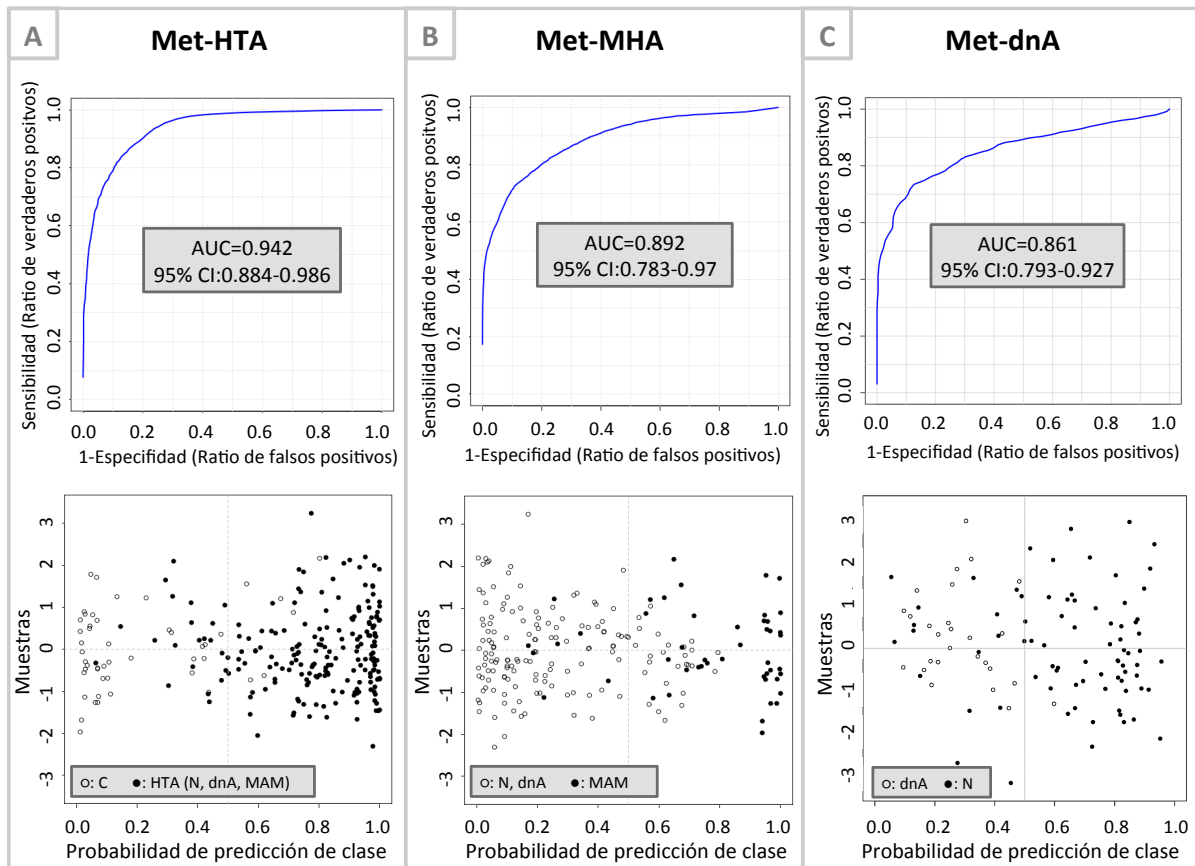


Figura 35. Paneles multi-moleculares que se definen en función de su respuesta, ya sea a la hipertensión (met-HTA), a microalbuminuria mantenida (met-MAM) y al desarrollo *de novo* albuminuria (met-dnA). Los paneles superiores muestran las curvas ROC (AUC: área bajo la curva, con 95% intervalo de confianza) y los paneles inferiores muestran gráficos de probabilidad de pronóstico de clase, que muestran la agrupación de sujetos en función de su estado clínico. Met-HTA se compone de guanidoacetato, pantotenato, 3-ureidopropionato, oxalacetato y piruvato. Met-MAM se compone de 3-hidroxi butirato y piruvato. Met-dnA se compone de guanidoacetato, glutamato y pantotenato.

En el estudio prospectivo, se encontró alteración significativa en la orina de los pacientes N que más tarde van a progresar a dnA para guanidoacetato, glutamato y pantotenato como se mostró en la **Figura 34**. Con estos datos, se evaluó la combinación de estas tres respuestas metabólicas en un tercer panel ("met-dnA") que resulta en un valor de AUC de 0,861 (**Figura 35 C**).

En este estudio se demuestra el valor añadido en la exactitud de predicción proporcionada por estos paneles si se comparan con el diagnóstico o pronóstico basado en la respuesta del marcador individual. Se observa una correlación positiva de los paneles met-HTA y met-dnA (ambos paneles con más de 2 variables) entre la precisión de predicción y el número de características incluidas, aumentando la sensibilidad y la especificidad como se muestra en la **Figura 36**.

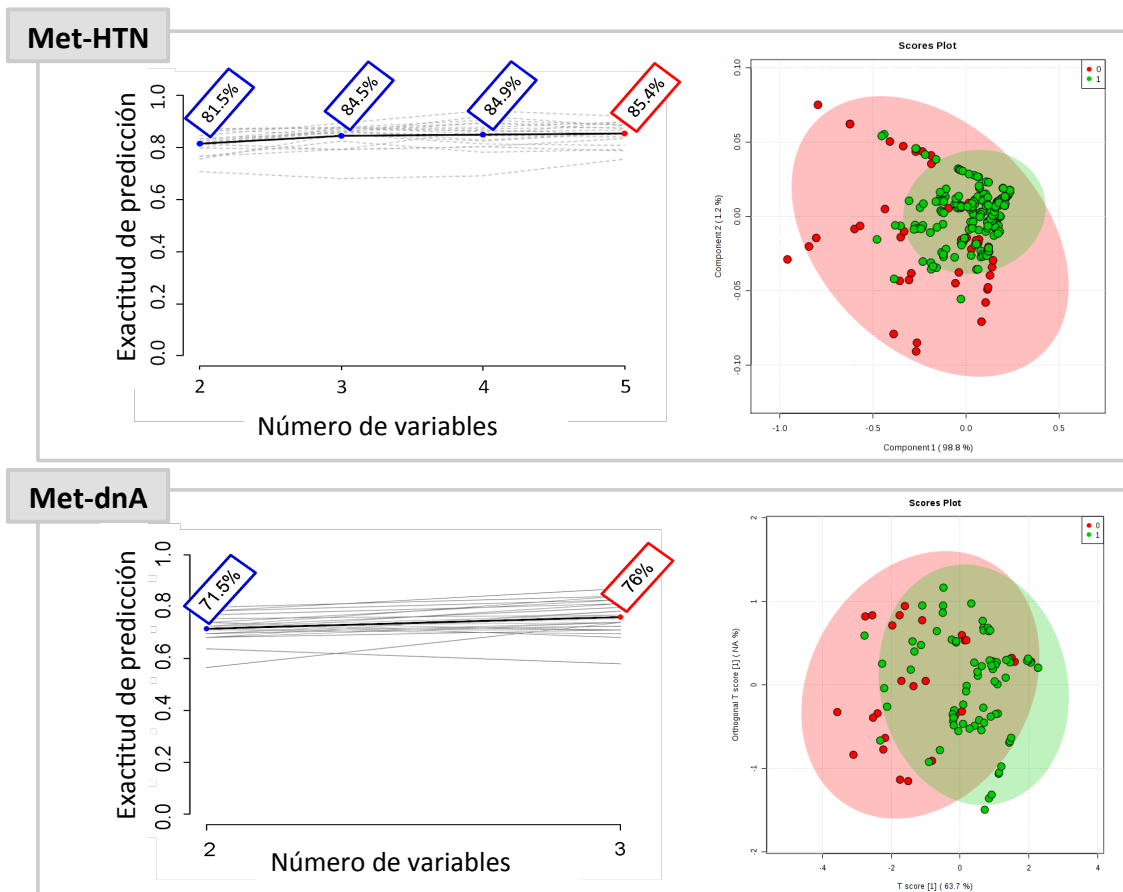


Figura 36. Exactitud de predicción de los paneles de metabolitos relacionada con el número de variables incluidas. Sólo se muestra Met-HTA y Met-dnA debido a que están compuestos por más de 2 variables. La exactitud de predicción aumenta claramente con el número de metabolitos incluidos. El gráfico PLS superior (Met-HTA) muestra agrupación de los sujetos de acuerdo con la condición de HTA (rojo: controles; verde: pacientes HTA). El gráfico PLS inferior (Met-dnA) muestra agrupación de los individuos HTA no progresores (los que quedan como normoalbuminúricos; verde) y la dispersión de normoalbuminúricos que tendrán una progresión negativa por el desarrollo de albuminuria (rojo).

En la **figura 37** se muestra la contribución relativa individual para cada metabolito en el modelo de hipertensión (Met-HTA) y en el modelo de predicción (met-dnA) donde se refleja la importancia media que proporciona una medida cuantitativa de la importancia de un biomarcador dado [160]. La escala de color se refiere a aumentar / disminuir en abundancia entre los grupos comparados. En el caso de Met-HTA solo el piruvato aumenta mientras que los otros 4 metabolitos disminuyen con respecto al control. En el panel Met-dnA, los tres metabolitos aumentan en dnA (progresores) en comparación con N (no progresores)

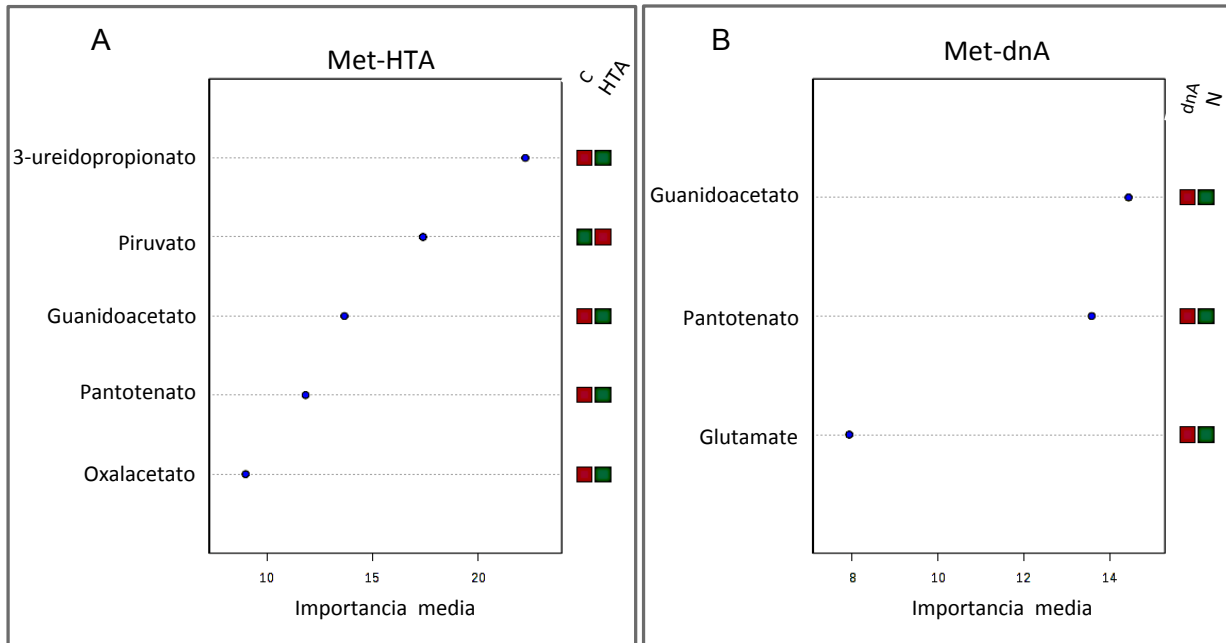


Figura 37. Gráficas de la contribución relativa individual para cada metabolito en el modelo de hipertensión (Met-HTA) y en el modelo de predicción (Met-dnA) rojo: aumentado, verde: disminuido.

Por otro lado se vio que este panel posee un mejor rendimiento en cuanto al AUC de posibles diferencias en los factores clínicos establecidos para la evaluación de pacientes hipertensos (véase la **Figura 38**). Las curvas ROC calculadas para SCR, eGFR o ACR individual (**Figura 38A-C**) o los tres de ellos combinados (AUC 0,601) (**Figura 38D**) se comportaron peor que los metabolitos de predicción met-dnA con AUC de 0,861. No se observaron diferencias significativas en la clínica de los pacientes que no progresan (N) de los que sí lo hacen (dnA), en cuanto a los factores clínicos mencionados, por lo tanto, podemos decir que las diferencias observadas en las respuestas metabólicas no podían atribuirse a un sesgo en los factores clínicos establecidos de riesgo.

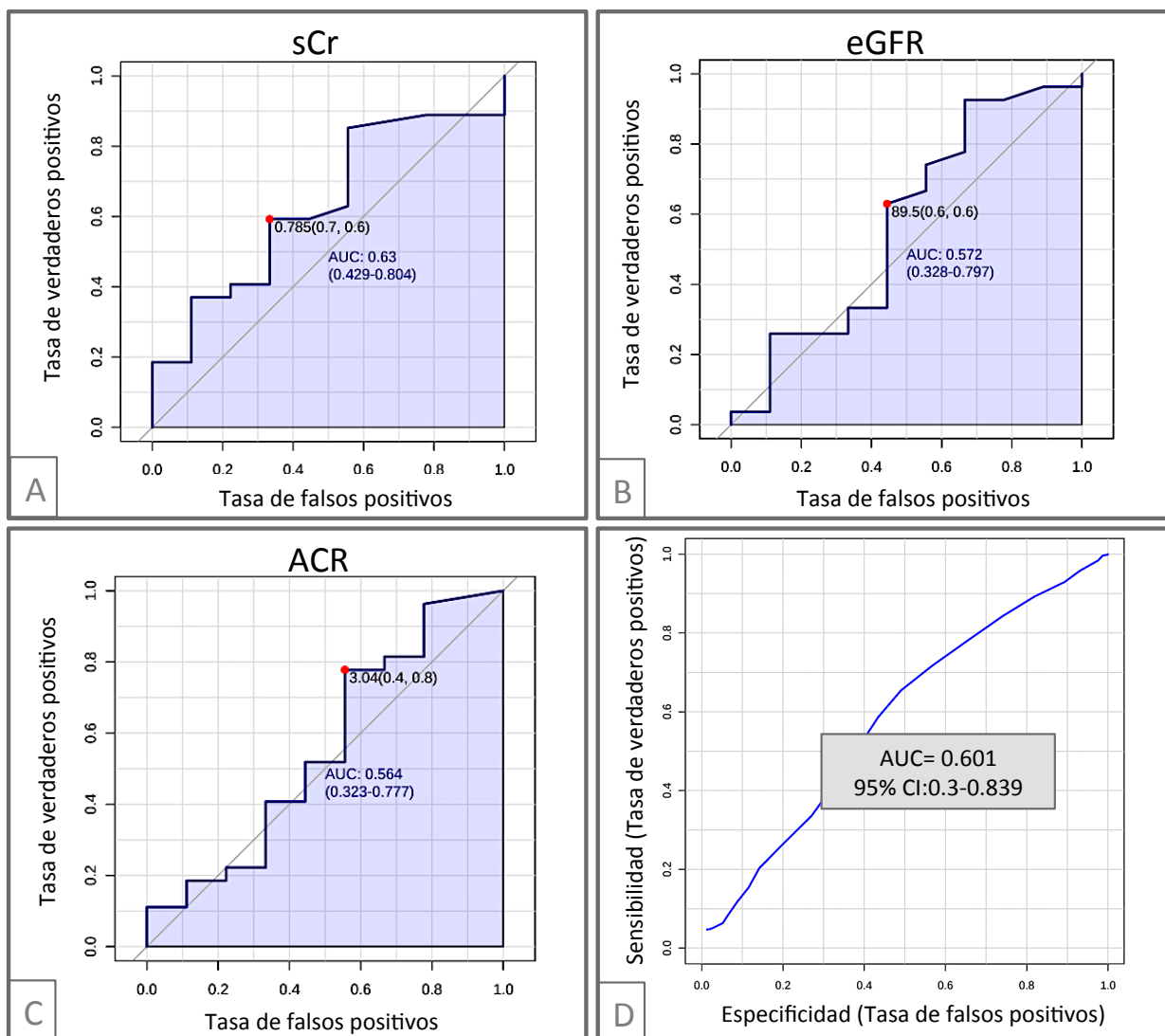


Figura 38. Curvas ROC de factores clínicos empleados en la práctica clínica habitual para la evaluación de pacientes hipertensos en predicción de progresión de albuminuria de individuos hipertensos normoalbuminúricos. A) SCr, B) eGFR, C) ACR y D) los tres factores clínicos combinados.

Nueve metabolitos de la orina aparecen alterados de manera significativa, los cuales se pudieron agrupar en paneles respondedores a HTA en sí misma y de microalbuminuria mantenida. Por otro lado, el estudio prospectivo reveló un panel compuesto por 3 metabolitos, que fue capaz de predecir el desarrollo de la albuminuria (dnA).

Estos resultados han dado lugar a una publicación actualmente aceptada en la revista *Translational Research* 2016 (**Anexo 6**).

Capítulo 4

Discusión

DESARROLLO DE ALBUMINURIA EN PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS DE FORMA CRÓNICA

La hipertensión es un importante factor de riesgo que se asocia con lesión en órganos diana, y afecta particularmente al corazón, a los vasos y a los riñones, lo que implica un empeoramiento significativo del pronóstico cardiovascular y renal, entre otros sistemas. En los pacientes con hipertensión esencial y función renal normal (tasa de filtración glomerular, $eGFR > 60 \text{ ml/min/1,73m}^3$), el aumento de la excreción urinaria de albúmina (albuminuria) se considera marcador de progresión de la enfermedad cardiovascular y de empeoramiento de la función renal [37]–[39] independientemente de la coexistencia de diabetes [38], [42]. Su capacidad predictiva se basa en el hecho de que existe daño microvascular en el riñón, y ésta y otras formas de diagnóstico de daño a órganos diana se han utilizado para predecir la mortalidad, aun cuando el riesgo cardiovascular global (evaluación basada en SCORE) no es elevada [43]. La albuminuria es parcialmente una consecuencia de la PA alta, además otros factores tales como la inflamación sistémica y la disfunción endotelial también participan en su aparición, así como en la disminución progresiva de $eGFR$ [179].

En pacientes hipertensos, la albuminuria se asocia, con la proteína C reactiva (PCR) y el péptido natriurético tipo B (NT-PNB), lo que nos sugiere que hay una correlación entre la gravedad de tener microalbuminuria y la aparición de inflamación y de insuficiencia cardíaca [179]. El bloqueo del sistema renina-angiotensina (SRA), que es el enfoque terapéutico más eficaz, tiene un doble objetivo; se ha demostrado que facilita el control de la PA y previene o disminuye el desarrollo albuminuria [54]. Sin embargo, la regresión de la eliminación de albúmina en respuesta al tratamiento no implica necesariamente un mejor pronóstico CV [180]–[182]. De hecho, la disminución de la albuminuria tiene que ser superior a 50% con el fin de ver una mejora en el pronóstico [183]. Por lo tanto, la albuminuria, como tal, tiene que ser considerada más como un marcador de daño que como un factor de riesgo [48]. En estudios realizados en individuos hipertensos con bajo o moderado riesgo CV, se vio que la presencia de albúmina en orina al inicio del estudio y el desarrollo de novo durante el seguimiento clínico, está vinculado a un mayor riesgo CV independientemente de otros factores de riesgo [30], [45]. Recientemente, por otra parte, se ha visto que existe desarrollo de eliminación patológica de albúmina en pacientes con tratamiento supresor del SRA con inhibidores (i-SRA) [42], [45]. En concreto, en la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre, el 16,1% de los pacientes normoalbuminúricos desarrollaron albuminuria de novo durante los tres años siguientes al inicio del tratamiento [30].

Así, se necesita encontrar nuevos predictores de progresión de la albuminuria para la evaluación de la lesión de órganos diana en hipertensos, lo que permite identificar individuos con mayor riesgo CV y ajustar de forma más adecuada la intervención farmacológica [180]. Los análisis, empleando estrategias ómicas (proteómica y metabolómica), proporcionan una información no sesgada de los cambios moleculares ya que, los cambios que ocurren a nivel molecular, se analizan como un todo, sin pre-selección de objetivos potenciales de interés.

En esta tesis hemos determinado paneles moleculares en orina relacionados con el desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos diabéticos y no diabéticos, con supresión crónica del SRA. Identificamos proteínas y metabolitos con distintas respuestas asociadas a la HTA y/o al desarrollo de albuminuria y llevamos a cabo estudios prospectivos, con el fin de identificar moléculas de respuesta temprana con potencial predictor. Estos marcadores moleculares han sido evaluados de forma positiva, tanto en la vigilancia de daño renal, como en la predicción de la progresión de la albuminuria, lo que demuestra que los mecanismos biológicos subyacentes tienen un reflejo molecular medible en orina y permiten anticipar la respuesta al biomarcador clínico tradicional (albuminuria).

PERFIL PROTEÓMICO DE LA ORINA DE PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON i-SRA

Con el fin de encontrar indicadores de daño orgánico subyacente, se llevó a cabo un análisis proteómico de la orina por 2D-DIGE con una pequeña cohorte inicial de pacientes no diabéticos para la fase de descubrimiento. Posteriormente, la cohorte de validación por SRM, incluyó tanto individuos diabéticos como no diabéticos y fue significativamente más numerosa. Como hemos demostrado en esta tesis, la presencia de diabetes no influyó significativamente en los niveles de proteínas alteradas, más que anticipando ligeramente la respuesta o agravando la misma como discutiremos más adelante.

En este estudio, identificamos un panel de proteínas que responden de manera diferencial al desarrollo de albuminuria en estos pacientes. Este panel lo componen principalmente tres proteínas: la proteína reguladora del complemento CD59 (CD59), α -1 antitripsina (AAT) y la tetranectina (TNA). De estas tres proteínas, CD59 y AAT mostraron niveles alterados en orina de pacientes normoalbuminúricos, que posteriormente, durante el seguimiento, van a desarrollar microalbuminuria. Además, estas alteraciones diferenciales se observan antes de que aparezca dicho aumento de proteína urinaria, por lo que sirven como predictores de la progresión hacia microalbuminuria.

CD59 se encontró disminuida en orina en pacientes con HTA antes y después del aumento de la eliminación de albúmina. CD59 es una glicoproteína de la superficie celular que inhibe el complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento, necesario para la formación del poro osmótico, y para proteger de este modo las células de la lisis en un escenario inflamatorio [184]. Los inhibidores del sistema de complemento, CD59 y el factor acelerador de la degradación (DAF), son sintetizados por células mesangiales y epiteliales del glomérulo y del túbulo lo que explicaría su presencia en la orina. Los mayores niveles de activación de estos inhibidores en orina se observan en un alto número de enfermedades renales, entre ellas aquellas que aparecen con lesión glomerular [185], [186]. Sin embargo, este incremento no se produjo en otras enfermedades renales, en particular en aquellas con daño túbulo-intersticial [185] lo que nos sugiere que una situación similar podría ocurrir en nuestros pacientes. De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito una expresión reducida de CD59 en las células endoteliales de los pacientes hipertensos, lo que sugiere que CD59 podría tener un posible papel en el desarrollo de la hipertensión y en el aumento del riesgo CV [187], además, curiosamente, se ha observado un ligero aumento en la PA en ratones knockout del gen CD59 [188]. Del mismo modo se ha encontrado una disminución en orina de CD59 en diabéticos con normo o microalbuminuria, lo cual podría contribuir al aumento del riesgo CV [189]. En nuestro estudio, CD59 muestra niveles bajos en orina de pacientes que van a desarrollar albuminuria *de novo*, y esta disminución fue más pronunciada en los individuos diabéticos. Además, CD59 permitió diferenciar pacientes hipertensos con albuminuria normal que van a progresar de forma negativa. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la disminución de los niveles de CD59 en orina, pueden ser considerados como un indicador temprano de daño

vascular y de progresión de aterosclerosis en hipertensos crónicamente tratados con i-SRA [190], [191].

AAT es una proteína plasmática sensible a la respuesta inflamatoria que inhibe serin proteasas, la cual, se ha visto que aumenta en orina de personas con nefropatía diabética [192], [193], en diabéticos con normo, micro o macroalbuminuria [194], [195] y en suero de individuos obesos con síndrome metabólico [196], lo que señala que AAT tiene un papel en las complicaciones que produce la diabetes. AAT también aparece incrementada en orina de pacientes con hipertensión tanto esencial como secundaria, pero sin una correlación con la eliminación albúmina, lo que apoya la idea de que hay filtración glomerular dañada y la producción local de AAT en el riñón dañado actúa como confluente de los mecanismos responsables del aumento de su concentración en la orina [197]. Nuestro estudio va un paso más allá, indicando que, pacientes hipertensos no diabéticos con desarrollo de microalbuminuria *de novo* muestran un aumento del nivel de AAT en orina, así como los pacientes con microalbuminuria mantenida. Por otro lado y aún más importante, el aumento del nivel de AAT en orina de normoalbuminúricos permite predecir una progresión negativa de la enfermedad. Por lo tanto, al considerarse la albuminuria un indicador de lesión de órganos diana (daño renal), el aumento de la AAT observado en hipertensos normoalbuminúricos con pronóstico negativo (desarrollo de albuminuria) puede ser considerada como una evidencia anterior de daño, apoyando además la idea de su síntesis local en respuesta a la inflamación.

Se ha demostrado la existencia de una estrecha relación entre los sistemas cardiovascular y renal en esta patología (HTA), que además, se encuentra acompañada por la activación del sistema de coagulación, por el aumento de inflamación y por una alteración en la reactividad autoinmune [198]–[201]. En particular, AAT, con su actividad de inhibidor de proteasas, inhibe la actividad de la proteína C reactiva y del activador del plasminógeno, que promueve la conversión de plasminógeno a plasmina, que a su vez actúa para degradar la fibrina. La tetranectina también participa en la activación del plasminógeno y niveles plasmáticos de TNA han sido inversamente asociados con la enfermedad arterial coronaria [202]. El aumento de los niveles de AAT y la disminución de los niveles en TNA en respuesta a la albuminuria, apuntan en la misma dirección, produciéndose un desorden en la regulación del sistema de coagulación y de acuerdo con una potencial intervención terapéutica sobre el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en hipertensos [203].

Estas respuestas alteradas apuntan a la vinculación de la disfunción vascular y de la enfermedad del riñón (**Figura 39**) [204]. Curiosamente las alteraciones moleculares que se encuentran, no sólo responden a la condición clínica de microalbuminuria, sino que ya se encuentran alterados en pacientes normoalbuminúricos tratados crónicamente y que siguen avanzando en el desarrollo a microalbuminuria. De este modo, los trastornos moleculares relacionados con la disfunción vascular, progresión de la aterosclerosis y el riesgo cardiovascular ya están teniendo lugar en las primeras etapas cuando la albuminuria se

encuentra todavía en el rango normal (<20mg/L), y que por tanto, son indetectables a nivel clínico.

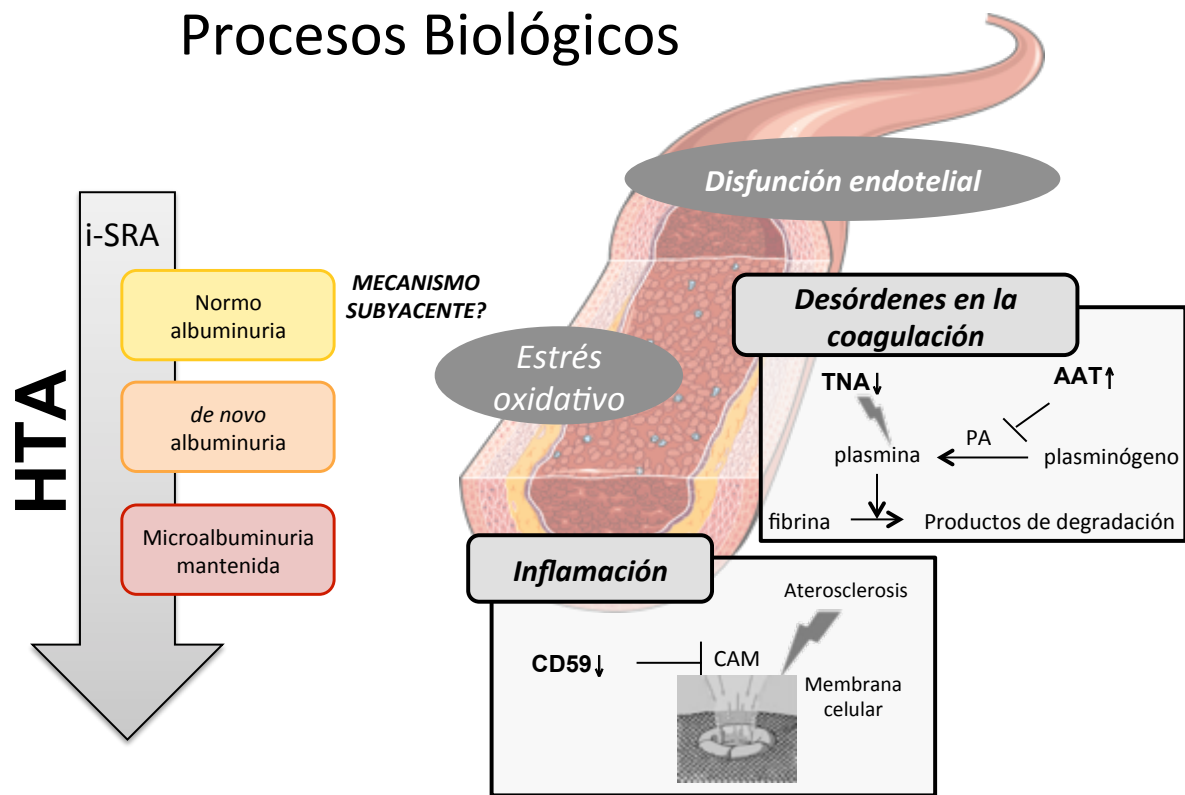


Figura 39. Principales alteraciones identificadas en orina de pacientes HTA crónicamente tratados, en respuesta a la progresión de la albuminuria donde están implicados trastornos de inflamación y coagulación como principales vías biológicas alteradas. Las diferencias observadas, ya en condiciones de normoalbuminuria, revelan mecanismos subyacentes asociados a riesgo cardiovascular que tienen lugar en estadios asintomáticos (basado en Gonzalez-Calero, et al. 2016). i-SRA: inhibidores del sistema renina-angiotensina, PA: activador de plasminógeno, CAM: Complejo de ataque a la membrana.

PERFIL PROTEÓMICO EXOSOMAL DE LA ORINA DE PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON i-SRA

En el apartado anterior se mostraron alteraciones significativas de proteínas en la orina global, en respuesta a albuminuria y su desarrollo *de novo* en estos individuos hipertensos. Los exosomas que se encuentran en la orina se muestran como mensajeros biológicos del sistema renal que pueden proporcionar nuevas pistas en este escenario clínico.

Los exosomas son vesículas extracelulares de 40-100nm de diámetro, recubiertas de membrana (bicapa) lipídica. Estas vesículas se forman por la fusión de los cuerpos multivesiculares (MVBs) con la membrana plasmática y la consecuente liberación de sus vesículas intraluminales, que luego una vez fuera de la célula pasan a denominarse exosomas en el espacio extracelular. Los exosomas han adquirido gran relevancia por las ya comprobadas funciones en la regulación de la respuesta inmune, la presentación de antígenos, la transferencia de ARN y proteínas, y la interacción/señalización célula-célula [163], [205], [206]. La composición proteica de los exosomas varía dependiendo del origen celular aunque existe un grupo de proteínas conservado para todos los exosomas. A este grupo de proteínas características de los exosomas pertenecen proteínas implicadas en el proceso de la formación de los MVB como Alix, Tsg 101 o clatrina. Otra clase de proteínas detectadas con frecuencia es la de la familia Rabs, pequeñas GTPasas que regulan procesos de acoplamiento y fusión en las membranas plasmáticas de los exosomas [207]. También se han identificado anexinas (I, II, IV, V, VI, VII y XI) que participan en mecanismos de tráfico y fusión de membranas. Los exosomas son ricos en tetraspaninas (CD63, CD81 y CD9) y en proteínas “heat shock” (HSP60, HSP70, HSPA5, CCT2). Existe una base de datos de proteínas y ARN llamada Exocarta (www.exocarta.org), elaborada con datos obtenidos a partir de publicaciones basadas en estudios realizados en exosomas de diversos orígenes celulares [205].

Los exosomas aislados de la orina contienen proteínas características de cada tipo de célula epitelial, desde el sistema sanguíneo hasta el sistema colector y excretor urinario, incluyendo en su interior proteínas de membrana y de citoplasma características de las células donde se hayan generado. Particularmente en el riñón, los exosomas pueden ser liberados por células como los podocitos, y pasar a través del túbulo renal hasta el túbulo colector, unirse por el receptor de las células epiteliales, e influir en ellas a través de la secreción de su contenido [208]. En este sentido, más que una forma de eliminación exocítica de residuos, los exosomas deben ser considerados como mensajeros, transfiriendo información entre células tanto renales como no renales, y llevando indicadores moleculares de la disfunción renal y/o del daño estructural [209], [210]. Este papel de los exosomas como mensajeros entre las células y tejidos gana especial importancia en escenarios complejos donde el diálogo multiorgánico se lleva a cabo [134], [211]. En un estudio previo del laboratorio, mostramos cómo los exosomas de la orina pueden reflejar cambios en proteínas que tienen lugar a nivel del tejido renal en nefropatía diabética [75]. Como un paso más, en la presente tesis se ha investigado, por primera vez, un papel potencial de las proteínas de los exosomas de la orina vinculado a la progresión de la albuminuria en hipertensos no diabéticos bajo supresión crónica del SRA.

Los exosomas representan un sub-proteoma de la orina global del individuo (3%). En este sentido, el proteoma exosomal urinario presenta una reducción en el rango de concentraciones de proteína y por lo tanto representan una herramienta alternativa para la detección de proteínas que de otro modo podrían estar enmascaradas por proteínas principales de la orina [134]. En este trabajo se identificaron las variaciones más significativas en los exosomas de la orina, lo que persigue una mejor comprensión de los procesos dinámicos interconectados que tienen lugar en el riñón de estos pacientes. Las alteraciones que se encuentran a este nivel de proteína son diferentes, y por tanto complementarios, a los anteriormente descritos en la orina global, como hemos visto previamente. A través de la técnica de análisis diferencial cuantitativo de alto rendimiento iTRAQ, se encontraron un total de 487 proteínas alteradas con criterios estrictos de selección para evitar falsos positivos. Entre ellas, 100 proteínas han sido descritas por primera vez en exosomas de la orina (de acuerdo con el repositorio de Exocarta) y 48 variaron significativamente su concentración en hipertensos no diabéticos bajo tratamiento crónico del SRA. Muchas de las 48 proteínas han sido identificadas previamente en exosomas de orina de individuos sanos liberados por podocitos [169]. En relación con el proyecto, actualmente, se está llevando a cabo un estudio de análisis de orina total por iTRAQ que en una primera aproximación podemos comparar los resultados encontrados. Usando los mismos criterios de significación, vimos que de las 48 proteínas, sólo 4 se identificaron en el estudio de la orina completa como muestra la **figura 40**, lo que demuestra que la fracción exosomal de la orina aporta un perfil diferente a cuando analizamos la orina completa.

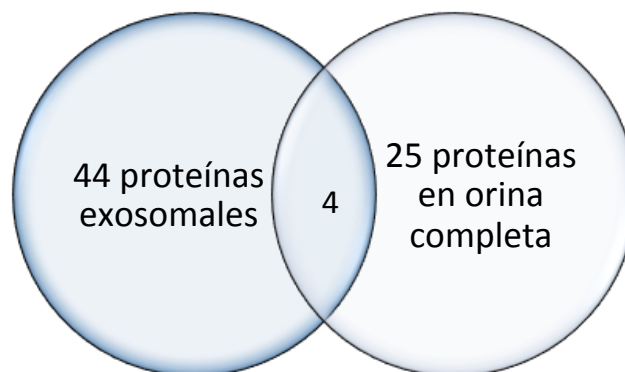


Figura 40. Comparación de las proteínas alteradas significativamente entre el estudio por iTRAQ de las proteínas extraídas de los exosomas de orina y las proteínas de la orina al completo sin fraccionar utilizando los mismos criterios de análisis, lo que demuestra que los exosomas aportan una visión diferente y complementaria a la orina global.

El análisis de las vías relacionadas de estas 48 proteínas exosomales reveló que 21 están implicadas en tres principales redes funcionales: “degradación de glucosaminoglicanos (GAGs)”, “sistema del complemento y coagulación”, y “estrés oxidativo”. En particular, estas proteínas interactúan en varios mecanismos que están asociados con la respuesta inflamatoria y que se resume gráficamente en la figura (**Figura 41**) y que explicaremos a continuación. Por otra parte, un panel de tres proteínas (antitrombina III (AT3), olfactomedin 4 (OLFM4), y mieloperoxidasa (MPO) confirmadas en una cohorte independiente por técnica SRM, responden al desarrollo de albuminuria en niveles tempranos (dnA).

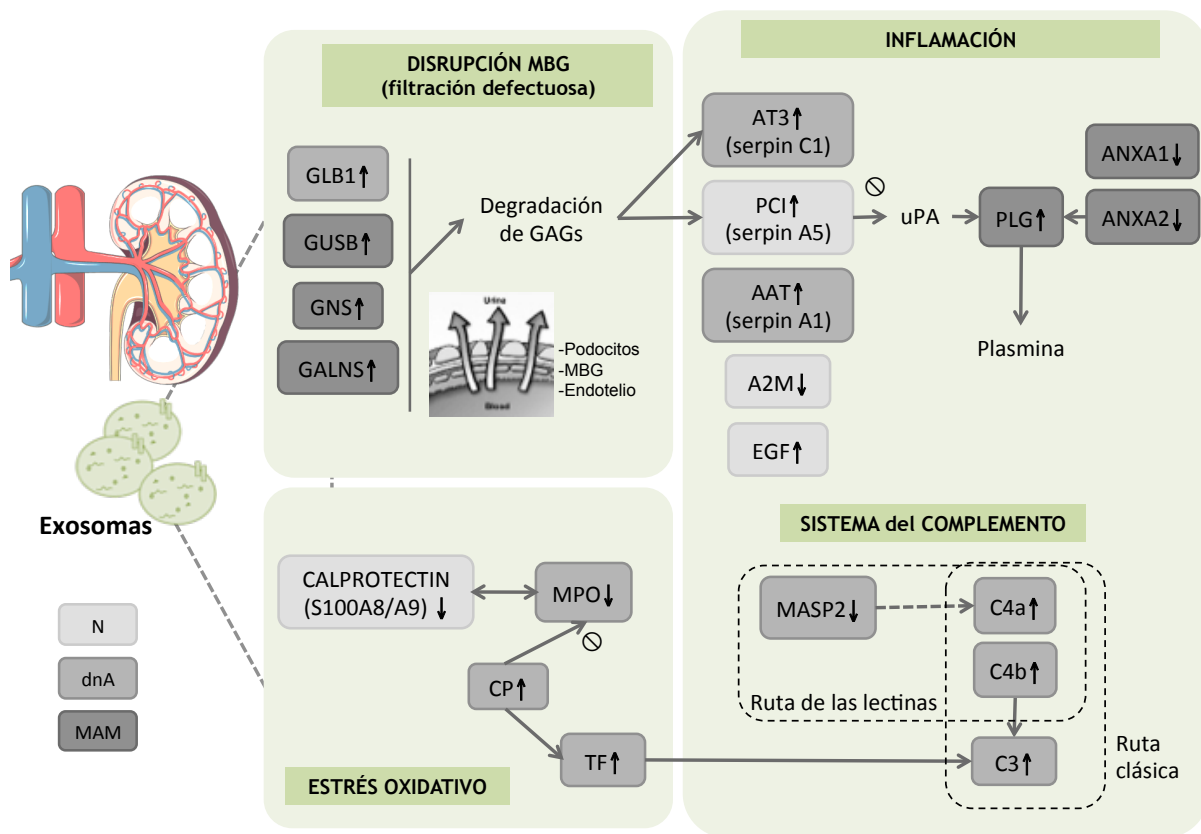


Figura 41. Alteraciones principales identificadas en las proteínas exosomales en orina debido a HTA y al desarrollo de albuminuria en pacientes tratados con i-SRA. Las variaciones apuntan a tres vías principales: inhibición de proteasas, inhibición de ROS y el sistema de complemento, todo ello en respuesta a la inflamación que se sabe que aparece durante la lesión renal que hace que haya una excreción patológica de albúmina. Las proteínas alteradas en el estudio aparecen en la escala de grises, coloreado según en que condición aparezca dicha proteína diferencial, y el aumento o la disminución de la respuesta para cada una de ellas, se indica con flechas.

Disrupción de la membrana basal glomerular (MBG), inhibición de proteasas e inflamación

En el estudio de interacciones, es de destacar la unión fuerte que aparece entre cuatro enzimas identificadas: beta-galactosidasa (GLB1), beta-glucuronidasa (GUSB), N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa (GNS) y N-acetil-galactosamina-6-sulfatasa (GALNS); con aumento en MAM, y una de ellas, GLB1, ya en dnA. Estas cuatro enzimas son responsables de la degradación de los glicosaminoglicanos (GAGs) y pueden estar relacionadas con el deterioro de la membrana basal glomerular (MBG), lo cual podría estar relacionado con una filtración defectuosa [212], [213]. Uno de los productos de degradación que se encuentra aumentado en condiciones patológicas es el proteoglicano heparán sulfato [214]. Estudios anteriores sugieren que la presencia de heparán sulfato facilita el paso de proteínas a través de la MBG [215]. Este proteoglicano se une y modula proteínas [216], entre ellas, inhibidores de serin proteasas dependientes de heparina, tales como antitrombina III (AT3, SerpinC1) [217] y el inhibidor de la proteína C (PCI, PAI-3, SerpinA5) [218] que en nuestro análisis encontramos aumentados en exosomas; PCI en N y dnA, y AT3 en dnA.

A pesar de que la fuente principal de PCI es el hígado, su síntesis también se produce en el riñón principalmente por células epiteliales del túbulo proximal (CETP) [218]. PCI es una proteína que promueve la coagulación y la inflamación [219] ya que inhibe al activador del plasminógeno urinario (uPA), una serin proteasa que activa el plasminógeno (PLG), convirtiéndolo en plasmina que disuelve los coágulos de fibrina [170]. El plasminógeno sintetizado en el hígado a menudo se extravasa de los capilares sanguíneos a los tejidos cuando hay la inflamación [220]. En este sentido podemos decir que al aumentar PCI, inhibidor de uPA, hay mayor cantidad de PLG no activo y por lo tanto menor degradación de fibrina. Lo que estaría en consonancia con lo observado en nuestro trabajo, donde se ve un aumento del plasminógeno en exosomas urinarios en condiciones de MAM.

Por otra parte, PLG se puede unir a Anexina A2 (ANXA2) promoviendo su activación de manera eficiente para formar plasmina [221]. En nuestro análisis, encontramos una disminución exosomal de ANXA2 y ANXA1 en pacientes MAM, lo que podría indicar una vez más que la ruta para la degradación de fibrina está poco regulada. Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos, dependientes de calcio, que se unen de forma reversible a las membranas en las balsas lipídicas y ejercen efectos anti-inflamatorios [222]–[226]. El descenso de regulación de ambas proteínas exosomales ANXA1 y ANXA2 puede contribuir a agravar la situación pro-inflamatoria en este contexto clínico.

Otras dos proteínas exosomales unidas en el análisis, variaron en pacientes normoalbuminúricos, ambas también participan en la coagulación y en la respuesta inflamatoria. Estas proteínas son, el factor de crecimiento epitelial (EGF) y la α -2 macroglobulina (A2M). EGF se ha encontrado expresado en el riñón y desempeña un papel en la modulación de la dinámica glomerular, del metabolismo renal, del transporte tubular, y del mantenimiento y reparación del epitelio [227]. En nuestro análisis aparece aumentado. A2M por otro lado, es un importante inhibidor de proteasas y de metaloproteinasas (MMP) circulantes en fluidos corporales [228], y que observamos disminuida en los pacientes hipertensos normoalbuminúricos. Estas dos proteínas muestran alteración en una etapa temprana, cuando la albuminuria ni siquiera está presente, lo que pone de manifiesto una respuesta subyacente de desregulación del metabolismo renal. Los resultados encontrados, tanto la disminución de A2M en normoalbuminúricos, seguido por el incremento observado de las enzimas de degradación de GAGs en el estado de la albuminuria, están en consonancia con una remodelación en la membrana basal glomerular (MBG) que implica la actividad patológica de MMP, lo que podría contribuir a la hiperfiltración glomerular, y por lo tanto a la excreción de albuminuria y a la pérdida de la función renal como anteriormente hemos publicado [229].

La α -1 antitripsina (AAT, SERPINA1), otro inhibidor de serin proteasas (heparina-independiente) aparece significativamente aumentada en los exosomas de pacientes albuminúricos de acuerdo a lo que vimos en la orina global en el apartado anterior, donde también obtuvimos AAT diferencial en condición de albuminuria. Igualmente, AAT aparece aumentada en la regulación de la inflamación, en la acumulación de matriz mesangial [230],

[231] y en la protección del tracto urinario contra el ataque de proteasas lo cual podría representar un marcador de estrés de podocitos [232].

Sistema del complemento y respuesta inflamatoria

Un sub-conjunto de proteínas alteradas identificadas en el análisis están relacionadas con el sistema del complemento, como parte de la respuesta inmune. Este sistema tiene tres vías de activación: a través de la vía clásica, a través de la vía alternativa, o por medio de la vía de las lectinas [233], [234]. La vía clásica y de las lectinas permiten la escisión de los componentes C4 (C4a y b) y C2 y por lo tanto permiten la activación de la C3 convertasa. Posteriormente, la escisión de C3 a través de la C3 convertasa permite la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM), un disparador pro-inflamatorio [233], [235]. Dado que se encontró disminuida la lectina de unión a manosa (MBL)-asociada a serin proteasa (MASP-2) en exosomas de dnA, mientras que los componentes C3, C4a y C4b se incrementaron en condiciones de la albuminuria, sugerimos en este contexto, una aparición favorecida de las vías alternativa y clásica frente a la vía de las lectinas. Se ha visto que los componentes C3 y C4, aparecen aumentados en inflamación crónica, induciendo a los monocitos a la expresión de factores pro-coagulantes [236]. Se sabe que la hipertensión se describe como un proceso inflamatorio y se ha sugerido que los podocitos participan en la eliminación de inmuno-complejos, algunos de los cuales aparecen unidos a vesículas membranosas glomerulares en la orina [237]. Además, en las nefropatías se produce tráfico de proteínas en exceso provocando una respuesta inflamatoria con aumento local de C3 en el lugar donde se produce la reabsorción de proteínas [238], [239]. Por otro lado, los altos niveles basales de C3 en suero se correlacionan con un mayor riesgo a desarrollar hipertensión, diabetes mellitus o infarto de miocardio [236].

Estrés oxidativo

Curiosamente, en nuestro análisis, se vieron aumentadas tanto C3 como transferrina (TF) en la fracción exosomal de hipertensos con albuminuria, de acuerdo con Tang et al. que mostró C3 aumentada en respuesta a TF en las células epiteliales del túbulo proximal (CETP) [240]. Se ha visto que los radicales libres del hierro en la TF es tóxico para las células epiteliales debido a su acumulación intracelular y al daño peroxidativo después de su reabsorción en el túbulo proximal [240]. Nuestros datos apuntan a una acumulación de TF en el riñón en condiciones de albuminuria, con un potente efecto perjudicial por el exceso de acumulación de hierro. De acuerdo con esta teoría, se ha visto que la depleción de hierro reduce la inflamación renal en diabetes experimental [241]. Por otra parte, la ceruloplasmina (CP) también se encontró aumentada en los pacientes albuminúricos hipertensos. La CP es una glicoproteína antioxidante que contiene cobre cuya función es oxidar el hierro ferroso (tóxico) a férrico (no tóxico). Sin embargo, puede ser pro-oxidante en condiciones de aumento del estrés oxidativo mediante la inducción de la producción de ROS y la oxidación de LDL [242]. Hemos obtenido una correlación de la CP urinaria exosomal con el aumento de la albuminuria tal como hemos observado en un trabajo previo en plasma de pacientes hipertensos que progresaron desarrollando albuminuria bajo la misma condición de i-SRA [243].

CP también actúa uniéndose a mieloperoxidasa (MPO) inhibiendo su actividad oxidante [171], [244]–[246]. MPO exosomal se encuentra disminuida en la condición de dnA, siguiendo la misma tendencia que la observada para la calprotectina en N y el dnA. La calprotectina es un complejo heterodimérico de dos proteínas intracelulares de unión a calcio, S100A8 (MRP8) y S100A9 (MRP14), con un patrón de localización en el riñón predominantemente glomerular [247], [248]. Ambas proteínas, MPO y calprotectina, se han relacionado con un efecto sinérgico, como co-reguladores en la formación de ROS [249]. Los niveles sanguíneos elevados de proteínas S100 en respuesta a la inflamación han sido ampliamente documentados, y se correlacionan positivamente con el riesgo cardiovascular, la diabetes o incluso la proteinuria [250]–[252]. Diferente al patrón que se ve en plasma, la fracción exosomal reveló una tendencia a la baja en los pacientes hipertensos con incipiente albuminuria o sin ella. Esto podría explicarse atendiendo a los mecanismos de reparación de tejidos. La calprotectina está vinculada a un aumento de los macrófagos M2 polarizados, causando una reparación deletérea del tejido, aumentando el daño renal y manteniendo la inflamación [253]. Este efecto de reparación de tejidos requiere el contacto físico entre los macrófagos M2 y las células epiteliales dañadas del túbulo [254], lo que sugiere que podría estar mediado por exomas. Nuestros datos están de acuerdo con una reparación de tejidos ineficaz en las primeras etapas del proceso de desarrollo y en el mantenimiento de microalbuminuria. Además, la calprotectina también inhibe MMP, cuyo aumento de actividad aparece en este escenario clínico [229] como hemos dicho anteriormente.

Panel diagnóstico de dnA

Se seleccionaron tres proteínas representativas que muestran niveles alterados en dnA en estos pacientes hipertensos bajo tratamiento con i-SRA. A través de un análisis sobre la base de un ensayo específico por espectrometría de masas SRM, se obtuvo un panel molecular que responde a la condición hipertensiva dnA. Este panel está compuesto por tres marcadores exomales: antitrombina III (AT3), olfactomedin 4 (OLFM4) y mieloperoxidase (MPO); los dos primeros aparecen aumentados y el último disminuido.

Como hemos dicho anteriormente, la actividad del inhibidor de serin proteasas AT3 es estimulada por la unión al proteoglicano heparán sulfato, el cual se encuentra en la superficie luminal de las células endoteliales [214]. Se sabe que AT3 está relacionado con la homeostasis en el riñón, y sus niveles de concentración en la orina se correlacionan con la excreción de albúmina y de PLG [255], lo que se correlaciona con lo observado. OLFM4 (también conocido como hGC-1, GW112) es también una glicoproteína de matriz extracelular [256], que participa en la diferenciación celular e inflamación [257], [258], y en la regulación de la apoptosis y la proliferación [259]–[261]. En el riñón, OLFM4 se observó en el túbulo, pero no en el glomérulo [174] y se encontró significativamente aumentada en vesículas extracelulares urinarias aisladas en enfermedad renal poliquística [262]. Con tendencia opuesta, se encontró MPO disminuida en los exomas de pacientes con dnA. MPO es una proteína con grupo hemo catalizadora de la oxidación de las lipoproteínas, en el riñón aparece expresada en las membranas basales glomerulares y en infiltrados de células mononucleares

[245]. Una deficiencia en la expresión de MPO se ha visto que se corrobora con una alta incidencia de diabetes mellitus y de enfermedades trombóticas, así como un aumento de la concentración sérica de fibrinógeno; lo que indica la importancia de la relación entre células circulantes y coagulación de la sangre [245].

En conclusión, en nuestro estudio, los resultados obtenidos sugieren un papel importante del sistema inmune durante la hipertensión, en particular, en la respuesta inflamatoria. Esto se refleja claramente en las proteínas exosomales de la orina, como reservorios de proteínas alteradas durante la patogénesis. Estudiando este subproteoma, vemos un vínculo funcional entre las proteínas relacionadas con la coagulación, el sistema de complemento y el estrés oxidativo y por otro lado creamos un panel de diagnóstico de desarrollo de albuminuria incipiente. Esta es una demostración más de que la proteómica cuantitativa de vesículas extracelulares urinarias es una poderosa herramienta para monitorizar proteínas que de otro modo sería difícil al no poder acceder de forma no invasiva en el riñón. Además, nuestros resultados permiten avanzar en la comprensión de la fisiología del tracto urinario y de la patología de la albuminuria en hipertensos no diabéticos.

PERFIL METABOLÓMICO DE ORINA EN PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON i-SRA

Si bien la proteómica permite investigar en que se ha “traducido” la información genética, el metaboloma refleja el último eslabón de la cadena, lo que está pasando como última consecuencia.

Como hemos visto, en relación a lo anterior y de forma complementaria, investigamos las alteraciones metabólicas medibles en orina en un escenario clínico poco explorado, la búsqueda de nuevos indicadores metabólicos de la progresión del daño renal y cardiovascular que puedan ser monitoreados en estos pacientes hipertensos crónicamente tratados.

La albuminuria se sabe que está asociada con la diabetes. Sin embargo, en esta tesis se ha visto que no hay diferencias significativas entre diabéticos y no diabéticos en cuanto a la respuesta de las moléculas respondedoras estudiadas. Por lo tanto en este análisis se incluyeron ambos tipos de pacientes para reflejar mejor la práctica clínica habitual en las unidades de hipertensión. En ningún caso los pacientes poseían ningún tipo de nefropatía como causa de HTA ($eGFR > 60 \text{ ml / min / } 1,73\text{m}^3$). En el estudio metabólico, se encontró un patrón de alteración a nivel de metabolitos provocado por la hipertensión (bajo i-SRA), y por otra parte, un sub-conjunto de estos metabolitos respondieron específicamente a la albuminuria o a la predicción de su futuro desarrollo en pacientes con niveles normales de albúmina en orina. Los nueve metabolitos que se encuentran alterados en este escenario clínico muestran una posible relación entre tres principales rutas biológicas, como puede verse en la **Figura 42**: el metabolismo de la β -alanina, el metabolismo de la arginina y la prolina (metabolismo Arg & Pro), y el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT).

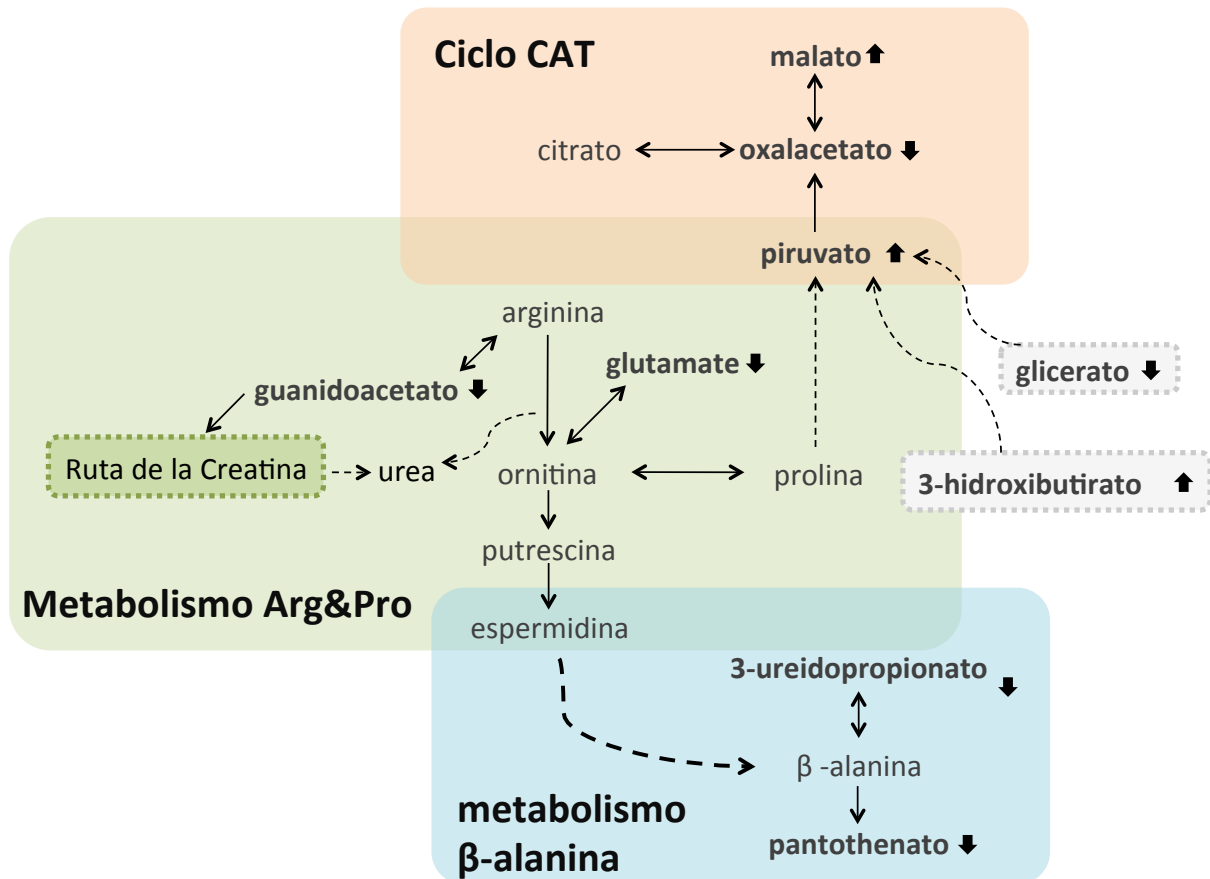


Figura 42. Vías metabólicas alteradas en la orina de pacientes con supresión crónica del SRA en respuesta a hipertensión y a la albuminuria. Los metabolitos alterados identificados en orina en el estudio aparecen en negrita, y el aumento o la disminución de la respuesta para cada metabolito se indica con flechas. Alteraciones de metabolitos apuntan a tres rutas metabólicas principales: ciclo del ácido tricarboxílico (CAT), el metabolismo de la arginina y la prolina (Arg y Pro), y el metabolismo de β -alanina.

El 3-Ureidopropionato, el pantotenoato, y el glicerato se encontraron disminuidos en HTA. Los dos primeros se han identificado como marcadores de uremia [263], y se ha encontrado una reducción progresiva de la filtración de glicerato en daño glomerular [264] de acuerdo con nuestros datos. 3-Ureidopropionato y pantotenoato conectan los metabolismos de la Arg & Pro y de la β -alanina a través de la espermidina, una de las poliaminas que hemos encontrado disminuida en orina, en un estudio previo, en respuesta a la aterosclerosis temprana junto con la putrescina [70]. La putrescina se sintetiza a partir de la arginina vía ornitina, la cual es también un precursor del glutamato. Este aminoácido se encontró disminuido en orina de pacientes HTA de forma más pronunciada cuando existe la condición de microalbuminuria mantenida. En línea con nuestro estudio, se ha visto que la anulación de los receptores específicos del glutamato en el riñón a través de antagonistas promueve el desarrollo gradual de albuminuria [265]. Otro metabolito identificado previamente por nuestro grupo como un indicador de enfermedad CV es el 3-hidroxiubutirato. Este metabolito se encontró variado en plasma y en orina en respuesta a la aterosclerosis temprana y al síndrome coronario agudo

[70], [266]. En nuestro estudio, 3-hidroxi-butirato respondió específicamente a MAM aumentando, condición clínica en la que se espera un daño vascular superior.

Guanidoacetato, otro intermediario en el metabolismo de Arg & Pro, es un precursor de la creatina, un sustrato de la creatina quinasa (CK). La CK se ha asociado con un fracaso en el tratamiento antihipertensivo [267], pero los mecanismos que provocan esta asociación son aún desconocidos. En nuestro estudio se muestra una relación directa de la disminución de guanidoacetato que podría apuntar a una deficiencia en la conversión de arginina a este metabolito, el cual al final, puede comprometer la función de la óxido nítrico sintasa (NOS), lo que se traduce en un efecto negativo en la función endotelial [268]. Por otro lado, el guanidoacetato ha sido propuesto como un marcador fuerte de lesión renal, mostrando niveles reducidos en orina de pacientes trasplantados con función renal normal [269] de acuerdo con lo observado.

En el mismo contexto y apuntando de nuevo a la disfunción renal y al daño vascular, la hipertensión se ha definido como una enfermedad mitocondrial y metabólica [270], y se ha visto en datos previos, un aumento del estrés oxidativo durante la supresión crónica del SRA [229], [271]. En estos pacientes con HTA tratados crónicamente, se encontraron alterados el glutamato, el piruvato, el oxaloacetato y el malato, con una respuesta más pronunciada en el caso de MAM o en presencia de diabetes. El glutamato y el piruvato ejercen control sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y sobre la inhibición intrínseca del Complejo II mitocondrial por vía del oxaloacetato que protege contra la generación de ROS [272] el cual aparece disminuido en nuestro estudio. Por otra parte, se ha observado que la actividad de una nueva lanzadera malato/oxaloacetato encontrada, aumenta con el desarrollo de la hipertensión [273], y ambos metabolitos forman parte del ciclo CAT, el cual ha sido asociado con la diabetes [274], [275] y la microalbuminuria [106].

Estas tendencias reflejan claramente una lesión subyacente multiorgánica, que afectan e interconectan especialmente ambos sistemas, renal y cardiovascular. En este estudio, mostramos una poderosa combinación de metabolitos en función de la alteración observada, constituyendo tres paneles metabólicos diferentes capaces de responder a la HTA (met-HTA: guanidoacetato, pantotenato, 3-ureidopropionato, oxalacetato y piruvato), a albuminuria (met-Alb: 3-hidroxi-butirato y piruvato), o incluso predecir la progresión futura en los pacientes normoalbuminúricos (met-dnA: guanidoacetato, glutamato y pantotenato).

ALTERACIONES EN ORINA EN RESPUESTA A UN DAÑO RENAL AGUDO: INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

Finalmente, a modo de anexo a los estudios recogidos en esta Tesis Doctoral, mostramos alteraciones de la orina en respuesta a un daño renal que, por ser agudo y no crónico, tiene un reflejo totalmente diferente (**Anexo 5**). Mas allá de la búsqueda de marcadores en el contexto de la hipertensión y de forma adicional al estudio molecular en el desarrollo de albuminuria en pacientes en tratamiento crónico, investigamos los cambios moleculares significativos en la orina en respuesta a un suceso de insuficiencia renal aguda (IRA) y su posterior evolución hasta el alta del paciente. Este estudio, complementó el proyecto anterior con una situación no mantenida en el tiempo pero que produce un daño a nivel renal [77]. La IRA es la pérdida rápida de la función renal, caracterizada por la oliguria y por el desequilibrio de líquidos y electrolitos en el cuerpo. A modo de resumen, observamos que las proteínas kininógeno1 (KNG1) y proteína de unión al retinol 4 (RBP4) en orina responden claramente a IRA (anexo publicación 1). Además, la RBP4 podría predecir la recuperación del paciente mediante la monitorización en el tiempo de niveles de la proteína después de la lesión renal aguda, ya que la RBP4 refleja la normalización del paciente antes de lo que lo hacen los valores clínicos de uso rutinario en la monitorización, como lo es la creatinina sérica (SCr) (Figura 43) [77].

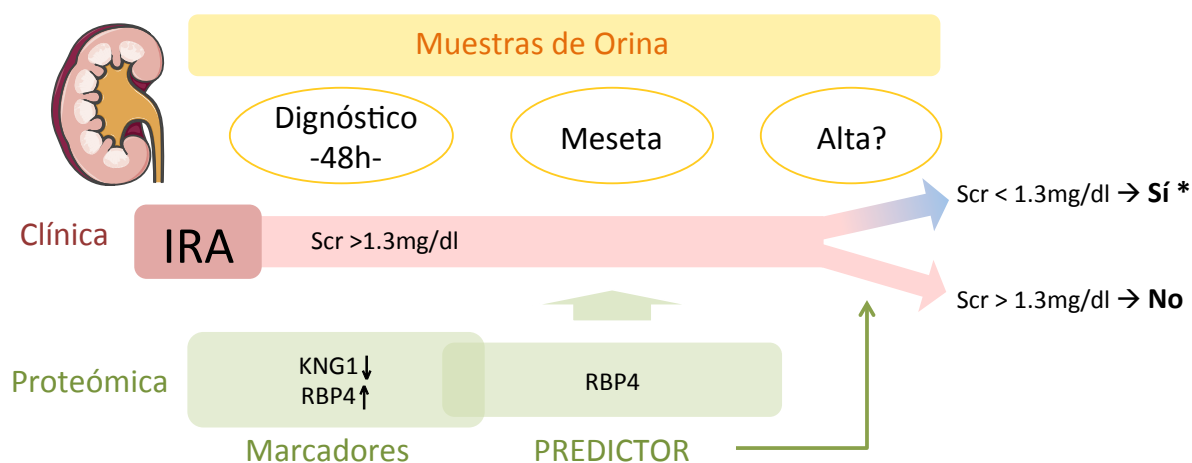


Figura 43. Esquema de los resultados obtenidos en el estudio de las alteraciones proteicas en orina a un suceso de insuficiencia renal aguda (diagnóstico) y su posterior evolución (meseta y alta). Donde KNG1 disminuyendo y RBP4 aumentando son marcadores de diagnóstico, además este ultimo en el periodo después de las 48h es capaz de predecir la recuperación del paciente volviendo a valores normalizados. *En pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) se considera recuperación cuando los pacientes normalizan sus niveles de SCr (los que presentaban antes del episodio agudo).

CONCLUSIÓN GENERAL

Como hemos dicho, la hipertensión arterial es una causa fundamental de riesgo cardiovascular y renal. El sistema renina-angiotensina (SRA), es el sistema regulador de la vasoconstricción que cuando se activa de forma crónica en condiciones patológicas produce daño orgánico al aumentar la presión arterial. La terapia más comúnmente empleada en el tratamiento de los pacientes hipertensos es la supresión de este sistema mediante inhibición a través de fármacos como los iECAs y ARAs II. Sin embargo, existe una progresión de la enfermedad CV y renal en un número no despreciable de individuos, a pesar de estar bajo supresión crónica de SRA. El aumento de la albuminuria producida por un aumento de la PA se considera marcador de progresión de la enfermedad cardiovascular y de empeoramiento de la función renal independientemente de la coexistencia de diabetes.

Durante el curso de esta tesis, hemos identificado perfiles de proteínas y metabolitos creando, por primera vez, una huella molecular en orina tanto en respuesta a HTA tratada con progresión de albuminuria, como de pronóstico. Además se identificó un amplio panel en la fracción exosomal de la orina que identifican varias condiciones de desarrollo.

En el análisis de la orina completa obtuvimos tres proteínas alteradas significativamente: glicoproteína CD59 (CD59), alfa-1-antitripsina (AAT) y tetranectina (TNA) en pacientes hipertensos (diabéticos y no diabéticos) y/o con desarrollo de albuminuria de novo, a pesar del tratamiento de bloqueo del SRA, implicadas en el estrés oxidativo y en la disfunción endotelial. Por otra parte, el estudio metabolómico mostró nueve metabolitos de la orina alterados de manera significativa, los cuales se agruparon en paneles respondedores a HTA en sí misma (guanidoacetato, pantotenato, 3-ureidopropionato, oxalacetato y piruvato), a microalbuminuria mantenida (3-hidroxi-butirato y piruvato) y a albuminuria de novo (guanidoacetato, glutamato y pantotenato) uniendo el metabolismo de la arginina y prolina, el metabolismo de β -alanina y el ciclo del ácido tricarbóxico. Como vemos, los trastornos cardiovasculares y renales tienen un efecto aditivo con reflejo en la orina a nivel de proteínas y metabolitos, el cual influye en el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, el riesgo cardiovascular y el metabolismo energético en el contexto de hipertensión arterial tratada de forma crónica.

Además, CD59 y AAT, a nivel de proteínas, y guanidoacetato, glutamato y pantotenato, a nivel de metabolitos, son capaces de predecir en individuos normoalbuminúricos el desarrollo de albuminuria en el futuro. Como hemos visto en el estudio de metabolitos el panel predictor llega a identificar el pronóstico mejor que los marcadores clínicos tradicionales (SCr, eGFR, ACR) en el que las curvas ROC tenían un AUC más bajo. Estos resultados contribuyen a la identificación precoz de pacientes en riesgo de desarrollar albuminuria, incluso cuando este predictor clásico se encuentra todavía en el intervalo normal, es decir pacientes en los que la enfermedad cardiovascular y renal progresa de forma silente, a pesar de la supresión de SRA.

En esta tesis, los exosomas se muestran por primera vez como reservorios de proteínas alteradas en respuesta a la progresión de la albuminuria. La alta cobertura del proteoma

exosomal ha permitido la identificación de patrones alterados de proteínas, reflejando respuestas en un escenario pro-inflamatorio y de estrés oxidativo a partir de la condición de normoalbuminuria y que se agrava en dnA y MAM. La disrupción de la membrana basal glomerular relacionada con la albuminuria también se refleja por el aumento de enzimas y proteínas específicas implicadas en la reparación de tejidos y por la disminución de la inhibición de metaloproteinasas en las etapas tempranas al desarrollo de albuminuria. Este estudio demuestra que la proteómica cuantitativa de vesículas extracelulares en orina es una poderosa herramienta no invasiva para monitorizar proteínas que de otro modo tendrían un difícil acceso e implica un avance en la comprensión de la fisiopatología renal en el desarrollo de la albuminuria en pacientes hipertensos no diabéticos.

Estos hallazgos revelan una serie de nuevas dianas que podría allanar el camino para el desarrollo de futuros fármacos y estrategias terapéuticas hacia una intervención rápida y más eficiente, en particular para aquellos pacientes tratados de forma crónica y con un peor pronóstico en términos de desarrollo de la albuminuria, con resultado favorable en la prevención de complicaciones cardiovasculares. Finalmente hemos visto que el uso de paneles de biomarcadores en detrimento de las moléculas individuales mejora enormemente la precisión y especificidad para el diagnóstico de estas patologías.

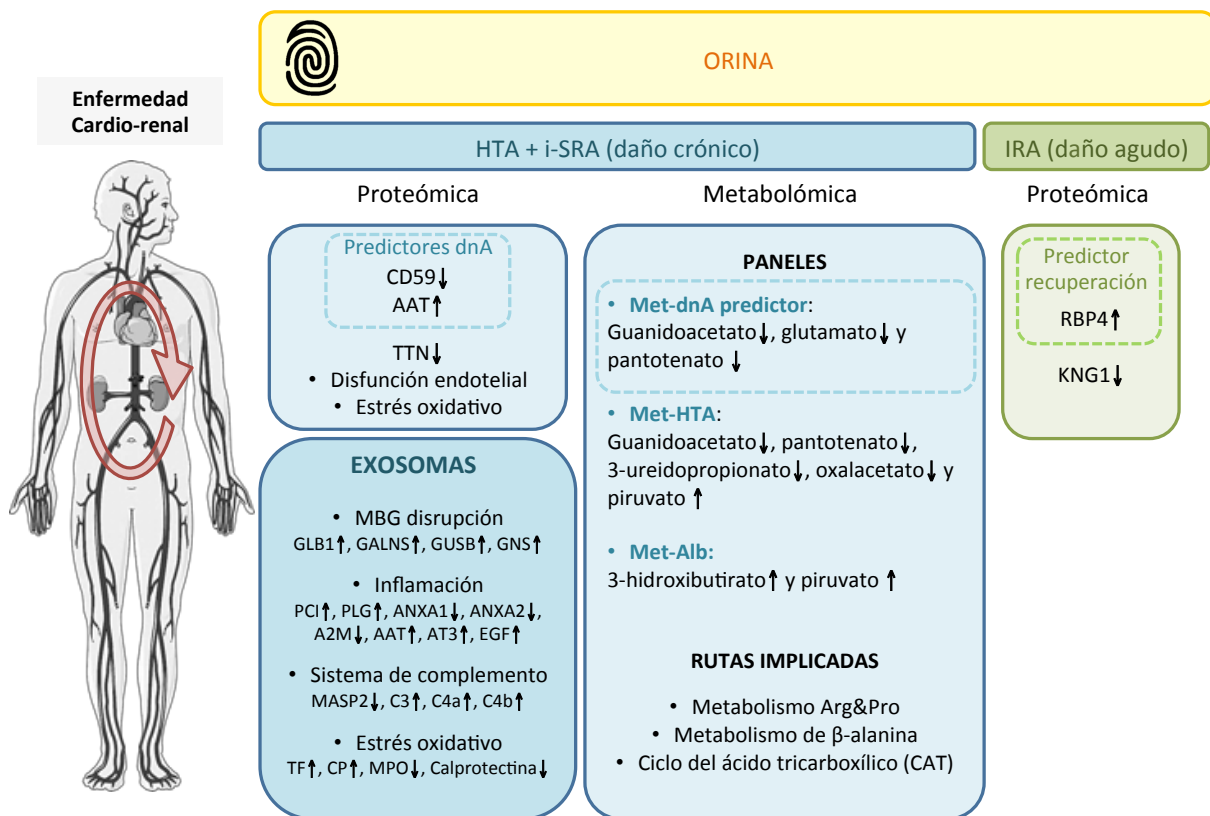


Figura 44. Resumen final de los resultados obtenidos en esta tesis analizando muestras de orina y exosomas de la orina por métodos proteómicos y metabolómicos. En los recuadros en azul se muestra los estudios realizados en pacientes hipertensos bajo supresión crónica del SRA (HTA + i-SRA), daño crónico. En verde se muestra un estudio adicional que se hizo en pacientes con insuficiencia renal aguda (IRA), daño agudo.

Por último, podemos decir que hemos ampliado la visión en cuanto a dianas de daño renal ya que estudiando el proteoma en orina de pacientes con IRA hemos obtenido diferentes datos a los observados en pacientes HTA con desarrollo de albuminuria tratados crónicamente con i-SRA. Una vez más, no es lo mismo una situación aguda que crónica o mantenida y estos estudios seguidos durante esta tesis nos permiten ver dianas moleculares diferentes y complementarias.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Las proteínas CD59, alfa-1-antitripsina y tetranectina se encuentran alteradas de manera significativa en orina de pacientes hipertensos bajo supresión crónica del SRA; alfa-1-antitripsina y CD59 en respuesta al desarrollo de albuminuria de novo y mantenida, y tetranectina con disminución progresiva ya en la condición de normoalbuminuria.
2. El análisis cuantitativo diferencial LC-MS/MS incluyendo marcaje iTRAQ ha permitido, por vez primera, una amplia cobertura en la identificación del proteoma exosomal en orina de pacientes hipertensos en respuesta a la progresión de la albuminuria, a pesar de la supresión crónica del SRA. El análisis de vesículas exosomales es una poderosa herramienta no invasiva para aproximarse a cambios a nivel renal que de otro modo tienen difícil acceso en el riñón.
3. El análisis exosomal ha permitido identificar respuestas moleculares en un escenario pro-inflamatorio y de estrés oxidativo apuntando, a la disrupción de la membrana basal glomerular. Ello viene reflejado por el aumento de proteínas específicas implicadas en la reparación de tejidos y por la disminución de enzimas en las primeras etapas de inhibición de metaloproteinasas.
4. A nivel de metabolitos, hemos identificado un total de nueve con alteraciones significativas en la orina de estos pacientes: glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato, 3-ureidopropionato, 3-hidroxi-butirato, malato y piruvato. En función de su perfil de respuesta, identificamos tres paneles metabólicos asociados a hipertensión, albuminuria de novo o albuminuria mantenida. Estos cambios a nivel metabólico reflejan un efecto aditivo entre las patologías cardiovascular y renal apuntando nuevamente a estrés oxidativo, disfunción endotelial y metabolismo energético alterado en el cuadro de hipertensión arterial tratada crónicamente.
5. CD59, alfa-1 antitripsina, guanidoacetato, glutamato y pantotenato, combinados o de modo individual, tienen poder predictor. Es decir, son capaces de predecir qué individuos normoalbuminúricos van a desarrollar albuminuria en el futuro, ya que en estos sujetos muestran respuesta alterada en orina aún cuando el indicador clásico (albúmina) está en el rango normal. Actualmente, estos individuos con peor pronóstico pasan “desapercibidos” por lo que este hallazgo es de especial importancia en la estratificación de individuos con mayor riesgo cardiovascular y de daño renal, para los que se podrían diseñar nuevas estrategias terapéuticas y que podrían ser aplicadas de un modo temprano.

Limitaciones

LIMITACIONES

La principal limitación de esta tesis doctoral radica en el número “limitado” de muestras de orina de sujetos reclutados, y potencial variabilidad atribuible a su a distribución por edad, la diabetes o los fármacos. El potencial valor predictivo de los indicadores descritos debe ser confirmada en una cohorte más amplia de pacientes hipertensos con diferente progresión en términos de albuminuria antes de su traslación al ámbito clínico. Para cubrir estas posibles limitaciones, se han seleccionado cohortes independientes para el descubrimiento y la confirmación basada en la disponibilidad a lo largo del curso de los diferentes estudios y hay que tener en cuenta que las aproximaciones ómicas permiten identificar diferencias significativas en un número mayor de muestras que en los estudios clínicos clásicos. Otra limitación podría ser un sesgo de aleatorización potencial en los criterios de selección; que son compensados mediante la aplicación de criterios basados en las diferencias significativas entre los grupos al seleccionar las moléculas de interés. Por otro lado, la albuminuria se sabe que está asociada con la diabetes. Sin embargo, en los estudios llevados a cabo en este escenario clínico, no se encontraron diferencias significativas en la orina atribuibles a una condición diabética. En los estudios se incluyeron pacientes diabéticos y no diabéticos para reflejar mejor la práctica clínica rutinaria en muchas unidades de hipertensión, aun así, todos los pacientes tenían $eGFR > 60 \text{ ml / min / } 1,73\text{m}^3$. Por otro lado, la orina tiene un enorme potencial como fluido no invasivo capaz de reflejar los cambios en la función o daño orgánico, pero la variabilidad en el contenido de proteína puede ser considerable y este hecho implica normalización, por ejemplo por contenido total de proteínas. Como se trata de estudios observacionales, pueden ser identificadas las asociaciones entre las moléculas propuestas, aunque la causalidad no, de este modo, las inferencias a mecanismos se basan en la literatura anteriormente publicada.

A pesar de estas limitaciones estamos frente a unos datos prometedores. Será necesario un estudio multi-centro a gran escala para asegurar el gran potencial de este subconjunto de indicadores en la evaluación de la eficacia de la supresión del SRA en pacientes hipertensos antes de su aplicación clínica eventual, y estimular y facilitar la traslación a partir de observaciones clínicas para combinar mejor los proyectos de ciencias básicas y clínicas.

Perspectivas futuras

PERSPECTIVAS FUTURAS

Teniendo en consideración los estudios recogidos en esta tesis doctoral y los trabajos publicados en el área cardiovascular y renal por estrategias ómicas se puede considerar que se está avanzando en dirección correcta hacia un mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos tratados crónicamente con inhibidores del SRA ya que se han encontrado indicadores que están poniendo voz a las rutas biológicas implicadas. Será por ello interesante observar estas moléculas alteradas en hipertensión resistente donde la presión arterial no es controlada por el tratamiento convencional de inhibición de SRA o en patologías similares. En nuestra opinión, la orina no ha hecho más que iniciar su andadura en el campo de la hipertensión y daño orgánico aunque aún quedan muchos estudios por realizar para sacar un mayor provecho de este fluido y, si se consigue superar la barrera a estudios con un número más elevado de pacientes o, mejor aún, dar el salto a ensayos clínicos, es muy posible que la orina se destaque como fuente de marcadores cardiovasculares y renales, y pueda tener una aplicación clínica directa. Pero sobre todo, consideramos que los estudios en microvesículas exosomales de la orina en este área van a tomar una importancia grande en los próximos años, siendo contenedores de datos prometedores revelando cambios que se desconocen hasta ahora.

Anexos

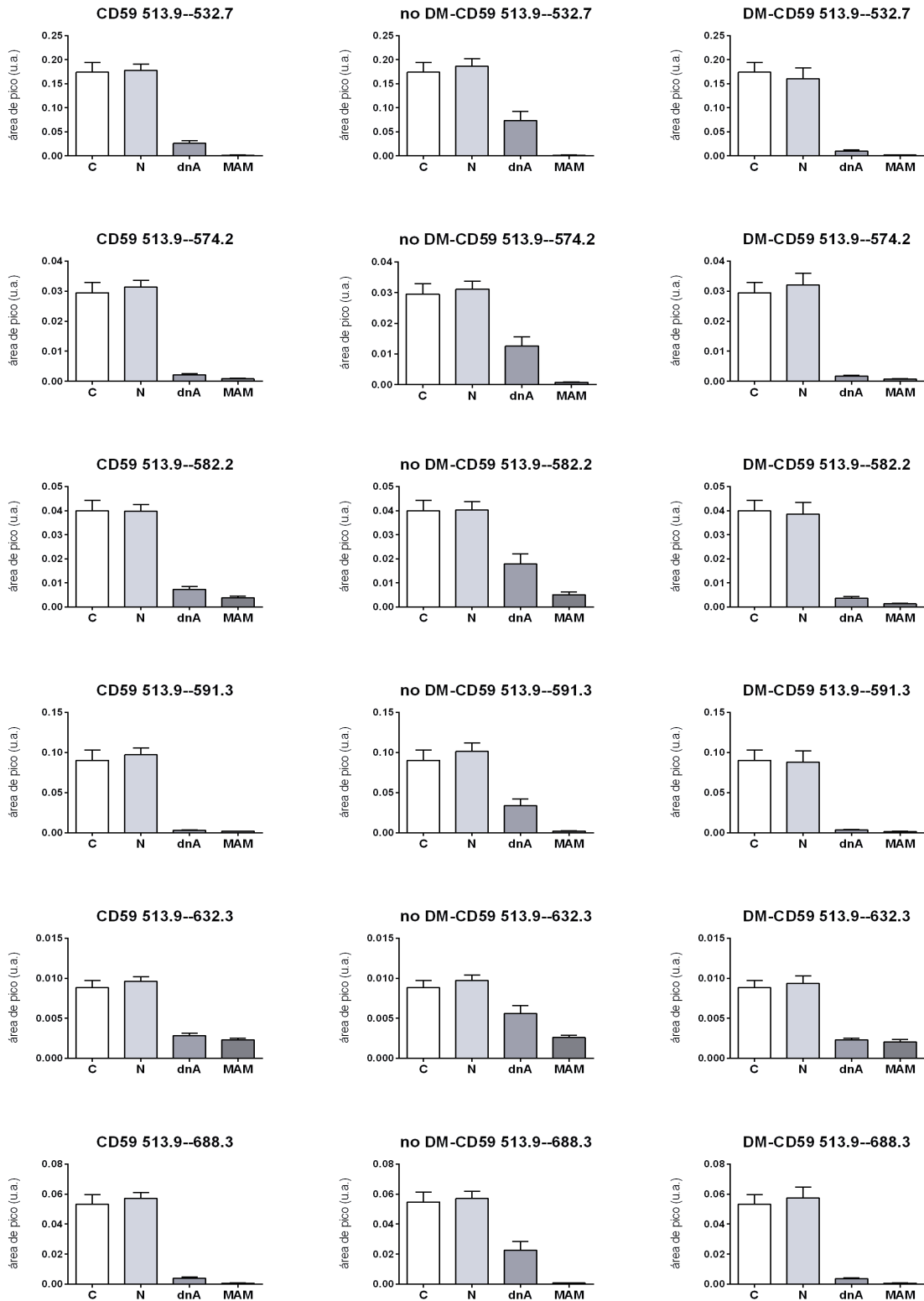
ANEXO 1

Tabla Anexo 1. Resultado HTA. Datos de las 56 manchas consideradas como proteínas de interés (POI). La columna Recogido en Set indica el set al que pertenece según los filtros aplicados. Las celdas sombreadas son spots con p-valores <0.05 T-Student en la comparación del par correspondiente. Pos.: posición en el gel, Med.Ratio: media del relación, C: controles, N: normoalbuminúricos, dnA: de novo albuminúricos, MAM: microalbuminúria mantenida.

| Pos. | Nº gel master | N/C | | dnA/C | | MAM/C | | dnA/N | | MAM/N | | MAM/dnA | | 1-ANOVA | Recogido en Set |
|------|---------------|--------|------------|---------|------------|---------|------------|--------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|-----------------|
| | | T-test | Med. Ratio | T-test | Med. Ratio | T-test | Med. Ratio | T-test | Med. Ratio | T-test | Med. Ratio | T-test | Med. Ratio | | |
| 1 | 22 | 0,49 | -1,24 | 0,026 | 3,27 | 0,19 | 1,88 | 0,04 | 4,04 | 0,16 | 2,33 | 0,29 | -1,74 | 0,04 | L4 |
| 2 | 27 | 0,81 | 1,07 | 0,0069 | 6,26 | 0,0065 | 3,74 | 0,0099 | 5,83 | 0,0099 | 3,48 | 0,45 | -1,67 | 0,0015 | L4 |
| 3 | 102 | 0,64 | 1,04 | 0,0078 | 5,27 | 0,00097 | 3,64 | 0,011 | 5,07 | 0,00026 | 3,5 | 0,81 | -1,45 | 0,00042 | L1,L4 |
| 4 | 104 | 0,98 | -1,33 | 0,039 | 3,96 | 0,053 | 2,31 | 0,012 | 5,28 | 0,0037 | 3,09 | 0,5 | -1,71 | 0,013 | L4 |
| 5 | 107 | 0,81 | -1,16 | 0,024 | 3,72 | 0,063 | 2,07 | 0,0084 | 4,34 | 0,011 | 2,41 | 0,29 | -1,8 | 0,0099 | L4 |
| 6 | 122 | 0,28 | 1,25 | 0,0037 | 4,28 | 0,05 | 2,05 | 0,0093 | 3,41 | 0,069 | 1,63 | 0,1 | -2,09 | 0,0021 | L4 |
| 7 | 124 | 0,88 | 1,02 | 0,0026 | 6,09 | 0,0051 | 2,65 | 0,0052 | 6 | 0,0082 | 2,61 | 0,12 | -2,3 | 0,00044 | L4 |
| 8 | 126 | 0,27 | 1,26 | 0,0096 | 2,94 | 0,082 | 1,79 | 0,024 | 2,32 | 0,16 | 1,42 | 0,19 | -1,64 | 0,0098 | L4 |
| 9 | 130 | 0,64 | 1,04 | 0,0018 | 5,95 | 0,014 | 2,6 | 0,0014 | 5,73 | 0,0082 | 2,5 | 0,06 | -2,29 | 0,00026 | L4 |
| 10 | 131 | 0,46 | 1,21 | 0,003 | 5,81 | 0,036 | 2,4 | 0,01 | 4,79 | 0,049 | 1,98 | 0,061 | -2,42 | 0,0016 | L4 |
| 11 | 132 | 0,58 | 1,12 | 0,0012 | 6,52 | 0,0057 | 2,92 | 0,0021 | 5,83 | 0,0069 | 2,61 | 0,078 | -2,23 | 0,00016 | L4 |
| 12 | 136 | 0,7 | 1,04 | 0,0049 | 7 | 0,0064 | 2,73 | 0,0073 | 6,71 | 0,0059 | 2,62 | 0,11 | -2,57 | 0,00069 | L4 |
| 13 | 137 | 0,6 | 1,15 | 0,0024 | 7,15 | 0,0032 | 2,86 | 0,0068 | 6,19 | 0,0074 | 2,48 | 0,13 | -2,5 | 0,00038 | L4 |
| 14 | 157 | 0,46 | 1,25 | 0,0013 | 6,75 | 0,0034 | 3,36 | 0,004 | 5,38 | 0,0092 | 2,68 | 0,1 | -2,01 | 0,00021 | L4 |
| 15 | 161 | 0,63 | 1,15 | 0,013 | 4,85 | 0,021 | 2,59 | 0,021 | 4,23 | 0,036 | 2,26 | 0,23 | -1,87 | 0,0064 | L4 |
| 16 | 162 | 0,18 | 1,45 | 0,0043 | 5,79 | 0,028 | 2,34 | 0,016 | 3,99 | 0,066 | 1,61 | 0,095 | -2,47 | 0,0019 | L1,L4 |
| 17 | 171 | 0,16 | 1,5 | 0,0013 | 6,56 | 0,023 | 2,73 | 0,0049 | 4,37 | 0,057 | 1,82 | 0,071 | -2,4 | 0,00048 | L4 |
| 18 | 173 | 0,63 | 1,13 | 0,0092 | 5,39 | 0,016 | 2,66 | 0,016 | 4,76 | 0,028 | 2,34 | 0,18 | -2,03 | 0,0037 | L4 |
| 19 | 182 | 0,56 | 1,15 | 0,0044 | 5,28 | 0,015 | 2,5 | 0,0081 | 4,6 | 0,022 | 2,18 | 0,12 | -2,11 | 0,0015 | L4 |
| 20 | 249 | 0,15 | 1,48 | 0,0067 | 2,87 | 0,13 | 1,58 | 0,091 | 1,94 | 0,88 | 1,07 | 0,12 | -1,82 | 0,021 | L4 |
| 21 | 255 | 0,34 | 1,34 | 0,0082 | 3,06 | 0,23 | 1,51 | 0,042 | 2,28 | 0,76 | 1,13 | 0,076 | -2,03 | 0,022 | L4 |
| 22 | 265 | 0,63 | 1,21 | 0,021 | 4,21 | 0,44 | 1,65 | 0,038 | 3,49 | 0,68 | 1,37 | 0,14 | -2,55 | 0,041 | L4 |
| 23 | 282 | 0,041 | 1,52 | 0,00088 | 3,04 | 0,0087 | 2,03 | 0,011 | 2 | 0,18 | 1,33 | 0,13 | -1,5 | 0,00042 | L4 |
| 24 | 283 | 0,83 | -1,3 | 0,036 | 3,82 | 0,89 | 1,18 | 0,019 | 4,95 | 0,72 | 1,53 | 0,062 | -3,24 | 0,048 | L1,L4 |
| 25 | 285 | 0,13 | 1,44 | 0,022 | 3,05 | 0,087 | 1,71 | 0,069 | 2,12 | 0,39 | 1,19 | 0,22 | -1,78 | 0,02 | L4 |
| 26 | 289 | 0,94 | -1,29 | 0,019 | 4,19 | 0,34 | 1,52 | 0,0079 | 5,41 | 0,22 | 1,96 | 0,085 | -2,76 | 0,018 | L1,L4 |
| 27 | 350 | 0,0005 | 2,37 | 0,31 | -1,18 | 0,63 | 1,06 | 0,014 | -2,81 | 0,00024 | -2,23 | 0,3 | 1,26 | 0,0049 | L1,L4 |
| 28 | 352 | 0,0095 | 1,99 | 0,3 | -1,23 | 0,19 | -1,33 | 0,044 | -2,45 | 0,0016 | -2,65 | 0,66 | -1,08 | 0,019 | L1,L4 |
| 29 | 377 | 0,47 | -1,14 | 0,026 | 1,97 | 0,15 | 1,48 | 0,024 | 2,25 | 0,099 | 1,69 | 0,38 | -1,33 | 0,031 | L4 |
| 30 | 378 | 0,54 | 1,13 | 0,03 | 2,66 | 0,013 | 1,91 | 0,065 | 2,36 | 0,019 | 1,69 | 0,63 | -1,4 | 0,016 | L4 |
| 31 | 382 | 0,052 | 1,61 | 0,25 | -1,54 | 0,61 | -1,27 | 0,039 | -2,47 | 0,0028 | -2,03 | 0,36 | 1,21 | 0,044 | L1,L4 |
| 32 | 639 | 0,21 | -1,26 | 0,041 | 2,91 | 0,00059 | 2,59 | 0,025 | 3,67 | 0,00044 | 3,26 | 0,83 | -1,12 | 0,0017 | L1,L4 |
| 33 | 680 | 0,49 | 1,38 | 0,00083 | 3,87 | 0,018 | 2,17 | 0,018 | 2,81 | 0,17 | 1,58 | 0,12 | -1,78 | 0,0035 | L1,L4 |
| 34 | 682 | 0,23 | -1,28 | 0,0081 | -2,03 | 0,0052 | -2,19 | 0,2 | -1,59 | 0,14 | -1,71 | 0,82 | -1,08 | 0,016 | L1,L4 |
| 35 | 685 | 0,09 | -1,38 | 0,00031 | -2,36 | 0,023 | -1,6 | 0,081 | -1,71 | 0,66 | -1,16 | 0,14 | 1,47 | 0,0056 | L1,L4 |
| 36 | 745 | 0,24 | -1,21 | 0,02 | -1,98 | 0,024 | -1,68 | 0,095 | -1,63 | 0,16 | -1,38 | 0,49 | 1,18 | 0,029 | L1,L4 |
| 37 | 786 | 0,18 | 1,28 | 0,026 | -1,41 | 0,012 | -1,36 | 0,018 | -1,81 | 0,013 | -1,73 | 0,66 | 1,04 | 0,0045 | L1,L4 |
| 38 | 804 | 0,44 | 1,12 | 0,0043 | -1,54 | 0,017 | -1,44 | 0,0075 | -1,72 | 0,02 | -1,61 | 0,71 | 1,07 | 0,0024 | L1,L4 |
| 39 | 808 | 0,059 | 1,43 | 0,045 | -1,45 | 0,074 | -1,34 | 0,0026 | -2,07 | 0,0022 | -1,91 | 0,48 | 1,08 | 0,00088 | L1,L4 |
| 40 | 811 | 0,11 | 1,38 | 0,034 | -1,35 | 0,065 | -1,3 | 0,011 | -1,86 | 0,018 | -1,79 | 0,82 | 1,04 | 0,0052 | L1,L4 |
| 41 | 816 | 0,12 | 1,32 | 0,019 | -1,41 | 0,032 | -1,34 | 0,0077 | -1,87 | 0,01 | -1,76 | 0,66 | 1,06 | 0,0022 | L1,L4 |
| 42 | 829 | 0,27 | 1,16 | 0,028 | -1,43 | 0,32 | -1,19 | 0,0024 | -1,67 | 0,089 | -1,39 | 0,44 | 1,2 | 0,03 | L4 |
| 43 | 832 | 0,095 | 1,34 | 0,044 | -1,42 | 0,16 | -1,26 | 0,0085 | -1,91 | 0,023 | -1,7 | 0,51 | 1,13 | 0,0074 | L4 |
| 44 | 845 | 0,4 | 1,38 | 0,047 | -2,97 | 0,5 | -1,5 | 0,015 | -4,11 | 0,13 | -2,08 | 0,095 | 1,98 | 0,037 | L4 |
| 45 | 846 | 0,61 | 1,12 | 0,023 | -2,8 | 0,13 | -1,96 | 0,0053 | -3,12 | 0,033 | -2,19 | 0,23 | 1,42 | 0,011 | L1,L4 |
| 46 | 848 | 0,83 | 1,07 | 0,0089 | -3,66 | 0,37 | -1,53 | 0,012 | -3,91 | 0,32 | -1,63 | 0,044 | 2,4 | 0,023 | L4 |
| 47 | 867 | 0,87 | -1,03 | 0,016 | 3,65 | 0,22 | 1,58 | 0,014 | 3,75 | 0,22 | 1,62 | 0,1 | -2,31 | 0,018 | L4 |
| 48 | 924 | 0,036 | 1,6 | 0,52 | -1,18 | 0,14 | -1,42 | 0,035 | -1,88 | 0,00079 | -2,26 | 0,64 | -1,2 | 0,012 | L1,L4 |
| 49 | 934 | 0,094 | 1,55 | 0,2 | -1,45 | 0,085 | -1,48 | 0,064 | -2,24 | 0,013 | -2,28 | 0,8 | -1,02 | 0,031 | L1,L4 |
| 50 | 1052 | 0,52 | 1,07 | 0,00046 | -1,54 | 0,075 | -1,32 | 0,0035 | -1,65 | 0,087 | -1,42 | 0,6 | 1,16 | 0,0082 | L4 |
| 51 | 1055 | 0,74 | 1,06 | 0,011 | -1,52 | 0,0058 | -1,56 | 0,02 | -1,62 | 0,012 | -1,65 | 0,93 | -1,02 | 0,0032 | L1,L4 |
| 52 | 1058 | 0,57 | 1,15 | 0,0028 | 5,11 | 0,013 | 2,49 | 0,0061 | 4,46 | 0,024 | 2,17 | 0,084 | -2,05 | 0,00092 | L4 |
| 53 | 1059 | 0,58 | 1,12 | 0,0036 | 4,97 | 0,017 | 2,48 | 0,0074 | 4,43 | 0,032 | 2,21 | 0,12 | -2,01 | 0,0015 | L4 |
| 54 | 1060 | 0,53 | 1,11 | 0,004 | 4,91 | 0,019 | 2,75 | 0,0061 | 4,42 | 0,032 | 2,48 | 0,18 | -1,79 | 0,0018 | L4 |
| 55 | 1072 | 0,013 | -2,03 | 0,0076 | -2,4 | 0,033 | -2 | 0,44 | -1,18 | 0,78 | 1,01 | 0,75 | 1,2 | 0,019 | L1,L4 |
| 56 | 1075 | 0,39 | 1,25 | 0,083 | -1,75 | 0,14 | -1,54 | 0,032 | -2,19 | 0,036 | -1,93 | 0,56 | 1,13 | 0,04 | L1,L4 |

ANEXO 2

Figura Anexo. Resultado de las transiciones medidas por SRM de CD59. En pacientes de forma global, en pacientes no diabéticos (no DM), y pacientes diabéticos (DM).



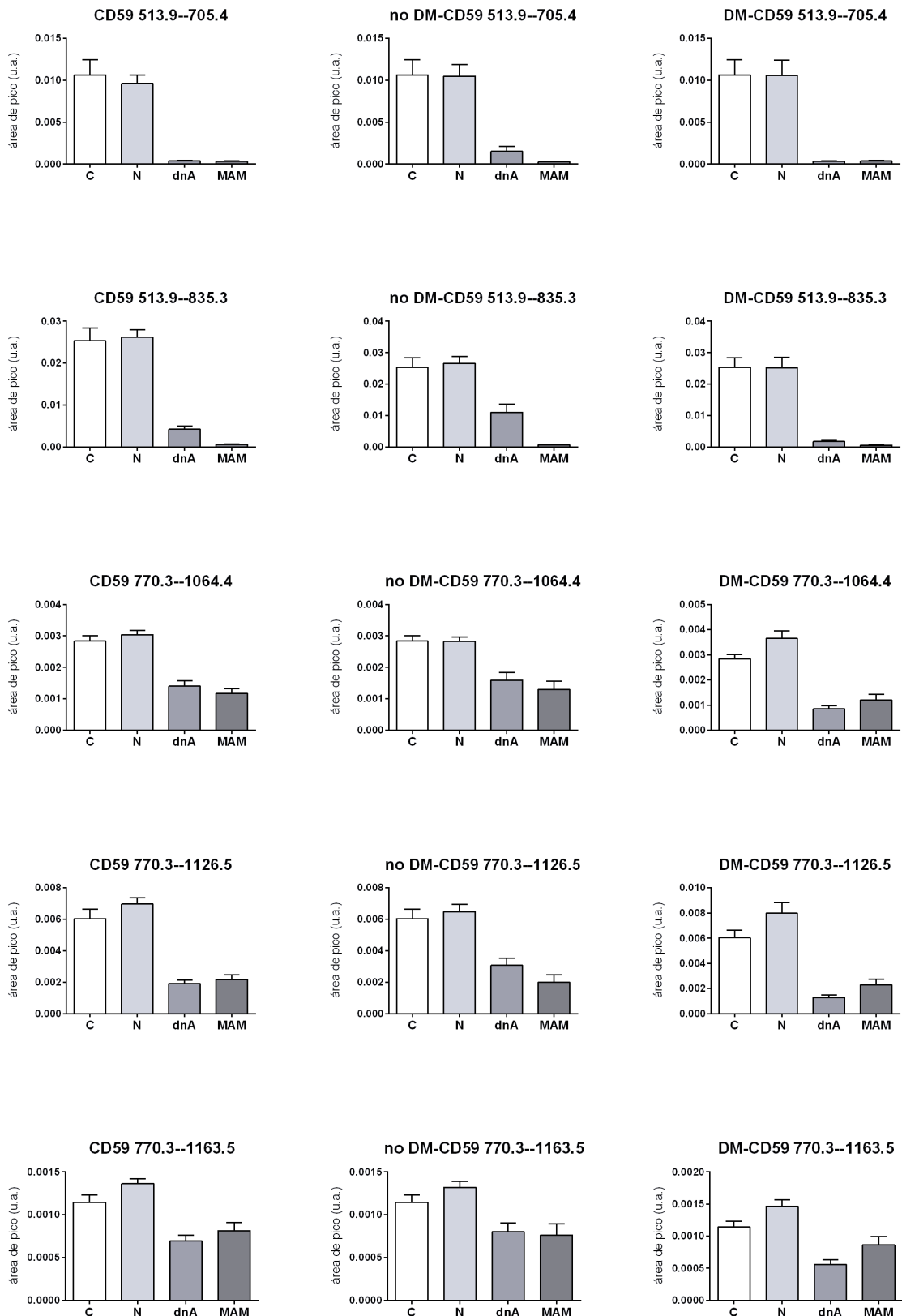


Figura Anexo. Resultado de las transiciones medidas por SRM de AAT. En pacientes de forma global, en pacientes no diabéticos (no DM), y pacientes diabéticos (DM).

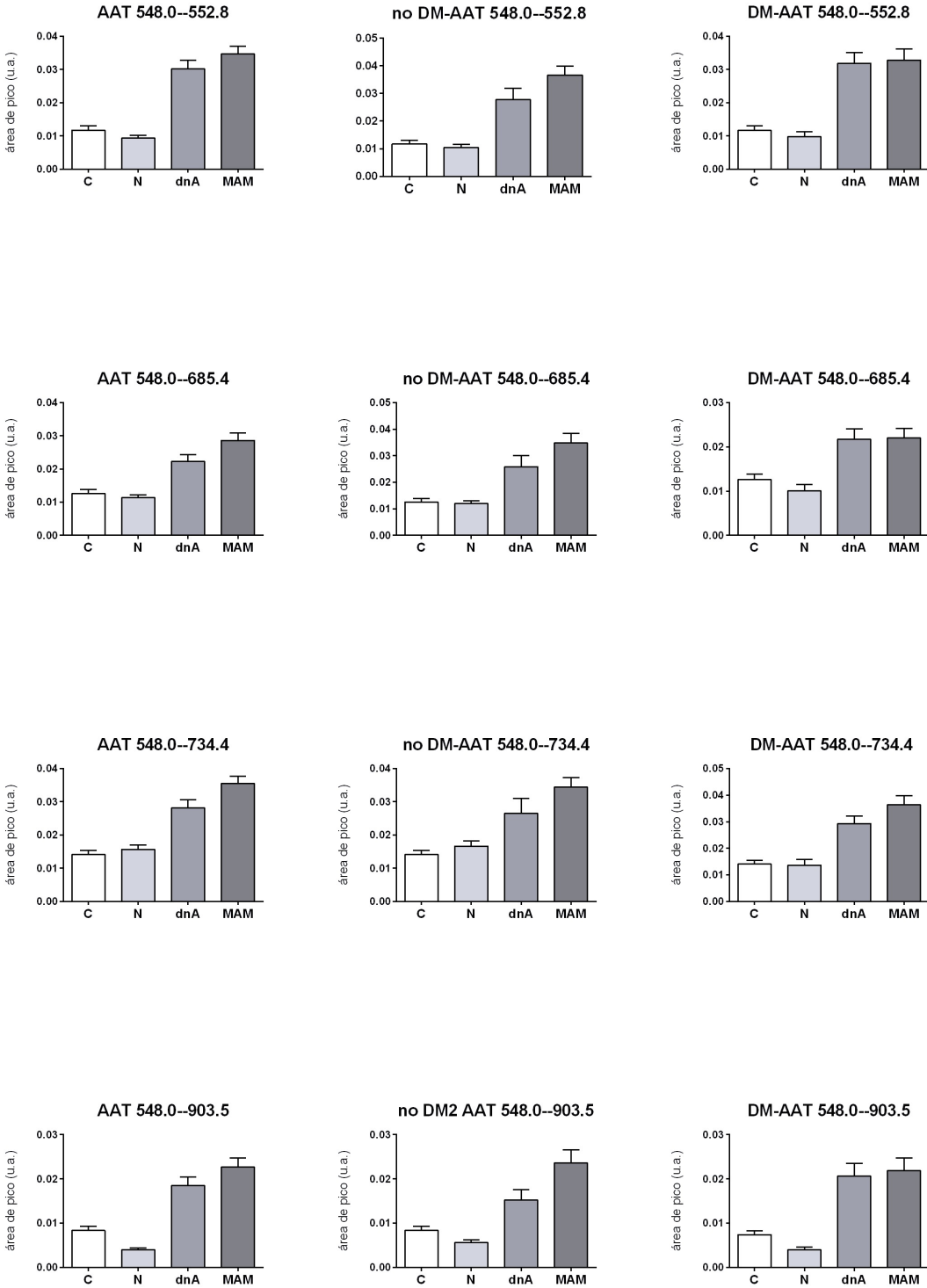
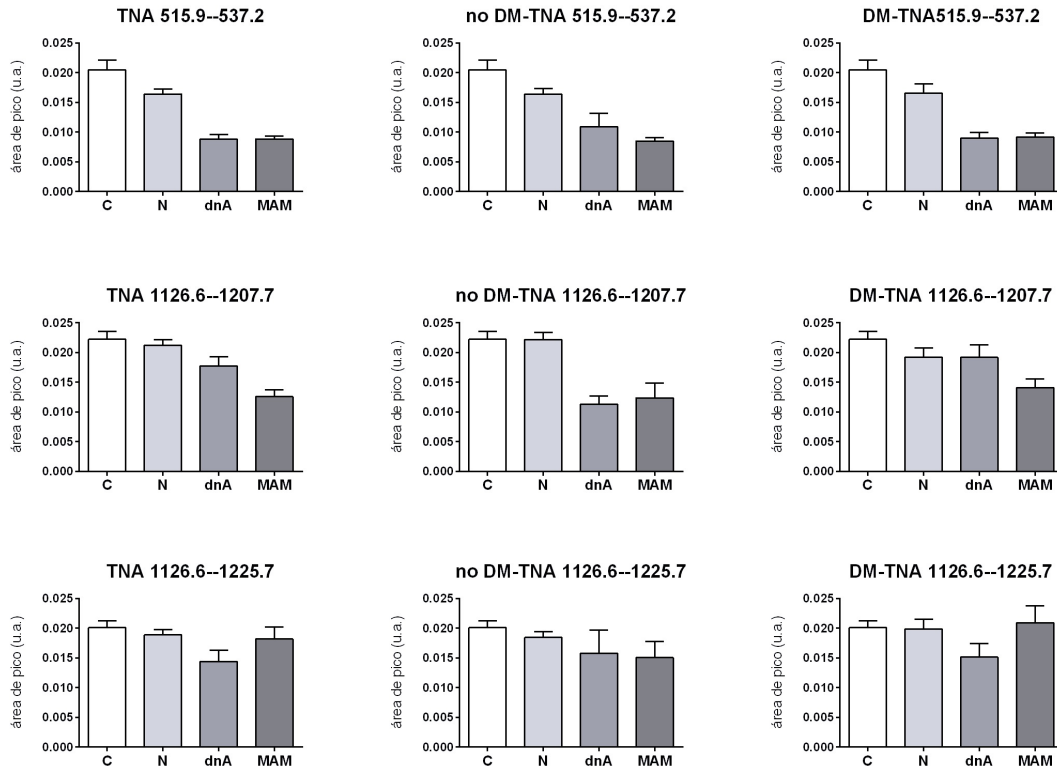


Figura Anexo. Resultado de las transiciones medidas por SRM de TNA. En pacientes de forma global, en pacientes no diabéticos (no DM), y pacientes diabéticos (DM).



ANEXO 3

Tabla Anexo 2. Resultado del análisis de iTRAQ de proteínas exosomales obteniendo un listado de las 487 proteínas identificadas con > de 3 péptidos de 1839 proteínas identificadas. C: control. N: normoalbuminúricos. dnA: de novo albuminuria. MAM: microalbuminuria mantenida

| FASTA | PROTEÍNA | DESCRIPCIÓN | Pept | Zq_N1 | Zq_N2 | Zq_d nA1 | Zq_d nA2 | Zq_MA M1 | Zq_MA M2 | Zq_N | Zq_d nA | Zq_MA M | FL_N 1 | FL_N 2 | FL_d nA1 | FL_d nA2 | FL_M AM1 | FL_M AM2 |
|--------|-------------|---|------|-------|-------|----------|----------|----------|----------|------|---------|---------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|
| P15924 | DESP_HUMAN | DESP_HUMAN Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3 | 105 | -1,7 | 2,7 | -0,5 | 1,8 | 0,5 | 1,6 | 0,49 | 0,63 | 1,08 | 1,6 | 3,2 | 1,2 | 1,5 | 1,3 | 1,8 |
| O60437 | PEPL_HUMAN | PEPL_HUMAN Perioplakin OS=Homo sapiens GN=PPL PE=1 SV=4 | 68 | -2,4 | 2,1 | -0,8 | 1,2 | 0,4 | 0,4 | 0,16 | 0,18 | 0,36 | 2,0 | 2,5 | 1,3 | 1,3 | 1,2 | 1,1 |
| P98164 | LRP2_HUMAN | LRP2_HUMAN Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=LRP2 PE=1 SV=3 | 59 | -0,2 | -1,0 | -0,5 | -0,9 | -1,6 | -0,5 | 0,59 | 0,71 | 1,02 | 1,0 | 1,6 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 1,2 |
| P19013 | K2C4_HUMAN | K2C4_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT4 PE=1 SV=4 | 59 | -3,7 | 2,9 | -0,7 | -1,9 | 1,0 | 0,3 | 0,41 | 1,33 | 0,68 | 2,9 | 3,5 | 1,3 | 1,6 | 1,6 | 1,1 |
| P01024 | CO3_HUMAN | CO3_HUMAN Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 | 57 | 0,1 | -0,8 | -1,9 | -2,4 | -1,1 | -2,8 | 0,37 | 2,17 | 1,97 | 1,0 | 1,4 | 2,0 | 1,8 | 1,7 | 2,8 |
| P15144 | AMPN_HUMAN | AMPN_HUMAN Aminopeptidase N OS=Homo sapiens GN=ANPEP PE=1 SV=4 | 55 | 0,1 | -1,0 | -0,4 | -0,4 | -0,1 | 0,6 | 0,43 | 0,39 | 0,24 | 1,0 | 1,5 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 |
| P13647 | K2C5_HUMAN | K2C5_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 | 52 | -1,4 | 2,8 | -1,3 | 0,7 | 0,9 | 1,4 | 0,70 | 0,33 | 1,14 | 1,5 | 3,3 | 1,6 | 1,2 | 1,5 | 1,7 |
| P02751 | FINC_HUMAN | FINC_HUMAN Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4 | 51 | 0,5 | 0,1 | -3,5 | 0,8 | -3,1 | -0,1 | 0,28 | 1,40 | 1,61 | 1,2 | 1,0 | 3,4 | 1,2 | 4,3 | 1,1 |
| O60494 | CUBN_HUMAN | CUBN_HUMAN Cubilin OS=Homo sapiens GN=CUBN PE=1 SV=5 | 46 | 0,8 | -1,4 | 0,8 | -1,8 | -0,3 | -0,9 | 0,27 | 0,50 | 0,60 | 1,3 | 1,8 | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 1,4 |
| P07911 | UROM_HUMAN | UROM_HUMAN Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1 | 44 | 2,1 | -0,3 | 4,9 | 1,1 | 3,2 | -0,2 | 0,93 | 3,01 | 1,47 | 1,8 | 1,1 | 5,4 | 1,3 | 4,5 | 1,1 |
| P04264 | K2C1_HUMAN | K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 | 44 | -0,6 | 2,2 | 0,9 | 4,3 | 0,5 | 3,2 | 0,81 | 2,61 | 1,86 | 1,2 | 2,6 | 1,4 | 2,9 | 1,3 | 3,2 |
| P35908 | K22E_HUMAN | K22E_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 | 43 | -0,9 | -0,8 | 0,9 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | 0,85 | 0,85 | 0,59 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,2 | 1,4 | 1,2 |
| Q92817 | EVPL_HUMAN | EVPL_HUMAN Envoplakin OS=Homo sapiens GN=EVPL PE=1 SV=3 | 43 | -2,0 | 1,8 | -0,7 | 0,9 | 0,3 | 0,6 | 0,11 | 0,09 | 0,42 | 1,8 | 2,2 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,2 |
| P02768 | ALBU_HUMAN | ALBU_HUMAN Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 | 41 | 0,3 | 0,8 | -4,9 | 0,8 | -1,9 | -2,5 | 0,55 | 2,05 | 2,20 | 1,1 | 1,4 | 5,5 | 1,2 | 2,5 | 2,5 |
| P35527 | K1C9_HUMAN | K1C9_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 | 41 | -0,6 | -1,9 | 1,1 | -0,3 | 0,3 | -0,4 | 1,22 | 0,39 | 0,01 | 1,2 | 2,3 | 1,5 | 1,1 | 1,2 | 1,1 |
| P08473 | NEP_HUMAN | NEP_HUMAN Neprilysin OS=Homo sapiens GN=MME PE=1 SV=2 | 41 | -0,9 | -0,7 | -0,4 | -0,1 | 0,2 | 0,7 | 0,82 | 0,29 | 0,43 | 1,3 | 1,4 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,3 |
| P0C0L4 | CO4A_HUMAN | CO4A_HUMAN Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=1 | 41 | 0,3 | -1,7 | -1,4 | -1,6 | -1,3 | -2,6 | 0,69 | 1,48 | 1,94 | 1,1 | 2,1 | 1,6 | 1,5 | 1,9 | 2,6 |
| P15311 | EZRI_HUMAN | EZRI_HUMAN Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=4 | 40 | 0,4 | -0,3 | -0,4 | -0,8 | -0,4 | 1,5 | 0,02 | 0,63 | 0,54 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,7 |
| Q02383 | SEMG2_HUMAN | SEMG2_HUMAN Semenogelin-2 OS=Homo sapiens GN=SEMG2 PE=1 SV=1 | 40 | 0,7 | 0,5 | -1,4 | 2,2 | -4,4 | 0,6 | 0,60 | 0,38 | 1,88 | 1,2 | 1,2 | 1,7 | 1,7 | 8,0 | 1,3 |
| P04279 | SEMG1_HUMAN | SEMG1_HUMAN Semenogelin-1 OS=Homo sapiens GN=SEMG1 PE=1 SV=2 | 39 | 0,6 | 0,6 | -1,3 | 2,2 | -4,2 | 0,6 | 0,59 | 0,49 | 1,80 | 1,2 | 1,3 | 1,5 | 1,7 | 7,2 | 1,2 |
| Q8WUM4 | PDC61_HUMAN | PDC61_HUMAN Programmed cell death 6-interacting protein OS=Homo sapiens GN=PDC61 PE=1 SV=1 | 38 | 0,3 | -0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,0 | 1,4 | 0,08 | 0,22 | 0,70 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,7 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P13645 | K1C10_HUMAN | K1C10_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 | 37 | 0,1 | -0,1 | 1,3 | 0,6 | 0,8 | 1,2 | - | 0,02 | 0,98 | 1,01 | 1,0 | 1,1 | 1,6 | 1,2 | 1,5 | 1,6 |
| P02538 | K2C6A_HUMAN | K2C6A_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 | 37 | -1,7 | 3,9 | -1,6 | 1,1 | 0,7 | 2,2 | 1,12 | - | 0,27 | 1,45 | 1,6 | 5,6 | 1,7 | 1,3 | 1,4 | 2,3 |
| P07355 | ANXA2_HUMAN | ANXA2_HUMAN Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2 | 36 | -0,7 | 1,5 | 0,8 | 0,8 | 1,1 | 2,3 | 0,40 | 0,83 | 1,71 | 1,2 | 2,0 | 1,3 | 1,2 | 1,7 | 2,3 | |
| P00450 | CERU_HUMAN | CERU_HUMAN Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1 | 35 | 0,9 | -1,3 | -1,8 | -1,3 | -2,4 | -4,3 | - | - | - | 1,3 | 1,7 | 1,9 | 1,4 | 3,1 | 4,8 | |
| P13646 | K1C13_HUMAN | K1C13_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=4 | 35 | -2,3 | 3,8 | -0,8 | 0,9 | 1,1 | 0,8 | 0,75 | 0,04 | 0,92 | 1,9 | 5,3 | 1,3 | 1,2 | 1,7 | 1,3 | |
| P01009 | A1AT_HUMAN | A1AT_HUMAN Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3 | 32 | -0,4 | -0,3 | -2,2 | -3,4 | -1,4 | -3,6 | - | - | - | 1,1 | 1,1 | 2,1 | 2,3 | 1,9 | 3,8 | |
| P02787 | TRFE_HUMAN | TRFE_HUMAN Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 | 31 | 0,4 | 0,7 | -1,3 | -1,9 | -2,9 | -1,9 | 0,55 | - | - | 1,1 | 1,4 | 1,6 | 1,6 | 3,9 | 2,0 | |
| P10253 | LYAG_HUMAN | LYAG_HUMAN Lysosomal alpha-glucosidase OS=Homo sapiens GN=GAA PE=1 SV=4 | 30 | 0,2 | -1,8 | -1,2 | 0,0 | -3,3 | -1,1 | - | - | - | 1,0 | 2,2 | 1,5 | 1,0 | 4,9 | 1,5 | |
| P06733 | ENOA_HUMAN | ENOA_HUMAN Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 | 29 | -0,1 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 0,2 | 1,4 | 0,17 | 0,76 | 0,79 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,7 | |
| P04083 | ANXA1_HUMAN | ANXA1_HUMAN Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2 | 29 | -2,4 | 2,8 | -0,4 | 1,2 | 1,1 | 2,2 | 0,21 | 0,38 | 1,68 | 2,0 | 3,4 | 1,1 | 1,3 | 1,7 | 2,3 | |
| O43451 | MGA_HUMAN | MGA_HUMAN Maltase-glucoamylase, intestinal OS=Homo sapiens GN=MGAM PE=1 SV=5 | 29 | 0,8 | -0,9 | -1,1 | -1,3 | -0,1 | -0,9 | - | - | - | 1,3 | 1,5 | 1,5 | 1,4 | 1,0 | 1,4 | |
| P14618 | KPYM_HUMAN | KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 | 28 | -0,7 | 0,5 | -0,3 | 0,4 | -0,4 | 1,4 | - | 0,06 | 0,48 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,7 | |
| P27487 | DPP4_HUMAN | DPP4_HUMAN Dipeptidyl peptidase 4 OS=Homo sapiens GN=DPP4 PE=1 SV=2 | 28 | 1,0 | -0,2 | 0,7 | -0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,41 | 0,09 | 0,46 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | |
| P04745 | AMY1_HUMAN | AMY1_HUMAN Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2 | 27 | 0,3 | -3,6 | -0,7 | -1,2 | -2,6 | -1,6 | - | - | - | 1,1 | 4,9 | 1,3 | 1,3 | 3,4 | 1,8 | |
| P14923 | PLAK_HUMAN | PLAK_HUMAN Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 | 27 | -1,6 | 2,5 | -0,2 | 0,9 | 0,6 | 2,0 | 0,41 | 0,34 | 1,27 | 1,6 | 2,9 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | |
| P01133 | EGF_HUMAN | EGF_HUMAN Pro-epidermal growth factor OS=Homo sapiens GN=EGF PE=1 SV=2 | 26 | -2,0 | -1,1 | -0,6 | -0,2 | -1,8 | 1,2 | - | - | - | 1,8 | 1,6 | 1,2 | 1,1 | 2,4 | 1,6 | |
| P04406 | G3P_HUMAN | G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 | 25 | -0,8 | 0,7 | -0,5 | 0,7 | -0,4 | 1,9 | - | 0,07 | 0,71 | 1,3 | 1,3 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 2,0 | |
| P54802 | ANAG_HUMAN | ANAG_HUMAN Alpha-N-acetylglucosaminidase OS=Homo sapiens GN=NAGLU PE=1 SV=2 | 25 | -0,8 | -2,2 | -0,8 | -1,2 | -2,9 | -1,8 | - | - | - | 1,3 | 2,6 | 1,3 | 1,4 | 3,9 | 2,0 | |
| P02533 | K1C14_HUMAN | K1C14_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 | 25 | -0,3 | 0,8 | -0,7 | -1,6 | 0,7 | 1,2 | 0,22 | - | 0,97 | 1,1 | 1,4 | 1,3 | 1,5 | 1,4 | 1,6 | |
| Q07075 | AMPE_HUMAN | AMPE_HUMAN Glutamyl aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=ENPEP PE=1 SV=3 | 24 | -1,0 | -0,7 | -0,1 | -0,2 | -0,7 | 0,1 | - | - | - | 1,3 | 1,4 | 1,0 | 1,0 | 1,4 | 1,0 | |
| P29508 | SPB3_HUMAN | SPB3_HUMAN Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERPINB3 PE=1 SV=2 | 24 | -0,7 | 2,0 | 0,4 | 0,9 | 0,2 | 2,0 | 0,64 | 0,69 | 1,10 | 1,2 | 2,4 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 2,1 | |
| P09525 | ANXA4_HUMAN | ANXA4_HUMAN Annexin A4 OS=Homo sapiens GN=ANXA4 PE=1 SV=4 | 23 | 0,4 | -0,5 | 0,5 | -0,5 | 0,6 | -0,2 | - | 0,02 | 0,22 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | |
| P50995 | ANX11_HUMAN | ANX11_HUMAN Annexin A11 OS=Homo sapiens GN=ANXA11 PE=1 SV=1 | 23 | 2,5 | -0,3 | 1,7 | -0,9 | 1,5 | -0,8 | 1,08 | 0,37 | 0,36 | 2,1 | 1,2 | 1,8 | 1,3 | 2,0 | 1,3 | |
| O43895 | XPP2_HUMAN | XPP2_HUMAN Xaa-Pro aminopeptidase 2 OS=Homo sapiens GN=XPNPEP2 PE=1 SV=3 | 23 | -1,4 | -0,5 | -0,4 | -0,2 | -0,5 | 1,0 | - | - | 0,26 | 1,5 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,5 | |
| O00159 | MYO1C_HUMAN | MYO1C_HUMAN Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens GN=MYO1C PE=1 SV=4 | 23 | -0,8 | -0,8 | -1,0 | -0,5 | -1,0 | 0,7 | - | - | - | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,1 | 1,6 | 1,3 | |
| Q09666 | AHNAK_HUMAN | AHNAK_HUMAN Neuroblast differentiation-associated protein OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2 | 23 | -0,9 | 0,5 | -0,3 | -1,2 | 0,4 | -1,3 | - | - | - | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,4 | 1,2 | 1,6 | |
| P08133 | ANXA6_HUMAN | ANXA6_HUMAN Annexin A6 OS=Homo sapiens GN=ANXA6 PE=1 SV=3 | 22 | 0,3 | -1,1 | 0,1 | -0,4 | 0,3 | 0,3 | - | - | 0,34 | 1,1 | 1,6 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | |
| O43707 | ACTN4_HUMAN | ACTN4_HUMAN Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2 | 22 | -0,9 | 0,7 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,6 | - | - | - | 1,3 | 1,4 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|---|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P33908 | MA1A1_HUMAN | MA1A1_HUMAN Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA OS=Homo sapiens GN=MAN1A1 PE=1 SV=3 | 22 | 0,7 | -1,0 | 0,5 | -1,4 | -0,3 | 0,4 | - | - | 0,08 | 1,2 | 1,6 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,2 | |
| Q6UX06 | OLFM4_HUMAN | OLFM4_HUMAN Olfactomedin-4 OS=Homo sapiens GN=OLFM4 PE=1 SV=1 | 21 | -0,1 | -2,0 | -2,4 | -2,0 | -0,9 | -0,2 | 1,10 | 2,20 | - | 1,0 | 2,5 | 2,3 | 1,6 | 1,5 | 1,1 | |
| P05154 | IPSP_HUMAN | IPSP_HUMAN Plasma serine protease inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINA5 PE=1 SV=3 | 21 | -2,6 | -1,4 | -1,3 | -2,3 | -2,4 | 0,3 | 2,00 | 1,83 | 1,06 | 2,1 | 1,8 | 1,6 | 1,8 | 3,2 | 1,1 | |
| P01833 | PIGR_HUMAN | PIGR_HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 | 21 | -1,6 | -2,1 | -0,7 | -2,6 | -1,2 | -0,1 | 1,82 | 1,69 | 0,67 | 1,6 | 2,5 | 1,3 | 1,9 | 1,8 | 1,0 | |
| Q5T2W1 | NHRF3_HUMAN | NHRF3_HUMAN Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3 OS=Homo sapiens GN=PDZK1 PE=1 SV=2 | 21 | 0,4 | -0,9 | -0,9 | -1,9 | 0,3 | 0,1 | 0,27 | 1,38 | 0,21 | 1,1 | 1,5 | 1,4 | 1,6 | 1,1 | 1,1 | |
| P35579 | MYH9_HUMAN | MYH9_HUMAN Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4 | 21 | -0,2 | 0,1 | -0,2 | -0,3 | 0,4 | 0,1 | 0,05 | - | 0,24 | 0,28 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,1 |
| Q8N1N4 | K2C78_HUMAN | K2C78_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 PE=2 SV=2 | 21 | -2,7 | 2,8 | -0,9 | 1,0 | 1,1 | 0,7 | 0,05 | 0,04 | 0,92 | 2,2 | 3,4 | 1,4 | 1,3 | 1,7 | 1,3 | |
| P02788 | TRFL_HUMAN | TRFL_HUMAN Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6 | 21 | 2,3 | 0,2 | 0,1 | 1,3 | -0,8 | -1,4 | 1,24 | 0,69 | - | 1,9 | 1,1 | 1,0 | 1,4 | 1,4 | 1,7 | |
| P00558 | PGK1_HUMAN | PGK1_HUMAN Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3 | 20 | -0,6 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | -0,2 | 1,7 | - | 0,50 | 0,79 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,9 | |
| Q00610 | CLH1_HUMAN | CLH1_HUMAN Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=CLTC PE=1 SV=5 | 20 | -0,8 | 0,5 | -0,4 | -0,3 | 0,5 | 0,0 | - | - | 0,27 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | |
| Q08380 | LG3BP_HUMAN | LG3BP_HUMAN Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP PE=1 SV=1 | 20 | 1,7 | -0,4 | 1,5 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,66 | 0,82 | 0,27 | 1,7 | 1,2 | 1,7 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | |
| P62736 | ACTA_HUMAN | ACTA_HUMAN Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1 | 20 | 0,2 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,5 | 1,5 | 0,13 | 0,29 | 0,98 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,3 | 1,7 | |
| Q9Y6W3 | CAN7_HUMAN | CAN7_HUMAN Calpain-7 OS=Homo sapiens GN=CAPN7 PE=1 SV=1 | 20 | -0,1 | -0,2 | -0,4 | 0,4 | -0,4 | 0,6 | - | 0,03 | 0,10 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | |
| P12821 | ACE_HUMAN | ACE_HUMAN Angiotensin-converting enzyme OS=Homo sapiens GN=ACE PE=1 SV=1 | 20 | 1,7 | -1,1 | 0,2 | -0,5 | -0,3 | -0,3 | 0,30 | - | - | 1,6 | 1,6 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | |
| P08758 | ANXA5_HUMAN | ANXA5_HUMAN Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2 | 19 | 0,4 | -0,7 | 0,5 | -1,4 | 0,5 | -0,6 | - | - | - | 1,1 | 1,4 | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 1,3 | |
| P16444 | DPEP1_HUMAN | DPEP1_HUMAN Dipeptidase 1 OS=Homo sapiens GN=DPEP1 PE=1 SV=3 | 19 | -0,8 | -1,2 | -0,4 | -1,0 | -0,3 | 0,2 | 1,00 | 0,70 | 0,07 | 1,3 | 1,7 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | |
| P10909 | CLUS_HUMAN | CLUS_HUMAN Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1 | 19 | 0,2 | 0,2 | -2,0 | 0,3 | -2,7 | 0,2 | 0,21 | - | 1,24 | 1,1 | 1,1 | 2,0 | 1,1 | 3,7 | 1,1 | |
| P01023 | A2MG_HUMAN | A2MG_HUMAN Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 | 18 | 1,3 | 1,5 | 0,6 | -0,1 | -0,3 | 1,0 | 1,40 | 0,26 | 0,33 | 1,5 | 1,9 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | |
| P26038 | MOES_HUMAN | MOES_HUMAN Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3 | 18 | 0,8 | -0,1 | 0,3 | -0,7 | -0,1 | 0,5 | 0,37 | - | 0,19 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | |
| P08727 | K1C19_HUMAN | K1C19_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=1 SV=4 | 18 | -1,1 | 0,5 | -0,5 | -0,9 | 1,0 | -0,2 | 0,30 | - | 0,43 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 1,7 | 1,1 | |
| P12109 | CO6A1_HUMAN | CO6A1_HUMAN Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=3 | 18 | -1,7 | -1,5 | -0,6 | -2,4 | -1,6 | 0,3 | 1,60 | 1,51 | 0,66 | 1,7 | 1,9 | 1,3 | 1,8 | 2,1 | 1,1 | |
| P06727 | APOA4_HUMAN | APOA4_HUMAN Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3 | 18 | 0,6 | -0,4 | 1,5 | -3,4 | 0,4 | -0,8 | 0,13 | - | 0,20 | 1,2 | 1,2 | 1,7 | 2,3 | 1,2 | 1,3 | |
| P05109 | S10A8_HUMAN | S10A8_HUMAN Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 | 18 | 4,4 | 1,4 | 4,3 | 4,0 | 4,5 | -1,9 | 2,91 | 4,18 | 1,27 | 3,6 | 1,8 | 4,6 | 2,7 | 8,4 | 2,0 | |
| P07195 | LDHB_HUMAN | LDHB_HUMAN L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 | 17 | -0,1 | -1,2 | 0,7 | -0,4 | -0,3 | 1,2 | - | 0,14 | 0,46 | 1,0 | 1,7 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,6 | |
| Q96KP4 | CNDP2_HUMAN | CNDP2_HUMAN Cytosolic non-specific dipeptidase OS=Homo sapiens GN=CNDP2 PE=1 SV=2 | 17 | -0,2 | -1,0 | -0,9 | -0,7 | -0,6 | -0,1 | 0,61 | - | 0,38 | 1,1 | 1,6 | 1,4 | 1,2 | 1,4 | 1,0 | |
| P00966 | ASSY_HUMAN | ASSY_HUMAN Argininosuccinate synthase OS=Homo sapiens GN=ASS1 PE=1 SV=2 | 17 | 0,2 | -1,0 | 0,0 | -0,2 | 0,2 | 1,0 | - | - | 0,63 | 1,1 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,5 | |
| P08183 | MDR1_HUMAN | MDR1_HUMAN Multidrug resistance protein 1 OS=Homo sapiens GN=ABCB1 PE=1 SV=3 | 17 | 0,0 | -0,7 | -0,3 | -0,8 | -0,1 | -0,2 | - | - | - | 1,0 | 1,4 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | |
| Q03154 | ACY1_HUMAN | ACY1_HUMAN Aminoacylase-1 OS=Homo sapiens GN=ACY1 PE=1 SV=1 | 17 | 0,7 | -0,3 | 0,6 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,17 | 0,49 | 0,40 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P49221 | TGM4_HUMAN | TGM4_HUMAN Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4 OS=Homo sapiens GN=TGM4 PE=1 SV=2 | 16 | 2,0 | -0,9 | -2,1 | -2,4 | -2,1 | -1,0 | 0,54 | - | - | 1,8 | 1,5 | 2,1 | 1,8 | 2,8 | 1,4 |
| O00560 | SDCB1_HUMAN | SDCB1_HUMAN Syntenin-1 OS=Homo sapiens GN=SDCBP PE=1 SV=1 | 16 | -0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,7 | -0,3 | 1,5 | 0,09 | 0,41 | 0,63 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,8 |
| P08571 | CD14_HUMAN | CD14_HUMAN Monocyte differentiation antigen CD14 OS=Homo sapiens GN=CD14 PE=1 SV=2 | 16 | 0,0 | -0,3 | -1,3 | -1,5 | -2,4 | 0,4 | 0,16 | 1,41 | 0,96 | 1,0 | 1,1 | 1,6 | 1,5 | 3,1 | 1,2 |
| P15309 | PPAP_HUMAN | PPAP_HUMAN Prostatic acid phosphatase OS=Homo sapiens GN=ACPP PE=1 SV=3 | 16 | -1,8 | -4,3 | -1,3 | -2,8 | -2,5 | -0,9 | 3,02 | 2,05 | 1,69 | 1,7 | 6,5 | 1,6 | 2,0 | 3,3 | 1,4 |
| P19440 | GGT1_HUMAN | GGT1_HUMAN Gamma-glutamyltranspeptidase 1 OS=Homo sapiens GN=GGT1 PE=1 SV=2 | 16 | 0,1 | -0,4 | -0,6 | 0,4 | -0,1 | 1,0 | 0,14 | 0,10 | 0,46 | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,5 |
| Q13621 | S12A1_HUMAN | S12A1_HUMAN Solute carrier family 12 member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC12A1 PE=1 SV=2 | 16 | 1,2 | -1,3 | 1,0 | -0,1 | 0,8 | 0,3 | 0,08 | 0,44 | 0,52 | 1,4 | 1,8 | 1,4 | 1,0 | 1,4 | 1,1 |
| P53990 | IST1_HUMAN | IST1_HUMAN IST1 homolog OS=Homo sapiens GN=IST1 PE=1 SV=1 | 16 | 0,3 | 0,2 | 0,0 | 0,3 | -0,6 | 1,2 | 0,25 | 0,13 | 0,28 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,4 | 1,6 |
| A8K2U0 | A2ML1_HUMAN | A2ML1_HUMAN Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=A2ML1 PE=1 SV=3 | 16 | 0,0 | 3,0 | 0,8 | 3,3 | 0,9 | 1,8 | 1,49 | 2,05 | 1,35 | 1,0 | 3,7 | 1,3 | 2,3 | 1,5 | 2,0 |
| P11142 | HSP7C_HUMAN | HSP7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 | 15 | -0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,8 | 0,2 | 0,0 | 0,08 | 0,50 | 0,08 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,0 |
| P08195 | 4F2_HUMAN | 4F2_HUMAN 4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=3 | 15 | -0,5 | -0,8 | -0,9 | -1,0 | -0,7 | -0,1 | 0,65 | 0,96 | 0,41 | 1,2 | 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,4 | 1,0 |
| P05023 | AT1A1_HUMAN | AT1A1_HUMAN Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 PE=1 SV=1 | 15 | 0,8 | -1,1 | 0,5 | -1,1 | 0,7 | 0,0 | 0,16 | 0,27 | 0,35 | 1,3 | 1,6 | 1,2 | 1,3 | 1,4 | 1,0 |
| P01876 | IGHA1_HUMAN | IGHA1_HUMAN Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 | 15 | -0,6 | -2,3 | -0,4 | -3,3 | -0,9 | -1,5 | 1,44 | 1,83 | 1,21 | 1,2 | 2,8 | 1,1 | 2,2 | 1,6 | 1,7 |
| P01042 | KNG1_HUMAN | KNG1_HUMAN Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2 | 15 | -1,1 | -1,1 | -0,2 | -2,0 | -0,4 | 0,5 | 1,09 | 1,06 | 0,03 | 1,4 | 1,6 | 1,1 | 1,6 | 1,2 | 1,2 |
| O00468 | AGRIN_HUMAN | AGRIN_HUMAN Agrin OS=Homo sapiens GN=AGRN PE=1 SV=4 | 15 | -0,3 | -0,8 | -1,5 | -0,2 | -1,4 | -0,1 | 0,56 | 0,85 | 0,71 | 1,1 | 1,5 | 1,7 | 1,1 | 1,9 | 1,0 |
| P02647 | APOA1_HUMAN | APOA1_HUMAN Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 | 15 | -0,3 | 0,1 | -0,4 | -1,0 | 0,4 | -0,8 | 0,07 | 0,68 | 0,23 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,4 |
| P46940 | IQGA1_HUMAN | IQGA1_HUMAN Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens GN=IQGAP1 PE=1 SV=1 | 15 | -0,8 | 0,9 | -0,4 | 0,3 | -0,1 | 0,7 | 0,03 | 0,06 | 0,30 | 1,3 | 1,5 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,3 |
| O43490 | PROM1_HUMAN | PROM1_HUMAN Prominin-1 OS=Homo sapiens GN=PROM1 PE=1 SV=1 | 15 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | -0,3 | -0,1 | 0,3 | 0,14 | 0,19 | 0,10 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,1 |
| P04792 | HSPB1_HUMAN | HSPB1_HUMAN Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 | 15 | -0,7 | 3,5 | -0,1 | 4,8 | 1,1 | 1,8 | 1,42 | 2,33 | 1,46 | 1,2 | 4,6 | 1,0 | 3,3 | 1,7 | 1,9 |
| P06702 | S10A9_HUMAN | S10A9_HUMAN Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 | 15 | 4,4 | 1,1 | 4,1 | 3,7 | 3,0 | -2,0 | 2,74 | 3,93 | 0,51 | 3,6 | 1,6 | 4,3 | 2,5 | 4,2 | 2,1 |
| Q99816 | TS101_HUMAN | TS101_HUMAN Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Homo sapiens GN=TSG101 PE=1 SV=2 | 14 | -0,5 | -0,2 | -0,5 | 0,2 | -0,6 | 1,3 | 0,37 | 0,14 | 0,35 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,7 |
| P27105 | STOM_HUMAN | STOM_HUMAN Erythrocyte band 7 integral membrane protein OS=Homo sapiens GN=STOM PE=1 SV=3 | 14 | 0,0 | -0,8 | 1,1 | -0,1 | 1,0 | 0,0 | 0,37 | 0,50 | 0,51 | 1,0 | 1,4 | 1,5 | 1,0 | 1,6 | 1,0 |
| P31946 | 1433B_HUMAN | 1433B_HUMAN 14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=3 | 14 | -0,6 | 0,9 | -0,6 | 1,4 | -0,3 | 1,0 | 0,14 | 0,40 | 0,35 | 1,2 | 1,5 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,4 |
| Q71U36 | TBA1A_HUMAN | TBA1A_HUMAN Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1 | 14 | 0,0 | 0,5 | 0,3 | 0,0 | 0,8 | 0,9 | 0,28 | 0,19 | 0,89 | 1,0 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 1,5 | 1,4 |
| P38606 | VATA_HUMAN | VATA_HUMAN V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Homo sapiens GN=ATP6V1A PE=1 SV=2 | 14 | -0,4 | -0,5 | 0,1 | -0,9 | -0,9 | 0,7 | 0,45 | 0,42 | 0,14 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 1,3 | 1,6 | 1,3 |
| P20073 | ANXA7_HUMAN | ANXA7_HUMAN Annexin A7 OS=Homo sapiens GN=ANXA7 PE=1 SV=3 | 14 | 1,5 | 0,0 | 1,2 | -0,4 | 0,7 | -0,3 | 0,75 | 0,43 | 0,19 | 1,5 | 1,0 | 1,5 | 1,1 | 1,4 | 1,1 |
| Q14624 | ITIH4_HUMAN | ITIH4_HUMAN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4 | 14 | -1,2 | -1,8 | -0,6 | -2,0 | -2,0 | -1,3 | 1,48 | 1,33 | 1,61 | 1,4 | 2,2 | 1,2 | 1,7 | 2,6 | 1,6 |
| P16278 | BGAL_HUMAN | BGAL_HUMAN Beta-galactosidase OS=Homo sapiens GN=GLB1 PE=1 SV=2 | 14 | 0,3 | -1,6 | -1,3 | -2,0 | -2,2 | -1,6 | 0,68 | 1,63 | 1,89 | 1,1 | 2,1 | 1,6 | 1,6 | 2,9 | 1,8 |
| P11117 | PPAL_HUMAN | PPAL_HUMAN Lysosomal acid phosphatase OS=Homo sapiens GN=ACP2 PE=1 SV=3 | 14 | -0,2 | -1,1 | 0,0 | -0,6 | -1,3 | -0,3 | 0,64 | 0,34 | 0,77 | 1,0 | 1,7 | 1,0 | 1,2 | 1,8 | 1,1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|---|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P01011 | AACT_HUMAN | AACT_HUMAN Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2 | 14 | -1,2 | 0,0 | -1,6 | -0,5 | -2,1 | -1,1 | - | - | - | 1,4 | 1,0 | 1,7 | 1,1 | 2,8 | 1,5 |
| P08236 | BGLR_HUMAN | BGLR_HUMAN Beta-glucuronidase OS=Homo sapiens GN=GUSB PE=1 SV=2 | 14 | 0,2 | -1,4 | -0,6 | 0,8 | -1,2 | -1,8 | 0,58 | 0,11 | 1,51 | 1,1 | 1,8 | 1,2 | 1,2 | 1,8 | 1,9 |
| P01857 | IGHG1_HUMAN | IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 | 14 | 0,1 | -1,0 | -1,6 | -1,9 | -1,5 | -3,3 | 0,49 | 1,77 | 2,39 | 1,0 | 1,6 | 1,8 | 1,6 | 2,0 | 3,4 |
| P14550 | AK1A1_HUMAN | AK1A1_HUMAN Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] OS=Homo sapiens GN=AKR1A1 PE=1 SV=3 | 14 | -0,3 | -0,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | - | 0,05 | 0,05 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| P22735 | TGM1_HUMAN | TGM1_HUMAN Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K OS=Homo sapiens GN=TGM1 PE=1 SV=4 | 14 | -1,4 | 1,1 | -1,0 | -0,2 | 0,5 | -0,1 | 0,40 | - | - | 1,5 | 1,6 | 1,4 | 1,0 | 1,3 | 1,0 |
| P98160 | PGBM_HUMAN | PGBM_HUMAN Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Homo sapiens GN=HSPG2 PE=1 SV=4 | 14 | 0,5 | -0,6 | -0,7 | -1,6 | -1,1 | -0,9 | 0,19 | 0,58 | 0,22 | 1,1 | 1,3 | 1,3 | 1,5 | 1,7 | 1,4 |
| P30740 | ILEU_HUMAN | ILEU_HUMAN Leukocyte elastase inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINB1 PE=1 SV=1 | 14 | -0,8 | 1,0 | 0,9 | -0,8 | 0,5 | 1,0 | - | - | - | 1,2 | 1,6 | 1,4 | 1,2 | 1,3 | 1,4 |
| P68104 | EF1A1_HUMAN | EF1A1_HUMAN Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 | 13 | -1,7 | 1,5 | -1,0 | 0,3 | 0,0 | 1,4 | 0,14 | 0,06 | 0,75 | 1,7 | 1,9 | 1,4 | 1,1 | 1,0 | 1,7 |
| P55072 | TERA_HUMAN | TERA_HUMAN Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4 | 13 | -0,1 | 0,2 | -0,3 | 0,1 | -0,2 | 1,1 | - | - | - | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,5 |
| P05062 | ALDOB_HUMAN | ALDOB_HUMAN Fructose-bisphosphate aldolase B OS=Homo sapiens GN=ALDOB PE=1 SV=2 | 13 | 0,1 | -1,0 | -0,1 | -0,2 | -0,3 | 0,4 | 0,03 | 0,11 | 0,43 | 1,0 | 1,5 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,1 |
| Q9H4M9 | EHD1_HUMAN | EHD1_HUMAN EH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=EHD1 PE=1 SV=2 | 13 | -0,3 | -0,4 | -0,6 | -0,5 | -0,6 | 1,1 | - | - | - | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,5 |
| P07339 | CATD_HUMAN | CATD_HUMAN Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1 | 13 | 0,4 | -1,0 | -1,2 | -2,2 | -2,0 | -0,6 | 0,36 | 0,56 | 0,24 | 1,1 | 1,5 | 1,6 | 1,7 | 2,6 | 1,3 |
| Q13510 | ASAHI_HUMAN | ASAHI_HUMAN Acid ceramidase OS=Homo sapiens GN=ASAHI PE=1 SV=5 | 13 | 0,3 | -0,8 | -0,2 | -0,3 | 0,1 | -0,6 | - | - | - | 1,1 | 1,5 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 |
| P16152 | CBR1_HUMAN | CBR1_HUMAN Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens GN=CBR1 PE=1 SV=3 | 13 | -0,2 | 0,2 | -0,1 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,26 | 0,25 | 0,24 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,4 |
| Q96FN5 | KIF12_HUMAN | KIF12_HUMAN Kinesin-like protein KIF12 OS=Homo sapiens GN=KIF12 PE=2 SV=3 | 13 | 0,7 | -0,6 | 0,1 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,04 | 0,07 | 0,50 | 1,2 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 1,3 | 1,2 |
| P52209 | 6PGD_HUMAN | 6PGD_HUMAN 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=3 | 13 | -1,3 | 1,6 | -0,1 | 0,7 | 0,5 | 1,3 | 0,09 | 0,29 | 0,93 | 1,5 | 2,0 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 1,6 |
| Q9NQ84 | GPC5C_HUMAN | GPC5C_HUMAN G-protein coupled receptor family C group 5 member C OS=Homo sapiens GN=GPRC5C PE=1 SV=2 | 13 | 0,4 | 0,0 | 1,3 | 0,9 | 0,2 | 1,4 | 0,16 | 0,29 | 0,93 | 1,1 | 1,0 | 1,6 | 1,2 | 1,1 | 1,7 |
| Q14697 | GANAB_HUMAN | GANAB_HUMAN Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=3 | 13 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | -0,7 | -0,5 | 0,1 | 0,18 | 1,08 | 0,81 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 1,0 |
| O14745 | NHRF1_HUMAN | NHRF1_HUMAN Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 OS=Homo sapiens GN=SLC9A3R1 PE=1 SV=4 | 13 | 1,7 | -0,5 | 0,9 | -1,0 | 0,9 | 0,7 | 0,23 | 0,28 | 0,25 | 1,7 | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 1,6 | 1,3 |
| P68871 | HBB_HUMAN | HBB_HUMAN Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 | 13 | 1,0 | 1,7 | 1,3 | 7,7 | 0,4 | 4,5 | 0,63 | 0,03 | 0,83 | 1,4 | 2,1 | 1,6 | 6,8 | 1,2 | 5,4 |
| P13639 | EF2_HUMAN | EF2_HUMAN Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4 | 12 | -1,0 | 1,2 | -0,1 | 0,0 | 0,7 | 0,9 | 1,36 | 4,53 | 2,45 | 1,3 | 1,7 | 1,1 | 1,0 | 1,4 | 1,4 |
| P06396 | GELS_HUMAN | GELS_HUMAN Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1 | 12 | 0,1 | -0,7 | -0,5 | -0,7 | -1,1 | -0,1 | 0,11 | 0,09 | 0,78 | 1,0 | 1,4 | 1,2 | 1,2 | 1,7 | 1,1 |
| P49327 | FAS_HUMAN | FAS_HUMAN Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3 | 12 | -1,1 | 0,7 | -0,6 | -0,4 | -0,2 | 0,3 | 0,32 | 0,60 | 0,64 | 1,4 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| P55017 | S12A3_HUMAN | S12A3_HUMAN Solute carrier family 12 member 3 OS=Homo sapiens GN=SLC12A3 PE=1 SV=3 | 12 | -0,8 | -1,7 | -0,5 | 0,4 | -0,6 | 0,7 | 0,24 | 0,50 | 0,06 | 1,3 | 2,1 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,3 |
| P12277 | KCRB_HUMAN | KCRB_HUMAN Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1 | 12 | -1,5 | -1,7 | -1,2 | -0,5 | -1,1 | -0,5 | 1,25 | 0,06 | 0,08 | 1,6 | 2,2 | 1,5 | 1,1 | 1,7 | 1,2 |
| P05155 | IC1_HUMAN | IC1_HUMAN Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2 | 12 | -2,5 | -0,5 | -1,1 | -2,2 | -0,9 | 0,7 | 1,65 | 0,86 | 0,82 | 2,1 | 1,2 | 1,5 | 1,7 | 1,5 | 1,3 |
| Q93088 | BHMT1_HUMAN | BHMT1_HUMAN Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=BHMT PE=1 SV=2 | 12 | -0,9 | -1,2 | -0,4 | -0,7 | -0,6 | 0,3 | 1,50 | 1,65 | 0,09 | 1,3 | 1,7 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,1 |
| | | | | | | | | | | 1,07 | 0,52 | 0,19 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| O00391 | QSOX1_HUMAN | QSOX1_HUMAN Sulfhydryl oxidase 1 OS=Homo sapiens GN=QSOX1 PE=1 SV=3 | 12 | -1,2 | -0,7 | -1,0 | -1,5 | -1,4 | -0,2 | - | - | - | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 1,1 |
| Q6EMK4 | VASN_HUMAN | VASN_HUMAN Vasorin OS=Homo sapiens GN=VASN PE=1 SV=1 | 12 | -1,1 | -0,6 | -0,6 | -0,3 | -1,9 | 0,9 | 0,95 | 1,29 | 0,82 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 2,5 | 1,4 |
| O75874 | IDHC_HUMAN | IDHC_HUMAN Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=IDH1 PE=1 SV=2 | 12 | -0,1 | -1,5 | -0,3 | -0,8 | -1,2 | 0,5 | 0,81 | 0,55 | 0,36 | 1,0 | 1,9 | 1,1 | 1,2 | 1,8 | 1,2 |
| Q9BRK3 | MXRA8_HUMAN | MXRA8_HUMAN Matrix-remodeling-associated protein 8 OS=Homo sapiens GN=MXRA8 PE=1 SV=1 | 12 | 0,1 | -1,6 | 0,6 | -0,4 | -0,5 | -0,1 | 0,74 | 0,11 | 0,30 | 1,0 | 2,0 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,0 |
| P05783 | K1C18_HUMAN | K1C18_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens GN=KRT18 PE=1 SV=2 | 12 | -1,4 | 0,4 | 0,0 | -0,7 | 1,1 | -0,1 | 0,53 | 0,36 | 0,48 | 1,5 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,7 | 1,1 |
| O95171 | SCEL_HUMAN | SCEL_HUMAN Scellin OS=Homo sapiens GN=SCEL PE=1 SV=2 | 12 | -2,8 | 2,2 | -0,9 | 1,4 | 0,4 | 0,6 | 0,28 | 0,27 | 0,52 | 2,3 | 2,7 | 1,4 | 1,4 | 1,2 | 1,3 |
| Q5VW32 | BROX_HUMAN | BROX_HUMAN BRO1 domain-containing protein BROX OS=Homo sapiens GN=BROX PE=1 SV=1 | 12 | 0,5 | -0,4 | 0,0 | 0,4 | -0,5 | 1,5 | 0,06 | 0,22 | 0,54 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,8 |
| Q9UBG3 | CRNN_HUMAN | CRNN_HUMAN Cornulin OS=Homo sapiens GN=CRNN PE=1 SV=1 | 12 | -1,8 | 3,4 | -0,8 | 4,2 | 0,4 | 0,4 | 0,76 | 1,69 | 0,38 | 1,7 | 4,4 | 1,3 | 2,8 | 1,2 | 1,1 |
| P05543 | THBG_HUMAN | THBG_HUMAN Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7 PE=1 SV=2 | 11 | 0,4 | -1,6 | -0,5 | -1,4 | -2,0 | -2,3 | 0,58 | 0,97 | 2,17 | 1,1 | 2,0 | 1,2 | 1,4 | 2,7 | 2,4 |
| P02750 | A2GL_HUMAN | A2GL_HUMAN Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2 | 11 | 1,7 | -0,5 | 0,3 | 0,3 | -3,2 | -2,7 | 0,60 | 0,29 | 2,95 | 1,7 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 4,6 | 2,8 |
| P04217 | A1BG_HUMAN | A1BG_HUMAN Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4 | 11 | 0,7 | 0,7 | -0,4 | 0,3 | -3,6 | -1,5 | 0,67 | 0,06 | 2,53 | 1,2 | 1,4 | 1,2 | 1,1 | 5,5 | 1,8 |
| P05164 | PERM_HUMAN | PERM_HUMAN Myeloperoxidase OS=Homo sapiens GN=MPO PE=1 SV=1 | 11 | 1,6 | 0,0 | 1,3 | 2,9 | 0,9 | 0,3 | 0,80 | 2,11 | 0,62 | 1,6 | 1,0 | 1,6 | 2,1 | 1,6 | 1,1 |
| P00338 | LDHA_HUMAN | LDHA_HUMAN L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 | 11 | -0,4 | 1,2 | 0,6 | 1,4 | -0,1 | 2,5 | 0,37 | 1,02 | 1,18 | 1,1 | 1,7 | 1,3 | 1,4 | 1,1 | 2,5 |
| P60174 | TPIS_HUMAN | TPIS_HUMAN Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TP11 PE=1 SV=3 | 11 | 0,2 | 0,6 | 0,6 | 1,5 | 0,1 | 1,0 | 0,37 | 1,05 | 0,57 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,5 | 1,0 | 1,5 |
| P15289 | ARSA_HUMAN | ARSA_HUMAN Arylsulfatase A OS=Homo sapiens GN=ARSA PE=1 SV=3 | 11 | -0,2 | -1,6 | -1,8 | 0,7 | -3,6 | -1,7 | 0,92 | 0,52 | 2,66 | 1,1 | 2,1 | 1,9 | 1,2 | 5,7 | 1,9 |
| P09543 | CN37_HUMAN | CN37_HUMAN 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Homo sapiens GN=CNP PE=1 SV=2 | 11 | -0,1 | -0,5 | -0,3 | -0,3 | -0,2 | 0,6 | 0,30 | 0,31 | 0,20 | 1,0 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 |
| P08263 | GSTA1_HUMAN | GSTA1_HUMAN Glutathione S-transferase A1 OS=Homo sapiens GN=GSTA1 PE=1 SV=3 | 11 | -0,4 | -0,2 | 0,1 | -0,2 | 0,0 | 1,4 | 0,29 | 0,06 | 0,69 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,7 |
| Q12907 | LMAN2_HUMAN | LMAN2_HUMAN Vesicular integral-membrane protein VIP36 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1 | 11 | 1,4 | -1,9 | 0,3 | -0,8 | -1,3 | -1,4 | 0,24 | 0,25 | 1,34 | 1,5 | 2,3 | 1,1 | 1,2 | 1,9 | 1,7 |
| Q15149 | PLEC_HUMAN | PLEC_HUMAN Plectin OS=Homo sapiens GN=PLEC PE=1 SV=3 | 11 | -1,3 | 1,0 | -0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | 0,13 | 0,08 | 0,18 | 1,5 | 1,6 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,0 |
| P01859 | IGHG2_HUMAN | IGHG2_HUMAN Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 | 11 | 0,5 | -0,6 | -0,6 | -1,8 | -1,9 | -4,2 | 0,05 | 1,24 | 3,05 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,6 | 2,6 | 4,8 |
| P06744 | G6PI_HUMAN | G6PI_HUMAN Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=4 | 11 | 0,0 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,04 | 0,27 | 0,36 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,1 |
| Q9UN37 | VPS4A_HUMAN | VPS4A_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein 4A OS=Homo sapiens GN=VPS4A PE=1 SV=1 | 11 | -0,1 | 0,2 | -1,1 | 0,4 | -0,9 | 1,7 | 0,05 | 0,33 | 0,40 | 1,0 | 1,1 | 1,5 | 1,1 | 1,6 | 1,9 |
| P08779 | K1C16_HUMAN | K1C16_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 | 11 | -0,3 | 0,8 | -0,1 | -1,5 | 1,0 | 0,8 | 0,26 | 0,82 | 0,87 | 1,1 | 1,4 | 1,0 | 1,5 | 1,6 | 1,3 |
| P07384 | CAN1_HUMAN | CAN1_HUMAN Calpain-1 catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=CAPN1 PE=1 SV=1 | 11 | 0,7 | 0,4 | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,9 | 0,53 | 0,59 | 0,54 | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,4 |
| Q13835 | PKP1_HUMAN | PKP1_HUMAN Plakophilin-1 OS=Homo sapiens GN=PKP1 PE=1 SV=2 | 11 | -1,7 | 3,6 | -0,5 | 1,5 | 0,8 | 2,3 | 0,94 | 0,47 | 1,58 | 1,7 | 4,9 | 1,2 | 1,4 | 1,5 | 2,4 |
| P25311 | ZA2G_HUMAN | ZA2G_HUMAN Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 | 10 | 0,5 | -0,8 | 0,1 | 0,2 | -3,1 | -1,1 | 0,18 | 0,14 | 2,08 | 1,2 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 4,5 | 1,5 |
| P07900 | HS90A_HUMAN | HS90A_HUMAN Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5 | 10 | -0,8 | 0,6 | -0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,0 | 0,09 | 0,05 | 0,08 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 |
| P63104 | 1433Z_HUMAN | 1433Z_HUMAN 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 | 10 | -0,6 | 1,1 | -0,2 | 1,5 | 0,4 | 0,7 | 0,25 | 0,68 | 0,58 | 1,2 | 1,6 | 1,1 | 1,5 | 1,2 | 1,3 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|---|----|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P22314 | UBA1_HUMAN | UBA1_HUMAN Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UBA1 PE=1 SV=3 | 10 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | -0,1 | 0,6 | -0,2 | 0,08 | 0,10 | 0,18 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,3 | 1,1 |
| P02649 | APOE_HUMAN | APOE_HUMAN Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1 | 10 | -1,1 | -0,7 | 0,5 | -0,4 | -0,3 | 1,1 | -0,89 | 0,04 | 0,39 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,5 |
| P22792 | CPN2_HUMAN | CPN2_HUMAN Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPN2 PE=1 SV=3 | 10 | -0,6 | -1,1 | -0,5 | -2,4 | -0,8 | -0,2 | -0,83 | -1,41 | -0,52 | 1,2 | 1,6 | 1,2 | 1,8 | 1,5 | 1,1 |
| Q9H3G5 | CPVL_HUMAN | CPVL_HUMAN Probable serine carboxypeptidase CPVL OS=Homo sapiens GN=CPVL PE=1 SV=2 | 10 | -0,7 | -0,9 | -0,4 | -1,0 | -1,1 | 0,2 | -0,82 | -0,71 | -0,46 | 1,2 | 1,5 | 1,2 | 1,3 | 1,7 | 1,1 |
| P19835 | CEL_HUMAN | CEL_HUMAN Bile salt-activated lipase OS=Homo sapiens GN=CEL PE=1 SV=3 | 10 | -1,0 | -0,6 | -0,2 | -1,8 | -2,0 | -0,7 | -0,79 | -1,00 | -1,35 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,6 | 2,6 | 1,3 |
| Q9BYF1 | ACE2_HUMAN | ACE2_HUMAN Angiotensin-converting enzyme 2 OS=Homo sapiens GN=ACE2 PE=1 SV=2 | 10 | 0,5 | -1,2 | -1,0 | -1,5 | 0,1 | -0,8 | -0,38 | -1,26 | -0,33 | 1,2 | 1,7 | 1,4 | 1,5 | 1,1 | 1,3 |
| P21399 | ACOC_HUMAN | ACOC_HUMAN Cytoplasmic aconitate hydratase OS=Homo sapiens GN=ACOC1 PE=1 SV=3 | 10 | -0,3 | -0,4 | -0,4 | -0,2 | -0,3 | 0,3 | -0,33 | -0,28 | -0,02 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,1 |
| O75351 | VPS4B_HUMAN | VPS4B_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein 4B OS=Homo sapiens GN=VPS4B PE=1 SV=2 | 10 | -0,6 | 0,0 | -1,2 | -0,2 | -1,0 | 0,0 | -0,29 | -0,71 | -0,49 | 1,2 | 1,0 | 1,6 | 1,0 | 1,6 | 1,0 |
| Q8IX04 | UEVLD_HUMAN | UEVLD_HUMAN Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 OS=Homo sapiens GN=UEVLD PE=1 SV=2 | 10 | -0,1 | -0,4 | -0,3 | -0,1 | -0,1 | 0,3 | -0,26 | -0,23 | 0,09 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,1 |
| O95336 | 6PGL_HUMAN | 6PGL_HUMAN 6-phosphogluconolactonase OS=Homo sapiens GN=6PGLS PE=1 SV=2 | 10 | -0,7 | 0,2 | -0,6 | -0,3 | -2,5 | 0,5 | -0,22 | -0,44 | -0,99 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 3,4 | 1,2 |
| O75891 | AL1L1_HUMAN | AL1L1_HUMAN Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALDH1L1 PE=1 SV=2 | 10 | 0,3 | -0,8 | -0,3 | -0,6 | 0,4 | -0,1 | -0,22 | -0,42 | -0,13 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,1 |
| P30041 | PRDX6_HUMAN | PRDX6_HUMAN Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3 | 10 | -0,9 | 0,7 | -0,5 | 1,9 | -0,2 | 2,3 | -0,12 | -0,72 | -1,01 | 1,3 | 1,4 | 1,2 | 1,6 | 1,1 | 2,4 |
| Q13885 | TBB2A_HUMAN | TBB2A_HUMAN Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1 | 10 | -0,5 | 0,3 | -0,3 | -0,1 | 0,3 | -0,1 | -0,09 | -0,18 | 0,13 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,0 |
| Q14314 | FGL2_HUMAN | FGL2_HUMAN Fibrolectin OS=Homo sapiens GN=FGL2 PE=1 SV=1 | 10 | 0,8 | -0,9 | -0,2 | -2,1 | -0,2 | -0,7 | -0,05 | -1,15 | -0,45 | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 1,7 | 1,1 | 1,3 |
| P34931 | HS71L_HUMAN | HS71L_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1-like OS=Homo sapiens GN=HSPA1L PE=1 SV=2 | 10 | -0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,8 | -0,1 | 1,2 | 0,02 | 0,46 | 0,57 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,6 |
| P12814 | ACTN1_HUMAN | ACTN1_HUMAN Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=2 | 10 | -0,9 | 1,1 | 0,1 | 0,8 | 0,6 | 1,0 | 0,11 | 0,45 | 0,78 | 1,3 | 1,6 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,4 |
| Q8IWA5 | CTL2_HUMAN | CTL2_HUMAN Choline transporter-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLC44A2 PE=1 SV=3 | 10 | 1,0 | -0,6 | 1,3 | 0,5 | 0,8 | -0,1 | 0,24 | 0,87 | 0,34 | 1,4 | 1,3 | 1,6 | 1,1 | 1,5 | 1,0 |
| P23284 | PPIB_HUMAN | PPIB_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2 | 10 | -0,3 | 0,8 | -1,1 | 0,5 | -2,4 | 0,5 | 0,27 | -0,29 | -0,91 | 1,1 | 1,4 | 1,5 | 1,1 | 3,1 | 1,2 |
| Q9UBC9 | SPRR3_HUMAN | SPRR3_HUMAN Small proline-rich protein 3 OS=Homo sapiens GN=SPRR3 PE=1 SV=2 | 10 | -2,1 | 3,1 | -0,3 | -0,9 | 0,7 | -0,8 | 0,49 | -0,57 | -0,05 | 1,9 | 4,0 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,4 |
| Q9H223 | EHD4_HUMAN | EHD4_HUMAN EH domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=EHD4 PE=1 SV=1 | 9 | -1,0 | -0,6 | -0,7 | -1,3 | -0,8 | 0,7 | -0,82 | -1,01 | -0,03 | 1,4 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | 1,5 | 1,3 |
| Q5JWF2 | GNAS1_HUMAN | GNAS1_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas OS=Homo sapiens GN=GNAS PE=1 SV=2 | 9 | 0,3 | -0,4 | 0,3 | -0,5 | -0,1 | 0,1 | -0,06 | -0,11 | -0,02 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 |
| Q06830 | PRDX1_HUMAN | PRDX1_HUMAN Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 | 9 | -0,1 | 0,4 | 0,3 | 1,2 | 0,3 | 1,1 | 0,17 | 0,77 | 0,71 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,2 | 1,5 |
| P62937 | PPIA_HUMAN | PPIA_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2 | 9 | 0,0 | 0,4 | 0,3 | 1,4 | 0,2 | 1,1 | 0,18 | 0,83 | 0,64 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | 1,5 |
| P15313 | VATB1_HUMAN | VATB1_HUMAN V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform OS=Homo sapiens GN=ATP6V1B1 PE=1 SV=3 | 9 | 0,2 | -0,5 | 0,5 | -1,6 | -0,6 | 0,0 | -0,17 | -0,53 | -0,29 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,5 | 1,3 | 1,0 |
| P12429 | ANXA3_HUMAN | ANXA3_HUMAN Annexin A3 OS=Homo sapiens GN=ANXA3 PE=1 SV=3 | 9 | 2,3 | -0,7 | 1,7 | 0,1 | 1,6 | -1,6 | 0,79 | 0,86 | -0,01 | 2,0 | 1,4 | 1,8 | 1,0 | 2,1 | 1,8 |
| P21796 | VDAC1_HUMAN | VDAC1_HUMAN Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=1 SV=2 | 9 | -1,7 | -0,5 | -0,4 | -0,7 | 0,7 | 0,4 | -1,13 | -0,52 | -0,57 | 1,7 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,2 |
| Q00796 | DHSO_HUMAN | DHSO_HUMAN Sorbitol dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=SORD PE=1 SV=4 | 9 | -0,1 | -0,4 | -0,3 | -0,1 | -0,5 | 0,4 | -0,24 | -0,23 | -0,03 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,3 | 1,2 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P54652 | HSP72_HUMAN | HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Homo sapiens GN=HSPA2 PE=1 SV=1 | 9 | -0,9 | 0,5 | -0,7 | 0,7 | -0,6 | 1,4 | - | 0,22 | 0,04 | 0,42 | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 1,7 |
| Q9UKU9 | ANGL2_HUMAN | ANGL2_HUMAN Angiopoietin-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=ANGPTL2 PE=2 SV=1 | 9 | 2,2 | -2,6 | 0,6 | -2,1 | -0,5 | -1,6 | 0,20 | - | 0,77 | 1,03 | 2,0 | 3,2 | 1,2 | 1,7 | 1,3 | 1,8 |
| P22732 | GTR5_HUMAN | GTR5_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5 OS=Homo sapiens GN=SLC2A5 PE=1 SV=1 | 9 | 1,0 | -1,3 | 0,7 | -1,3 | 0,4 | 0,2 | 0,16 | - | 0,34 | 0,33 | 1,3 | 1,8 | 1,3 | 1,4 | 1,2 | 1,1 |
| P00918 | CAH2_HUMAN | CAH2_HUMAN Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens GN=CA2 PE=1 SV=2 | 9 | 0,8 | -1,2 | 1,3 | 0,2 | -0,2 | 1,2 | 0,15 | 0,76 | 0,50 | 1,3 | 1,7 | 1,6 | 1,1 | 1,1 | 1,6 | |
| P06576 | ATPB_HUMAN | ATPB_HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3 | 9 | -0,4 | 0,5 | 0,0 | -0,8 | 0,9 | 0,3 | 0,07 | - | 0,38 | 0,61 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 1,2 | 1,5 | 1,1 |
| P26641 | EF1G_HUMAN | EF1G_HUMAN Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3 | 9 | -1,6 | 1,7 | -0,4 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,07 | 0,13 | 0,50 | 1,6 | 2,2 | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | |
| P00915 | CAH1_HUMAN | CAH1_HUMAN Carbonic anhydrase 1 OS=Homo sapiens GN=CA1 PE=1 SV=2 | 9 | 0,2 | 0,3 | 1,0 | 4,6 | -1,8 | 2,1 | 0,26 | 2,81 | 0,14 | 1,1 | 1,1 | 1,4 | 3,2 | 2,4 | 2,2 | |
| Q7LBR1 | CHM1B_HUMAN | CHM1B_HUMAN Charged multivesicular body protein 1b OS=Homo sapiens GN=CHMP1B PE=1 SV=1 | 9 | -0,6 | 1,1 | -2,2 | 0,3 | -2,2 | 3,0 | 0,27 | - | 0,92 | 0,37 | 1,2 | 1,6 | 2,2 | 1,1 | 3,0 | 3,1 |
| O75131 | CPNE3_HUMAN | CPNE3_HUMAN Copine-3 OS=Homo sapiens GN=CPNE3 PE=1 SV=1 | 9 | 1,7 | -0,4 | 1,4 | -0,3 | 1,1 | -0,2 | 0,63 | 0,53 | 0,46 | 1,6 | 1,2 | 1,7 | 1,1 | 1,7 | 1,1 | |
| Q99456 | K1C12_HUMAN | K1C12_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 12 OS=Homo sapiens GN=KRT12 PE=1 SV=1 | 9 | -0,8 | 2,7 | 0,2 | 0,6 | 1,3 | 0,4 | 0,93 | 0,38 | 0,85 | 1,3 | 3,3 | 1,1 | 1,2 | 1,9 | 1,2 | |
| O00187 | MASP2_HUMAN | MASP2_HUMAN Mannan-binding lectin serine protease 2 OS=Homo sapiens GN=MASP2 PE=1 SV=4 | 9 | 2,2 | -0,3 | 2,2 | 1,9 | 0,2 | -1,3 | 0,94 | 2,07 | 0,53 | 1,9 | 1,1 | 2,2 | 1,6 | 1,1 | 1,6 | |
| P31947 | 1433S_HUMAN | 1433S_HUMAN 14-3-3 protein sigma OS=Homo sapiens GN=SFN PE=1 SV=1 | 9 | -1,1 | 3,5 | -0,7 | 3,7 | 0,7 | 1,2 | 1,21 | 1,52 | 0,94 | 1,4 | 4,7 | 1,3 | 2,5 | 1,4 | 1,6 | |
| P01008 | ANT3_HUMAN | ANT3_HUMAN Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1 | 8 | -0,3 | -0,5 | -1,6 | -2,2 | -0,7 | -1,0 | 0,41 | 1,90 | 0,85 | 1,1 | 1,2 | 1,8 | 1,7 | 1,4 | 1,5 | |
| P62258 | 1433E_HUMAN | 1433E_HUMAN 14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1 | 8 | 0,6 | 0,1 | 0,0 | 0,6 | 0,1 | 0,0 | 0,35 | 0,29 | 0,06 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | |
| P62873 | GBB1_HUMAN | GBB1_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=GNB1 PE=1 SV=3 | 8 | -0,7 | -0,5 | -0,7 | -0,5 | -0,8 | 1,0 | 0,59 | 0,61 | 0,08 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,5 | 1,5 | |
| P50395 | GDIB_HUMAN | GDIB_HUMAN Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 PE=1 SV=2 | 8 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | -0,1 | 0,7 | 0,09 | 0,37 | 0,28 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,3 | |
| P08107 | HSP71_HUMAN | HSP71_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5 | 8 | -0,3 | 0,6 | -0,1 | 2,3 | -0,3 | 1,5 | 0,11 | 1,10 | 0,57 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 1,8 | 1,2 | 1,8 | |
| P07737 | PROF1_HUMAN | PROF1_HUMAN Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 | 8 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 1,9 | 0,3 | 1,3 | 0,38 | 1,08 | 0,80 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,6 | 1,2 | 1,6 | |
| P32119 | PRDX2_HUMAN | PRDX2_HUMAN Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5 | 8 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 3,0 | -0,4 | 2,3 | 0,69 | 1,84 | 0,91 | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 2,1 | 1,2 | 2,4 | |
| P02743 | SAMP_HUMAN | SAMP_HUMAN Serum amyloid P-component OS=Homo sapiens GN=APCS PE=1 SV=2 | 8 | -0,7 | -2,0 | 0,8 | -2,2 | -0,9 | -1,2 | 1,37 | 0,72 | 1,05 | 1,2 | 2,4 | 1,3 | 1,8 | 1,6 | 1,6 | |
| Q92820 | GGH_HUMAN | GGH_HUMAN Gamma-glutamyl hydrolase OS=Homo sapiens GN=GGH PE=1 SV=2 | 8 | -1,5 | -1,2 | -1,1 | 0,3 | -1,5 | 0,4 | 1,35 | 0,38 | 0,59 | 1,6 | 1,7 | 1,5 | 1,1 | 2,1 | 1,1 | |
| Q12794 | HYAL1_HUMAN | HYAL1_HUMAN Hyaluronidase-1 OS=Homo sapiens GN=HYAL1 PE=1 SV=2 | 8 | -0,8 | -1,5 | -0,5 | -1,3 | -2,0 | -0,6 | 1,13 | 0,85 | 1,31 | 1,3 | 1,9 | 1,2 | 1,4 | 2,6 | 1,3 | |
| P01871 | IGHM_HUMAN | IGHM_HUMAN Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3 | 8 | -1,3 | -0,6 | -1,1 | 0,4 | -1,8 | 0,5 | 0,93 | 0,33 | 0,68 | 1,5 | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 2,4 | 1,2 | |
| P29622 | KAIN_HUMAN | KAIN_HUMAN Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3 | 8 | -0,8 | -1,1 | 0,4 | -2,2 | -0,2 | -0,8 | 0,93 | 0,92 | 0,52 | 1,3 | 1,6 | 1,2 | 1,8 | 1,1 | 1,4 | |
| P02730 | B3AT_HUMAN | B3AT_HUMAN Band 3 anion transport protein OS=Homo sapiens GN=SLC4A1 PE=1 SV=3 | 8 | 1,4 | -2,7 | 1,4 | 1,6 | 0,8 | 0,9 | 0,64 | 1,50 | 0,85 | 1,5 | 3,3 | 1,7 | 1,5 | 1,5 | 1,4 | |
| O15484 | CAN5_HUMAN | CAN5_HUMAN Calpain-5 OS=Homo sapiens GN=CAPN5 PE=1 SV=2 | 8 | 0,0 | -1,0 | -0,7 | -1,2 | -0,6 | 0,1 | 0,53 | 0,96 | 0,26 | 1,0 | 1,6 | 1,3 | 1,4 | 1,3 | 1,0 | |
| Q14764 | MVP_HUMAN | MVP_HUMAN Major vault protein OS=Homo sapiens GN=MVP PE=1 SV=4 | 8 | -0,6 | -0,2 | -0,5 | 0,1 | 0,7 | 0,2 | 0,41 | 0,17 | 0,46 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,4 | 1,1 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|---|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P19801 | ABP1_HUMAN | ABP1_HUMAN Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing] OS=Homo sapiens GN=ABP1 PE=1 SV=4 | 8 | 0,6 | -1,3 | -0,5 | -1,6 | -1,6 | -0,4 | - | - | - | 1,2 | 1,7 | 1,2 | 1,5 | 2,2 | 1,2 |
| P34896 | GLYC_HUMAN | GLYC_HUMAN Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic OS=Homo sapiens GN=SHMT1 PE=1 SV=1 | 8 | -0,3 | -0,4 | -0,2 | 0,1 | -0,3 | 0,9 | 0,33 | 0,04 | 0,32 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,4 |
| Q96TA1 | NIBL1_HUMAN | NIBL1_HUMAN Niban-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=FAM129B PE=1 SV=3 | 8 | -2,0 | 1,3 | -0,9 | -0,2 | 0,2 | 1,1 | 0,33 | -0,57 | 0,65 | 1,8 | 1,8 | 1,4 | 1,1 | 1,1 | 1,5 |
| Q3LXA3 | DHAK_HUMAN | DHAK_HUMAN Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Homo sapiens GN=DAK PE=1 SV=2 | 8 | 0,1 | -0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,8 | - | 0,02 | 0,75 | 1,0 | 1,3 | 1,0 | 1,0 | 1,4 | 1,4 |
| P20711 | DDC_HUMAN | DDC_HUMAN Aromatic-L-amino-acid decarboxylase OS=Homo sapiens GN=DDC PE=1 SV=2 | 8 | 0,9 | -1,2 | 0,4 | -0,1 | 0,3 | -0,5 | - | 0,12 | -0,10 | 1,3 | 1,7 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,2 |
| P02760 | AMBP_HUMAN | AMBP_HUMAN Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1 | 8 | 0,3 | -0,6 | 0,0 | 0,2 | -0,7 | -1,3 | - | 0,09 | 0,99 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 1,4 | 1,7 |
| Q07837 | SLC31_HUMAN | SLC31_HUMAN Neutral and basic amino acid transport protein rBAT OS=Homo sapiens GN=SLC3A1 PE=1 SV=2 | 8 | 0,5 | -0,8 | 0,2 | 0,1 | 1,0 | -0,5 | - | 0,16 | 0,22 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,0 | 1,6 | 1,2 |
| P69905 | HBA_HUMAN | HBA_HUMAN Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 | 8 | 0,2 | -0,4 | 0,9 | 3,8 | 0,1 | 2,8 | - | 2,34 | 1,47 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 2,6 | 1,1 | 2,9 |
| P21810 | PGS1_HUMAN | PGS1_HUMAN Biglycan OS=Homo sapiens GN=BGN PE=1 SV=2 | 8 | 0,0 | -0,2 | 0,2 | -1,5 | -0,2 | 0,2 | - | 0,64 | 0,00 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | 1,1 |
| P43490 | NAMPT_HUMAN | NAMPT_HUMAN Nicotinamide phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=NAMPT PE=1 SV=1 | 8 | -0,6 | 0,5 | -0,3 | -0,5 | 0,9 | 0,8 | - | 0,39 | 0,84 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,6 | 1,4 |
| P06858 | LIPL_HUMAN | LIPL_HUMAN Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=LPL PE=1 SV=1 | 8 | -0,2 | 0,1 | -1,0 | 0,1 | -3,0 | -0,5 | - | 0,48 | 1,74 | 1,1 | 1,0 | 1,4 | 1,0 | 4,3 | 1,2 |
| P17174 | AATC_HUMAN | AATC_HUMAN Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=GOT1 PE=1 SV=3 | 8 | 0,6 | -0,7 | 0,6 | -0,4 | 0,0 | 0,5 | - | 0,10 | 0,23 | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 1,2 |
| O43633 | CHM2A_HUMAN | CHM2A_HUMAN Charged multivesicular body protein 2a OS=Homo sapiens GN=CHMP2A PE=1 SV=1 | 8 | -0,4 | 0,3 | -1,4 | 0,9 | -1,4 | 1,2 | - | 0,24 | 0,08 | 1,1 | 1,1 | 1,7 | 1,3 | 2,0 | 1,6 |
| P60842 | IF4A1_HUMAN | IF4A1_HUMAN Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1 | 8 | -0,8 | 0,9 | -0,3 | -0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,02 | -0,54 | 0,53 | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,2 |
| Q14204 | DYHC1_HUMAN | DYHC1_HUMAN Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5 | 8 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | -0,2 | 0,9 | 0,0 | 0,04 | -0,03 | 0,43 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,5 | 1,0 |
| Q04695 | K1C17_HUMAN | K1C17_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 | 8 | 0,6 | -0,4 | -0,1 | -4,1 | 1,6 | -0,2 | 0,10 | -2,14 | 0,69 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 2,8 | 2,2 | 1,1 |
| P49189 | AL9A1_HUMAN | AL9A1_HUMAN 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALDH9A1 PE=1 SV=3 | 8 | 0,0 | 0,3 | -0,2 | 0,8 | -0,4 | 0,5 | 0,11 | 0,29 | 0,03 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| P55786 | PSA_HUMAN | PSA_HUMAN Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=NPEPPS PE=1 SV=2 | 8 | -0,5 | 0,8 | 0,2 | 0,8 | 0,3 | 0,6 | 0,14 | 0,51 | 0,46 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,3 |
| Q9NZH0 | GPC5B_HUMAN | GPC5B_HUMAN G-protein coupled receptor family C group 5 member B OS=Homo sapiens GN=GPRC5B PE=2 SV=2 | 8 | 0,5 | -0,1 | 1,8 | 0,9 | 0,7 | 0,3 | 0,17 | 1,37 | 0,49 | 1,2 | 1,1 | 1,9 | 1,3 | 1,4 | 1,1 |
| P62979 | RS27A_HUMAN | RS27A_HUMAN Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=2 | 8 | 0,7 | -0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,6 | 0,20 | 0,33 | 0,37 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 |
| P07237 | PDIA1_HUMAN | PDIA1_HUMAN Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3 | 8 | -1,4 | 2,1 | -0,5 | 2,6 | 0,8 | 0,8 | 0,36 | 1,05 | 0,76 | 1,5 | 2,6 | 1,2 | 1,9 | 1,5 | 1,3 |
| P11597 | CETP_HUMAN | CETP_HUMAN Cholesteryl ester transfer protein OS=Homo sapiens GN=CETP PE=1 SV=2 | 8 | 1,5 | -0,4 | -1,4 | 0,3 | -0,7 | 0,4 | 0,56 | - | 0,13 | 1,6 | 1,2 | 1,7 | 1,1 | 1,4 | 1,2 |
| P00747 | PLMN_HUMAN | PLMN_HUMAN Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2 | 8 | 0,8 | 0,3 | -0,9 | 0,2 | -1,1 | -1,9 | 0,56 | -0,36 | 1,47 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,7 | 2,1 |
| P02790 | HEMO_HUMAN | HEMO_HUMAN Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2 | 8 | 0,9 | 0,5 | 0,0 | 1,4 | -0,2 | -1,7 | 0,67 | 0,71 | 0,95 | 1,3 | 1,2 | 1,0 | 1,4 | 1,1 | 1,9 |
| P02671 | FIBA_HUMAN | FIBA_HUMAN Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2 | 8 | 1,6 | -0,1 | 0,8 | -0,4 | -0,8 | -0,4 | 0,72 | 0,19 | 0,62 | 1,6 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,5 | 1,2 |
| P02545 | LMNA_HUMAN | LMNA_HUMAN Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1 | 8 | 0,0 | 1,5 | 0,3 | 1,6 | 1,1 | 1,0 | 0,77 | 0,99 | 1,05 | 1,0 | 2,0 | 1,1 | 1,5 | 1,7 | 1,5 |
| P02675 | FIBB_HUMAN | FIBB_HUMAN Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2 | 8 | 0,9 | 1,4 | 0,6 | 0,3 | -0,6 | 1,3 | 1,13 | 0,45 | 0,34 | 1,3 | 1,9 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,6 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|---|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P02511 | CRYAB_HUMAN | CRYAB_HUMAN Alpha-crystallin B chain OS=Homo sapiens GN=CRYAB PE=1 SV=2 | 7 | 0,8 | 0,5 | 1,5 | 1,3 | 1,3 | 0,5 | 0,62 | 1,42 | 0,88 | 1,3 | 1,2 | 1,7 | 1,4 | 1,9 | 1,2 |
| P23528 | COF1_HUMAN | COF1_HUMAN Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3 | 7 | -1,1 | 0,4 | -0,9 | 0,8 | -0,8 | 1,0 | -0,38 | -0,07 | 0,11 | 1,4 | 1,2 | 1,4 | 1,2 | 1,5 | 1,5 |
| P60709 | ACTB_HUMAN | ACTB_HUMAN Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 | 7 | 0,7 | 0,2 | 0,5 | 0,5 | 0,7 | -0,1 | 0,45 | 0,51 | 0,28 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,0 |
| P07996 | TSP1_HUMAN | TSP1_HUMAN Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1 PE=1 SV=2 | 7 | -0,9 | -1,0 | -0,4 | -1,6 | -1,1 | -0,1 | -0,95 | -1,03 | -0,58 | 1,3 | 1,6 | 1,2 | 1,5 | 1,7 | 1,0 |
| P51149 | RAB7A_HUMAN | RAB7A_HUMAN Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1 | 7 | -0,9 | -0,2 | -0,6 | -0,1 | -0,1 | 0,3 | 0,56 | 0,38 | 0,10 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 1,1 |
| P23526 | SAHH_HUMAN | SAHH_HUMAN Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4 | 7 | -0,4 | -0,3 | -0,1 | 0,4 | -0,2 | 1,2 | -0,39 | 0,18 | 0,50 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,6 |
| P84077 | ARF1_HUMAN | ARF1_HUMAN ADP-ribosylation factor 1 OS=Homo sapiens GN=ARF1 PE=1 SV=2 | 7 | -0,5 | 0,1 | -0,3 | -0,1 | -0,4 | 0,7 | -0,24 | -0,21 | 0,12 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,3 |
| P63000 | RAC1_HUMAN | RAC1_HUMAN Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 OS=Homo sapiens GN=RAC1 PE=1 SV=1 | 7 | -0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | -0,1 | 1,4 | 0,04 | 0,01 | 0,69 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,7 |
| P11021 | GRP78_HUMAN | GRP78_HUMAN 78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 | 7 | -0,6 | 0,9 | -0,2 | 1,0 | -0,5 | 1,3 | 0,16 | 0,38 | 0,37 | 1,2 | 1,5 | 1,1 | 1,3 | 1,3 | 1,6 |
| Q9H6S3 | ES8L2_HUMAN | ES8L2_HUMAN Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=EPS8L2 PE=1 SV=2 | 7 | -1,1 | -0,1 | -0,5 | -0,3 | -0,3 | 0,6 | -0,61 | -0,38 | 0,15 | 1,4 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| P05787 | K2C8_HUMAN | K2C8_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=7 | 7 | -0,1 | -0,7 | 0,2 | -0,7 | 1,0 | -0,4 | -0,39 | -0,26 | 0,27 | 1,0 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 1,6 | 1,2 |
| Q9Y6R7 | FCGBP_HUMAN | FCGBP_HUMAN IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3 | 7 | -0,1 | -2,0 | -0,9 | 0,4 | -1,3 | 1,0 | 1,05 | 0,24 | 0,18 | 1,0 | 2,4 | 1,4 | 1,1 | 1,9 | 1,5 |
| P00749 | UROK_HUMAN | UROK_HUMAN Urokinase-type plasminogen activator OS=Homo sapiens GN=PLAU PE=1 SV=2 | 7 | -1,3 | -0,6 | -0,2 | -2,5 | -1,9 | -0,2 | -0,94 | -1,34 | 1,06 | 1,5 | 1,3 | 1,1 | 1,9 | 2,5 | 1,1 |
| P14384 | CBPM_HUMAN | CBPM_HUMAN Carboxypeptidase M OS=Homo sapiens GN=CPM PE=1 SV=2 | 7 | -0,8 | -0,9 | -0,5 | -0,4 | -0,8 | 0,6 | 0,82 | 0,48 | 0,07 | 1,3 | 1,5 | 1,2 | 1,1 | 1,5 | 1,3 |
| P45880 | VDAC2_HUMAN | VDAC2_HUMAN Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Homo sapiens GN=VDAC2 PE=1 SV=2 | 7 | -2,0 | 0,4 | -0,7 | -0,8 | 0,6 | 0,3 | -0,80 | -0,77 | 0,46 | 1,8 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | 1,1 |
| P05026 | AT1B1_HUMAN | AT1B1_HUMAN Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1B1 PE=1 SV=1 | 7 | 0,1 | -1,5 | 0,1 | -1,7 | 0,4 | 0,3 | -0,71 | -0,80 | 0,34 | 1,0 | 1,9 | 1,0 | 1,5 | 1,2 | 1,1 |
| P61970 | NTF2_HUMAN | NTF2_HUMAN Nuclear transport factor 2 OS=Homo sapiens GN=NUTF2 PE=1 SV=1 | 7 | -0,1 | -1,1 | 0,0 | -1,8 | -1,5 | -1,1 | 0,58 | 0,94 | 1,31 | 1,0 | 1,6 | 1,0 | 1,6 | 2,1 | 1,5 |
| P02748 | CO9_HUMAN | CO9_HUMAN Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2 | 7 | -0,1 | -1,0 | -1,4 | -2,6 | -0,8 | -2,7 | 0,52 | 1,98 | 1,78 | 1,0 | 1,5 | 1,6 | 1,9 | 1,5 | 2,9 |
| Q14393 | GAS6_HUMAN | GAS6_HUMAN Growth arrest-specific protein 6 OS=Homo sapiens GN=GAS6 PE=1 SV=2 | 7 | 0,0 | -0,9 | 0,1 | 0,6 | -1,6 | 0,3 | -0,48 | 0,34 | -0,65 | 1,0 | 1,5 | 1,0 | 1,2 | 2,2 | 1,1 |
| Q495M3 | S36A2_HUMAN | S36A2_HUMAN Proton-coupled amino acid transporter 2 OS=Homo sapiens GN=SLC36A2 PE=1 SV=1 | 7 | 0,3 | -1,2 | 0,9 | -1,3 | 0,8 | -0,3 | 0,45 | 0,16 | 0,28 | 1,1 | 1,7 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,1 |
| P25705 | ATPA_HUMAN | ATPA_HUMAN ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 | 7 | -1,6 | 0,8 | -0,9 | -1,4 | 0,8 | 1,3 | 0,42 | 1,12 | 1,05 | 1,6 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,7 |
| P42685 | FRK_HUMAN | FRK_HUMAN Tyrosine-protein kinase FRK OS=Homo sapiens GN=FRK PE=1 SV=1 | 7 | -0,1 | -0,6 | -0,2 | -0,8 | -0,3 | 0,6 | 0,36 | 0,54 | 0,15 | 1,0 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,3 |
| Q96IU4 | ABHEB_HUMAN | ABHEB_HUMAN Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B OS=Homo sapiens GN=ABHD14B PE=1 SV=1 | 7 | 0,0 | -0,7 | -0,4 | -0,4 | -1,5 | -0,6 | 0,31 | 0,40 | 1,07 | 1,0 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 2,1 | 1,3 |
| P51178 | PLCD1_HUMAN | PLCD1_HUMAN 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-1 OS=Homo sapiens GN=PLCD1 PE=1 SV=2 | 7 | 0,4 | -0,8 | 0,0 | -0,1 | -0,1 | 0,5 | -0,24 | -0,04 | 0,23 | 1,1 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,2 |
| P00352 | AL1A1_HUMAN | AL1A1_HUMAN Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2 | 7 | 1,0 | -1,4 | 0,8 | 0,2 | 0,1 | -0,3 | 0,24 | 0,48 | 0,12 | 1,3 | 1,9 | 1,3 | 1,0 | 1,0 | 1,1 |
| P06865 | HEXA_HUMAN | HEXA_HUMAN Beta-hexosaminidase subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HEXA PE=1 SV=2 | 7 | 0,7 | -1,1 | -0,7 | -0,2 | -1,4 | -1,3 | 0,21 | 0,50 | 1,34 | 1,2 | 1,6 | 1,3 | 1,1 | 2,0 | 1,7 |
| P34913 | HYES_HUMAN | HYES_HUMAN Bifunctional epoxide hydrolase 2 OS=Homo sapiens GN=EPHX2 PE=1 SV=2 | 7 | 0,3 | -0,7 | 0,9 | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,20 | 0,48 | 0,30 | 1,1 | 1,4 | 1,4 | 1,0 | 1,1 | 1,2 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P01834 | IGKC_HUMAN | IGKC_HUMAN Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1 | 7 | 0,5 | -0,8 | -0,4 | -0,7 | -0,9 | -3,3 | - | - | - | 1,2 | 1,4 | 1,2 | 1,2 | 1,6 | 3,5 |
| Q9Y376 | CAB39_HUMAN | CAB39_HUMAN Calcium-binding protein 39 OS=Homo sapiens GN=CAB39 PE=1 SV=1 | 7 | 1,6 | -1,8 | 1,1 | -0,8 | 0,2 | 0,3 | 0,12 | 0,15 | 0,24 | 1,6 | 2,3 | 1,5 | 1,2 | 1,1 | 1,1 |
| Q9UQB8 | BAIP2_HUMAN | BAIP2_HUMAN Brain-specific angiogenesis inhibitor 1- associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=BAIAP2 PE=1 SV=1 | 7 | -0,3 | 0,1 | -0,5 | 0,5 | -0,3 | 0,6 | 0,11 | 0,01 | 0,14 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| Q9UK41 | VPS28_HUMAN | VPS28_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog OS=Homo sapiens GN=VPS28 PE=1 SV=1 | 7 | -0,1 | 0,0 | 0,2 | 0,3 | 0,0 | 1,1 | 0,06 | 0,25 | 0,57 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,5 |
| P14625 | ENPL_HUMAN | ENPL_HUMAN Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 | 7 | -0,4 | 0,3 | -0,5 | -0,2 | -0,3 | -0,1 | 0,05 | 0,36 | 0,18 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,0 |
| Q9NP79 | VTA1_HUMAN | VTA1_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog OS=Homo sapiens GN=VTA1 PE=1 SV=1 | 7 | 0,7 | -0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,0 | 0,5 | 0,01 | 0,21 | 0,24 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,2 |
| P21266 | GSTM3_HUMAN | GSTM3_HUMAN Glutathione S-transferase Mu 3 OS=Homo sapiens GN=GSTM3 PE=1 SV=3 | 7 | 0,7 | -0,6 | 0,4 | -0,4 | 0,2 | -0,2 | 0,05 | 0,01 | 0,02 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| P12035 | K2C3_HUMAN | K2C3_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 3 OS=Homo sapiens GN=KRT3 PE=1 SV=3 | 7 | -2,7 | 2,8 | -1,2 | -1,2 | 0,9 | 0,4 | 0,06 | 1,17 | 0,66 | 2,3 | 3,5 | 1,5 | 1,3 | 1,6 | 1,2 |
| P00751 | CFAB_HUMAN | CFAB_HUMAN Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2 | 7 | 0,9 | -0,6 | -0,4 | -2,1 | 0,0 | -1,0 | 0,12 | 1,24 | 0,51 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,7 | 1,0 | 1,5 |
| P41222 | PTGDS_HUMAN | PTGDS_HUMAN Prostaglandin-H2 D-isomerase OS=Homo sapiens GN=PTGDS PE=1 SV=1 | 7 | 1,0 | -0,8 | -1,1 | 0,1 | -2,3 | -0,5 | 0,12 | 0,53 | 1,43 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,0 | 3,1 | 1,2 |
| P13796 | PLSL_HUMAN | PLSL_HUMAN Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCP1 PE=1 SV=6 | 7 | 0,4 | 0,0 | -0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,19 | 0,02 | 0,20 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,1 |
| Q9UHI7 | S23A1_HUMAN | S23A1_HUMAN Solute carrier family 23 member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC23A1 PE=1 SV=3 | 7 | 1,0 | -0,7 | -0,5 | -1,7 | 0,6 | -0,5 | 0,19 | 1,10 | 0,08 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 1,5 | 1,4 | 1,2 |
| Q9NZZ3 | CHMP5_HUMAN | CHMP5_HUMAN Charged multivesicular body protein 5 OS=Homo sapiens GN=CHMP5 PE=1 SV=1 | 7 | -1,4 | 1,9 | -1,6 | 0,5 | -1,9 | 2,4 | 0,27 | 0,57 | 0,26 | 1,5 | 2,4 | 1,8 | 1,1 | 2,6 | 2,6 |
| P04004 | VTNC_HUMAN | VTNC_HUMAN Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1 | 7 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | 0,6 | -0,4 | -0,2 | 0,35 | 0,35 | 0,29 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 1,1 |
| P15941 | MUC1_HUMAN | MUC1_HUMAN Mucin-1 OS=Homo sapiens GN=MUC1 PE=1 SV=3 | 7 | 0,6 | 0,2 | 2,3 | 0,3 | 1,5 | 0,8 | 0,38 | 1,28 | 1,15 | 1,2 | 1,1 | 2,3 | 1,1 | 2,0 | 1,4 |
| P12273 | PIP_HUMAN | PIP_HUMAN Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 | 7 | 0,6 | 0,2 | -3,3 | 0,9 | -3,4 | -0,6 | 0,39 | 1,21 | 2,02 | 1,2 | 1,1 | 3,3 | 1,2 | 5,4 | 1,3 |
| Q99536 | VAT1_HUMAN | VAT1_HUMAN Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens GN=VAT1 PE=1 SV=2 | 7 | 0,8 | 0,1 | 0,9 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,47 | 0,79 | 0,68 | 1,3 | 1,1 | 1,4 | 1,2 | 1,4 | 1,3 |
| P09211 | GSTP1_HUMAN | GSTP1_HUMAN Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 | 7 | 0,0 | 1,2 | 0,7 | 2,1 | 0,3 | 0,9 | 0,58 | 1,43 | 0,60 | 1,0 | 1,7 | 1,3 | 1,7 | 1,2 | 1,4 |
| Q6W4X9 | MUC6_HUMAN | MUC6_HUMAN Mucin-6 OS=Homo sapiens GN=MUC6 PE=1 SV=3 | 7 | 1,2 | 0,1 | -2,5 | 1,4 | -1,6 | -0,3 | 0,68 | 0,59 | 0,97 | 1,5 | 1,1 | 2,6 | 1,4 | 2,2 | 1,1 |
| Q9Y446 | PKP3_HUMAN | PKP3_HUMAN Plakophilin-3 OS=Homo sapiens GN=PKP3 PE=1 SV=1 | 7 | -0,7 | 2,4 | 0,1 | 1,9 | 1,0 | 1,4 | 0,81 | 0,96 | 1,20 | 1,3 | 2,9 | 1,0 | 1,6 | 1,7 | 1,7 |
| Q96HE7 | ERO1A_HUMAN | ERO1A_HUMAN ERO1-like protein alpha OS=Homo sapiens GN=ERO1L PE=1 SV=2 | 7 | -1,1 | 2,8 | -0,5 | 4,0 | 0,6 | 1,1 | 0,85 | 1,74 | 0,83 | 1,4 | 3,4 | 1,2 | 2,7 | 1,3 | 1,5 |
| P05090 | APOD_HUMAN | APOD_HUMAN Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1 | 7 | 1,2 | 0,6 | 1,9 | 1,0 | 0,5 | 0,9 | 0,93 | 1,47 | 0,67 | 1,4 | 1,3 | 2,0 | 1,3 | 1,3 | 1,4 |
| P02679 | FIBG_HUMAN | FIBG_HUMAN Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3 | 7 | 1,3 | 1,4 | 0,6 | 0,9 | -1,2 | 1,3 | 1,32 | 0,77 | 0,05 | 1,5 | 1,8 | 1,3 | 1,3 | 1,8 | 1,7 |
| Q96P63 | SPB12_HUMAN | SPB12_HUMAN Serpin B12 OS=Homo sapiens GN=SERPINB12 PE=1 SV=1 | 7 | 1,8 | 0,9 | 1,9 | 3,2 | 1,3 | 1,4 | 1,35 | 2,55 | 1,39 | 1,7 | 1,5 | 2,0 | 2,2 | 1,9 | 1,8 |
| Q9UBV8 | PEF1_HUMAN | PEF1_HUMAN Peflin OS=Homo sapiens GN=PEF1 PE=1 SV=1 | 7 | 2,8 | 0,0 | 1,6 | -0,1 | 1,0 | 0,3 | 1,36 | 0,80 | 0,69 | 2,3 | 1,0 | 1,8 | 1,0 | 1,7 | 1,1 |
| P47929 | LEG7_HUMAN | LEG7_HUMAN Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2 | 7 | -1,0 | 4,1 | 0,1 | 3,9 | 0,8 | 3,3 | 1,56 | 1,99 | 2,07 | 1,4 | 6,2 | 1,0 | 2,6 | 1,5 | 3,6 |
| P15586 | GNS_HUMAN | GNS_HUMAN N-acetylglucosamine-6-sulfatase OS=Homo sapiens GN=GNS PE=1 SV=3 | 6 | 1,5 | -1,1 | -0,4 | -0,5 | -2,8 | -2,2 | 0,20 | 0,43 | 2,49 | 1,6 | 1,6 | 1,2 | 1,1 | 4,0 | 2,4 |
| P21926 | CD9_HUMAN | CD9_HUMAN CD9 antigen OS=Homo sapiens GN=CD9 PE=1 SV=4 | 6 | 0,6 | 0,3 | 1,0 | 1,4 | 0,1 | 1,5 | 0,43 | 1,24 | 0,77 | 1,2 | 1,1 | 1,5 | 1,4 | 1,0 | 1,8 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| O75955 | FLOT1_HUMAN | FLOT1_HUMAN Flotillin-1 OS=Homo sapiens GN=FLOT1 PE=1 SV=3 | 6 | -0,5 | -0,2 | -0,6 | 0,0 | -0,6 | -0,5 | - | - | - | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,3 | 1,2 |
| O00299 | CLIC1_HUMAN | CLIC1_HUMAN Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 | 6 | 0,6 | -0,5 | 0,0 | -0,8 | 0,3 | -0,8 | 0,08 | 0,40 | 0,21 | 1,2 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 1,3 |
| P62805 | H4_HUMAN | H4_HUMAN Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 | 6 | -0,1 | 3,0 | -0,5 | 4,2 | -0,7 | 3,6 | 1,42 | 1,81 | 1,43 | 1,0 | 3,7 | 1,2 | 2,9 | 1,4 | 4,0 |
| P17927 | CR1_HUMAN | CR1_HUMAN Complement receptor type 1 OS=Homo sapiens GN=CR1 PE=1 SV=3 | 6 | 1,6 | -1,1 | 1,5 | 1,2 | 1,4 | 0,5 | 0,22 | 1,33 | 0,92 | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 1,4 | 2,0 | 1,2 |
| Q9Y2S2 | CRYL1_HUMAN | CRYL1_HUMAN Lambda-crystallin homolog OS=Homo sapiens GN=CRYL1 PE=1 SV=3 | 6 | 1,0 | -0,7 | 0,7 | 0,2 | 0,9 | -0,2 | 0,16 | 0,41 | 0,37 | 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,0 | 1,6 | 1,1 |
| Q8TE68 | ES8L1_HUMAN | ES8L1_HUMAN Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=EPS8L1 PE=1 SV=3 | 6 | -1,5 | 1,2 | -0,3 | 1,3 | 0,3 | 0,7 | - | 0,51 | 0,52 | 1,6 | 1,7 | 1,1 | 1,4 | 1,2 | 1,3 |
| Q8N271 | PROM2_HUMAN | PROM2_HUMAN Prominin-2 OS=Homo sapiens GN=PROM2 PE=1 SV=1 | 6 | -0,1 | -0,1 | 0,9 | 1,1 | -0,1 | 0,3 | - | 1,02 | 0,11 | 1,0 | 1,0 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 1,1 |
| O00592 | PODXL_HUMAN | PODXL_HUMAN Podocalyxin OS=Homo sapiens GN=PODXL PE=1 SV=2 | 6 | 0,0 | -1,2 | 0,4 | -0,8 | 0,4 | 1,6 | - | - | 1,00 | 1,0 | 1,7 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,9 |
| P61026 | RAB10_HUMAN | RAB10_HUMAN Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1 SV=1 | 6 | -0,3 | 0,2 | 0,0 | -0,1 | 0,4 | 0,6 | 0,02 | 0,03 | 0,51 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,3 |
| P24855 | DNAS1_HUMAN | DNAS1_HUMAN Deoxyribonuclease-1 OS=Homo sapiens GN=DNASE1 PE=1 SV=1 | 6 | -1,5 | -3,3 | -1,2 | -0,6 | -3,1 | -0,8 | - | 0,90 | 1,94 | 1,6 | 4,3 | 1,6 | 1,2 | 4,6 | 1,3 |
| P04746 | AMYP_HUMAN | AMYP_HUMAN Pancreatic alpha-amylase OS=Homo sapiens GN=AMY2A PE=1 SV=2 | 6 | 0,6 | -5,0 | -0,8 | -2,2 | -2,6 | -1,9 | - | - | - | 1,2 | 9,2 | 1,3 | 1,7 | 3,5 | 2,1 |
| P39059 | COFA1_HUMAN | COFA1_HUMAN Collagen alpha-1(XV) chain OS=Homo sapiens GN=COL15A1 PE=1 SV=2 | 6 | -1,8 | -1,2 | -0,9 | -2,0 | -1,1 | 0,3 | - | - | - | 1,7 | 1,7 | 1,4 | 1,7 | 1,7 | 1,1 |
| Q9UHL4 | DPP2_HUMAN | DPP2_HUMAN Dipeptidyl peptidase 2 OS=Homo sapiens GN=DPP7 PE=1 SV=3 | 6 | -1,3 | -1,4 | -0,9 | -0,6 | -2,1 | -0,8 | 1,34 | 0,73 | 1,43 | 1,5 | 1,9 | 1,4 | 1,2 | 2,9 | 1,3 |
| O43505 | B3GN1_HUMAN | B3GN1_HUMAN N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase OS=Homo sapiens GN=B3GNT1 PE=1 SV=1 | 6 | -1,0 | -1,6 | -0,1 | -1,6 | -1,1 | 0,2 | - | - | - | 1,3 | 2,1 | 1,0 | 1,5 | 1,7 | 1,1 |
| P22891 | PROZ_HUMAN | PROZ_HUMAN Vitamin K-dependent protein Z OS=Homo sapiens GN=PROZ PE=1 SV=2 | 6 | -1,4 | -0,6 | -0,5 | -1,8 | -0,6 | 0,1 | - | - | - | 1,5 | 1,3 | 1,2 | 1,6 | 1,4 | 1,0 |
| P42785 | PCP_HUMAN | PCP_HUMAN Lysosomal Pro-X carboxypeptidase OS=Homo sapiens GN=PRCP PE=1 SV=1 | 6 | -0,2 | -1,3 | -0,5 | -1,0 | -1,3 | -0,5 | 0,74 | 0,78 | 0,92 | 1,1 | 1,8 | 1,2 | 1,3 | 2,0 | 1,2 |
| Q7L5L3 | GDPD3_HUMAN | GDPD3_HUMAN Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=GDPD3 PE=2 SV=3 | 6 | -0,7 | -0,7 | -0,7 | -0,4 | 0,0 | -0,8 | - | - | - | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 1,3 |
| O75936 | BODG_HUMAN | BODG_HUMAN Gamma-butyrobetaine dioxygenase OS=Homo sapiens GN=BBOX1 PE=1 SV=1 | 6 | -0,3 | -0,5 | -0,9 | 0,0 | 0,2 | 0,4 | - | - | 0,28 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,0 | 1,1 | 1,2 |
| P40925 | MDHC_HUMAN | MDHC_HUMAN Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MDH1 PE=1 SV=4 | 6 | -0,8 | 0,0 | -0,6 | 0,3 | -0,8 | 1,0 | 0,36 | 0,13 | 0,08 | 1,3 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,5 | 1,5 |
| P22352 | GPX3_HUMAN | GPX3_HUMAN Glutathione peroxidase 3 OS=Homo sapiens GN=GPX3 PE=1 SV=2 | 6 | 2,7 | -3,2 | 1,2 | -0,2 | -0,8 | -1,6 | 0,26 | 0,50 | 1,16 | 2,3 | 4,1 | 1,6 | 1,1 | 1,5 | 1,9 |
| P62491 | RB11A_HUMAN | RB11A_HUMAN Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens GN=RAB11A PE=1 SV=3 | 6 | -0,5 | 0,0 | -0,4 | -0,3 | -0,3 | 0,4 | - | - | 0,04 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| P29992 | GNA11_HUMAN | GNA11_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 OS=Homo sapiens GN=GNA11 PE=1 SV=2 | 6 | 0,2 | -0,6 | 0,1 | -0,8 | -0,3 | 0,9 | - | - | - | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,4 |
| P30039 | PBLD_HUMAN | PBLD_HUMAN Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein OS=Homo sapiens GN=PBLD PE=1 SV=2 | 6 | 0,6 | -1,0 | 0,9 | -0,1 | 0,3 | -0,3 | - | 0,41 | 0,04 | 1,2 | 1,6 | 1,4 | 1,0 | 1,2 | 1,1 |
| P35580 | MYH10_HUMAN | MYH10_HUMAN Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3 | 6 | -0,9 | 0,6 | -0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | - | - | 0,20 | 1,3 | 1,3 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,1 |
| Q9UGT4 | SUSD2_HUMAN | SUSD2_HUMAN Sushi domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=SUSD2 PE=1 SV=1 | 6 | 0,1 | -0,4 | 0,2 | -0,2 | -0,3 | 0,5 | - | - | 0,11 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 |
| Q7Z406 | MYH14_HUMAN | MYH14_HUMAN Myosin-14 OS=Homo sapiens GN=MYH14 PE=1 SV=2 | 6 | -1,4 | 1,2 | -0,4 | 0,6 | 0,9 | 0,4 | - | 0,12 | 0,63 | 1,6 | 1,7 | 1,2 | 1,2 | 1,6 | 1,2 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| Q14254 | FLOT2_HUMAN | FLOT2_HUMAN Flotillin-2 OS=Homo sapiens GN=FLOT2 PE=1 SV=2 | 6 | 0,6 | -0,7 | 0,2 | -0,4 | 0,2 | -1,0 | - | - | - | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,5 |
| O75787 | RENH_HUMAN | RENH_HUMAN Renin receptor OS=Homo sapiens GN=ATP6AP2 PE=1 SV=2 | 6 | -0,5 | 0,4 | -0,1 | -2,3 | 0,2 | 1,2 | 0,08 | 0,11 | 0,38 | 1,2 | 1,2 | 1,0 | 1,8 | 1,1 | 1,6 |
| P30086 | PEBP1_HUMAN | PEBP1_HUMAN Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3 | 6 | 0,0 | -0,1 | -0,1 | -0,3 | -1,2 | 0,5 | 0,07 | 0,25 | 0,36 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,8 | 1,2 |
| P61160 | ARP2_HUMAN | ARP2_HUMAN Actin-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTR2 PE=1 SV=1 | 6 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,3 | 0,2 | 0,04 | 0,20 | 0,27 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,1 |
| P30044 | PRDX5_HUMAN | PRDX5_HUMAN Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX5 PE=1 SV=4 | 6 | -0,6 | 0,6 | -0,2 | 1,2 | 0,2 | 1,0 | 0,00 | 0,47 | 0,63 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | 1,5 |
| P25325 | THTM_HUMAN | THTM_HUMAN 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase OS=Homo sapiens GN=MPST PE=1 SV=3 | 6 | -0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,6 | -0,2 | 0,6 | 0,00 | 0,29 | 0,20 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,3 |
| Q58FF7 | H90B3_HUMAN | H90B3_HUMAN Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 OS=Homo sapiens GN=HSP90AB3P PE=5 SV=1 | 6 | -0,9 | 0,9 | -0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,03 | 0,01 | 0,42 | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,1 |
| O75083 | WDR1_HUMAN | WDR1_HUMAN WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=WDR1 PE=1 SV=4 | 6 | -0,1 | 0,2 | 0,1 | -0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,05 | 0,06 | 0,02 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,0 |
| Q9UIV8 | SPB13_HUMAN | SPB13_HUMAN Serpin B13 OS=Homo sapiens GN=SERPINB13 PE=2 SV=2 | 6 | -1,1 | 1,2 | -0,2 | 0,4 | 0,3 | 1,0 | 0,07 | 0,14 | 0,65 | 1,4 | 1,7 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,5 |
| A6NEC2 | PSAL_HUMAN | PSAL_HUMAN Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein OS=Homo sapiens GN=NPEPPSL1 PE=2 SV=3 | 6 | -0,9 | 1,0 | -0,8 | 1,0 | 0,0 | 0,2 | 0,08 | 0,12 | 0,09 | 1,3 | 1,6 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | 1,1 |
| Q16851 | UGPA_HUMAN | UGPA_HUMAN UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Homo sapiens GN=UGP2 PE=1 SV=5 | 6 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | 0,09 | 0,25 | 0,43 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 |
| P07476 | INVO_HUMAN | INVO_HUMAN Involutrin OS=Homo sapiens GN=IVL PE=1 SV=2 | 6 | -1,1 | 1,4 | -0,3 | -0,1 | -0,4 | -0,9 | 0,16 | 0,18 | 0,63 | 1,4 | 1,8 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,4 |
| P63096 | GNAI1_HUMAN | GNAI1_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=GNAI1 PE=1 SV=2 | 6 | 1,1 | -0,6 | 0,9 | -0,2 | 0,7 | -0,1 | 0,22 | 0,35 | 0,29 | 1,4 | 1,3 | 1,4 | 1,1 | 1,4 | 1,0 |
| P13797 | PLST_HUMAN | PLST_HUMAN Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 PE=1 SV=4 | 6 | -0,1 | 0,7 | 0,6 | 0,4 | 0,1 | -0,1 | 0,30 | 0,53 | 0,02 | 1,0 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,0 |
| P18669 | PGAM1_HUMAN | PGAM1_HUMAN Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 PE=1 SV=2 | 6 | 0,1 | 0,5 | 0,5 | 1,3 | -0,1 | 0,8 | 0,32 | 0,88 | 0,37 | 1,0 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | 1,0 | 1,4 |
| O95833 | CLIC3_HUMAN | CLIC3_HUMAN Chloride intracellular channel protein 3 OS=Homo sapiens GN=CLIC3 PE=1 SV=2 | 6 | -0,5 | 1,2 | 0,1 | 0,6 | 1,0 | 0,0 | 0,33 | 0,32 | 0,45 | 1,2 | 1,7 | 1,0 | 1,2 | 1,6 | 1,0 |
| P0DJJ8 | PEPA3_HUMAN | PEPA3_HUMAN Pepsin A-3 OS=Homo sapiens GN=PGA3 PE=1 SV=1 | 6 | -0,3 | 1,0 | -1,4 | -0,9 | -5,3 | 0,3 | 0,37 | 1,18 | 2,53 | 1,1 | 1,6 | 1,7 | 1,3 | 13,8 | 1,1 |
| P35858 | ALS_HUMAN | ALS_HUMAN Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens GN=IGFALS PE=1 SV=1 | 6 | 1,0 | 0,2 | 1,0 | 0,8 | 0,4 | 0,6 | 0,58 | 0,90 | 0,49 | 1,4 | 1,1 | 1,4 | 1,2 | 1,2 | 1,3 |
| P27797 | CALR_HUMAN | CALR_HUMAN Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1 | 6 | -0,5 | 1,9 | 0,5 | 2,0 | 0,9 | 0,5 | 0,70 | 1,22 | 0,69 | 1,2 | 2,3 | 1,2 | 1,7 | 1,5 | 1,2 |
| Q01546 | K22O_HUMAN | K22O_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 oral OS=Homo sapiens GN=KRT76 PE=1 SV=2 | 6 | -1,6 | 3,5 | -0,9 | -0,4 | 1,5 | 0,7 | 0,96 | 0,61 | 1,09 | 1,6 | 4,8 | 1,4 | 1,1 | 2,1 | 1,3 |
| P04080 | CYTB_HUMAN | CYTB_HUMAN Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 | 6 | -2,0 | 4,0 | -0,3 | 5,5 | 0,6 | 2,9 | 1,00 | 2,60 | 1,73 | 1,8 | 5,8 | 1,1 | 4,0 | 1,3 | 3,1 |
| Q16695 | H31T_HUMAN | H31T_HUMAN Histone H3.1t OS=Homo sapiens GN=HIST3H3 PE=1 SV=3 | 6 | -0,8 | 3,3 | -0,9 | 5,5 | -0,9 | 4,9 | 1,28 | 2,30 | 2,03 | 1,3 | 4,3 | 1,4 | 4,0 | 1,5 | 6,8 |
| O75340 | PDCD6_HUMAN | PDCD6_HUMAN Programmed cell death protein 6 OS=Homo sapiens GN=PDCD6 PE=1 SV=1 | 6 | 3,2 | -0,1 | 2,1 | -0,1 | 1,3 | 0,2 | 1,58 | 1,02 | 0,78 | 2,6 | 1,0 | 2,1 | 1,0 | 1,9 | 1,1 |
| Q96DA0 | ZG16B_HUMAN | ZG16B_HUMAN Zymogen granule protein 16 homolog B OS=Homo sapiens GN=ZG16B PE=1 SV=3 | 6 | 0,9 | 2,9 | 1,9 | 1,3 | 0,9 | 3,1 | 1,90 | 1,62 | 2,00 | 1,3 | 3,6 | 2,0 | 1,4 | 1,6 | 3,3 |
| P33778 | H2B1B_HUMAN | H2B1B_HUMAN Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2 | 6 | 0,9 | 2,9 | 0,4 | 5,1 | -0,1 | 2,9 | 1,91 | 2,72 | 1,40 | 1,3 | 3,7 | 1,1 | 3,6 | 1,0 | 3,1 |
| P04066 | FUCO_HUMAN | FUCO_HUMAN Tissue alpha-L-fucosidase OS=Homo sapiens GN=FUCA1 PE=1 SV=4 | 5 | 0,2 | -1,7 | -1,5 | -0,3 | -2,8 | -2,1 | 0,78 | 0,93 | 2,44 | 1,1 | 2,2 | 1,8 | 1,1 | 4,0 | 2,3 |
| P34059 | GALNS_HUMAN | GALNS_HUMAN N-acetylgalactosamine-6-sulfatase OS=Homo sapiens GN=GALNS PE=1 SV=1 | 5 | 0,4 | -1,8 | -0,8 | -0,7 | -2,5 | -2,0 | 0,73 | 0,75 | 2,25 | 1,1 | 2,2 | 1,3 | 1,2 | 3,4 | 2,3 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|--------------|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P08962 | CD63_HUMAN | CD63_HUMAN CD63 antigen OS=Homo sapiens GN=CD63 PE=1 SV=2 | 5 | -0,9 | -0,9 | 0,0 | -0,4 | -0,1 | -1,2 | - | - | - | 1,3 | 1,5 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,6 | |
| P29401 | TKT_HUMAN | TKT_HUMAN Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3 | 5 | -0,6 | 0,2 | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | - | 0,19 | 0,04 | 0,35 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,2 |
| Q93050 | VPP1_HUMAN | VPP1_HUMAN V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Homo sapiens GN=ATP6V0A1 PE=1 SV=3 | 5 | 0,3 | -0,7 | 0,4 | -0,7 | 0,5 | -0,4 | - | 0,20 | 0,16 | 0,07 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,2 |
| P09327 | VILI_HUMAN | VILI_HUMAN Villin-1 OS=Homo sapiens GN=VIL1 PE=1 SV=4 | 5 | 0,8 | -0,7 | -0,2 | -2,5 | 0,9 | -1,1 | 0,01 | - | 1,38 | 0,08 | 1,3 | 1,4 | 1,1 | 1,9 | 1,6 | 1,6 |
| P51688 | SPHM_HUMAN | SPHM_HUMAN N-sulphoglucosamine sulphohydrolase OS=Homo sapiens GN=SGSH PE=1 SV=1 | 5 | -0,4 | -1,7 | -0,7 | -0,1 | -2,3 | -1,3 | - | 1,03 | 0,42 | 1,82 | 1,1 | 2,1 | 1,3 | 1,0 | 3,2 | 1,7 |
| Q12805 | FBLN3_HUMAN | FBLN3_HUMAN EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=EFEMP1 PE=1 SV=2 | 5 | -0,7 | -1,3 | -0,5 | -2,9 | -0,2 | -0,8 | - | 1,03 | 1,71 | 0,46 | 1,3 | 1,8 | 1,2 | 2,1 | 1,1 | 1,3 |
| A2BHY4 | A2BHY4_HUMAN | A2BHY4_HUMAN Complement component C4B (Childo blood group) OS=Homo sapiens GN=C4B-1 PE=4 SV=1 | 5 | -0,3 | -1,7 | -1,4 | -2,0 | -2,1 | -1,8 | - | 0,96 | 1,73 | 1,92 | 1,1 | 2,1 | 1,7 | 1,7 | 2,8 | 2,0 |
| Q14108 | SCRB2_HUMAN | SCRB2_HUMAN Lysosome membrane protein 2 OS=Homo sapiens GN=SCARB2 PE=1 SV=2 | 5 | -0,8 | -1,1 | 0,4 | -0,4 | 0,4 | 0,5 | - | 0,93 | 0,00 | 0,47 | 1,3 | 1,6 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,2 |
| P02792 | FRIL_HUMAN | FRIL_HUMAN Ferritin light chain OS=Homo sapiens GN=FTL PE=1 SV=2 | 5 | 1,5 | -3,2 | 0,5 | -0,7 | 1,3 | -1,9 | - | 0,84 | 0,10 | 0,32 | 1,6 | 4,2 | 1,2 | 1,2 | 1,9 | 2,1 |
| P36955 | PEDF_HUMAN | PEDF_HUMAN Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4 | 5 | -0,3 | -0,9 | -0,5 | -3,0 | -0,2 | -2,6 | - | 0,58 | 1,76 | 1,42 | 1,1 | 1,5 | 1,2 | 2,2 | 1,1 | 2,9 |
| P51654 | GPC3_HUMAN | GPC3_HUMAN Glypican-3 OS=Homo sapiens GN=GPC3 PE=1 SV=1 | 5 | -0,4 | -0,6 | -1,0 | 0,5 | -0,8 | 0,0 | - | 0,49 | 0,27 | 0,42 | 1,1 | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 1,5 | 1,0 |
| P50053 | KHK_HUMAN | KHK_HUMAN Ketohehexokinase OS=Homo sapiens GN=KHK PE=1 SV=1 | 5 | -0,5 | -0,5 | -0,6 | 0,0 | -0,2 | 0,3 | - | 0,48 | 0,29 | 0,05 | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 1,2 |
| Q13228 | SBP1_HUMAN | SBP1_HUMAN Selenium-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=SELENBP1 PE=1 SV=2 | 5 | 0,5 | -1,4 | -0,3 | 0,5 | -1,0 | 0,6 | - | 0,47 | 0,09 | 0,20 | 1,2 | 1,9 | 1,1 | 1,1 | 1,7 | 1,3 |
| B9A064 | IGLL5_HUMAN | IGLL5_HUMAN Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2 | 5 | -0,3 | -0,6 | -1,2 | -0,6 | -2,1 | -1,6 | - | 0,45 | 0,91 | 1,84 | 1,1 | 1,3 | 1,6 | 1,2 | 2,8 | 1,8 |
| Q16706 | MA2A1_HUMAN | MA2A1_HUMAN Alpha-mannosidase 2 OS=Homo sapiens GN=MAN2A1 PE=1 SV=2 | 5 | 0,2 | -1,0 | 0,0 | -1,1 | -0,4 | -0,6 | - | 0,40 | 0,52 | 0,48 | 1,1 | 1,6 | 1,0 | 1,3 | 1,2 | 1,3 |
| P12955 | PEPD_HUMAN | PEPD_HUMAN Xaa-Pro dipeptidase OS=Homo sapiens GN=PEPD PE=1 SV=3 | 5 | 0,6 | -1,3 | -0,2 | -0,5 | -0,1 | -1,0 | - | 0,36 | 0,36 | 0,57 | 1,2 | 1,8 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,5 |
| Q8WW52 | F151A_HUMAN | F151A_HUMAN Protein FAM151A OS=Homo sapiens GN=FAM151A PE=2 SV=2 | 5 | -0,1 | -0,5 | -0,3 | -0,6 | -0,5 | 0,3 | - | 0,32 | 0,46 | 0,11 | 1,0 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,1 |
| P02753 | RET4_HUMAN | RET4_HUMAN Retinol-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=RBP4 PE=1 SV=3 | 5 | -0,2 | -0,4 | 1,0 | -2,5 | 0,8 | -1,3 | - | 0,30 | 0,77 | 0,25 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,9 | 1,5 | 1,7 |
| P54760 | EPHB4_HUMAN | EPHB4_HUMAN Ephrin type-B receptor 4 OS=Homo sapiens GN=EPHB4 PE=1 SV=2 | 5 | 0,3 | -0,9 | 0,6 | -0,1 | -1,3 | -0,4 | - | 0,28 | 0,25 | 0,86 | 1,1 | 1,5 | 1,2 | 1,0 | 1,9 | 1,2 |
| Q58FF8 | H90B2_HUMAN | H90B2_HUMAN Putative heat shock protein HSP 90-beta 2 OS=Homo sapiens GN=HSP90AB2P PE=1 SV=2 | 5 | -1,5 | 1,1 | -0,8 | 0,4 | -0,3 | 2,1 | - | 0,23 | 0,20 | 0,88 | 1,6 | 1,6 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 2,3 |
| P09960 | LKHA4_HUMAN | LKHA4_HUMAN Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens GN=LTA4H PE=1 SV=2 | 5 | -0,3 | -0,2 | 0,2 | 0,6 | -0,1 | 0,6 | - | 0,21 | 0,40 | 0,28 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,3 |
| P62070 | RRAS2_HUMAN | RRAS2_HUMAN Ras-related protein R-Ras2 OS=Homo sapiens GN=RRAS2 PE=1 SV=1 | 5 | 0,2 | -0,6 | 0,2 | -0,5 | 0,4 | 0,8 | - | 0,21 | 0,14 | 0,58 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,4 |
| Q9HB40 | RISC_HUMAN | RISC_HUMAN Retinoid-inducible serine carboxypeptidase OS=Homo sapiens GN=SCPEP1 PE=1 SV=1 | 5 | -0,1 | -0,3 | -0,8 | -1,3 | -1,6 | -1,1 | - | 0,20 | 1,05 | 1,36 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 1,4 | 2,3 | 1,6 |
| P01019 | ANGT_HUMAN | ANGT_HUMAN Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1 | 5 | 0,9 | -1,3 | -0,8 | -2,6 | -1,0 | -2,0 | - | 0,16 | 1,70 | 1,52 | 1,3 | 1,8 | 1,4 | 1,9 | 1,6 | 2,2 |
| Q7L576 | CYFP1_HUMAN | CYFP1_HUMAN Cytoplasmic FMRI-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=CYFIP1 PE=1 SV=1 | 5 | -0,7 | 0,4 | -0,3 | 0,0 | 0,4 | 0,3 | - | 0,14 | 0,17 | 0,37 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,1 |
| Q9H4B7 | TBB1_HUMAN | TBB1_HUMAN Tubulin beta-1 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB1 PE=1 SV=1 | 5 | -0,8 | 0,6 | -0,8 | -0,2 | -0,1 | 0,9 | - | 0,11 | 0,50 | 0,40 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | 1,0 | 1,1 | 1,4 |
| Q96DG6 | CMBL_HUMAN | CMBL_HUMAN Carboxymethylenebutenolidase homolog OS=Homo sapiens GN=CMBL PE=1 SV=1 | 5 | 0,8 | -0,9 | 1,0 | -0,6 | 0,4 | -0,1 | - | 0,07 | 0,17 | 0,15 | 1,3 | 1,5 | 1,4 | 1,2 | 1,2 | 1,1 |
| P14543 | NID1_HUMAN | NID1_HUMAN Nidogen-1 OS=Homo sapiens GN=NID1 PE=1 SV=3 | 5 | 0,7 | -0,7 | 0,8 | -0,7 | -1,2 | -1,2 | - | 0,01 | 0,05 | 1,22 | 1,2 | 1,4 | 1,4 | 1,2 | 1,8 | 1,7 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|---|---|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Q9Y5K6 | CD2AP_HUMAN | CD2AP_HUMAN CD2-associated protein OS=Homo sapiens GN=CD2AP PE=1 SV=1 | 5 | 0,4 | -0,4 | -0,1 | 0,0 | -0,6 | 0,0 | 0,01 | - | - | 1,2 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 1,0 |
| P17655 | CAN2_HUMAN | CAN2_HUMAN Calpain-2 catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=CAPN2 PE=1 SV=6 | 5 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,0 | 0,02 | 0,29 | 0,22 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,0 |
| P55291 | CAD15_HUMAN | CAD15_HUMAN Cadherin-15 OS=Homo sapiens GN=CDH15 PE=1 SV=1 | 5 | 0,1 | -0,1 | 0,0 | -0,3 | -2,4 | -0,9 | 0,03 | -0,15 | -1,67 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 3,4 | 1,5 |
| O43175 | SERA_HUMAN | SERA_HUMAN D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4 | 5 | -1,4 | 1,4 | -0,2 | 1,8 | 0,2 | 2,0 | 0,03 | 0,78 | 1,06 | 1,5 | 1,9 | 1,1 | 1,6 | 1,1 | 2,2 |
| P59998 | ARPC4_HUMAN | ARPC4_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ARPC4 PE=1 SV=3 | 5 | -0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,9 | 0,2 | 1,3 | 0,12 | 0,64 | 0,72 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,6 |
| P30101 | PDIA3_HUMAN | PDIA3_HUMAN Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4 | 5 | -1,2 | 1,6 | -0,6 | 0,5 | -0,2 | 0,2 | 0,16 | -0,08 | -0,02 | 1,5 | 2,0 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| Q8NFJ5 | RAI3_HUMAN | RAI3_HUMAN Retinoic acid-induced protein 3 OS=Homo sapiens GN=GPRC5A PE=1 SV=2 | 5 | 0,8 | -0,4 | 1,7 | -0,8 | 1,3 | -0,2 | 0,21 | 0,43 | 0,54 | 1,3 | 1,2 | 1,9 | 1,2 | 1,9 | 1,1 |
| Q9Y512 | SAM50_HUMAN | SAM50_HUMAN Sorting and assembly machinery component 50 homolog OS=Homo sapiens GN=SAMM50 PE=1 SV=3 | 5 | 0,9 | -0,4 | 0,4 | -0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,23 | 0,11 | 0,16 | 1,3 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,0 |
| O15144 | ARPC2_HUMAN | ARPC2_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1 | 5 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 0,25 | 0,20 | 0,50 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,3 |
| P17858 | K6PL_HUMAN | K6PL_HUMAN 6-phosphofructokinase, liver type OS=Homo sapiens GN=PFKL PE=1 SV=6 | 5 | 0,3 | 0,2 | 0,8 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,28 | 0,63 | 0,63 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,4 | 1,3 |
| P61158 | ARP3_HUMAN | ARP3_HUMAN Actin-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=ACTR3 PE=1 SV=3 | 5 | 0,4 | 0,1 | 0,7 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,29 | 0,47 | 0,45 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,2 |
| Q99497 | PARK7_HUMAN | PARK7_HUMAN Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2 | 5 | 0,8 | -0,2 | 0,7 | 0,4 | -0,1 | 0,5 | 0,31 | 0,57 | 0,20 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,2 |
| P54793 | ARSF_HUMAN | ARSF_HUMAN Arylsulfatase F OS=Homo sapiens GN=ARSF PE=1 SV=4 | 5 | 0,4 | 0,2 | 0,7 | 2,2 | 0,8 | 0,3 | 0,31 | 1,47 | 0,57 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,8 | 1,5 | 1,1 |
| O00204 | ST2B1_HUMAN | ST2B1_HUMAN Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1 OS=Homo sapiens GN=SULT2B1 PE=1 SV=2 | 5 | -1,4 | 2,3 | -0,4 | 0,8 | 0,5 | 0,9 | 0,46 | 0,20 | 0,74 | 1,5 | 2,8 | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,4 |
| P19012 | K1C15_HUMAN | K1C15_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Homo sapiens GN=KRT15 PE=1 SV=3 | 5 | 0,1 | 1,1 | -0,5 | -1,5 | 1,7 | 0,0 | 0,55 | -0,98 | 0,84 | 1,0 | 1,6 | 1,2 | 1,5 | 2,4 | 1,0 |
| O60218 | AK1BA_HUMAN | AK1BA_HUMAN Aldo-keto reductase family 1 member B10 OS=Homo sapiens GN=AKR1B10 PE=1 SV=2 | 5 | -0,8 | 2,1 | -0,9 | 0,5 | 0,6 | 1,5 | 0,64 | -0,16 | 1,02 | 1,3 | 2,6 | 1,4 | 1,1 | 1,3 | 1,8 |
| P31949 | S10AB_HUMAN | S10AB_HUMAN Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2 | 5 | 0,1 | 1,2 | 0,4 | -1,2 | 1,0 | -0,8 | 0,66 | -0,39 | 0,14 | 1,0 | 1,7 | 1,2 | 1,4 | 1,7 | 1,4 |
| P20142 | PEPC_HUMAN | PEPC_HUMAN Gastricsin OS=Homo sapiens GN=PGC PE=1 SV=1 | 5 | 0,8 | 0,6 | -2,8 | 1,9 | -3,8 | 0,1 | 0,68 | -0,42 | -1,84 | 1,3 | 1,3 | 2,8 | 1,6 | 6,5 | 1,0 |
| P29373 | RABP2_HUMAN | RABP2_HUMAN Cellular retinoic acid-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=CRABP2 PE=1 SV=2 | 5 | -1,9 | 3,5 | -0,7 | 3,7 | -0,2 | 2,5 | 0,81 | 1,48 | 1,17 | 1,8 | 4,8 | 1,3 | 2,6 | 1,1 | 2,7 |
| P17931 | LEG3_HUMAN | LEG3_HUMAN Galectin-3 OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=1 SV=5 | 5 | -0,1 | 1,7 | 0,4 | 3,2 | -0,5 | 3,1 | 0,83 | 1,79 | 1,34 | 1,0 | 2,2 | 1,2 | 2,2 | 1,3 | 3,4 |
| P02042 | HBD_HUMAN | HBD_HUMAN Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2 | 5 | -0,1 | 1,9 | 0,4 | 5,0 | 0,5 | 2,1 | 0,86 | 2,70 | 1,29 | 1,0 | 2,3 | 1,1 | 3,6 | 1,3 | 2,3 |
| P36952 | SPB5_HUMAN | SPB5_HUMAN Serpin B5 OS=Homo sapiens GN=SERPINB5 PE=1 SV=2 | 5 | -1,0 | 2,9 | -0,2 | 2,0 | 0,6 | 1,6 | 0,95 | 0,90 | 1,09 | 1,4 | 3,7 | 1,1 | 1,7 | 1,3 | 1,9 |
| O60235 | TM11D_HUMAN | TM11D_HUMAN Transmembrane protease serine 11D OS=Homo sapiens GN=TMPRSS11D PE=1 SV=1 | 5 | 0,6 | 3,0 | 0,5 | 3,7 | 0,5 | 1,7 | 1,81 | 2,10 | 1,10 | 1,2 | 3,9 | 1,2 | 2,7 | 1,3 | 2,0 |
| Q9BTY2 | FUCO2_HUMAN | FUCO2_HUMAN Plasma alpha-L-fucosidase OS=Homo sapiens GN=FUCA2 PE=1 SV=2 | 4 | 0,0 | -0,8 | -0,5 | -0,5 | -1,9 | -1,3 | - | - | - | 1,0 | 1,4 | 1,2 | 1,1 | 2,6 | 1,7 |
| P62820 | RAB1A_HUMAN | RAB1A_HUMAN Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens GN=RAB1A PE=1 SV=3 | 4 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | -0,1 | 0,5 | -0,1 | 0,02 | 0,05 | 0,19 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,3 | 1,1 |
| P13473 | LAMP2_HUMAN | LAMP2_HUMAN Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=LAMP2 PE=1 SV=2 | 4 | -1,2 | -0,8 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,5 | -0,99 | 0,30 | 0,31 | 1,5 | 1,4 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 |
| P61586 | RHOA_HUMAN | RHOA_HUMAN Transforming protein RhoA OS=Homo sapiens GN=RHOA PE=1 SV=1 | 4 | -0,3 | -0,4 | -0,9 | -0,2 | -0,7 | -0,1 | - | - | - | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,4 | 1,1 |
| Q9NP85 | PODO_HUMAN | PODO_HUMAN Podocin OS=Homo sapiens GN=NPHS2 PE=1 SV=1 | 4 | -0,1 | -0,9 | -0,5 | -1,3 | 0,2 | 0,0 | - | - | - | 1,0 | 1,5 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,0 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|---|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| O00526 | UPK2_HUMAN | UPK2_HUMAN Uroplakin-2 OS=Homo sapiens GN=UPK2 PE=2 SV=2 | 4 | -0,1 | -1,0 | 0,3 | -1,1 | -0,1 | 0,3 | - | - | 0,13 | 1,0 | 1,6 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 1,1 |
| Q9UI12 | VATH_HUMAN | VATH_HUMAN V-type proton ATPase subunit H OS=Homo sapiens GN=ATP6V1H PE=1 SV=1 | 4 | 1,0 | -1,0 | 1,2 | -1,9 | 0,2 | -0,6 | 0,54 | 0,40 | - | 1,4 | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 1,1 | 1,3 |
| Q9HBG4 | VPP4_HUMAN | VPP4_HUMAN V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 4 OS=Homo sapiens GN=ATP6V0A4 PE=1 SV=2 | 4 | 0,7 | -0,5 | 0,5 | -1,0 | -0,3 | -0,4 | 0,02 | 0,33 | 0,21 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,2 |
| O95954 | FTCD_HUMAN | FTCD_HUMAN Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Homo sapiens GN=FTCD PE=1 SV=2 | 4 | 0,6 | -0,6 | 0,0 | -0,2 | 0,5 | 0,1 | 0,08 | 0,26 | 0,32 | 1,2 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 1,3 | 1,0 |
| Q6UVK1 | CSPG4_HUMAN | CSPG4_HUMAN Chondroitin sulfate proteoglycan 4 OS=Homo sapiens GN=CSPG4 PE=1 SV=2 | 4 | -1,7 | -1,8 | -1,1 | -2,3 | -1,9 | -0,7 | - | - | - | 1,7 | 2,2 | 1,5 | 1,8 | 2,6 | 1,3 |
| Q6UX73 | CP089_HUMAN | CP089_HUMAN UPF0764 protein C16orf89 OS=Homo sapiens GN=C16orf89 PE=1 SV=2 | 4 | -1,2 | -1,8 | -0,8 | -0,9 | -1,4 | -0,4 | 1,75 | 1,72 | 1,34 | 1,5 | 2,3 | 1,4 | 1,3 | 2,0 | 1,2 |
| P01620 | KV302_HUMAN | KV302_HUMAN Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 | 4 | -0,9 | -1,7 | -1,0 | -2,2 | -1,9 | -3,8 | - | - | - | 1,3 | 2,1 | 1,4 | 1,8 | 2,5 | 4,6 |
| Q9UHG3 | PCYOX_HUMAN | PCYOX_HUMAN Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 | 4 | -2,1 | -0,3 | 0,1 | 0,7 | 0,5 | 0,7 | 1,21 | 0,36 | 0,61 | 1,9 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 1,3 |
| P01034 | CYTC_HUMAN | CYTC_HUMAN Cystatin-C OS=Homo sapiens GN=CST3 PE=1 SV=1 | 4 | -2,2 | -0,1 | -0,3 | -1,0 | -0,9 | 1,0 | - | - | 0,09 | 2,0 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,5 | 1,5 |
| Q8WZ75 | ROBO4_HUMAN | ROBO4_HUMAN Roundabout homolog 4 OS=Homo sapiens GN=ROBO4 PE=1 SV=1 | 4 | -2,3 | 0,0 | -1,0 | -0,9 | -2,5 | 0,4 | 1,18 | 0,66 | - | 2,0 | 1,0 | 1,4 | 1,3 | 3,6 | 1,2 |
| P00738 | HPT_HUMAN | HPT_HUMAN Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 | 4 | 0,1 | -1,8 | -1,3 | 1,0 | -1,2 | -0,9 | - | - | - | 1,0 | 2,3 | 1,6 | 1,3 | 1,8 | 1,4 |
| P09467 | F16P1_HUMAN | F16P1_HUMAN Fructose-1,6-bisphosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=FBP1 PE=1 SV=5 | 4 | -1,2 | -0,4 | -0,7 | 0,3 | -0,9 | 0,5 | 0,86 | 0,16 | 1,04 | 1,5 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 1,6 | 1,2 |
| P62834 | RAP1A_HUMAN | RAP1A_HUMAN Ras-related protein Rap-1A OS=Homo sapiens GN=RAP1A PE=1 SV=1 | 4 | -0,6 | -1,1 | -1,0 | -1,3 | -1,1 | 1,2 | 0,84 | 0,19 | 0,20 | 1,2 | 1,6 | 1,4 | 1,4 | 1,7 | 1,6 |
| P11279 | LAMP1_HUMAN | LAMP1_HUMAN Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=LAMP1 PE=1 SV=3 | 4 | -0,8 | -0,7 | 0,3 | -0,5 | -0,2 | -0,5 | - | - | - | 1,3 | 1,4 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 |
| Q9Y287 | ITM2B_HUMAN | ITM2B_HUMAN Integral membrane protein 2B OS=Homo sapiens GN=ITM2B PE=1 SV=1 | 4 | -0,6 | -0,8 | -0,8 | -1,3 | -0,7 | 0,7 | 0,74 | 0,07 | 0,35 | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,4 |
| P15428 | PGDH_HUMAN | PGDH_HUMAN 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)] OS=Homo sapiens GN=HPGD PE=1 SV=1 | 4 | -1,0 | -0,4 | -0,4 | -0,4 | 0,4 | -0,6 | - | - | - | 1,4 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| Q16769 | QPCT_HUMAN | QPCT_HUMAN Glutaminyl-peptide cyclotransferase OS=Homo sapiens GN=QPCT PE=1 SV=1 | 4 | 0,0 | -1,3 | -1,3 | 0,1 | -1,4 | -0,8 | 0,71 | 1,05 | 0,04 | 1,0 | 1,8 | 1,6 | 1,0 | 2,1 | 1,4 |
| P12111 | CO6A3_HUMAN | CO6A3_HUMAN Collagen alpha-3(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A3 PE=1 SV=5 | 4 | -0,3 | -1,1 | 0,1 | -1,4 | -0,6 | -0,2 | - | - | - | 1,1 | 1,6 | 1,0 | 1,5 | 1,4 | 1,1 |
| P39060 | COIA1_HUMAN | COIA1_HUMAN Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Homo sapiens GN=COL18A1 PE=1 SV=5 | 4 | 0,1 | -1,3 | -0,4 | -1,0 | -1,0 | 0,4 | 0,66 | 0,69 | 0,43 | 1,0 | 1,8 | 1,2 | 1,3 | 1,6 | 1,2 |
| Q5SZK8 | FREM2_HUMAN | FREM2_HUMAN FRAS1-related extracellular matrix protein 2 OS=Homo sapiens GN=FREM2 PE=1 SV=2 | 4 | -0,9 | -0,3 | -0,2 | -1,7 | -1,1 | 0,1 | 0,62 | 0,70 | 0,30 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,6 | 1,8 | 1,0 |
| P57735 | RAB25_HUMAN | RAB25_HUMAN Ras-related protein Rab-25 OS=Homo sapiens GN=RAB25 PE=1 SV=2 | 4 | -1,0 | -0,1 | -0,9 | -0,9 | -0,1 | 0,3 | 0,59 | 0,95 | 0,50 | 1,4 | 1,0 | 1,4 | 1,3 | 1,0 | 1,1 |
| Q92692 | PVRL2_HUMAN | PVRL2_HUMAN Poliovirus receptor-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=PVRL2 PE=1 SV=1 | 4 | 0,4 | -1,4 | -0,6 | -2,3 | -0,7 | -0,8 | 0,55 | 0,90 | 0,11 | 1,1 | 1,9 | 1,3 | 1,8 | 1,4 | 1,4 |
| Q13404 | UB2V1_HUMAN | UB2V1_HUMAN Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 OS=Homo sapiens GN=UBE2V1 PE=1 SV=2 | 4 | -1,6 | 0,6 | -0,3 | 0,5 | 0,1 | 0,4 | 0,54 | 1,46 | 0,76 | 1,7 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 |
| O96009 | NAPSA_HUMAN | NAPSA_HUMAN Napsin-A OS=Homo sapiens GN=NAPSA PE=1 SV=1 | 4 | -0,4 | -0,4 | 0,4 | 1,4 | -0,1 | 1,0 | - | - | - | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | 1,5 |
| P48735 | IDHP_HUMAN | IDHP_HUMAN Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS=Homo sapiens GN=IDH2 PE=1 SV=2 | 4 | -0,6 | -0,2 | 0,0 | -2,8 | 1,3 | 0,0 | 0,41 | 0,86 | 0,45 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 2,1 | 2,0 | 1,0 |
| Q96EY5 | F125A_HUMAN | F125A_HUMAN Multivesicular body subunit 12A OS=Homo sapiens GN=FAM125A PE=1 SV=1 | 4 | -1,1 | 0,3 | -1,3 | 0,5 | -1,3 | 1,3 | 0,40 | 0,38 | 0,00 | 1,4 | 1,2 | 1,6 | 1,1 | 1,9 | 1,7 |
| Q9Y646 | CBPQ_HUMAN | CBPQ_HUMAN Carboxypeptidase Q OS=Homo sapiens GN=CPQ PE=1 SV=1 | 4 | -0,5 | -0,3 | -1,7 | 0,6 | -1,7 | -0,1 | - | - | - | 1,2 | 1,2 | 1,9 | 1,2 | 2,4 | 1,0 |
| Q6UWR7 | ENPP6_HUMAN | ENPP6_HUMAN Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6 OS=Homo sapiens GN=ENPP6 PE=1 SV=1 | 4 | -0,5 | -0,2 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | -0,7 | 0,39 | 0,51 | 0,86 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,3 |

| sapiens GN=ENPP6 PE=1 SV=2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------|---|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P11766 | ADHX_HUMAN | ADHX_HUMAN Alcohol dehydrogenase class-3 OS=Homo sapiens GN=ADHS PE=1 SV=4 | 4 | -0,3 | -0,4 | -0,1 | 0,5 | -0,2 | -0,2 | - | 0,22 | - | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,1 |
| P18085 | ARF4_HUMAN | ARF4_HUMAN ADP-ribosylation factor 4 OS=Homo sapiens GN=ARF4 PE=1 SV=3 | 4 | -0,5 | -0,1 | -0,6 | -1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,31 | 0,86 | 0,01 | 1,2 | 1,0 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | 1,0 |
| P10619 | PPGB_HUMAN | PPGB_HUMAN Lysosomal protective protein OS=Homo sapiens GN=CTSA PE=1 SV=2 | 4 | -0,1 | -0,5 | -1,3 | -1,6 | -2,6 | -0,4 | 0,29 | 1,47 | 1,50 | 1,0 | 1,2 | 1,6 | 1,5 | 3,7 | 1,2 |
| O94832 | MYO1D_HUMAN | MYO1D_HUMAN Unconventional myosin-Id OS=Homo sapiens GN=MYO1D PE=1 SV=2 | 4 | -0,1 | -0,5 | -0,2 | -0,9 | -0,2 | 0,8 | 0,28 | 0,55 | 0,29 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,4 |
| P31150 | GDIA_HUMAN | GDIA_HUMAN Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens GN=GDII PE=1 SV=2 | 4 | -0,6 | 0,0 | -0,8 | 0,3 | -0,5 | 0,6 | 0,28 | 0,25 | 0,04 | 1,2 | 1,0 | 1,4 | 1,1 | 1,3 | 1,3 |
| P58107 | EPIPL_HUMAN | EPIPL_HUMAN Epiplakin OS=Homo sapiens GN=EPPK1 PE=1 SV=2 | 4 | -1,0 | 0,5 | -0,9 | -0,6 | 0,1 | 0,3 | 0,23 | 0,75 | 0,22 | 1,4 | 1,3 | 1,4 | 1,2 | 1,1 | 1,1 |
| P50895 | BCAM_HUMAN | BCAM_HUMAN Basal cell adhesion molecule OS=Homo sapiens GN=BCAM PE=1 SV=2 | 4 | 0,3 | -0,8 | -0,2 | -1,1 | 0,2 | 0,0 | 0,21 | 0,64 | 0,14 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,0 |
| P52565 | GDIR1_HUMAN | GDIR1_HUMAN Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIRA PE=1 SV=3 | 4 | -0,2 | -0,2 | -0,3 | 0,4 | -0,5 | 0,6 | 0,21 | 0,09 | 0,08 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,3 |
| P00734 | THRB_HUMAN | THRB_HUMAN Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2 | 4 | 0,5 | -0,9 | -1,4 | -2,6 | -0,7 | -2,7 | 0,19 | 2,00 | 1,69 | 1,2 | 1,5 | 1,7 | 2,0 | 1,4 | 3,0 |
| P04350 | TBB4A_HUMAN | TBB4A_HUMAN Tubulin beta-4A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4A PE=1 SV=2 | 4 | -0,8 | 0,4 | -0,5 | 0,0 | 0,2 | 1,0 | 0,19 | 0,27 | 0,57 | 1,3 | 1,2 | 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,5 |
| Q53GD3 | CTL4_HUMAN | CTL4_HUMAN Choline transporter-like protein 4 OS=Homo sapiens GN=SLC44A4 PE=2 SV=2 | 4 | 0,1 | -0,4 | 0,0 | -0,9 | -0,3 | 0,7 | 0,17 | 0,46 | 0,19 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,3 | 1,2 | 1,3 |
| P35052 | GPC1_HUMAN | GPC1_HUMAN Glypican-1 OS=Homo sapiens GN=GPC1 PE=1 SV=2 | 4 | 0,4 | -0,7 | -0,1 | 0,9 | -0,3 | -1,2 | 0,16 | 0,42 | 0,74 | 1,1 | 1,4 | 1,0 | 1,3 | 1,2 | 1,6 |
| Q9Y6R1 | S4A4_HUMAN | S4A4_HUMAN Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1 OS=Homo sapiens GN=SLC4A4 PE=1 SV=1 | 4 | 0,1 | -0,4 | -0,7 | -0,5 | -0,3 | 0,1 | 0,16 | 0,58 | 0,13 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 1,0 |
| Q7Z4W1 | DCXR_HUMAN | DCXR_HUMAN L-xylulose reductase OS=Homo sapiens GN=DCXR PE=1 SV=2 | 4 | 0,2 | -0,5 | -0,4 | 0,4 | -0,3 | 0,0 | 0,14 | 0,03 | 0,14 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 |
| Q9H8L6 | MMRN2_HUMAN | MMRN2_HUMAN Multimerin-2 OS=Homo sapiens GN=MMRN2 PE=1 SV=2 | 4 | 0,5 | -0,7 | 0,8 | -1,3 | -0,8 | -0,7 | 0,12 | 0,21 | 0,72 | 1,2 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,3 |
| Q96RW7 | HMCN1_HUMAN | HMCN1_HUMAN Hemicentin-1 OS=Homo sapiens GN=HMCN1 PE=1 SV=2 | 4 | -0,4 | 0,2 | 0,2 | -1,0 | -0,6 | -0,3 | 0,10 | 0,38 | 0,46 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,4 | 1,1 |
| P09488 | GSTM1_HUMAN | GSTM1_HUMAN Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Homo sapiens GN=GSTM1 PE=1 SV=3 | 4 | 0,2 | -0,3 | 0,2 | -0,7 | -0,3 | 0,8 | 0,09 | 0,25 | 0,27 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,4 |
| Q15833 | STXB2_HUMAN | STXB2_HUMAN Syntaxin-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=STXBP2 PE=1 SV=2 | 4 | 0,3 | -0,4 | 0,1 | -0,2 | 0,4 | -0,2 | 0,05 | 0,03 | 0,14 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 1,1 |
| P50990 | TCPQ_HUMAN | TCPQ_HUMAN T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4 | 4 | -0,4 | 0,3 | -0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,05 | 0,10 | 0,39 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,1 |
| Q6XQN6 | PNCB_HUMAN | PNCB_HUMAN Nicotinate phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=NAPRT1 PE=1 SV=2 | 4 | 0,2 | -0,1 | 0,2 | -0,3 | 0,0 | 0,1 | 0,03 | 0,09 | 0,09 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,1 |
| Q15274 | NADC_HUMAN | NADC_HUMAN Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] OS=Homo sapiens GN=QPRT PE=1 SV=3 | 4 | 1,2 | -1,1 | 0,7 | -1,0 | -0,9 | -1,0 | 0,03 | 0,18 | 0,94 | 1,5 | 1,7 | 1,3 | 1,3 | 1,6 | 1,5 |
| P30153 | 2AAA_HUMAN | 2AAA_HUMAN Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R1A PE=1 SV=4 | 4 | -0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,9 | 0,6 | 0,03 | 0,23 | 0,73 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,6 | 1,3 |
| Q96QK1 | VPS35_HUMAN | VPS35_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Homo sapiens GN=VPS35 PE=1 SV=2 | 4 | -0,2 | 0,3 | 0,0 | 0,7 | 0,6 | 0,1 | 0,04 | 0,36 | 0,37 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 1,0 |
| Q01518 | CAP1_HUMAN | CAP1_HUMAN Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAP1 PE=1 SV=5 | 4 | -0,5 | 0,6 | -0,2 | 1,1 | 0,2 | 1,3 | 0,04 | 0,46 | 0,72 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,7 |
| P61019 | RAB2A_HUMAN | RAB2A_HUMAN Ras-related protein Rab-2A OS=Homo sapiens GN=RAB2A PE=1 SV=1 | 4 | -0,3 | 0,4 | -0,8 | 0,9 | -0,1 | 0,7 | 0,05 | 0,07 | 0,32 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | 1,3 |
| P11586 | C1TC_HUMAN | C1TC_HUMAN C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=3 | 4 | 0,3 | -0,1 | 0,0 | -0,1 | 0,5 | 0,7 | 0,09 | - | 0,62 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 1,3 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|---|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Q92747 | ARC1A_HUMAN | ARC1A_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A OS=Homo sapiens GN=ARPC1A PE=1 SV=2 | 4 | -0,7 | 0,9 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,9 | 0,09 | 0,32 | 0,46 | 1,3 | 1,5 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,5 |
| Q14914 | PTGR1_HUMAN | PTGR1_HUMAN Prostaglandin reductase 1 OS=Homo sapiens GN=PTGR1 PE=1 SV=2 | 4 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,5 | -0,2 | 0,4 | 0,11 | 0,38 | 0,09 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,2 |
| P08185 | CBG_HUMAN | CBG_HUMAN Corticosteroid-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA6 PE=1 SV=1 | 4 | 0,4 | -0,1 | -0,3 | -0,1 | -0,7 | -1,7 | 0,12 | -0,19 | -1,21 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| Q9UEF7 | KLOT_HUMAN | KLOT_HUMAN Klotho OS=Homo sapiens GN=KL PE=1 SV=2 | 4 | 0,9 | -0,6 | 1,8 | 0,1 | 0,9 | -0,4 | 0,16 | 0,97 | 0,26 | 1,4 | 1,3 | 2,0 | 1,0 | 1,6 | 1,2 |
| A8MZ36 | EVPLL_HUMAN | EVPLL_HUMAN Envoplakin-like protein OS=Homo sapiens GN=EVPLL PE=2 SV=1 | 4 | -1,3 | 1,7 | 0,2 | 0,5 | 0,6 | -0,2 | 0,17 | 0,36 | 0,22 | 1,5 | 2,1 | 1,1 | 1,1 | 1,4 | 1,1 |
| P15121 | ALDR_HUMAN | ALDR_HUMAN Aldose reductase OS=Homo sapiens GN=AKR1B1 PE=1 SV=3 | 4 | 0,7 | -0,3 | 1,2 | -0,4 | -0,1 | 0,8 | 0,18 | 0,41 | 0,37 | 1,2 | 1,2 | 1,6 | 1,1 | 1,1 | 1,4 |
| P11413 | G6PD_HUMAN | G6PD_HUMAN Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=G6PD PE=1 SV=4 | 4 | 0,3 | 0,1 | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 0,0 | 0,20 | 0,78 | 0,51 | 1,1 | 1,1 | 1,5 | 1,2 | 1,7 | 1,0 |
| Q1EHB4 | SC5AC_HUMAN | SC5AC_HUMAN Sodium-coupled monocarboxylate transporter 2 OS=Homo sapiens GN=SLC5A12 PE=2 SV=2 | 4 | 1,4 | -0,9 | 0,3 | -0,4 | 0,8 | -0,6 | 0,23 | -0,03 | 0,12 | 1,5 | 1,5 | 1,1 | 1,1 | 1,5 | 1,3 |
| P28838 | AMPL_HUMAN | AMPL_HUMAN Cytosol aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=LAP3 PE=1 SV=3 | 4 | 0,7 | -0,2 | 1,0 | -0,1 | 0,9 | 0,6 | 0,24 | 0,45 | 0,73 | 1,3 | 1,1 | 1,5 | 1,0 | 1,6 | 1,3 |
| P40121 | CAPG_HUMAN | CAPG_HUMAN Macrophage-capping protein OS=Homo sapiens GN=CAPG PE=1 SV=2 | 4 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 1,1 | -0,1 | 1,2 | 0,26 | 0,66 | 0,55 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,6 |
| O00754 | MA2B1_HUMAN | MA2B1_HUMAN Lysosomal alpha-mannosidase OS=Homo sapiens GN=MAN2B1 PE=1 SV=3 | 4 | 0,9 | -0,1 | 0,0 | 0,0 | -0,6 | -0,3 | 0,40 | 0,02 | -0,45 | 1,3 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,4 | 1,1 |
| O14773 | TPP1_HUMAN | TPP1_HUMAN Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Homo sapiens GN=TPP1 PE=1 SV=2 | 4 | 1,0 | -0,2 | 0,8 | 0,3 | 0,2 | -0,9 | 0,41 | 0,53 | -0,33 | 1,4 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,4 |
| P15104 | GLNA_HUMAN | GLNA_HUMAN Glutamine synthetase OS=Homo sapiens GN=GLUL PE=1 SV=4 | 4 | -0,2 | 1,1 | 0,0 | 1,7 | 0,8 | 0,1 | 0,44 | 0,86 | 0,45 | 1,1 | 1,6 | 1,0 | 1,6 | 1,5 | 1,1 |
| Q9Y696 | CLIC4_HUMAN | CLIC4_HUMAN Chloride intracellular channel protein 4 OS=Homo sapiens GN=CLIC4 PE=1 SV=4 | 4 | 1,3 | -0,3 | -1,3 | -0,4 | -1,1 | 0,5 | 0,49 | -0,84 | -0,28 | 1,5 | 1,2 | 1,6 | 1,1 | 1,7 | 1,2 |
| O95865 | DDAH2_HUMAN | DDAH2_HUMAN N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 OS=Homo sapiens GN=DDAH2 PE=1 SV=1 | 4 | 0,5 | 0,8 | 0,9 | -0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,62 | 0,31 | 0,49 | 1,2 | 1,4 | 1,4 | 1,1 | 1,3 | 1,2 |
| P13866 | SC5A1_HUMAN | SC5A1_HUMAN Sodium/glucose cotransporter 1 OS=Homo sapiens GN=SLC5A1 PE=1 SV=1 | 4 | 1,3 | 0,0 | -0,2 | -1,1 | 0,9 | -0,5 | 0,68 | -0,67 | 0,22 | 1,5 | 1,0 | 1,1 | 1,3 | 1,6 | 1,2 |
| Q99832 | TCPH_HUMAN | TCPH_HUMAN T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 PE=1 SV=2 | 4 | -0,5 | 1,9 | 0,3 | 0,6 | 1,8 | 0,7 | 0,71 | 0,44 | 1,24 | 1,2 | 2,4 | 1,1 | 1,2 | 2,5 | 1,3 |
| P06703 | S10A6_HUMAN | S10A6_HUMAN Protein S100-A6 OS=Homo sapiens GN=S100A6 PE=1 SV=1 | 4 | 2,1 | -0,6 | 1,9 | -0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,74 | 0,62 | 0,62 | 1,9 | 1,3 | 2,1 | 1,2 | 1,4 | 1,3 |
| P04259 | K2C6B_HUMAN | K2C6B_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 | 4 | -1,2 | 2,7 | -1,4 | 3,4 | 0,7 | 0,5 | 0,74 | 0,99 | 0,60 | 1,4 | 3,3 | 1,7 | 2,4 | 1,4 | 1,2 |
| P35222 | CTNB1_HUMAN | CTNB1_HUMAN Catenin beta-1 OS=Homo sapiens GN=CTNNB1 PE=1 SV=1 | 4 | -1,2 | 2,7 | -0,2 | 1,0 | 0,8 | 1,2 | 0,75 | 0,41 | 0,98 | 1,5 | 3,4 | 1,1 | 1,3 | 1,5 | 1,6 |
| P49411 | EFTU_HUMAN | EFTU_HUMAN Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2 | 4 | 0,6 | 1,3 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 1,1 | 0,95 | 0,64 | 0,91 | 1,2 | 1,8 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | 1,6 |
| P28676 | GRAN_HUMAN | GRAN_HUMAN Grancalcin OS=Homo sapiens GN=GCA PE=1 SV=2 | 4 | 2,4 | -0,2 | 1,2 | 0,6 | 1,2 | -1,1 | 1,10 | 0,89 | 0,04 | 2,1 | 1,1 | 1,6 | 1,2 | 1,8 | 1,5 |
| P18054 | LOX12_HUMAN | LOX12_HUMAN Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type OS=Homo sapiens GN=ALOX12 PE=1 SV=4 | 4 | -0,6 | 3,0 | -0,1 | 3,6 | 0,6 | -0,4 | 1,22 | 1,73 | 0,10 | 1,2 | 3,9 | 1,0 | 2,5 | 1,4 | 1,2 |
| P30613 | KPYR_HUMAN | KPYR_HUMAN Pyruvate kinase isozymes R/L OS=Homo sapiens GN=PKLR PE=1 SV=2 | 4 | 3,0 | -0,5 | 1,8 | 0,6 | 1,2 | 0,0 | 1,22 | 1,22 | 0,62 | 2,6 | 1,3 | 2,0 | 1,2 | 1,9 | 1,0 |
| P30626 | SORCN_HUMAN | SORCN_HUMAN Sorcin OS=Homo sapiens GN=SRI PE=1 SV=1 | 4 | 2,8 | 0,1 | 1,8 | -0,6 | 1,4 | 1,0 | 1,41 | 0,61 | 1,20 | 2,4 | 1,0 | 2,0 | 1,2 | 2,0 | 1,5 |
| Q96FQ6 | S10AG_HUMAN | S10AG_HUMAN Protein S100-A16 OS=Homo sapiens GN=S100A16 PE=1 SV=1 | 4 | 0,4 | 2,8 | 0,7 | 1,9 | 0,2 | 1,9 | 1,63 | 1,34 | 1,06 | 1,1 | 3,6 | 1,3 | 1,6 | 1,1 | 2,1 |
| Q9HCY8 | S10AE_HUMAN | S10AE_HUMAN Protein S100-A14 OS=Homo sapiens GN=S100A14 PE=1 SV=1 | 4 | 0,7 | 3,0 | 1,1 | 2,0 | 1,6 | 1,9 | 1,82 | 1,54 | 1,72 | 1,2 | 3,8 | 1,5 | 1,7 | 2,2 | 2,1 |

P32926 DSG3_HUMAN DSG3_HUMAN Desmoglein-3 OS=Homo sapiens GN=DSG3
PE=1 SV=2 4 | 0,4 3,4 1,8 4,1 1,3 2,5 | 1,90 2,94 1,93 | 1,1 4,7 2,0 2,9 2,0 2,8


ANEXO 4

Tabla. Resultado de las 100 nuevas proteínas encontradas en exosomas de orina. Señaladas en rojo aparecen las proteínas que además están dentro de las 48 significativamente alteradas.

| Fasta | Gen | Descripción | Péptidos ID |
|--------|-----------------|--|-------------|
| A6NEC2 | NPPSL1 | Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein | 6 |
| A8MZ36 | EVPLL | Envoplakin-like protein | 4 |
| B9A064 | IPLL5 | Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 | 5 |
| O00204 | SULT2B1 | Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1 | 5 |
| O00468 | AGRN | Agrin | 15 |
| O00754 | MAN2B1 | Lysosomal alpha-mannosidase | 4 |
| O43505 | B3GNT1 | N-acetylglucosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase | 6 |
| O43633 | CHMP2A | Charged multivesicular body protein 2a | 8 |
| O60218 | AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | 5 |
| P00747 | PLG | Plasminogen | 8 |
| P00749 | PLAU | Urokinase-type plasminogen activator | 7 |
| P00751 | CFB | Complement factor B | 7 |
| P00915 | CA1 | Carbonic anhydrase 1 | 9 |
| P01008 | SERPINC1 | Antithrombin-III | 8 |
| P01019 | AGT | Angiotensinogen | 5 |
| P01023 | A2M | Alpha-2-macroglobulin | 18 |
| P01620 | | Ig kappa chain V-III region SIE PE | 4 |
| P01834 | IGKC | Ig kappa chain C region | 7 |
| P01857 | IGHG1 | Ig gamma-1 chain C region | 14 |
| P01871 | IGHM | Ig mu chain C region | 8 |
| P02538 | KRT6A | Keratin, type II cytoskeletal 6A | 37 |
| P02545 | LMNA | Prelamin-A/C | 8 |
| P02675 | FGB | Fibrinogen beta chain | 8 |
| P02788 | LTF | Lactotransferrin | 21 |
| P02790 | HPX | Hemopexin | 8 |
| P04745 | AMY1A | Alpha-amylase 1 | 27 |
| P05783 | KRT18 | Keratin, type I cytoskeletal 18 | 12 |
| P05787 | KRT8 | Keratin, type II cytoskeletal 8 | 7 |
| P06858 | LPL | Lipoprotein lipase | 8 |
| P06865 | HEXA | Beta-hexosaminidase subunit alpha | 7 |
| P07476 | IVL | Involucrin | 6 |
| P08185 | SERPINA6 | Corticosteroid-binding globulin | 4 |
| P08779 | KRT16 | Keratin, type I cytoskeletal 16 | 11 |
| P09488 | GSTM1 | Glutathione S-transferase Mu 1 | 4 |
| P0DJD8 | PGA3 | Pepsin A-3 | 6 |
| P12035 | KRT3 | Keratin, type II cytoskeletal 3 | 7 |
| P13647 | KRT5 | Keratin, type II cytoskeletal 5 | 52 |
| P14625 | HSP90B1 | Endoplasmic | 7 |
| P15289 | ARSA | Arylsulfatase A | 11 |

| | | | |
|--------|--------------|---|----|
| P15586 | GNS | N-acetylglucosamine-6-sulfatase | 6 |
| P19013 | KRT4 | Keratin, type II cytoskeletal 4 | 59 |
| P19801 | ABP1 | Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing] | 8 |
| P19835 | CEL | Bile salt-activated lipase | 10 |
| P20142 | PGC | Gastricsin | 5 |
| P22352 | GPX3 | Glutathione peroxidase 3 | 6 |
| P22735 | TGM1 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K | 14 |
| P24855 | DNASE1 | Deoxyribonuclease-1 | 6 |
| P26641 | EEF1G | Elongation factor 1-gamma | 9 |
| P30101 | PDIA3 | Protein disulfide-isomerase A3 | 5 |
| P30153 | PPP2R1A | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform | 4 |
| P33778 | HIST1H2BB | Histone H2B type 1-B | 6 |
| P34059 | GALNS | N-acetylgalactosamine-6-sulfatase | 5 |
| P35052 | GPC1 | Glypican-1 | 4 |
| P35222 | CTNNB1 | Catenin beta-1 | 4 |
| P35580 | MYH10 | Myosin-10 | 6 |
| P36952 | SERPINB5 | Serpin B5 | 5 |
| P41222 | PTGDS | Prostaglandin-H2 D-isomerase | 7 |
| P43490 | NAMPT | Nicotinamide phosphoribosyltransferase | 8 |
| P45880 | VDAC2 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 | 7 |
| P47929 | LGALS7 | Galectin-7 | 7 |
| P48735 | IDH2 | Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial | 4 |
| P49189 | ALDH9A1 | 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase | 8 |
| P49411 | TUFM | Elongation factor Tu, mitochondrial | 4 |
| P51654 | GPC3 | Glypican-3 | 5 |
| P51688 | SGSH | N-sulphoglucosamine sulphohydrolase | 5 |
| P54760 | EPHB4 | Ephrin type-B receptor 4 | 5 |
| P55291 | CDH15 | Cadherin-15 | 5 |
| P55786 | NPPS | Puromycin-sensitive aminopeptidase | 8 |
| P60842 | EIF4A1 | Eukaryotic initiation factor 4A-1 | 8 |
| Q01546 | KRT76 | Keratin, type II cytoskeletal 2 oral | 6 |
| Q04695 | KRT17 | Keratin, type I cytoskeletal 17 | 8 |
| Q12794 | HYAL1 | Hyaluronidase-1 | 8 |
| Q13404 | UBE2V1 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 | 4 |
| Q13835 | PKP1 | Plakophilin-1 | 11 |
| Q14204 | DYNC1H1 | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 | 8 |
| Q14393 | GAS6 | Growth arrest-specific protein 6 | 7 |
| Q15149 | PLEC | Plectin | 11 |
| Q15274 | QPRT | Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] | 4 |
| Q16769 | QPCT | Glutaminyl-peptide cyclotransferase | 4 |
| Q3LXA3 | DAK | Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) | 8 |
| Q58FF7 | HSP90AB3P | Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 | 6 |
| Q58FF8 | HSP90AB2P | Putative heat shock protein HSP 90-beta 2 | 5 |
| Q5SZK8 | FREM2 | FRAS1-related extracellular matrix protein 2 | 4 |
| Q6UVK1 | CSPG4 | Chondroitin sulfate proteoglycan 4 | 4 |
| Q6XQN6 | NAPRT1 | Nicotinate phosphoribosyltransferase | 4 |

| | | | |
|--------|------------------|--|----|
| Q7L576 | CYFIP1 | Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 | 5 |
| Q8N1N4 | KRT78 | Keratin, type II cytoskeletal 78 | 21 |
| Q8WZ75 | ROBO4 | Roundabout homolog 4 | 4 |
| Q92692 | PVRL2 | Poliovirus receptor-related protein 2 | 4 |
| Q96EY5 | FAM125A | Multivesicular body subunit 12A | 4 |
| Q96HE7 | ERO1L | ERO1-like protein alpha | 7 |
| Q96P63 | SERPINB12 | Serpin B12 | 7 |
| Q96RW7 | HMCN1 | Hemicentin-1 | 4 |
| Q99832 | CCT7 | T-complex protein 1 subunit eta | 4 |
| Q9BTY2 | FUCA2 | Plasma alpha-L-fucosidase | 4 |
| Q9NP79 | VTA1 | Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog | 7 |
| Q9NZH0 | GPRC5B | G-protein coupled receptor family C group 5 member B | 8 |
| Q9UHL4 | DPP7 | Dipeptidyl peptidase 2 | 6 |
| Q9Y446 | PKP3 | Plakophilin-3 | 7 |
| Q9Y646 | CPQ | Carboxypeptidase Q | 4 |

SCIENTIFIC REPORTS 

OPEN

Urinary Kininogen-1 and Retinol binding protein-4 respond to Acute Kidney Injury: predictors of patient prognosis?

Received: 03 July 2015
Accepted: 02 December 2015
Published: 21 January 2016

Laura Gonzalez-Calero¹, Marta Martin-Lorenzo¹, Angeles Ramos-Barron², Jorge Ruiz-Criado², Aroa S. Maroto¹, Alberto Ortiz³, Carlos Gomez-Alamillo², Manuel Arias², Fernando Vivanco^{1,4} & Gloria Alvarez-Llamas¹

Implementation of therapy for acute kidney injury (AKI) depends on successful prediction of individual patient prognosis. Clinical markers as serum creatinine (sCr) have limitations in sensitivity and early response. The aim of the study was to identify novel molecules in urine which show altered levels in response to AKI and investigate their value as predictors of recovery. Changes in the urinary proteome were here investigated in a cohort of 88 subjects (55 AKI patients and 33 healthy donors) grouped in discovery and validation independent cohorts. Patients' urine was collected at three time points: within the first 48 h after diagnosis (T1), at 7 days of follow-up (T2) and at discharge of Nephrology (T3). Differential gel electrophoresis was performed and data were confirmed by Western blot (WB), liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Retinol binding protein 4 (RBP4) and kininogen-1 (KNG1) were found significantly altered following AKI. RBP4 increased at T1, and progressively decreased towards normalization. Maintained decrease was observed for KNG1 from T1. Individual patient response along time revealed RBP4 responds to recovery earlier than sCr. In conclusion, KNG1 and RBP4 respond to AKI. By monitoring RBP4, patient's recovery can be anticipated pointing to a role of RBP4 in prognosis evaluation.

Acute kidney injury (AKI) is a multifactorial syndrome, a frequent clinical complication in hospitalized patients and responsible of a substantial morbidity and mortality^{1,2}. Serum creatinine (sCr) is the reference standard for AKI diagnosis, but lacks sensitivity, may be delayed in response to injury (retrospective indicator), and is influenced by independent factors. As result, current diagnosis is often delayed in time, limiting the possibility of earlier intervention and promoting adverse outcomes. AKI may progress to chronic kidney disease (CKD), CKD itself is a risk factor for AKI in CKD patients, and AKI may accelerate CKD progression. In fact a substantial proportion of AKI patients in daily clinical practice have underlying CKD. In this context, design of novel therapeutic strategies aimed at limiting kidney injury and preventing AKI progression requires novel biomarkers that allow early monitoring of kidney damage and helping in prognosis prediction^{3,4}.

Urine represents a combination of both plasma ultrafiltrate and urinary tract proteins, including glomerular filtrated plasma proteins, soluble proteins secreted by tubular epithelial cells and microvesicles as exosomes. Thus, urine composition not only reflects normal kidney function but also contains specific kidney produced proteins which may be altered in response to underlying physiopathology⁵. Urine has been investigated to study renal physiology and kidney diseases⁶. Our group have investigated urine in the search for novel molecular targets of potential use in the clinical setting from a diagnosis or prognosis point of view in the context of diabetic nephropathy⁷, chronic kidney disease⁸, and cardiovascular disease⁹. Here, we pursued the identification of major

¹Department of Immunology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz-UAM, REDinREN, Madrid, Spain. ²Nephrology Department, Valdecilla Hospital, University of Cantabria, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Santander, Cantabria, Spain. ³Department of Nephrology/IRSIN, IIS-Fundación Jiménez Díaz, School of Medicine, UAM, Madrid, Spain. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Universidad Complutense, Madrid, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.A.-L. (email: galvarez@fjd.es)

| Characteristics | N (%) |
|--|------------------------------|
| Age, years | 64 ± 16 [†] (15–84) |
| Men | 37 (67.3) |
| Comorbidities | |
| Hypertension | 41 (74.5) |
| Diabetes mellitus | 21 (38.2) |
| Cardiovascular disease | 28 (50.9) |
| Chronic kidney disease | 16 (29.1) |
| Charlson comorbidity score | 5.6 ± 3.4 [†] |
| ISI comorbidity score | 0.28 ± 0.19 [†] |
| Nephrotoxic drugs (≥1) | 47 (85.5) |
| Type of admission | |
| Medical | 39 (70.9) |
| Surgical | 16 (29.1) |
| ICU stage | 12 (21.8) |
| Etiology of acute kidney disease | |
| Pre-renal | 28 (50.9) |
| Acute tubular necrosis | 27 (49.1) |
| AKI–KDIGO at diagnosis | |
| 1 | 5 (9.1) |
| 2 | 9 (16.4) |
| 3 | 41 (74.5) |
| Peak sCr | 8.1 ± 4.7 [†] |
| Length of stay, days | 9 (8) [*] |
| Dialysis required | 15 (27.3) |
| Oliguria (≤400 mL/24h) | 10 (20) |
| Full recovery of renal function at discharge | 17 (34.7) |
| Hospital mortality | 3 (5.5) |
| Mortality at one year | 7 (12.7) |

Table 1. Demographics characteristics of patients included in the study. [†]Expressed as median and interquartile range. ^{*}Expressed as mean ± SD.

molecular alterations in urine in response to AKI in the search for novel indicators. Their capability to monitor recovery from AKI and thus predict patient's prognosis will be also evaluated.

Results

Urinary RBP4 and KNG1 proteins are identified as main responders to AKI. Table 1 depicts demographic and clinical characteristics of participants. Individual data are included in Supplementary Tables. Principal component analysis (Fig. 1A) revealed a clear differentiation between controls and cases with a slight trend towards recovery gradually over time for a sub-group of individuals. Differential statistical analysis revealed Retinol binding protein 4 (RBP4) and Kininogen 1 (KNG1) as main molecular responders to AKI condition (Fig. 1B and Table 2). RBP4 is increased significantly in the first sample (T1) compared to control values, and remains significantly higher at T2. Inter-individual variability was particularly observed at nephrological discharge (T3). The opposite trend was observed for KNG1, decreasing its urinary concentration in response to AKI from the first time point evaluated (T1). At discharge, KNG1 urinary levels remain considerably lower than control values.

In the confirmation cohort, target analysis of urinary RBP4 and KNG1 was performed by liquid chromatography mass spectrometry in selected reaction monitoring mode (SRM-LC-MS/MS) for validation. In this case, individual urine samples were analyzed to assess individual behavior (molecular response). Again, significant differences were observed between control group and AKI patients for RBP4 and KNG1 (Fig. 2) in the first 48 h and follow-up, confirming previously observed trends by differential gel electrophoresis (DIGE) and the response of these two proteins (RBP4 increase and KNG1 decrease) to AKI. This response was further evaluated by ROC curves, resulting in areas under the curve (AUC) higher than 0.9 in both cases (see Fig. 2). While average KNG1 levels do not return to control values at discharge, there is a clear trend towards normalization in the case of RBP4 (Fig. 2).

RBP4 in urine responds to patient's recovery earlier than sCr clinical marker. To further investigate a potential prognostic value for RBP4, we analyzed individual samples collected from a new randomized cohort of a total of 23 patients and 13 healthy subjects by WB. Thirteen of those 23 patients could be monitored at the three time points. On average, including all patients monitored (and not only those for whom sampling was possible at the three time points), RBP4 increased significantly at T1 and progressively decreased thereafter

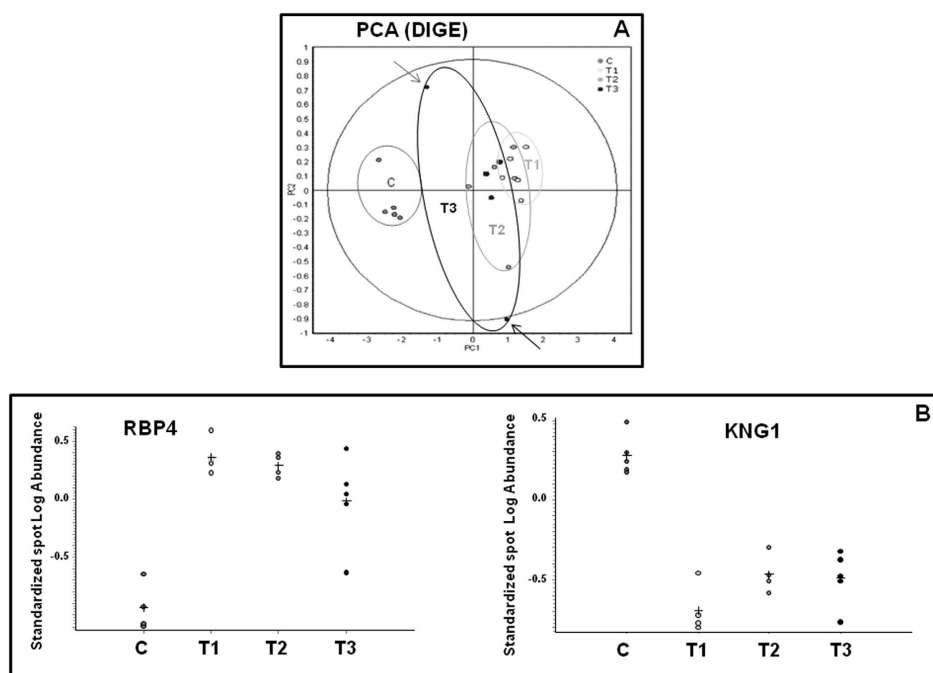


Figure 1. Proteins significantly altered in urine in response to AKI. (A) Principal component analysis (PCA) graph resulting from the DIGE analysis show clear grouping of control subjects and AKI patients. Each dot represents a pool sample made of urine aliquots from 4 individuals. Urine was collected from a total of 20 healthy subjects (C) and 20 patients at three different time points (T1, T2 and T3). Arrows point to individuals showing trend of partial recovery. (B) Standardized Log Abundance found corresponding to protein spots of RBP4 and KNG1. A clear increase in response to AKI was observed for RBP4 and the opposite trend was found for KNG1.

| Protein | T1/C | | T2/C | | T3/C | | 1-ANOVA |
|---------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|---------|
| | T-test | Av.Ratio | T-test | Av.Ratio | T-test | Av.Ratio | |
| KNG1 | 0.001 | -9.13 | 0.009 | -5.57 | 0.07 | -5.76 | 0.0004 |
| RBP4 | 0.0008 | 19.06 | 0.009 | 15.69 | 0.1 | 9.93 | 0.0008 |

Table 2. T-Test and average data values for RBP4 and KNG1 protein spots as main significantly varied proteins over time in response to AKI.

towards normalization, as expected in view of DIGE and SRM data (Fig. 3A). Persistent decrease in KNG1 was observed from T1 (Fig. 3B).

In a further step, patients' response was analyzed individually in view of their recovery. In daily clinical practice a substantial proportion of AKI patients have underlying CKD (30% in our series) as does a significant proportion of the general population (around 10%)¹⁰. Thus, inclusion of CKD patients, as in this study, represents the AKI patients clinicians are dealing with¹¹. Lack of clinical recovery means that CKD may have developed (if there was no prior CKD) or that CKD has progressed (in patients with prior CKD). Both outcomes are associated with impaired vital outcomes, and early prediction of *de novo* or worsening CKD may be equally useful to identify a high risk population that may be enrolled in future clinical trials. In this study, recovery means sCr values ≤ 1.3 mg/dL by T3 for non-CKD patients of returning to basal levels for CKD individuals, according to clinical criteria. Figure 4A represents those patients who clinically recover later than T3 according to sCr values, showing normalized RBP4 values (no significant differences between C and T3) already at T3. Individual response of urinary RBP4 also shows a decreasing trend towards control values after AKI for those patients who recover (Fig. 4B). Patients with sCr(T3) ≤ 1.3 mg/dL already showed RBP4 values close to controls at this time point (Fig. 4B, dashed lines), while in patients who do not recover urinary RBP4 is persistently high (Fig. 4B, insert). These results were further confirmed by ELISA as can be seen in Supplementary Figure 3. RBP4 is, thus, able to show patient's recovery earlier than sCr.

Discussion

The human urinary proteome was here first investigated in the search for significantly altered molecules in response to AKI¹². Prior studies point to the need of defining marker panels preferably than individual diagnostic

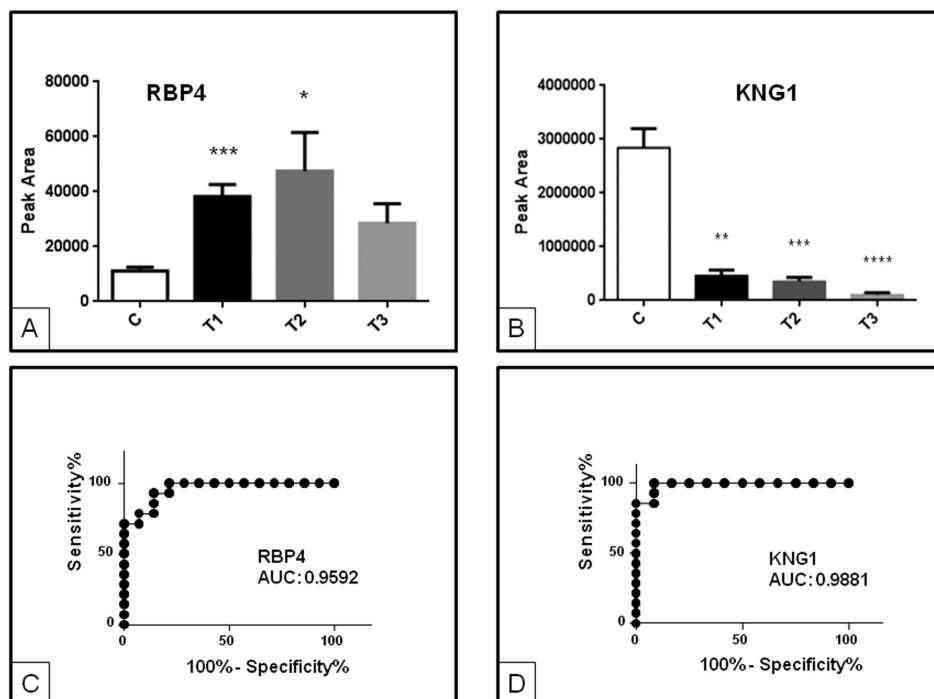


Figure 2. Urinary RBP4 (A) and KNG1 (B) analysis by (SRM)LC-MS/MS. Transitions shown (precursor → fragment) are: 813.48 → 970.60 (RBP4) and 713.70 → 956.0 (KNG1). A different cohort of individuals to that used in DIGE analysis was recruited. Increased urinary levels for RBP4 in response to AKI were confirmed. Error bars show standard error of media. ROC curves showing response to AKI were calculated for RBP4 (C) and KNG1 (D). *p value ≤ 0.05; **p value ≤ 0.01; ***p value ≤ 0.001; ****p value ≤ 0.0001.

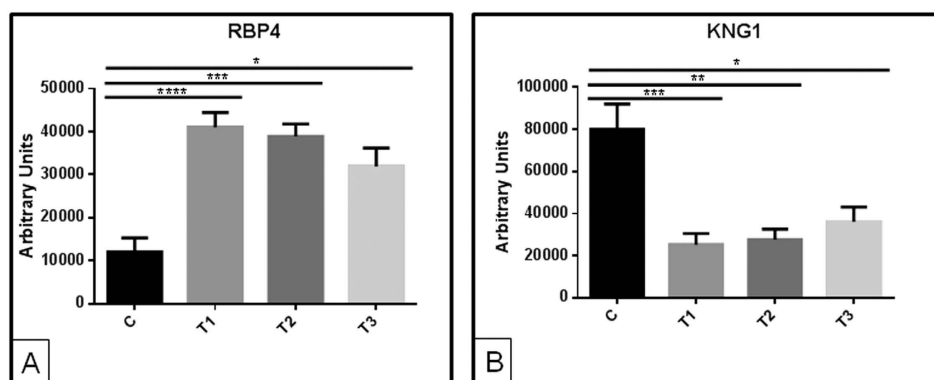


Figure 3. Western blot data for RBP4 performed with individual urine samples. A different cohort of individuals to that used in DIGE analyses was recruited. On average, increased urinary levels for RBP4 (A) and decreased urinary levels for KNG1 (B) in response to AKI was confirmed: graphs show average data for all patients monitored (recovered at any time point or not). *p value ≤ 0.05; **p value ≤ 0.01; ***p value ≤ 0.001; ****p value ≤ 0.0001.

molecules to better assess the complex AKI/CKD syndromes¹³. Proteomics approaches provide non-biased information on the protein changes in a biological fluid as a whole, without pre-selection of potential targets of interest. DIGE technology was chosen here for the discovery phase, based on its proved value as a differential proteomics strategy for proteins quantification in biological samples in the search for markers of disease (cardiovascular disease, kidney disease, cancer and neurodegenerative diseases, among others), by our group and others^{3,14–19}. KNG1 and RBP4 were found here as responders to AKI from the first sample obtained within 48 h of nephrological diagnosis. These data were confirmed in an additional cohort of individuals and prompted the development of a specific mass spectrometry-based quantitative method specifically developed for high-throughput assessment of KNG1 and RBP4 proteins in urine, in a manner which may offer a future reliable quantitative assay which may be

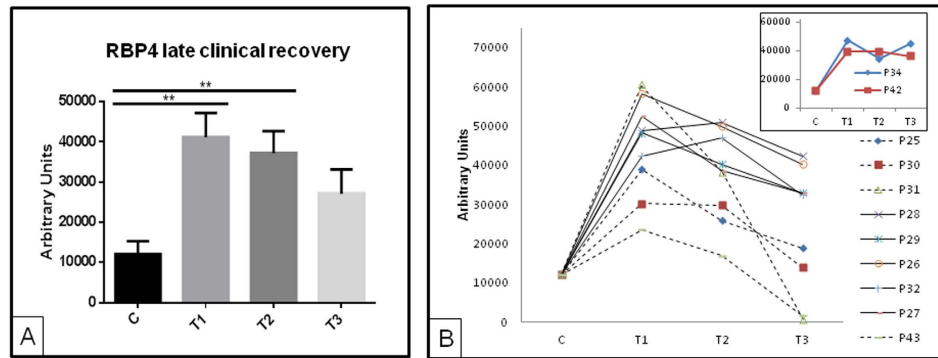


Figure 4. WB data for RBP4 and KNG1 for patients who clinically recovered later than T3 according to sCr. Normalization of RBP4 levels was observed already at T3 on average (A,B) Individual RBP4 responses for those patients monitored at the three time points (solid lines represent patients with sCr(T3) > 1.3 mg/dL and dashed lines represent patients with sCr(T3) ≤ 1.3 mg/dL). Inset shows representative behavior of RBP4 for patients who do not recover. **p value ≤ 0.01.

competitive in the clinical setting. Not only earlier diagnosis but also outcome prediction after an AKI episode is of enormous interest. Insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP-7) was recently identified in urine as a prognostic marker³ and, here, the capacity to anticipate patient's recovery earlier than traditional markers as sCr was further evaluated and confirmed for RBP4.

KNG1 and RBP4 genes were two of the top kidney up-regulated ones in an end stage renal disease (ESRD) mouse model²⁰. We show here a significant decrease in urinary KNG1 in response to AKI. Kininogen is a precursor of kinins from the kallikrein-kinin system. When this cascade is activated, the serine protease kallikrein (tissue or plasma) processes kininogen (low or high molecular weight) to produce vasoactive peptides (e.g. bradykinin (BK)) which are involved in blood pressure regulation, renal and cardiac function and inflammation among other physiological and pathological processes^{21,22}. In a salt-induced hypertension rat model, tissue kallikrein/kinin infusion reversed kidney injury, inflammation and fibrosis²³ pointing to a protective role for this metabolic cascade^{24,25}. In hypertensive subjects, urinary kininogen and kinins were decreased, while excretion of kallikrein was normal. However, in end-stage renal disease, kinins and kallikrein were decreased and a normal excretion of kininogen was found²⁶. In IgA nephropathy patients, urinary kininogen excretion was found significantly different for responders and non-responders to an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE-inhibitor) therapy²⁷, which may be in alignment with the reported variants of kininogen gene influencing individual response to aldosterone²⁸. To our best knowledge, urinary KNG1 has not been directly related to AKI in humans. T-Kininogen was found differentially expressed in rats after cisplatin or ischemia/reperfusion treatment²⁹. In response to streptozotocin-induced diabetes in rats, kininogen, kallikrein, BK levels and BK B1- and B2-receptor expression were decreased in glomeruli and in cultured podocytes, implying a role for kallikrein-kinin system in podocyte apoptosis in diabetic conditions³⁰. Plasma high molecular weight kininogen increased in accordance to progressive renal function worsening in microalbuminuric diabetic patients³¹, the opposite trend to what previously reported in urine. However, plasma kininogen was decreased in biopsy confirmed acute rejection after renal transplantation³², following the same trend that urine kininogen in response to kidney chronic allograft dysfunction³³. These two studies are in consonance with our findings. Despite these studies, the participation and specific role of the molecules constituting the kallikrein-kinin system in a wide variety of clinical contexts are underexplored. Nevertheless, there are enough evidences to propose a link between kininogen expression and kidney injury (e.g. AKI, rejection following transplantation), loss of renal function, hypertension or albuminuria progression.

We also found increased urinary levels of RBP4 in response to AKI. The rise was observed from the first 48 h of nephrological diagnosis and maintained at discharge on average, although individual differences were further explored and confirmed related to recovery. This low molecular weight protein is easily filtered by the glomerulus and reabsorbed for the most part in proximal tubules. It has been proposed as the best indicator of tubular dysfunction, as a minor reduction in tubular function may lead to increased RBP4 excretion. In consequence, urinary RBP4 level has been proposed as the most sensitive biomarker for loss of proximal renal tubule function in humans³⁴. In response to acute kidney allograft injury, RBP levels increased in urine³⁵. In a follow-up study of kidney transplantation prognosis in the following year, RBP predicted graft loss independently of histology and urinary albumin³⁶. Increased levels of RBP4 in diabetic patients with further increased observed in presence of microalbuminuria pointed to an incipient nephropathy in this clinical group³⁷. In this context, RBP4 has been proposed as a marker of risk of developing CKD of macroalbuminuric diabetic nephropathy patients³⁸. Other studies observed altered RBP4 levels in diabetic patients with tubular injury, although it is unclear whether it predicts microalbuminuria development³⁹⁻⁴¹. Related to AKI, there is increasing interest in further investigating the role of RBP4 in early diagnosis. Data shown here give further evidence of the RBP4 (reversible) response to the AKI clinical condition, showing increased urinary RBP4 levels in AKI patients. Furthermore, RBP4 response in urine tends to normalize with time for those patients who progressively recover in terms of sCr, however RBP4

remains persistently high in those patients who do not recover. More importantly, RBP4 responds earlier than sCr does on average and allows monitoring individual response and further predict future recovery.

The coexistence of common mechanisms in different renal disorders with subjacent complex cellular responses taking place simultaneously make the specific identification of biomarkers of AKI, allograft dysfunction, diabetic renal complications or CKD development a real challenge. Some of the proposed biomarkers in the literature are in fact coincident in various diseases⁴².

The use of panels of biomarkers to the detriment of individual molecules should be explored to improve accuracy and specificity. A specific assay for these RBP4 and KNG1 proteins quantitation, based on SRM methodology, was here developed which enormously facilitates feasibility in the clinic in terms of sensitivity and throughput.

One limitation of the study may be the number of recruited subjects, wide distribution for age, diabetes, hypertension or drugs. On the other hand, serum creatinine (sCr) and urinary output are the key clinical tools to define AKI. However, assessment of urinary output is more prone to error, especially in patients without an indwelling bladder catheter⁴³. Thus and in order to reflect daily clinical situation in many non-intensive care units (ICU), we relied on serum creatinine criteria for diagnosis of AKI. DIGE also has known weaknesses to be acknowledged, such as poor coverage of low abundance proteins or very hydrophobic proteins. On the other hand, urine has enormous potential as non-invasive fluid able to reflect changes in renal function or injury, but the variability in protein content may be considerable and this fact implies normalization to e.g. urinary creatinine or total protein content. Finally, real clinical translation of a novel identified marker is so far hampered by significant difficulties. In general, the biomarker pipeline from identification to final implementation should go through several essential process phases: candidate discovery, qualification, verification, research assay optimization, biomarker validation, commercialization and widespread implementation in routine clinical practice^{44,45}. Currently, no novel biomarker has progressed to all those stages in AKI. In particular, AKI occurs in a wide variety of clinical scenarios, thus assessing the real-life performance of a proposed marker implies prior testing of its sensitivity/specificity and capacity of prediction in these various clinical conditions⁴⁶.

Conclusions

Urinary KNG1 and RBP4 clearly respond to AKI. Additionally, RBP4 could predict recovery by monitoring this protein levels over time after AKI, as RBP4 reflects patient's normalization earlier than sCr values do. Further evaluation of KNG1 and RBP4 diagnostic and prognostic value should follow (e.g. in a prospective study where their role in earlier diagnosis could be investigated), alone or in combination with other proposed markers.

Methods

Subjects recruitment and urine samples collection. Urine samples from 55 AKI patients without proteinuria, diagnosed by Nephrology Department staff, were collected at Hospital Valdecilla (Santander, Spain) at three time points: diagnosis within the first 48 h (T1), at 7 days of follow-up (T2) and at Nephrology discharge (T3). AKI was defined and classified according KDIGO criteria⁴⁷. Peak sCr was considered as the highest value of sCr after diagnosis. Recovery was considered, as suggested by ADQI guidelines, when sCr was ≤ 1.3 mg/dL in patients without previous CKD or return to baseline values in case of CKD. Patients were randomized and samples from 20 patients were used in a first discovery phase, and samples from 35 patients were recruited for confirmation studies. Urine samples were also collected from 33 healthy donors (mean age 47.9 ± 12 (26–65), without comorbidities and normal renal function) (20 for the discovery phase and 13 for confirmation). Existence of cardiovascular disease (CVD), CKD, hypertension (HTN) or diabetes mellitus was assessed. Spot urine samples were obtained from a morning random-catch sample, collected in a sterile container, centrifuged to remove cell debris (3000 rpm, 10 min) (Centrifuge Sorvall T6000D), and the supernatant frozen at -80 °C until analysis.

Ethics, consent and permissions. Sample collection procedures were in accordance with the Helsinki declaration and signed informed consent was obtained. Approved consent was obtained from Ethical Committee for Clinical Research from Cantabria (CEIC, Comité de Ética e Investigación Clínica), endorsed by IDIVAL.

Unbiased proteomics analysis by Differential Gel Electrophoresis (DIGE). Differential protein analysis was performed by DIGE (GE Healthcare®). A total of 20 AKI patients and 20 control subjects were used in this first discovery phase, to identify strongest protein alterations in urine in response to AKI. Four individual urine samples from each group were pooled, making a total of 5 pools to be analysed per group (C, T1, T2 and T3). 5 nmol CyDye DIGE Fluor labelling kit (GE Healthcare) was used to label proteins following manufacturer's instructions. Labelled samples were loaded onto IPG strips (24 cm, pH 4–7) and isoelectric focusing (IEF) was carried out in a PROTEAN IEF CELL (BioRad)¹⁴. Second dimension was carried out on 14% running gels using EttanDaltSix System (GE Healthcare). Gels were scanned using a Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare) and spot maps were processed, analyzed and compared using the DeCyder Differential Analysis Software version 6.5 (GE Healthcare). Spot detection and normalized volume ratio calculations were performed in the Differential In-gel Analysis (DIA) module, while gel-to-gel matching and statistical analysis were performed in the Biological Variation Analysis (BVA) module. A first ANOVA test was performed (including FDR) followed by Student's t test for pairs comparisons of the expression data of each spot.

MALDI-TOF Mass Spectrometry identification of candidate markers of AKI. Spots selected for analysis were in-gel reduced, alkylated and digested with trypsin according to Sechi and Chait⁴⁸. Supernatants were spotted onto a matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) target plate. 0.5 μ l of a 3 mg/ml of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix in 0.1% trifluoroacetic acid-50% acetonitrile was added to the dried peptide digest spots. Samples were analyzed using MALDI-time of flight (TOF/TOF) mass spectrometer 4800 plus Proteomics Analyzer (Applied Biosystems. MDS Sciex, Toronto, Canada) and 4000 Series Explorer™ v 3.5 Software (ABSciex). GPS explorer v 3.5 (ABSciex) software was used for spectra analyses and generating peaking

lists. Searches for peptide mass fingerprints, tandem MS spectra and both combined were performed in the NCBI Inr database using Mascot v.2.2 from Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>). In all identified proteins, the probability score was greater than the one fixed by Mascot as being significant, that is, a p value under 0.05.

Urinary RBP4 and KNG1 targeted analysis by Selected Reaction Monitoring (SRM) LC-MS/MS.

As previously published by our group and others^{7,9,49}, we used SRM-LC-MS/MS to validate differential proteins identified in the discovery phase. Urine samples from different individuals' cohorts were used. In particular, 16 patients and 7 healthy subjects were recruited. Urine samples were concentrated and desalted. Total protein content was quantified by Bradford assay and protein samples were reduced, alkylated and digested with sequencing grade trypsin (Roche). Tryptic peptides solutions were cleaned with C18 spin columns (Protea Biosciences) according to manufacturer's instructions and mixed 1:1 with mobile phase A (0.1% formic acid in MilliQ water). A 6460 Triple Quadrupole mass spectrometer was used on-line connected to nano-chromatography in a Chip-format configuration (ChipCube interface, ProtiD Zorbax 300B-C18-5 μ m chip, 43 \times 0.075-mm analytical column and 40 nL enrichment column, Agilent Technologies). The system was controlled by Mass Hunter Software (v4.0 Agilent Technologies). Theoretical SRM transitions were designed using Skyline (v.1.1.0.2905) and peptide specificity was confirmed by protein blast. Only those proteotypic (specific) peptides were selected⁵⁰. In this case, one specific proteotypic peptide was measured per protein, by monitoring two transitions for RBP4 and three transitions for KNG1 (see Supplementary material).

Urinary RBP4 and KNG1 assessment by Western blot and ELISA. A different cohort to that used in the discovery phase was recruited for confirmation of candidate markers by WB. 10 mL urine samples were collected from 23 AKI patients and 13 healthy individuals. The same amount of total protein (10 μ g) total protein was dissolved in Laemmli buffer and loaded per lane in a 12% acrylamide gel (4% stacking). Membranes were blocked with PBS containing 7.5% non-fat dry milk powder and 0.1% Tween-20 for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated for 1 h with specific primary antibody rabbit monoclonal anti-KNG1 (1:5000) (Abcam) or with rabbit monoclonal anti-RBP4 (1:50000) (Abcam) in phosphate buffered saline in Tween-20 (PBS-T) (0.05%) containing 5% non-fat dry milk. Finally, they were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit TrueBlot[®] (1:1000) (Rockland) for KNG1 or HRP-conjugated goat anti-rabbit (1:10000) (Nordic) for RBP4 as secondary antibody, in PBS-T (0.05%) containing 5% non-fat dry milk. Detection was performed by enhanced chemiluminescence (ECL kit; GE Healthcare) following the instructions of the manufacturer. Protein bands were quantified by ImageJ software.

Concentration of RBP4 was additionally measured by ELISA in urine from a cohort of 8 control subjects and 8 AKI patients following manufacturer's instructions (Abcam, ab108897).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using SPSS, v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and GraphPad Prism 6 (version 6.01) software. The Kolmogorov-Smirnov test (KS) was used to assess the normal distribution of clinical variables. Quantitative variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median and interquartile range (IR) for variables with non-normal distribution. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test was calculated and differences were considered significant when p value < 0.05. For receiver operating characteristic (ROC) curve, assessment confidence level was selected as 95% and p value < 0.0001.

References

- Uchino, S. *et al.* Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* **297**, 813–818 (2005).
- Mehta, R. L. *et al.* Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int.* **66**, 1613–1621 (2004).
- Aregger, F. *et al.* Identification of IGFBP-7 by urinary proteomics as a novel prognostic marker in early acute kidney injury. *Kidney Int.* **85**, 909–19 (2014).
- Cruz, D. N. *et al.* ADQI Consensus on AKI Biomarkers and Cardiorenal Syndromes. *Contrib Nephrol* [McCullough, P. A. (ed.)] (Karger, Basel, 2013).
- Thongboonkerd, V. Proteomic analysis of renal diseases: unraveling the pathophysiology and biomarker discovery. *Expert Rev. Proteomics* **2**, 349–366 (2005).
- Konvalinka, A., Scholey, J. W. & Diamandis, E. P. Searching for new biomarkers of renal diseases through proteomics. *Clin. Chem.* **58**, 353–65 (2012).
- Zubiri, I. *et al.* Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *J. Proteomics.* **96**, 92–102 (2014).
- Posada-Ayala, M. *et al.* Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* **85**, 103–11 (2014).
- Martin-Lorenzo, M. *et al.* KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics* **11**, 1056–1067 (2015).
- Otero, A. *et al.* EPIRCE Study Group. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia.* **30**, 78–86 (2010).
- Singh, P. *et al.* Chronic kidney disease: an inherent risk factor for acute kidney injury? *Clin J Am Soc Nephrol.* **5**, 1690–5 (2010).
- Lisowska-Myjak, B. Serum and Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Blood Purif.* **29**, 357–365 (2010).
- De Loor, J. *et al.* How has urinary proteomics contributed to the discovery of early biomarkers of acute kidney injury? *Expert Rev. Proteomics* **11**, 415–424 (2014).
- Martin-Lorenzo, M. *et al.* *Electrophoresis* **35**, 2634–41 (2014).
- Alvarez-Llamas, G. *et al.* A role for the membrane proteome in human chronic kidney disease erythrocytes. *Transl. Res.* **160**, 374–83 (2012).
- de la Cuesta, F. *et al.* A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.003517 (2011).
- Zubiri, I. *et al.* Kidney tissue proteomics reveals regucalcin downregulation in response to diabetic nephropathy with reflection in urinary exosomes. *Transl Res.* **S1931–5244(15)**, 00174–7 (2015).
- Tumani, H. *et al.* 2D DIGE of the cerebrospinal fluid proteome in neurological diseases. *Expert Rev Proteomics.* **7**, 29–38 (2010).

19. Kondo, T. & Hirohashi, S. Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nat Protoc.* **1**, 2940–56 (2006).
20. Schanstra, J. P., Bachvarova, M., Neau, E., Bascands, J. L. & Bachvarov, D. Gene expression profiling in the remnant kidney model of wild type and kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Kidney Int.* **72**, 442–54 (2007).
21. Moreau, M. E. *et al.* The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *J. Pharmacol. Sci.* **99**, 6–38 (2005).
22. Rhaleb, N. E., Yang, X. P. & Carretero, O. A. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. *Compr. Physiol.* **1**, 971–93 (2011).
23. Chao, J. *et al.* Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing. *Biol. Chem.* **391**, 345–55 (2010).
24. Katori, M., Majima, M., Hayashi, I., Fujita, T. & Yamanaka, M. Role of the renal kallikrein-kinin system in the development of salt-sensitive hypertension. *Biol. Chem.* **382**, 61–4 (2001).
25. Chao, J., Bledsoe, G., Yin, H. & Chao, L. The tissue kallikrein-kinin system protects against cardiovascular and renal diseases and ischemic stroke independently of blood pressure reduction. *Biol. Chem.* **387**, 665–75 (2006).
26. Weinberg, M. S., Azar, P., Trebbin, W. M. & Solomon, R. J. The role of urinary kininogen in the regulation of kinin generation. *Kidney Int.* **28**, 975–81 (1985).
27. Rocchetti, M. T. *et al.* Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. *Proteomics* **8**, 206–16 (2008).
28. Barbalic, M., Schwartz, G. L., Chapman, A. B., Turner, S. T. & Boerwinkle, E. Kininogen gene (KNG) variation has a consistent effect on aldosterone response to antihypertensive drug therapy: the GERA study. *Physiol. Genomics* **39**, 56–60 (2009).
29. Zhang, W. *et al.* Identification of nestin as a urinary biomarker for acute kidney injury. *Am. J. Nephrol.* **39**, 110–21 (2014).
30. Kwak, S. J. *et al.* Local kallikrein-kinin system is involved in podocyte apoptosis under diabetic conditions. *Apoptosis* **16**, 478–90 (2011).
31. Merchant, M. L. *et al.* Plasma kininogen and kininogen fragments are biomarkers of progressive renal decline in type 1 diabetes. *Kidney Int.* **83**, 1177–84 (2013).
32. Freue, G. V. C. *et al.* Proteomic Signatures in Plasma during Early Acute Renal Allograft Rejection. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1954–1967 (2010).
33. Quintana, L. F. *et al.* Application of Label-free Quantitative Peptidomics for the Identification of Urinary Biomarkers of Kidney Chronic Allograft Dysfunction. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1658–1673 (2009).
34. Norden, A. G., Lapsley, M. & Unwin, R. J. Urine retinol-binding protein 4: a functional biomarker of the proximal renal tubule. *Adv. Clin. Chem.* **63**, 85–122 (2014).
35. Zhang, R. *et al.* Urine free light chains as a novel biomarker of acute kidney allograft injury. *Clin. Transplant.* **27**, 953–60 (2013).
36. Amer, H. *et al.* Urine high and low molecular weight proteins one-year post-kidney transplant: relationship to histology and graft survival. *Am. J. Transplant.* **13**, 676–84 (2013).
37. Raila, J. *et al.* Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney Int.* **72**, 505–11 (2007).
38. Titan, S. M. *et al.* Urinary MCP-1 and RBP: independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy. *J. Diabetes Complications* **26**, 546–53 (2012).
39. Soggiu, A. *et al.* A discovery-phase urine proteomics investigation in type 1 diabetes. *Acta Diabetol.* **49**, 453–64 (2012).
40. Riaz, S. *et al.* Proteomic identification of human urinary biomarkers in diabetes mellitus type 2. *Diabetes Technol Ther.* **12**, 979–88 (2010).
41. Schultz, C. J. *et al.* Markers of renal tubular dysfunction measured annually do not predict risk of microalbuminuria in the first few years after diagnosis of Type 1 diabetes. *Diabetologia* **44**, 224–229 (2001).
42. Varghese, S. A. *et al.* Identification of Diagnostic Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury. *J. Investig. Med.* **58**, 612–620 (2010).
43. Ruiz-Criado, J. *et al.* Long-Term Mortality among Hospitalized Non-ICU Patients with Acute Kidney Injury Referred to Nephrology. *Nephron* **131**, 23–33 (2015).
44. Rifai, N. *et al.* Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* **24**, 971–83 (2006).
45. Mischak, H. *et al.* Implementation of proteomic biomarkers: making it work. *Eur J Clin Invest.* **42**, 1027–36 (2012).
46. Konvalinka, A. Urine proteomics for acute kidney injury prognosis: another player and the long road ahead. *Kidney Int.* **85**, 735–8 (2014).
47. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int. Suppl.* **2**, 1–138 (2012).
48. Sechi, S. & Chait, B. T. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* **70**, 5150–8 (1998).
49. Picotti, P. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Methods* **9**, 555–66 (2012).
50. MacLean, B. *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–8 (2010).

Acknowledgements

Funding: from Instituto de Salud Carlos III: FIS PI11/01401, PI13/01873, FIS IF08/3667-1, CP09/00229, PI13/00047, PI10/00624, ISCIII-RETIC REDinREN RD012/0021. FEDER funds, Comunidad de Madrid/CIFRA S2010/BMD-2378, Programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCIII/Agencia Lain-Entralgo/CM) to AO, IDCSalud (3371/002) and Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, Proteomic Facility from Universidad Complutense de Madrid-Fundación Parque Científico de Madrid (UCM-FPCM), Spain, a member of ProteoRed-ISCIII Network.

Author Contributions

L.G.C. carried out the DIGE. and SRM experiments, performed statistical analysis and drafted the manuscript, M.M.L. carried out the SRM experiments and drafted the manuscript, A.R.B. participated in recruitment and patients' classification and data interpretation, J.R.C. participated in recruitment and patients' classification, A.S.M. carried out the WB experiments, A.O. participated in manuscript drafting and data interpretation, C.G.A. participated in the conception and design of the study, data interpretation and manuscript drafting, M.A. participated in the conception and design of the study, data interpretation and acquisition of funding, F.V. participated in manuscript drafting and data interpretation, G.A.L. performed statistical analysis, drafted the

manuscript, participated in the study design, acquisition of funding and general supervision. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Gonzalez-Calero, L. *et al.* Urinary Kininogen-1 and Retinol binding protein-4 respond to Acute Kidney Injury: predictors of patient prognosis? *Sci. Rep.* **6**, 19667; doi: 10.1038/srep19667 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ANEXO 6

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression.

Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

Cardiovasc Diabetol 2016; 15: 8. doi:10.1186/s12933-016-0331-7

Urinary Kininogen-1 and Retinol binding protein-4 respond to Acute Kidney Injury: predictors of patient prognosis?

Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Ramos-Barron A, Ruiz-Criado J, Maroto AS, Ortiz A, Gomez-Alamillo C, Arias M, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

Sci Rep 2016; 6: 19667.

Urine 2DE proteome analysis in healthy condition and kidney disease.

Marta Martin-Lorenzo*, **Laura Gonzalez-Calero***, Irene Zubiri , Diaz-Payno PJ, Aroa Sanz-Maroto , Maria Posada-Ayala , Alberto Ortiz, Fernando Vivanco, Gloria Alvarez-Llamas.

Electrophoresis 2014; 35: 2634–2641.

Exosomes: a potential key target in cardio-renal syndrome.

Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Alvarez-Llamas G.

Front Immunol 2014; 5: 465. doi:10.3389/fimmu.2014.00465

Hypertensive patients exhibit an altered metabolism. A specific metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression

Laura Gonzalez-Calero, Marta Martin-Lorenzo, Paula J. Martínez, Montserrat Baldan-Martin, Gema Ruiz-Hurtado Julian Segura Fernando de la Cuesta Maria G Barderas Luis M Ruilope Fernando Vivanco Gloria Alvarez-Llamas

Translational Research 2016

Urinary exosomes reveal protein signatures in hypertensive patients with resistant albuminuria.

Laura Gonzalez-Calero, Paula J. Martínez, Marta Martin-Lorenzo, Montserrat Baldan-Martin, Gema Ruiz-Hurtado, Fernando de la Cuesta, Eva Calvo, Julian Segura, Juan Antonio Lopez, Jesús Vázquez, Maria G. Barderas, Luis M Ruilope, Fernando Vivanco, Gloria Alvarez-Llamas.

Hypertension

PARTICIPACION EN PUBLICACIONES DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO

Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics.

Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG.

Int J Cardiol 2015; 196: 170–7. doi:10.1016/j.ijcard.2015.05.148

Plasma Molecular Signatures in Hypertensive Patients With Renin-Angiotensin System Suppression: New Predictors of Renal Damage and De Novo Albuminuria Indicators.

Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, Moreno-Luna R, Sastre-Oliva T, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruilope LM, Cuesta F de la, Barderas MG.

Hypertension (e-pub ahead of print 2016).

Molecular anatomy of ascending aorta in atherosclerosis by MS Imaging: Specific lipid and protein patterns reflect pathology.

Martin-Lorenzo M, Balluff B, Maroto AS, Carreira RJ, van Zeijl RJM, Gonzalez-Calero L, de la Cuesta F, Barderas MG, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, McDonnell LA, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

J Proteomics 2015; 126: 245–51.

Lipid and protein maps defining arterial layers in atherosclerotic aorta.

Martin-Lorenzo M, Balluff B, Maroto AS, Carreira RJ, van Zeijl RJM, Gonzalez-Calero L, de la Cuesta F, Barderas MG, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, McDonnell LA, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

Data Br 2015; 4: 328–31. doi:10.1016/j.dib.2015.06.005

Molecular anatomy of ascending aorta in atherosclerosis by MS Imaging: Specific lipid and protein patterns reflect pathology.

Martin-Lorenzo M, Balluff B, Maroto AS, Carreira RJ, van Zeijl RJM, Gonzalez-Calero L, de la Cuesta F, Barderas MG, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, McDonnell LA, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

J Proteomics 2015; 126: 245–251.

Cytoskeleton deregulation and impairment in amino acids and energy metabolism in early atherosclerosis at aortic tissue with reflection in plasma.

Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Maroto AS, Martinez PJ, Zubiri I, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Barderas MG, Heredero A, Aldamiz-Echevarría G, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

Biochim Biophys Acta 2015; 1862: 725–732. doi:10.1016/j.bbadis.2015.12.006

KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery.

Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto AS, Gonzalez-Calero L, Posada-Ayala M, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Lopez-Almodovar LF, Calvo-Bonacho E, Ruilope LM, Padial LR, Barderas MG, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

Metabolomics 2015; 11: 1056–1067. doi:10.1007/s11306-014-0761-8

Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease.

Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-lorenzo M, Sanz-maroto A, Molero D, Gonzalez-calero L, Fernandez-fernandez B, Cuesta F De, Laborde CM, Barderas MG, Ortiz A, Vivanco F, Alvarez-llamas G.

Kidney Int 2014; 85: 103–111. doi:10.1038/ki.2013.328

Kidney tissue proteomics reveals regucalcin downregulation in response to diabetic nephropathy with reflection in urinary exosomes.

Zubiri I, Posada-Ayala M, Benito-Martin A, Maroto AS, Martin-Lorenzo M, Cannata-Ortiz P, de la Cuesta F, Gonzalez-Calero L, Barderas MG, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

Transl Res 2015; 166: 474–484.e4. doi:10.1016/j.trsl.2015.05.007

Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis.

Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, Calvo E, Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, de la Cuesta F, Lopez JA, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.

J Proteomics 2014; 96: 92–102. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.037.

Bibliografía

- [1] G. Mancia, R. Fagard, K. Narkiewicz, J. Redon, A. Zanchetti, M. B??hm, T. Christiaens, R. Cifkova, G. De Backer, A. Dominiczak, M. Galderisi, D. E. Grobbee, T. Jaarsma, P. Kirchhof, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, A. J. Manolis, P. M. Nilsson, L. M. Ruilope, R. E. Schmieder, P. A. Sirnes, P. Sleight, M. Viigimaa, B. Waeber, F. Zannad, M. Burnier, E. Ambrosioni, M. Caulfield, A. Coca, M. H. Olsen, C. Tsioufis, P. Van De Borne, J. L. Zamorano, S. Achenbach, H. Baumgartner, J. J. Bax, H. Bueno, V. Dean, C. Deaton, C. Erol, R. Ferrari, D. Hasdai, A. W. Hoes, J. Knuuti, P. Kolh, P. Lancellotti, A. Linhart, P. Nihoyannopoulos, M. F. Piepoli, P. Ponikowski, J. L. Tamargo, M. Tendera, A. Torbicki, W. Wijns, S. Windecker, D. L. Clement, T. C. Gillebert, E. A. Rosei, S. D. Anker, J. Bauersachs, J. B. Hitij, M. Caulfield, M. De Buyzere, S. De Geest, G. A. Derumeaux, S. Erdine, C. Farsang, C. Funck-Brentano, V. Gerc, G. Germano, S. Gielen, H. Haller, J. Jordan, T. Kahan, M. Komajda, D. Lovic, H. Mahrholdt, J. Ostergren, G. Parati, J. Perk, J. Polonia, B. A. Popescu, ??eljko Reiner, L. Ryd??n, Y. Sirenko, A. Stanton, H. Struijker-Boudier, C. Vlachopoulos, M. Volpe, and D. A. Wood, "2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)," *Eur. Heart J.*, vol. 34, no. 28, pp. 2159–2219, 2013.
- [2] Center for Disease Control, "High blood pressure Fact Sheet," *CDC*, vol. 179, no. February, pp. 1–2, 2015.
- [3] N. R. Poulter, D. Prabhakaran, and M. Caulfield, "Hypertension," *Lancet*, vol. 386, no. 9995, pp. 801–812, 2015.
- [4] N. R. C. Campbell, D. T. Lackland, L. Lisheng, M. L. Niebylski, P. M. Nilsson, and X. H. Zhang, "Using the Global Burden of Disease Study to Assist Development of Nation-Specific Fact Sheets to Promote Prevention and Control of Hypertension and Reduction in Dietary Salt: A Resource From the World Hypertension League," *J. Clin. Hypertens.*, vol. 17, no. 3, pp. 165–167, 2015.
- [5] D. Lloyd-Jones, R. J. Adams, T. M. Brown, M. Carnethon, S. Dai, G. De Simone, T. B. Ferguson, E. Ford, K. Furie, C. Gillespie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, P. M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, M. Mussolino, G. Nichol, V. L. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, R. Stafford, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. D. Wong, and J. Wylie-Rosett, "Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2010 update: A report from the american heart association," *Circulation*, vol. 121, no. 7, 2010.
- [6] OMS, "Información general sobre la HIPER - TENSIÓN en el mundo," *Organ. Mund. La Salud*, p. 40, 2013.
- [7] L. M. Ruilope, "Current challenges in the clinical management of hypertension," *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 9, no. 5, pp. 267–275, 2011.
- [8] B. A. Vakili, P. M. Okin, and R. B. Devereux, "Prognostic implications of left ventricular hypertrophy," *Am. Heart J.*, vol. 141, no. 3, pp. 334–341, 2001.
- [9] R. Dhingra, J. M. Gaziano, and L. Djoussé, "Chronic kidney disease and the risk of heart failure in men," *Circ. Hear. Fail.*, vol. 4, no. 2, pp. 138–144, 2011.
- [10] M. E. Safar and G. M. London, "Arterial and venous compliance in sustained essential hypertension," *Hypertension*, vol. 10, no. 2, pp. 133–139, 1987.
- [11] H. A. Struijker Boudier, J. L. le Noble, M. W. Messing, M. S. Huijberts, F. A. le Noble, and H. van Essen, "The microcirculation and hypertension," *J. Hypertens. Suppl.*, vol. 10, no. 7, pp. S147–56, Dec. 1992.
- [12] D. Versari, E. Daghini, A. Viridis, L. Ghiadoni, and S. Taddei, "Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 157, no. 4, pp. 527–536, 2009.
- [13] C. Marchesi, P. Paradis, and E. L. Schiffrin, "Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 29, no. 7, pp. 367–374, 2008.
- [14] S. J. Ziemann, V. Melenovsky, and D. A. Kass, "Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 5, pp. 932–943, 2005.
- [15] L. G. Navar, "COUNTERPOINT: ACTIVATION OF THE INTRARENAL RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IS THE DOMINANT CONTRIBUTOR TO SYSTEMIC HYPERTENSION," *J Appl Physiol*, vol. 109, no. February, pp. 454–456, 2010.

- [16] W. G. McMaster, A. Kirabo, M. S. Madhur, and D. G. Harrison, "Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage," *Circ. Res.*, vol. 116, no. 6, pp. 1022–1033, 2015.
- [17] A. H. Gradman, "Evolving understanding of the renin-angiotensin-aldosterone system: Pathophysiology and targets for therapeutic intervention," *Am. Heart J.*, vol. 157, no. 6 SUPPL., pp. S1–S6, 2009.
- [18] M. M. Givertz, "Manipulation of the Renin-Angiotensin System," *Circulation.*, vol. 104, no. July, pp. 14–18, 2001.
- [19] S. Oparil and R. E. Schmieder, "New Approaches in the Treatment of Hypertension," *Circ. Res.*, vol. 116, no. 6, pp. 1074–1095, 2015.
- [20] M. H. Drazner, "The progression of hypertensive heart disease," *Circulation*, vol. 123, no. 3, pp. 327–334, 2011.
- [21] T. Semlitsch, K. Jeitler, A. Berghold, K. Horvath, N. Posch, S. Poggenburg, and A. Siebenhofer, "Long-term effects of weight-reducing diets in people with hypertension.," *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. 3, p. CD008274, Mar. 2016.
- [22] N. J. Brown and D. E. Vaughan, "Cardiovascular Drugs," *Circulation*, vol. 97, pp. 1411–1420, 1998.
- [23] M. Burner and H. Brunner, "Angiotensin II receptor antagonists.," *Lancet*, vol. 355, no. 9204, pp. 637–45, 2000.
- [24] M. de Gasparo, U. Joss, H. P. Ramjoué, S. E. Whitebread, H. Haenni, L. Schenkel, C. Kraehenbuehl, M. Biollaz, J. Grob, and J. Schmidlin, "Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 240, no. 2, pp. 650–6, Feb. 1987.
- [25] A. H. Gradman and R. Kad, "Renin Inhibition in Hypertension," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 519–528, 2008.
- [26] L. Te Riet, J. H. M. Van Esch, A. J. M. Roks, A. H. Van Den Meiracker, and A. H. J. Danser, "Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations," *Circ. Res.*, vol. 116, no. 6, pp. 960–975, 2015.
- [27] D. F. Márquez, G. Ruiz-Hurtado, L. M. Ruilope, and J. Segura, "An update of the blockade of the renin angiotensin aldosterone system in clinical practice," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 16, no. 15, pp. 2283–2292, 2015.
- [28] L. M. Ruilope and G. L. Bakris, "Renal function and target organ damage in hypertension," *Eur. Heart J.*, vol. 32, no. 13, pp. 1599–1604, 2011.
- [29] L. M. Ruilope and R. E. Schmieder, "Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients.," *Am. J. Hypertens.*, vol. 21, no. 5, pp. 500–508, 2008.
- [30] C. Cerezo, L. M. Ruilope, J. Segura, J. A. Garcia-Donaire, J. J. de la Cruz, J. R. Banegas, B. Waeber, T. J. Rabelink, and F. H. Messerli, "Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression.," *J. Hypertens.*, vol. 30, no. 1, pp. 204–9, Jan. 2012.
- [31] F. Gustafsson, J. Segura, and L. M. Ruilope, "How should we manage heart failure developing in patients already treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers for hypertension, diabetes or coronary disease?," *J. Hypertens.*, vol. 28, pp. 1595–1598, 2010.
- [32] W. B. Kannel, "Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment.," *Jama*, vol. 275, no. 20, pp. 1571–6, 1996.
- [33] K. Matsushita, M. van der Velde, B. C. Astor, M. Woodward, and A. S. Levey, "Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality: a collaborative meta-analysis of general population cohorts," *Lancet*, vol. 375, no. 9731, pp. 2073–2081, 2010.
- [34] G. Crippa, "Microalbuminuria in essential hypertension.," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 16, no. 1, pp. 74–77, 2002.
- [35] A. H. Abdelhafiz, S. Ahmed, and M. El Nahas, "Microalbuminuria: Marker or maker of cardiovascular disease," *Nephron - Exp. Nephrol.*, vol. 119, no. SUPPL. 1, 2011.
- [36] P. E. de Jong, R. T. Gansevoort, and S. J. L. Bakker, "Macroalbuminuria and microalbuminuria:\ndo both predict renal and cardiovascular events\nwith similar strength?," *J Nephrol*, vol. 20, pp. 375–380, 2007.

- [37] X. Kong, X. Jia, Y. Wei, M. Cui, Z. Wang, L. Tang, W. Li, Z. Zhu, P. Chen, and D. Xu, "Association between microalbuminuria and subclinical atherosclerosis evaluated by carotid artery intima-media in elderly patients with normal renal function," *BMC Nephrol.*, vol. 13, p. 37, 2012.
- [38] J. Ärnlöv, J. C. Evans, J. B. Meigs, T. J. Wang, C. S. Fox, D. Levy, E. J. Benjamin, R. B. D'Agostino, and R. S. Vasan, "Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: The framingham heart study," *Circulation*, vol. 112, no. 7, pp. 969–975, 2005.
- [39] S. Blecker, K. Matsushita, A. Kttgen, L. R. Loehr, A. G. Bertoni, L. E. Boulware, and J. Coresh, "High-normal albuminuria and risk of heart failure in the community," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 58, no. 1, pp. 47–55, 2011.
- [40] D. B. Sacks, M. Arnold, G. L. Bakris, D. E. Bruns, A. R. Horvath, M. S. Kirkman, A. Lernmark, B. E. Metzger, and D. M. Nathan, "Position statement executive summary: Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 34, no. 6, pp. 1419–1423, 2011.
- [41] S. Snyder and B. Pendergraph, "Detection and evaluation of chronic kidney disease.," *Am. Fam. Physician*, vol. 72, no. 9, pp. 1723–1740, 2005.
- [42] G. L. Bakris and M. Molitch, "Microalbuminuria as a risk predictor in diabetes: The continuing saga," *Diabetes Care*, vol. 37, no. 3, pp. 867–875, 2014.
- [43] T. Sehestedt, J. Jeppesen, T. W. Hansen, K. Wachtell, H. Ibsen, C. Torp-Petersen, P. Hildebrandt, and M. H. Olsen, "Risk prediction is improved by adding markers of subclinical organ damage to SCORE," *Eur. Heart J.*, vol. 31, no. 7, pp. 883–891, 2010.
- [44] M. Volpe, A. Battistoni, G. Tocci, E. A. Rosei, A. L. Catapano, R. Coppo, S. del Prato, S. Gentile, E. Mannarino, S. Novo, D. Prisco, and G. Mancia, "Cardiovascular risk assessment beyond Systemic Coronary Risk Estimation: a role for organ damage markers," *J Hypertens*, vol. 30, no. 6, pp. 1056–1064, 2012.
- [45] J. M. Pascual, E. Rodilla, J. A. Costa, M. Garcia-Esrich, C. Gonzalez, and J. Redon, "Prognostic value of microalbuminuria during antihypertensive treatment in essential hypertension," *Hypertension*, vol. 64, no. 6, pp. 1228–1234, 2014.
- [46] G. Mancia, G. De Backer, A. Dominiczak, R. Cifkova, R. Fagard, G. Germano, G. Grassi, A. M. Heagerty, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, K. Narkiewicz, L. Ruilope, A. Rynkiewicz, R. E. Schmieder, H. a J. S. Boudier, A. Zanchetti, A. Vahanian, J. Camm, R. De Caterina, V. Dean, K. Dickstein, G. Filippatos, C. Funck-Brentano, I. Hellems, S. D. Kristensen, K. McGregor, U. Sechtem, S. Silber, M. Tendera, P. Widimsky, J. L. Zamorano, S. Erdine, W. Kiowski, E. Agabiti-Rosei, E. Ambrosioni, L. H. Lindholm, M. Viigimaa, S. Adamopoulos, E. Agabiti-Rosei, E. Ambrosioni, V. Bertomeu, D. Clement, S. Erdine, C. Farsang, D. Gaita, G. Lip, J.-M. Mallion, A. J. Manolis, P. M. Nilsson, E. O'Brien, P. Ponikowski, J. Redon, F. Ruschitzka, J. Tamargo, P. van Zwieten, B. Waeber, and B. Williams, "2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).," *J. Hypertens.*, vol. 25, no. 6, pp. 1105–1187, 2007.
- [47] American Diabetes Association, "Executive summary: Standards of medical care in diabetes--2010.," *Diabetes Care*, vol. 33 Suppl 1, pp. 4–10, 2010.
- [48] P. E. de Jong and R. T. Gansevoort, "Albuminuria in non-primary renal disease: risk marker rather than risk factor.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 25, no. 3, pp. 656–8, 2010.
- [49] M. J. Pena, H. J. Lambers Heerspink, M. E. Hellemons, T. Friedrich, G. Dallmann, M. Lajer, S. J. L. Bakker, R. T. Gansevoort, P. Rossing, D. de Zeeuw, and S. S. Roscioni, "Urine and plasma metabolites predict the development of diabetic nephropathy in individuals with Type 2 diabetes mellitus," *Diabet. Med.*, vol. 31, no. 9, pp. 1138–1147, 2014.
- [50] M. E. Hellemons, M. Mazagova, R. T. Gansevoort, R. H. Henning, D. De Zeeuw, S. J. L. Bakker, H. J. Lambers-Heerspink, and L. E. Deelman, "Growth-differentiation factor 15 predicts worsening of albuminuria in patients with type 2 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 35, no. 11, pp. 2340–2346, 2012.
- [51] E. O. Kern, P. Erhard, W. Sun, S. Genuth, and M. F. Weiss, "Early Urinary Markers of Diabetic Kidney Disease: A Nested Cause-Control Study From the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 55, no. 5, pp. 824–834, 2010.

- [52] S. S. Roscioni, D. De Zeeuw, M. E. Hellemons, H. Mischak, P. Zürlbig, S. J. L. Bakker, R. T. Gansevoort, H. Reinhard, F. Persson, M. Lajer, P. Rossing, and H. J. L. Heerspink, "A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus," *Diabetologia*, vol. 56, no. 2, pp. 259–267, 2013.
- [53] G. Mancia, G. De Backer, A. Dominiczak, R. Cifkova, R. Fagard, G. Germano, G. Grassi, A. M. Heagerty, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, K. Narkiewicz, L. Ruilope, A. Rynkiewicz, R. E. Schmieder, H. A. J. Struijker Boudier, and A. Zanchetti, "2007 Guidelines for the management of arterial hypertension," *Eur. Heart J.*, vol. 28, no. 12, pp. 1462–1536, 2007.
- [54] National Kidney Foundation, *K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*, vol. 39. 2002.
- [55] P. Ruggenenti, A. Fassi, A. P. Ilieva, S. Bruno, I. P. Iliev, V. Brusegan, N. Rubis, G. Gherardi, F. Arnoldi, M. Ganeva, B. Ene-Iordache, F. Gaspari, A. Perna, A. Bossi, R. Trevisan, A. R. Dodesini, and G. Remuzzi, "Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes," *N Engl J Med*, vol. 351, no. 19, pp. 1941–1951, 2004.
- [56] W. C.ushman, G. W. Evans, R. P. Byington, D. C. Goff, R. H. Grimm, J. A. Cutler, D. G. Simons-Morton, J. N. Basile, M. A. Corson, J. L. Probstfield, L. Katz, K. A. Peterson, W. T. Friedewald, J. B. Buse, J. T. Bigger, H. C. Gerstein, and F. Ismail-Beigi, "Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, no. 17, pp. 1575–85, 2010.
- [57] A. I. Adler, R. J. Stevens, S. E. Manley, R. W. Bilous, C. A. Cull, and R. R. Holman, "Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64)," *Kidney Int*, vol. 63, no. 1, pp. 225–232, 2003.
- [58] C. Cerezo, J. Segura, M. Praga, and L. M. Ruilope, "Guidelines updates in the treatment of obesity or metabolic syndrome and hypertension," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 15, no. 3, pp. 196–203, 2013.
- [59] M. P. W. Smith, R. E. Banks, S. L. Wood, A. J. P. Lewington, and P. J. Selby, "Application of proteomic analysis to the study of renal diseases.," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 5, no. 12, pp. 701–12, 2009.
- [60] A. Konvalinka, J. W. Scholey, and E. P. Diamandis, "Searching for new biomarkers of renal diseases through proteomics," *Clin. Chem.*, vol. 58, no. 2, pp. 353–365, 2012.
- [61] Y. M. Gu, L. Thijs, Y. P. Liu, Z. Zhang, L. Jacobs, T. Koeck, P. Zürlbig, R. Lichtinghagen, K. Brand, T. Kuznetsova, L. Olivi, P. Verhamme, C. Delles, H. Mischak, and J. A. Staessen, "The urinary proteome as correlate and predictor of renal function in a population study," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 29, no. 12, pp. 2260–2268, 2014.
- [62] C. Delles, U. Neisius, and D. M. Carty, "Proteomics in hypertension and other cardiovascular diseases," *Ann. Med.*, vol. 44, no. S1, pp. S55–S64, 2012.
- [63] G. Alvarez-Llamas, F. de la Cuesta, M. E. G. Barderas, V. Darde, L. R. Padial, and F. Vivanco, "Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective.," *Expert Rev. Proteomics*, vol. 5, no. 5, pp. 679–691, 2008.
- [64] M. G. Barderas, C. M. Laborde, M. Posada, F. de la Cuesta, I. Zubiri, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 790132, 2011.
- [65] M. G. Barderas, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "Vascular Proteomics: Methods and Protocols," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1000, 2013.
- [66] D. T. Miller, P. M. Ridker, P. Libby, and D. J. Kwiatkowski, "Atherosclerosis. The Path From Genomics to Therapeutics," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 49, no. 15, pp. 1589–1599, 2007.
- [67] G. D. Lewis and R. E. Gerszten, "Toward metabolomic signatures of cardiovascular disease," *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 3, no. 2, pp. 119–121, 2010.
- [68] S. N. Goonewardena, L. E. Prevette, and A. A. Desai, "Metabolomics and Atherosclerosis," *Curr Atheroscler Rep*, vol. 12, no. 4, pp. 267–272, 2010.
- [69] S. B. Nikolic, J. E. Sharman, M. J. Adams, and L. M. Edwards, "Metabolomics in hypertension.," *J. Hypertens.*, vol. 32, no. 6, pp. 1159–69, 2014.
- [70] M. Martin-Lorenzo, I. Zubiri, A. S. Maroto, L. Gonzalez-Calero, M. Posada-Ayala, F. de la Cuesta, L. Mourino-Alvarez, L. F. Lopez-Almodovar, E. Calvo-Bonacho, L. M. Ruilope, L. R. Padial, M. G.

- Barderas, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery.," *Metabolomics*, vol. 11, no. 5, pp. 1056–1067, Jan. 2015.
- [71] M. Posada-Ayala, I. Zubiri, M. Martin-lorenzo, A. Sanz-maroto, D. Molero, L. Gonzalez-calero, B. Fernandez-fernandez, F. De Cuesta, C. M. Laborde, M. G. Barderas, A. Ortiz, F. Vivanco, and G. Alvarez-llamas, "Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease," *Kidney Int.*, vol. 85, no. 1, pp. 103–111, 2014.
- [72] D. Fliser, J. Novak, V. Thongboonkerd, A. Argiles, V. Jankowski, M. A. Girolami, J. Jankowski, and H. Mischak, "Advances in Urinary Proteome Analysis and Biomarker Discovery," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 4, pp. 1057–1071, 2007.
- [73] S. A. Varghese, T. B. Powell, M. N. Budisavljevic, J. C. Oates, J. R. Raymond, J. S. Almeida, and J. M. Arthur, "Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 3, pp. 913–22, 2007.
- [74] I. Zubiri, M. Posada-Ayala, A. Sanz-Maroto, E. Calvo, M. Martin-Lorenzo, L. Gonzalez-Calero, F. de la Cuesta, J. A. Lopez, B. Fernandez-Fernandez, A. Ortiz, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis.," *J. Proteomics*, vol. 96, pp. 92–102, Jan. 2014.
- [75] I. Zubiri, M. Posada-Ayala, A. Benito-Martin, A. S. Maroto, M. Martin-Lorenzo, P. Cannata-Ortiz, F. de la Cuesta, L. Gonzalez-Calero, M. G. Barderas, B. Fernandez-Fernandez, A. Ortiz, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "Kidney tissue proteomics reveals regucalcin downregulation in response to diabetic nephropathy with reflection in urinary exosomes.," *Transl. Res.*, vol. 166, no. 5, pp. 474–484.e4, Nov. 2015.
- [76] K. Rossing, H. Mischak, M. Dakna, P. Zürgbig, J. Novak, B. a Julian, D. M. Good, J. J. Coon, L. Tarnow, and P. Rossing, "Urinary proteomics in diabetes and CKD.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 19, no. 7, pp. 1283–90, 2008.
- [77] L. Gonzalez-Calero, M. Martin-Lorenzo, A. Ramos-Barron, J. Ruiz-Criado, A. S. Maroto, A. Ortiz, C. Gomez-Alamillo, M. Arias, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "Urinary Kininogen-1 and Retinol binding protein-4 respond to Acute Kidney Injury: predictors of patient prognosis?," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 19667, Jan. 2016.
- [78] V. Thongboonkerd, E. Gozal, L. R. Sachleben, J. M. Arthur, W. M. Pierce, J. Cai, J. Chao, M. Bader, J. B. Pesquero, D. Gozal, and J. B. Klein, "Proteomic analysis reveals alterations in the renal kallikrein pathway during hypoxia-induced hypertension," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 38, pp. 34708–34716, 2002.
- [79] J. D. Reid, D. T. Holmes, D. R. Mason, B. Shah, and C. H. Borchers, "Towards the Development of an Immuno MALDI (iMALDI) Mass Spectrometry Assay for the Diagnosis of Hypertension," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 10, pp. 1680–1686, 2010.
- [80] T. Grussenmeyer, S. Meili-Butz, V. Roth, T. Dieterle, M. Brink, B. Winkler, P. Matt, T. P. Carrel, F. S. Eckstein, I. Lefkovits, and M. T. R. Grapow, "Proteome analysis in cardiovascular pathophysiology using Dahl rat model," *J. Proteomics*, vol. 74, no. 5, pp. 672–682, 2011.
- [81] X. Jin, L. Xia, L. S. Wang, J. Z. Shi, Y. Zheng, W. L. Chen, L. Zhang, Z. G. Liu, G. Q. Chen, and N. Y. Fang, "Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats," *Proteomics*, vol. 6, no. 6, pp. 1948–1956, 2006.
- [82] L. Liu, W. Wang, X. Meng, J. Gao, H. Wu, P. Wang, W. Wu, L. Wang, L. Ma, and W. Zhang, "Left ventricular hypertrophy induced by abdominal aortic banding and its prevention by angiotensin receptor blocker telmisartan—a proteomic analysis.," *J. Physiol. Biochem.*, vol. 66, pp. 329–338, 2010.
- [83] J. Gallego-Delgado, A. Lazaro, J. I. Osende, V. Esteban, M. G. Barderas, C. Gomez-Guerrero, R. Vega, F. Vivanco, and J. Egido, "Proteomic analysis of early left ventricular hypertrophy secondary to hypertension: modulation by antihypertensive therapies.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 12 Suppl 3, pp. S159–64, 2006.
- [84] S. Delbosc and M. Haloui, "<Title/>," *Mol. Med.*, vol. 14, no. 7–8, p. 1, 2008.
- [85] D. M. Carty, J. Siwy, J. E. Brennand, P. Z??rbig, W. Mullen, J. Franke, J. W. McCulloch, R. A. North, L. C. Chappell, H. Mischak, L. Poston, A. F. Dominiczak, and C. Delles, "Urinary proteomics for prediction of preeclampsia," *Hypertension*, vol. 57, no. 3 PART 2, pp. 561–569, 2011.

- [86] "Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 183, no. 1, pp. 1–22, 2000.
- [87] V. Matafora, L. Zagato, M. Ferrandi, I. Molinari, G. Zerbini, N. Casamassima, C. Lanzani, S. Delli Carpini, F. Trepiccione, P. Manunta, A. Bachi, and G. Capasso, "Quantitative proteomics reveals novel therapeutic and diagnostic markers in hypertension," *BBA Clin.*, vol. 2, pp. 79–87, 2014.
- [88] K. Akira, S. Masu, M. Imachi, H. Mitome, and T. Hashimoto, "A metabonomic study of biochemical changes characteristic of genetically hypertensive rats based on ¹H NMR spectroscopic urinalysis," *Hypertens. Res.*, vol. 35, no. 4, pp. 404–412, 2012.
- [89] M. Fujiwara, K. Arifuku, I. Ando, and T. Nemoto, "Pattern Recognition Analysis for Classification of Hypertensive Model Rats and Diurnal Variation Using ¹H-NMR Spectroscopy of Urine," *Anal. Sci.*, vol. 21, no. November, pp. 1259–1262, 2005.
- [90] K. Akira, M. Imachi, and T. Hashimoto, "Investigations into biochemical changes of genetic hypertensive rats using ¹H nuclear magnetic resonance-based metabonomics," *Hypertens. Res.*, vol. 28, no. 5, pp. 425–30, 2005.
- [91] J. Aa, G. Wang, H. Hao, Q. Huang, Y. Lu, B. Yan, W. Zha, L. Liu, and A. Kang, "Differential regulations of blood pressure and perturbed metabolism by total ginsenosides and conventional antihypertensive agents in spontaneously hypertensive rats," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 31, no. 8, pp. 930–937, 2010.
- [92] J. T. Brindle, J. K. Nicholson, P. M. Schofield, D. J. Grainger, and E. Holmes, "Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension," *Analyst*, vol. 128, no. 1, pp. 32–36, 2003.
- [93] J. T. Brindle, J. K. Nicholson, P. M. Schofield, D. J. Grainger, and E. Holmes, "Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension," *Analyst*, vol. 128, no. 1, pp. 32–6, Jan. 2003.
- [94] Y. Liu, T. Chen, Y. Qiu, Y. Cheng, Y. Cao, A. Zhao, and W. Jia, "An ultrasonication-assisted extraction and derivatization protocol for GC/TOFMS-based metabolite profiling," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, no. 5, pp. 1405–1417, 2011.
- [95] B. Egan and K. Stepniakowski, "Evidence Linking Fatty Fat Acids, the Risk Factor Cluster, and Vascular Pathophysiology," *Endocrinol. Vasc.*, 1996.
- [96] R. W. Ordway, J. J. Singer, and J. V. Walsh, "Direct regulation of ion channels by fatty acids," *Trends Neurosci.*, vol. 14, no. 3, pp. 96–100, 1991.
- [97] T. De Meyer, D. Sinnaeve, B. Van Gasse, E. Tsiporkova, E. R. Rietzschel, M. L. De Buyzere, T. C. Gillebert, S. Bekaert, J. C. Martins, and W. Van Criekinge, "NMR-based characterization of metabolic alterations in hypertension using an adaptive, intelligent binning algorithm," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 10, pp. 3783–3790, 2008.
- [98] E. Holmes, R. L. Loo, J. Stampler, M. Bictash, I. K. Yap, Q. Chan, T. Ebbels, M. De Iorio, I. J. Brown, K. A. Veselkov, M. L. Daviglius, H. Kesteloot, H. Ueshima, L. Zhao, J. K. Nicholson, and P. Elliott, "Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure," *Nature*, vol. 453, no. 7193, pp. 396–400, 2008.
- [99] Y. Zheng, B. Yu, D. Alexander, T. A. Manolio, D. Aguilar, J. Coresh, G. Heiss, E. Boerwinkle, and J. A. Nettleton, "Associations between metabolomic compounds and incident heart failure among African Americans: The ARIC study," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 178, no. 4, pp. 534–542, 2013.
- [100] L. C. Kenny, D. I. Broadhurst, W. Dunn, M. Brown, R. A. North, L. McCowan, C. Roberts, G. J. S. Cooper, D. B. Kell, and P. N. Baker, "Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers," *Hypertension*, vol. 56, no. 4, pp. 741–749, 2010.
- [101] A. O. Odibo, K. R. Goetzinger, L. Odibo, A. G. Cahill, G. A. Macones, D. M. Nelson, and D. J. Dietzen, "First-trimester prediction of preeclampsia using metabolomic biomarkers: A discovery phase study," *Prenat. Diagn.*, vol. 31, no. 10, pp. 990–994, 2011.
- [102] R. O. Bahado-Singh, R. Akolekar, R. Mandal, E. Dong, J. Xia, M. Kruger, D. S. Wishart, and K. Nicolaides, "Metabolomics and first-trimester prediction of early-onset preeclampsia," *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.*, vol. 25, no. 10, pp. 1840–7, 2012.
- [103] R. O. Bahado-Singh, R. Akolekar, R. Mandal, E. Dong, J. Xia, M. Kruger, D. S. Wishart, and K.

- Nicolaides, "First-trimester metabolomic detection of late-onset preeclampsia," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 208, no. 1, pp. 58.e1–58.e7, 2013.
- [104] M. J. Pena, D. De Zeeuw, H. Mischak, J. Jankowski, R. Oberbauer, W. Woloszczuk, J. Benner, G. Dallmann, B. Mayer, G. Mayer, P. Rossing, and H. J. Lambers Heerspink, "Prognostic clinical and molecular biomarkers of renal disease in type 2 diabetes," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 30, pp. iv86–iv95, 2015.
- [105] M. J. Pena, J. Jankowski, G. Heinze, M. Kohl, A. Heinzel, S. J. L. Bakker, R. T. Gansevoort, P. Rossing, D. de Zeeuw, H. J. L. Heerspink, and V. Jankowski, "Plasma proteomics classifiers improve risk prediction for renal disease in patients with hypertension or type 2 diabetes.," *J. Hypertens.*, vol. 33, no. 10, pp. 2123–32, Oct. 2015.
- [106] V. G. Marrachelli, D. Monleon, P. Rentero, M. L. Mansego, J. M. anuel Morales, I. Galan, R. Segura, F. Martinez, J. C. arlos Martin-Escudero, L. Briongos, P. Marin, G. Lliso, F. J. avier Chaves, and J. Redon, "Genomic and metabolomic profile associated to microalbuminuria," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e98227, 2014.
- [107] F. de la Cuesta, G. Alvarez-Llamas, A. S. Maroto, A. Donado, I. Zubiri, M. Posada, L. R. Padial, A. G. Pinto, M. G. Barderas, and F. Vivanco, "A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 4, p. M110.003517, 2011.
- [108] G. Alvarez-Llamas, T. Martín-Rojas, F. de la Cuesta, E. Calvo, F. Gil-Dones, V. M. Dardé, L. F. Lopez-Almodovar, L. R. Padial, J.-A. Lopez, F. Vivanco, and M. G. Barderas, "Modification of the secretion pattern of proteases, inflammatory mediators, and extracellular matrix proteins by human aortic valve is key in severe aortic stenosis.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 12, no. 9, pp. 2426–39, 2013.
- [109] H. Zhou, T. Pisitkun, A. Aponte, P. S. T. Yuen, J. D. Hoffert, H. Yasuda, X. Hu, L. Chawla, R.-F. Shen, M. A. Knepper, and R. A. Star, "Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury.," *Kidney Int.*, vol. 70, no. 10, pp. 1847–57, 2006.
- [110] W. Kolch, C. Neus????, M. Pelzing, and H. Mischak, "Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 24, no. 6, pp. 959–977, 2005.
- [111] D. M. Good, V. Thongboonkerd, J. Novak, J. L. Bascands, J. P. Schanstra, J. J. Coon, A. Dominiczak, and H. Mischak, "Body fluid proteomics for biomarker discovery: Lessons from the past hold the key to success in the future," *J. Proteome Res.*, vol. 6, no. 12, pp. 4549–4555, 2007.
- [112] V. Thongboonkerd, K. R. McLeish, J. M. Arthur, and J. B. Klein, "Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation," *Kidney Int.*, vol. 62, no. 4, pp. 1461–1469, 2002.
- [113] P. Dennen and C. R. Parikh, "Biomarkers of acute kidney injury: can we replace serum creatinine?," *Clin. Nephrol.*, vol. 68, no. 5, pp. 269–78, Nov. 2007.
- [114] D. M. Smalley, K. E. Root, H. Cho, M. M. Ross1, K. Ley2, and D. E. Jackson, "Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles," *Thromb. Haemost.*, vol. 97, no. 6, pp. 67–80, 2007.
- [115] E. Ramacciotti, A. E. Hawley, and T. W. Shirley K. Wroblecki1, Daniel D. Myers Jr1, 3, John R. Strahler2, Philip C. Andrews2, Kenneth E. Guire4, Peter K. Henke1, and Wakefield, "Proteomics of Microparticles after Deep Venous Thrombosis Eduardo," *Thromb Res*, vol. 125, no. 6, pp. 269–274, 2010.
- [116] T. Pisitkun, R.-F. Shen, and M. A. Knepper, "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 36, pp. 13368–13373, 2004.
- [117] G. Van Niel, J. Mallegol, C. Bevilacqua, C. Candalh, S. Brugière, E. Tomaskovic-Crook, J. K. Heath, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman, "Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice.," *Gut*, vol. 52, no. 12, pp. 1690–7, 2003.
- [118] R. Wubbolts, R. S. Leckie, P. T. M. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. M??bius, J. Hoernschemeyer, J. W. Slot, H. J. Geuze, and W. Stoorvogel, "Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: Potential implications for their function and multivesicular body formation," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 13, pp. 10963–10972, 2003.
- [119] R. Zhan, X. Leng, X. Liu, X. Wang, J. Gong, L. Yan, L. Wang, Y. Wang, X. Wang, and L. J. Qian,

- “Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 387, no. 2, pp. 229–233, 2009.
- [120] C. Théry, A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, P. Ricciardi-castagnoli, G. Raposo, S. Amigorena, C. Thiry, and J. Garin, “of Dendritic Cell-derived Exosomes: Characterization Molecular of the Heat Shock Protein hsc73 Selective Accumulation,” vol. 147, no. 3, pp. 599–610, 2014.
- [121] K. R. Vrijisen, J. P. G. Sluijter, M. W. L. Schuchardt, B. W. M. van Balkom, W. A. Noort, S. A. J. Chamuleau, and P. A. F. M. Doevendans, “Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 5, pp. 1064–1070, 2010.
- [122] S. D. Conner and S. L. Schmid, “Regulated portals of entry into the cell,” *Nature*, vol. 422, no. 6927, pp. 37–44, 2003.
- [123] R. C. Piper and D. J. Katzmann, “Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies,” *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 23, pp. 519–547, 2007.
- [124] P. G. Woodman and C. E. Futter, “Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, no. 4, pp. 408–414, 2008.
- [125] W. Stoorvogel, M. J. Kleijmeer, H. J. Geuze, and G. Raposo, “The biogenesis and functions of exosomes,” *Traffic*, vol. 3, no. 5, pp. 321–330, 2002.
- [126] K. Ohshima, K. Inoue, A. Fujiwara, K. Hatakeyama, K. Kanto, Y. Watanabe, K. Muramatsu, Y. Fukuda, S. I. Ogura, K. Yamaguchi, and T. Mochizuki, “Let-7 microRNA family Is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line,” *PLoS One*, vol. 5, no. 10, pp. 1–10, 2010.
- [127] R. J. Simpson, J. W. Lim, R. L. Moritz, and S. Mathivanan, “Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 6, no. 3, pp. 267–283, 2009.
- [128] K. Denzer, M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze, “Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device,” *J. Cell Sci.*, vol. 113 Pt 19, pp. 3365–3374, 2000.
- [129] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659, 2007.
- [130] B. Fevrier and G. Raposo, “Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 16, no. 4, pp. 415–421, 2004.
- [131] A. Clayton, A. Turkes, S. Dewitt, R. Steadman, M. D. Mason, and M. B. Hallett, “Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins,” *FASEB J.*, vol. 18, no. 9, pp. 977–979, 2004.
- [132] J. Skog, T. Wurdinger, S. Van Rijn, D. Meijer, L. Gainche, M. Sena-estebes, W. T. C. Jr, R. S. Carter, A. M. Krichevsky, and X. O. Breakefield, “NIH Public Access,” vol. 10, no. 12, pp. 1470–1476, 2012.
- [133] I. Hrachovinová, B. Cambien, A. Hafezi-Moghadam, J. Kappelmayer, R. T. Camphausen, A. Widom, L. Xia, H. H. Kazazian, R. G. Schaub, R. P. McEver, and D. D. Wagner, “Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A,” *Nat. Med.*, vol. 9, no. 8, pp. 1020–5, 2003.
- [134] L. Gonzalez-Calero, M. Martin-Lorenzo, and G. Alvarez-Llamas, “Exosomes: a potential key target in cardio-renal syndrome,” *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 465, Jan. 2014.
- [135] W. F. Patton, “Review A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two- dimensional gel electrophoresis and proteomics Proteomics and 2-DE,” *Rev. Lit. Arts Am.*, 2000.
- [136] O. Chahrour, D. Cobice, and J. Malone, “Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 113, pp. 2–20, 2015.
- [137] J. H. F. Bothwell and J. L. Griffin, “An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Biol. Rev.*, vol. 86, no. 2, pp. 493–510, 2011.
- [138] W. B. Dunn, N. J. C. Bailey, and H. E. Johnson, “Measuring the metabolome: current analytical technologies,” *Analyst*, vol. 130, no. 5, pp. 606–625, 2005.

- [139] P. Picotti, O. Rinner, R. Stallmach, F. Dautel, T. Farrah, B. Domon, H. Wenschuh, and R. Aebersold, "High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes.," *Nat. Methods*, vol. 7, no. 1, pp. 43–46, 2010.
- [140] S. Pan, R. Aebersold, and R. Chen, "Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications," *J. proteome ...*, vol. 8, no. 2, pp. 787–797, 2008.
- [141] B. Domon and R. Aebersold, "Mass Spectrometry and Protein Analysis," *Science (80-.)*, vol. 312, no. 5771, pp. 212–217, 2006.
- [142] M. Martin-Lorenzo, L. Gonzalez-Calero, I. Zubiri, P. J. Diaz-Payno, A. Sanz-Maroto, M. Posada-Ayala, A. Ortiz, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "Urine 2DE proteome analysis in healthy condition and kidney disease," *Electrophoresis*, vol. 35, no. 18, pp. 2634–2641, 2014.
- [143] P. Fernández-Llama, S. Khositseth, P. a Gonzales, R. a Star, T. Pisitkun, and M. a Knepper, "Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation.," *Kidney Int.*, vol. 77, no. 8, pp. 736–42, 2010.
- [144] J. E. Jackson, *A User's Guide to Principal Components*. 1991.
- [145] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, "Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 5, pp. 850–858, 1996.
- [146] D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell, "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data," *Electrophoresis*, vol. 20, no. 18, pp. 3551–3567, 1999.
- [147] S. Martínez-Bartolomé, P. Navarro, F. Martín-Maroto, D. López-Ferrer, A. Ramos-Fernández, M. Villar, J. P. García-Ruiz, and J. Vázquez, "Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 7, no. 6, pp. 1135–45, 2008.
- [148] P. Navarro and J. Vazquez, "A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases," *J. Proteome Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 1792–1796, 2009.
- [149] E. Bonzon-Kulichenko, F. Garcia-Marques, M. Trevisan-Herraz, and J. V??zquez, "Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: Problems associated with the use of narrow mass precursor windows," *J. Proteome Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 700–710, 2015.
- [150] P. Navarro, M. Trevisan-Herraz, E. Bonzon-Kulichenko, E. Núñez, P. Martínez-Acedo, D. Pérez-Hernández, I. Jorge, R. Mesa, E. Calvo, M. Carrascal, M. L. Hernández, F. García, J. A. Bárcena, K. Ashman, J. Abian, C. Gil, J. M. Redondo, and J. Vázquez, "General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 1234–1247, 2014.
- [151] S. Keerthikumar, D. Chisanga, D. Ariyaratne, H. Al Saffar, S. Anand, K. Zhao, M. Samuel, M. Pathan, M. Jois, N. Chilamkurti, L. Gangoda, and S. Mathivanan, "ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo," *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 4, pp. 688–692, 2015.
- [152] M. Uhlen, L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A.-K. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Ponten, "Tissue-based map of the human proteome," *Science (80-.)*, vol. 347, no. 6220, pp. 1260419–1260419, 2015.
- [153] H. Mi, B. Lazareva-Ulitsky, R. Loo, A. Kejariwal, J. Vandergriff, S. Rabkin, N. Guo, A. Muruganujan, O. Doremieux, M. J. Campbell, H. Kitano, and P. D. Thomas, "The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. DATABASE ISS., pp. 284–288, 2005.
- [154] D. W. Huang, R. a Lempicki, and B. T. Sherman, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 1, pp. 44–57, 2009.
- [155] L. J. Jensen, M. Kuhn, M. Stark, S. Chaffron, C. Creevey, J. Muller, T. Doerks, P. Julien, A. Roth, M. Simonovic, P. Bork, and C. von Mering, "STRING 8 - A global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. SUPPL. 1, pp. 412–416, 2009.
- [156] M. Lauridsen, S. H. Hansen, J. W. Jaroszewski, and C. Cornett, "Human Urine as Test Material in H NMR-Based Metabonomics : Recommendations for Sample Preparation and Storage Human Urine as Test Material in 1 H NMR-Based Metabonomics : Recommendations for Sample Preparation and

- Storage,” vol. 79, no. 3, pp. 1181–1186, 2007.
- [157] D. Tulpan, S. Léger, L. Belliveau, A. Culf, and M. Cuperlović-Culf, “MetaboHunter: an automatic approach for identification of metabolites from 1H-NMR spectra of complex mixtures,” *BMC Bioinformatics*, vol. 12, no. 1, p. 400, 2011.
- [158] P. Picotti and R. Aebersold, “Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 6, pp. 555–566, 2012.
- [159] B. MacLean, D. M. Tomazela, N. Shulman, M. Chambers, G. L. Finney, B. Frewen, R. Kern, D. L. Tabb, D. C. Liebler, and M. J. MacCoss, “Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 7, pp. 966–968, 2010.
- [160] J. Xia, I. V. Sinelnikov, B. Han, and D. S. Wishart, “MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. W1, pp. W251–7, 2015.
- [161] V. Lange, P. Picotti, B. Domon, and R. Aebersold, “Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 4, no. 222, p. 222, 2008.
- [162] L. Gonzalez-Calero, M. Martin-Lorenzo, F. de la Cuesta, A. S. Maroto, M. Baldan-Martin, G. Ruiz-Hurtado, H. Pulido-Olmo, J. Segura, M. G. Barderas, L. M. Ruilope, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, “Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 15, no. 1, p. 8, Jan. 2016.
- [163] B. W. M. van Balkom, T. Pisitkun, A. Marianne C. Verhaar, and M. A. Knep, “Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases,” *Kidney Int.*, vol. 80, no. 11, pp. 1138–1145, 2012.
- [164] J. W. Dear, J. M. Street, and M. A. Bailey, “Urinary exosomes: A reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling,” *Proteomics*, vol. 13, no. 10–11, pp. 1572–1580, 2013.
- [165] D. A. Raj, I. Fiume, G. Capasso, and G. Pocsfalvi, “A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes,” *Kidney Int.*, vol. 81, no. 12, pp. 1263–1272, 2012.
- [166] L. Musante, D. E. Tataruch, and H. Holthofer, “Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 5, no. SEP, pp. 1–12, 2014.
- [167] M. Jayachandran, G. Lugo, H. Heiling, V. M. Miller, A. D. Rule, and J. C. Lieske, “Extracellular vesicles in urine of women with but not without kidney stones manifest patterns similar to men: a case control study,” *Biol. Sex Differ.*, vol. 6, p. 2, 2015.
- [168] C. Esteva-Font, X. Wang, E. Ars, E. Guillén-Gómez, L. Sans, I. González Saavedra, F. Torres, R. Torra, S. Masilamani, J. A. Ballarín, and P. Fernández-Llana, “Are sodium transporters in urinary exosomes reliable markers of tubular sodium reabsorption in hypertensive patients?” *Nephron - Physiol.*, vol. 114, no. 3, pp. 25–34, 2010.
- [169] M. Prunotto, A. Farina, L. Lane, A. Pernin, J. Schifferli, D. F. Hochstrasser, P. Lescuyer, and S. Moll, “Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine,” *J. Proteomics*, vol. 82, pp. 193–229, 2013.
- [170] G. Zhang, K. A. Kernan, S. J. Collins, X. Cai, J. M. Lopez-Guisa, J. L. Degen, Y. Shvil, and A. A. Eddy, “Plasmin(ogen) Promotes Renal Interstitial Fibrosis by Promoting Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Role of Plasmin-Activated Signals,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 3, pp. 846–859, 2007.
- [171] J. E. Wiggins, “Antioxidant Ceruloplasmin Is Expressed by Glomerular Parietal Epithelial Cells and Secreted into Urine in Association with Glomerular Aging and High-Calorie Diet,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 5, pp. 1382–1387, 2006.
- [172] T. R. Welch, L. S. Beischel, and D. P. Witte, “Differential expression of complement C3 and C4 in the human kidney,” *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 3, pp. 1451–8, 1993.
- [173] R. a Zager, B. a Schimpf, C. R. Bredl, and D. J. Gmur, “In Vitro Hypoxic Proximal Renal Tubular Cell Injury,” *Am. Soc. Clin. Investig.*, vol. 91, no. February, pp. 702–708, 1993.
- [174] K. Goto, N. Oue, S. Shinmei, K. Sentani, N. Sakamoto, Y. Naito, T. Hayashi, J. Teishima, A. Matsubara, and W. Yasui, “Expression of miR-486 is a potential prognostic factor after nephrectomy in advanced renal cell carcinoma,” *Mol Clin Oncol*, vol. 1, no. 2, pp. 235–240, 2013.

- [175] L. M. Hillegass, D. E. Griswold, and B. Brickson, "Assessment of Myeloperoxidase Kidney Activity in Whole Rat," *J. Pharmacol. Methods*, vol. 24, pp. 285–295, 1990.
- [176] M. Eikmans, "Expression of Surfactant Protein-C, S100A8, S100A9, and B Cell Markers in Renal Allografts: Investigation of the Prognostic Value," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 12, pp. 3771–3786, 2005.
- [177] M. Martin-Lorenzo, L. Gonzalez-Calero, A. S. Maroto, P. J. Martinez, I. Zubiri, F. de la Cuesta, L. Mourino-Alvarez, M. G. Barderas, A. Heredero, G. Aldamiz-Echevarría, F. Vivanco, and G. Alvarez-Llamas, "Cytoskeleton deregulation and impairment in amino acids and energy metabolism in early atherosclerosis at aortic tissue with reflection in plasma.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1862, no. 4, pp. 725–732, Dec. 2015.
- [178] J. Segura, C. Campo, and L. M. Ruilope, "Effect of proteinuria and glomerular filtration rate on cardiovascular risk in essential hypertension," *Kidney Int. Suppl.*, vol. 66, no. 92, pp. 45–49, 2004.
- [179] S. Murai, S. Tanaka, Y. Dohi, G. Kimura, and N. Ohte, "The prevalence, characteristics, and clinical significance of abnormal albuminuria in patients with hypertension.," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 3884, 2014.
- [180] G. Shlomain, G. Grassi, E. Grossman, and G. Mancia, "Assessment of target organ damage in the evaluation and follow-up of hypertensive patients: Where do we stand?," *J. Clin. Hypertens.*, vol. 15, no. 10, pp. 742–747, 2013.
- [181] H.-H. Parving, B. M. Brenner, J. J. V McMurray, D. de Zeeuw, S. M. Haffner, S. D. Solomon, N. Chaturvedi, F. Persson, A. S. Desai, M. Nicolaidis, A. Richard, Z. Xiang, P. Brunel, and M. a Pfeffer, "Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, pp. 2204–13, 2012.
- [182] K. Jamerson, P. M. A. Weber, G. L. Bakris, B. Dahlöf, B. Pitt, and M. . Victor Shi, M.D., Allen Hester, Ph.D., Jitendra Gupte, M.S., Marjorie Gatlin, M.D., and Eric J. Velazquez, "Benazepril plus Amlodipine or Hydrochlorothiazide for Hypertension in High-Risk Patients," *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 23, pp. 2417–28, 2009.
- [183] R. E. Schmieder, J. F. E. Mann, H. Schumacher, P. Gao, G. Mancia, M. a Weber, M. McQueen, T. Koon, and S. Yusuf, "Changes in albuminuria predict mortality and morbidity in patients with vascular disease.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 22, no. 7, pp. 1353–1364, 2011.
- [184] F. C. Kimberley, B. Sivasankar, and B. Paul Morgan, "Alternative roles for CD59," *Mol. Immunol.*, vol. 44, no. 1–3, pp. 73–81, 2007.
- [185] M. Tamano and H. Ohi, "Evaluation of Urinary Decay Accelerating Factor and CD59 in Renal Damage," *Clin Exper Nephrol*, vol. 2, pp. 155–161, 1998.
- [186] M. Nafar, S. Kalantari, S. Samavat, M. Rezaei-Tavirani, D. Rutishuser, and R. A. Zubarev, "The novel diagnostic biomarkers for focal segmental glomerulosclerosis," *Int. J. Nephrol.*, vol. 2014, 2014.
- [187] F. Castagna, J.Wang, M. Emit, G.Wang, S. Jelic, and G. Parati, "PROTECTION AGAINST COMPLEMENT ACTIVITY IS REDUCED IN ARTERIAL HYPERTENSION," *J. Hypertens.*, vol. 33, p. 119, 2015.
- [188] B. Coles, R. Lewis, P. B. Anning, J. Morton, S. Baalasubramanian, B. P. Morgan, and V. B. O'Donnell, "CD59 or C3 are not required for angiotensin II-dependent hypertension or hypertrophy in mice," *Immunology*, vol. 121, no. 4, pp. 518–525, 2007.
- [189] A. Soggiu, C. Piras, L. Bonizzi, H. A. Hussein, S. Pisanu, and P. Roncada, "A discovery-phase urine proteomics investigation in type 1 diabetes," *Acta Diabetol.*, vol. 49, no. 6, pp. 453–464, 2012.
- [190] G. Wu, W. Hu, A. Shahsafaei, W. Song, M. Dobarro, G. K. Sukhova, R. R. Bronson, G. P. Shi, R. P. Rother, J. A. Halperin, and X. Qin, "Complement regulator cd59 protects against atherosclerosis by restricting the formation of complement membrane attack complex," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 4, pp. 550–558, 2009.
- [191] R. D. Lewis, C. L. Jackson, B. P. Morgan, and T. R. Hughes, "The membrane attack complex of complement drives the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice," *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 5, pp. 1098–1105, 2010.
- [192] A. Alkhalaff, P. Z??rbig, S. J. L. Bakker, H. J. G. Bilo, M. Cerna, C. Fischer, S. Fuchs, B. Janssen, K. Medek, H. Mischak, J. M. Roob, K. Rossing, P. Rossing, I. Rychl??k, H. Sourij, B. Tiran, B. M. Winklhofer-Roob, and G. J. Navis, "Multicentric validation of proteomic biomarkers in urine specific for

- diabetic Nephropathy,” *PLoS One*, vol. 5, no. 10, 2010.
- [193] P. V. Rao, X. Lu, M. Standley, P. Pattee, G. Neelima, G. Girishesh, K. V. Dakshinamurthy, C. T. Roberts, and S. R. Nagalla, “Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy,” *Diabetes Care*, vol. 30, no. 3, pp. 629–637, 2007.
- [194] J. Jin, Y. H. Ku, Y. Kim, Y. Kim, K. Kim, J. Y. Lee, Y. M. Cho, H. K. Lee, K. S. Park, and Y. Kim, “Differential proteome profiling using iTRAQ in microalbuminuric and normoalbuminuric type 2 diabetic patients,” *Exp. Diabetes Res.*, vol. 2012, 2012.
- [195] B. Lisowska-myjak, A. Zbońska, J. Muszyński, and J. Pachecka, “Comparison of urinary albumin and alpha-1-antitrypsin (AAT) excretion in consecutive stages of proteinuria in patients with diabetes mellitus . Clin Exp Med Lett © Medical University of Lodz,” *Clin Exp Med Lett*, vol. 51, no. 1, pp. 83–87, 2010.
- [196] R. Ś. Stodulska, A. Babińska, A. S. Bielińska, and K. Sworczak, “Assessment of α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin levels in obese patients,” *Pol. Arch. Med. Wewn.*, vol. 118–12, pp. 713–717, 2008.
- [197] B. Lisowska-Myjak, J. Pachecka, P. Witak, and S. Radowicki, “Comparison of urinary excretion of albumin and alpha-1-antitrypsin in patients with arterial hypertension,” *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 59, no. 2, pp. 93–97, 1999.
- [198] B. Rodriguez-Iturbe, H. Pons, Y. Quiroz, and R. J. Johnson, “The immunological basis of hypertension,” *Am. J. Hypertens.*, vol. 27, no. 11, pp. 1327–1337, 2014.
- [199] C. Catena, L. Zingaro, D. Casaccio, and L. A. Sechi, “Abnormalities of coagulation in hypertensive patients with reduced creatinine clearance,” *Am. J. Med.*, vol. 109, no. 7, pp. 556–561, 2000.
- [200] U. Derhaschnig, C. Testori, E. Riedmueller, S. Aschauer, M. Wolzt, and B. Jilma, “Hypertensive emergencies are associated with elevated markers of inflammation, coagulation, platelet activation and fibrinolysis.,” *J. Hum. Hypertens.*, vol. 27, no. 6, pp. 368–73, 2013.
- [201] M. Levi, T. Van Der Poll, and H. R. Büller, “Bidirectional relation between inflammation and coagulation,” *Circulation*, vol. 109, no. 22, pp. 2698–2704, 2004.
- [202] X. Yin, S. Subramanian, S. J. Hwang, C. J. O’Donnell, C. S. Fox, P. Courchesne, P. Muntendam, N. Gordon, A. Adourian, P. Juhasz, M. G. Larson, and D. Levy, “Protein biomarkers of new-onset cardiovascular disease: Prospective study from the systems approach to biomarker research in cardiovascular disease initiative,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, no. 4, pp. 939–945, 2014.
- [203] D. I. Simon and N. M. Simon, “Plasminogen activator inhibitor-1: A novel therapeutic target for hypertension?,” *Circulation*, vol. 128, no. 21, pp. 2286–2288, 2013.
- [204] E. L. Schiffrin, M. L. Lipman, and J. F. E. Mann, “Chronic Kidney Disease: Effects on the Cardiovascular System,” *Circulation*, vol. 116, no. 1, pp. 85–97, 2007.
- [205] S. Mathivanan, H. Ji, and R. J. Simpson, “Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication,” *J. Proteomics*, vol. 73, no. 10, pp. 1907–1920, 2010.
- [206] G. Camussi, M. C. Deregibus, S. Bruno, V. Cantaluppi, and L. Biancone, “Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication,” *Kidney Int.*, vol. 78, no. 9, pp. 838–848, 2010.
- [207] R. Mears, R. A. Craven, S. Hanrahan, N. Totty, C. Upton, S. L. Young, P. Patel, P. J. Selby, and R. E. Banks, “Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry,” *Proteomics*, vol. 4, no. 12, pp. 4019–4031, 2004.
- [208] J. M. Street, W. Birkhoff, R. I. Menzies, D. J. Webb, M. A. Bailey, and J. W. Dear, “Exosomal transmission of functional aquaporin 2 in kidney cortical collecting duct cells.,” *J. Physiol.*, vol. 589, no. Pt 24, pp. 6119–27, 2011.
- [209] M. Salih, R. Zietse, and E. J. Hoorn, “Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond.,” *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 306, no. 11, pp. F1251–9, 2014.
- [210] H. Zhou, A. Cheruvanky, X. Hu, T. Matsumoto, N. Hiramatsu, M. E. Cho, A. Berger, A. Leelahavanichkul, K. Doi, L. S. G. G. Illei, J. B. Kopp, J. E. Balow, H. A. A. Iii, S. T. Yuen, and R. A. Star, “Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease,” *Kidney Int.*, vol. 74, no. 5, pp. 613–621, 2008.
- [211] E. González and J. M. Falcón-Pérez, “Cell-derived extracellular vesicles as a platform to identify low-

- invasive disease biomarkers.," *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 7159, no. December, pp. 1–17, 2015.
- [212] N. Parthasarathy and R. G. Spiro, "Effect of Diabetes on the Glycosaminoglycan Component of the Human Glomerular Basement Membrane," *Diabetes*, vol. 31, no. May, pp. 738–741, 1982.
- [213] G. S. Kumar, A. K. Shetty, and P. V. Salimath, "Modulatory effect of bitter gourd (*Momordica charantia* LINN.) on alterations in kidney heparan sulfate in streptozotocin-induced diabetic rats," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 115, no. 2, pp. 276–283, 2008.
- [214] M. Geiger, U. Priglinger, J. H. Griffin, and B. R. Binder, "Urinary protein C inhibitor: Glycosaminoclycans synthesized by the epithelial kidney cell line TCL-598 enhance its interaction with urokinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 18, pp. 11851–11857, 1991.
- [215] T. J. M. Wijnhoven, J. F. M. Lensen, R. G. P. Wismans, D. J. Lefeber, A. L. W. M. M. Rops, J. van der Vlag, J. H. M. Berden, L. P. W. J. van den Heuvel, and T. H. van Kuppevelt, "Removal of Heparan Sulfate from the Glomerular Basement Membrane Blocks Protein Passage," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 12, pp. 3119–3127, 2007.
- [216] J. F. M. Lensen, "Localization and Functional Characterization of Glycosaminoglycan Domains in the Normal Human Kidney as Revealed by Phage Display-Derived Single Chain Antibodies," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 5, pp. 1279–1288, 2005.
- [217] J. R. Bishop, M. Schuksz, and J. D. Esko, "Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology.," *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1030–1037, 2007.
- [218] K. Radtke, I. I. J. A. Fernandez, J. S. Greengard, W. W. Tang, C. B. Wilson, D. J. Loskutoff, I. Scharrer, and J. H. Griffin, "Protein C Inhibitor Is Expressed in Tubular Cells of Human Kidney," *J. Clin. Invest.*, vol. 94, no. November, pp. 2117–2124, 1994.
- [219] T. Hayashi, J. Nishioka, H. Kamada, K. Asanuma, H. Kondo, E. C. Gabazza, M. Ido, and K. Suzuki, "Characterization of a novel human protein C inhibitor (PCI) gene transgenic mouse useful for studying the role of PCI in physiological and pathological conditions," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 2, no. 6, pp. 949–961, 2004.
- [220] T. H. Bugge, M. J. Flick, C. C. Daugherty, and J. L. Degen, "Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction," *Genes Dev.*, vol. 9, no. 7, pp. 794–807, 1995.
- [221] K. A. Hajjar, A. T. Jacovina, and J. Chacko, "An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 33, pp. 21191–21197, 1994.
- [222] V. Gerke and S. E. Moss, "Annexins : From Structure to Function," *Physiol. Rev.*, vol. 82, pp. 331–371, 2002.
- [223] J. F. a Swisher, U. Khatri, and G. M. Feldman, "Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage activation.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 82, no. 5, pp. 1174–1184, 2007.
- [224] S. M. Ka, P. Y. Tsai, T. K. Chao, S. M. Yang, Y. J. Hung, J. S. Chen, H. A. Shui, and A. Chen, "Urine annexin A1 as an index for glomerular injury in patients," *Dis. Markers*, vol. 2014, 2014.
- [225] Q. Ling, A. T. Jacovina, A. Deora, M. Febbraio, R. Simantov, R. L. Silverstein, B. Hempstead, W. H. Mark, and K. A. Hajjar, "Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 1, pp. 38–48, 2004.
- [226] F. N. Facio, A. A. Sena, L. P. Araújo, G. E. Mendes, I. Castro, M. A. M. Luz, L. Yu, S. M. Oliani, and E. A. Burdmann, "Annexin 1 mimetic peptide protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats," *J. Mol. Med.*, vol. 89, no. 1, pp. 51–63, 2011.
- [227] E. J. Nouwen and M. E. De Broe, "EGF and TGF- α in the human kidney: identification of octopal cells in the collecting duct.," *Kidney Int.*, vol. 45, no. 5, pp. 1510–21, 1994.
- [228] H. Nagase, Y. Itho, and S. Binner, "Interaction of α 2-Macroglobulin with Matrix Metalloproteinases and Its Use for Identification of Their Active Forms," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 732, pp. 294–302, 1994.
- [229] H. Pulido-Olmo, C. F. García-Prieto, G. Álvarez-Llamas, M. G. Barderas, F. Vivanco, I. Aranguez, B. Somoza, J. Segura, R. Kreutz, M. S. Fernández-Alfonso, L. M. Ruilope, and G. Ruiz-Hurtado, "Role of matrix metalloproteinase-9 in chronic kidney disease: a new biomarker of resistant albuminuria.," *Clin. Sci. (Lond.)*, vol. 130, no. 7, pp. 525–38, Apr. 2016.

- [230] R. Machii, M. Sakatume, R. Kubota, S. Kobayashi, F. Geiyo, and K. Shiba, "Examination of the molecular diversity of α 1 antitrypsin in urine: Deficit of an α 1 globulin fraction on cellulose acetate membrane electrophoresis," *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 19, no. 1, pp. 16–21, 2005.
- [231] M. Navarro-Muñoz, M. Ibernón, J. Bonet, V. Pérez, M. C. Pastor, B. Bayés, J. Casado-Vela, M. Navarro, J. Ara, A. Espinal, L. Fluvià, A. Serra, D. López, and R. Romero, "Uromodulin and α 1-antitrypsin urinary peptide analysis to differentiate glomerular kidney diseases," *Kidney Blood Press. Res.*, vol. 35, no. 5, pp. 314–325, 2012.
- [232] A. Smith, V. L'Imperio, G. De Sio, F. Ferrario, C. Scalia, G. Dell'Antonio, F. Pieruzzi, C. Pontillo, S. Filip, K. Markoska, A. Granata, G. Spasovski, J. Jankowski, G. Capasso, F. Pagni, and F. Magni, " α 1-antitrypsin detected by MALDI-Imaging in the study of glomerulonephritis: its relevance in chronic kidney disease progression.," *Proteomics*, vol. 16(11–12), no. June, pp. 1759–66, Jan. 2016.
- [233] N. Imai, S. Nishi, B. Alchi, M. Ueno, S. Fukase, M. Arakawa, K. Saito, K. Takahashi, and F. Gejyo, "Immunohistochemical evidence of activated lectin pathway in kidney allografts with peritubular capillary C4d deposition," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 21, no. 9, pp. 2589–2595, 2006.
- [234] A. Roos, M. R. Daha, J. Van Pelt, and S. P. Berger, "Mannose-binding lectin and the kidney," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 22, no. 12, pp. 3370–3377, 2007.
- [235] B. P. Morgan, "The membrane attack complex as an inflammatory trigger," *Immunobiology*, 2015.
- [236] S. K. and Nadar and G. Y. H. Lip, "New insights into complement C3 and inflammation in hypertension," *J. Hum. Hypertens.*, pp. 261–263, 2007.
- [237] M. C. Hogan, K. L. Johnson, R. M. Zenka, M. C. Charlesworth, B. J. Madden, D. W. Mahoney, A. L. Oberg, B. Q. Huang, A. a Leontovich, L. L. Nesbitt, J. L. Bakeberg, D. J. McCormick, H. R. Bergen, and C. J. Ward, "Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine.," *Kidney Int.*, vol. 85, no. 5, pp. 1225–37, 2014.
- [238] A. SOGABE, H. UTO, S. KANMURA, T. NOSAKI, M. OYAMADA, K. TOKUNAGA, C. NISHIDA, M. FUKUMOTO1, M. OKUI, S. T. KIICHIRO NISHIMOTO, Y. S. AKIO IDO, and A. HIROHITO TSUBOUCHI, "Correlation of serum levels of complement C4a desArg with pathologically estimated severity of glomerular lesions and mesangial hypercellularity scores in patients with IgA nephropathy," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 32, pp. 307–314, 2013.
- [239] M. Abbate, C. Zoja, D. Rottoli, D. Corna, N. Perico, T. Bertani, and G. Remuzzi, "Antiproteinuric Therapy while Preventing the Abnormal Protein Traffic in Proximal Tubule Abrogates Protein- and Complement-Dependent Interstitial Inflammation in Experimental Renal Disease," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 22, pp. 804–813, 1999.
- [240] S. Tang, K. N. Lai, T. M. Chan, H. Y. Lan, S. K. Ho, and S. H. Sacks, "Transferrin but not albumin mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 37, no. 1, pp. 94–103, 2001.
- [241] Y. Minamiyama, S. Takemura, S. Kodai, H. Shinkawa, T. Tsukioka, H. Ichikawa, Y. Naito, T. Yoshikawa, and S. Okada, "Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 298, no. 6, pp. E1140–9, 2010.
- [242] N. Shukla, J. Maher, J. Masters, G. D. Angelini, and J. Y. Jeremy, "Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?," *Atherosclerosis*, vol. 187, no. 2, pp. 238–250, 2006.
- [243] M. Baldan-Martin, F. de la Cuesta, G. Alvarez-Llamas, L. Gonzalez-Calero, G. Ruiz-Hurtado, R. Moreno-Luna, L. Mourino-Alvarez, T. Sastre-Oliva, J. Segura, L. R. Padial, F. Vivanco, L. M. Ruilope, and M. G. Barderas, "Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics.," *Int. J. Cardiol.*, vol. 196, pp. 170–7, Oct. 2015.
- [244] S. V. Griffin, P. T. Chapman, E. A. Lianos, and C. M. Lockwood, "The inhibition of myeloperoxidase by ceruloplasmin can be reversed by anti-myeloperoxidase antibodies," *Kidney Int.*, vol. 55, no. 3, pp. 917–925, 1999.
- [245] E. Malle, T. Buch, and H. J. Grone, "Myeloperoxidase in kidney disease," *Kidney Int.*, vol. 64, no. 6, pp. 1956–1967, 2003.
- [246] Y. S. Park, K. Suzuki, S. Mumby, N. Taniguchi, and J. M. Gutteridge, "Antioxidant binding of caeruloplasmin to myeloperoxidase: myeloperoxidase is inhibited, but oxidase, peroxidase and

- immunoreactive properties of caeruloplasmin remain intact,” *Free Radic. Res.*, vol. 33, no. 3, pp. 261–265, 2000.
- [247] R. J. Pepper, S. Hamour, K. Chavele, S. K. Todd, N. Rasmussen, S. M. Flint, P. a Lyons, K. G. C. Smith, C. D. Pusey, H. T. Cook, and A. D. Salama, “Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis.,” *Kidney Int.*, vol. 83, no. 6, pp. 1150–8, 2013.
- [248] T. Kuwabara, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, Y. Saito, Y. Ogawa, H. Imamaki, T. Kawanishi, A. Ishii, K. Koga, K. P. Mori, Y. Kato, A. Sugawara, and K. Nakao, “Exacerbation of diabetic nephropathy by Hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice,” *Diabetologia*, vol. 55, no. 8, pp. 2256–2266, 2012.
- [249] A. Boyum, K. K. Skrede, O. Myhre, V. A. Tennfjord, C. G. Neurauter, H. Tolleshaug, E. Knudsen, P. K. Opstad, M. Bjoras, and H. B. Benestad, “Calprotectin (s100a8/s100a9) and myeloperoxidase: Co-regulators of formation of reactive oxygen species,” *Toxins (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 95–115, 2010.
- [250] W. H. Peng, W. X. Jian, H. L. Li, L. Hou, Y. D. Wei, W. M. Li, and Y. W. Xu, “Increased serum myeloid-related protein 8/14 level is associated with atherosclerosis in type 2 diabetic patients.,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 10, no. 1, p. 41, 2011.
- [251] K. Burkhardt, S. Schwarz, C. Pan, F. Stelter, K. Kotliar, M. Von Eynatten, D. Sollinger, I. Lanzl, U. Heemann, and M. Baumann, “Myeloid-related protein 8/14 complex describes microcirculatory alterations in patients with type 2 diabetes and nephropathy.,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 8, p. 10, 2009.
- [252] A. Schiopu and O. S. Cotoi, “S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, no. Cvd, 2013.
- [253] M. C. Dessing, A. Tamaro, W. P. Pulskens, G. J. Teske, L. M. Butter, N. Claessen, M. van Eijk, T. van der Poll, T. Vogl, J. Roth, S. Florquin, and J. C. Leemans, “The calcium-binding protein complex S100A8/A9 has a crucial role in controlling macrophage-mediated renal repair following ischemia/reperfusion,” *Kidney Int.*, vol. 87, no. 1, pp. 85–94, 2015.
- [254] M. B. Palmer, A. A. Vichot, L. G. Cantley, and G. W. Moeckel, “Quantification and localization of M2 macrophages in human kidneys with acute tubular injury,” *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.*, vol. 7, pp. 415–419, 2014.
- [255] N. Ueda, “Effect of corticosteroids on some hemostatic parameters in children with minimal change nephrotic syndrome.,” *Nephron*, vol. 56, no. 4, pp. 374–8, 1990.
- [256] W. Liu, L. Chen, J. Zhu, and G. P. Rodgers, “The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins,” *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 10, pp. 1785–1797, 2006.
- [257] W. Liu, M. Yan, Y. Liu, R. Wang, C. Li, C. Deng, A. Singh, W. G. Coleman, and G. P. Rodgers, “Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori* infection.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 24, pp. 11056–11061, 2010.
- [258] W. Liu, M. Yan, Y. Liu, K. R. McLeish, W. G. Coleman, and G. P. Rodgers, “Olfactomedin 4 inhibits cathepsin C-mediated protease activities, thereby modulating neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in mice,” *J. Immunol.*, vol. 189, no. 5, pp. 2460–2467, 2012.
- [259] X. Zhang, Q. Huang, Z. Yang, Y. Li, and C. Li, “GW112, A Novel Antiapoptotic Protein That Promotes Tumor Growth,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 1, pp. 2474–2481, 2004.
- [260] D. Kobayashi, S. Koshida, R. Moriai, N. Tsuji, and N. Watanabe, “Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells,” *Cancer Sci.*, vol. 98, no. 3, pp. 334–340, 2007.
- [261] I. Fernandez-Cadenas, A. Del, M. Mendioroz, J. Fernandez-, A. Penalba, M. Rubiera, M. Ribo, J. Alvarez-, C. A. Molina, E. García-arumi, J. Montaner, and D. Rio-espinola, “Genes involved in hemorrhagic transformations that follow recombinant t - PA treatment in stroke patients R earch A rticle,” *Pharmacogenomics*, vol. 14, no. 5, pp. 495–504, 2013.
- [262] G. Pocsfalvi, D. A. A. Raj, I. Fiume, A. Vilasi, F. Trepiccione, and G. Capasso, “Urinary extracellular vesicles as reservoirs of altered proteins during the pathogenesis of polycystic kidney disease Clinical Relevance,” *Proteomics Clin. Appl. Proteomics Clin. Appl.*, vol. 9, no. 9, pp. 552–567, 2015.
- [263] E. P. Rhee, A. Souza, L. Farrell, M. R. Pollak, G. D. Lewis, D. J. R. Steele, R. Thadhani, C. B. Clish, A. Greka, and R. E. Gerszten, “Metabolite profiling identifies markers of uremia.,” *J. Am. Soc. Nephrol.*,

vol. 21, no. 6, pp. 1041–1051, 2010.

- [264] D. J. Dietzen, T. R. Wilhite, D. N. Kenagy, D. S. Milliner, C. H. Smith, and M. Landt, “Extraction of glyceric and glycolic acids from urine with tetrahydrofuran: Utility in detection of primary hyperoxaluria,” *Clin. Chem.*, vol. 43, no. 8, pp. 1315–1320, 1997.
- [265] S. E. Dryer, “Glutamate receptors in the kidney,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 30, no. 10, pp. 1630–1638, 2015.
- [266] C. M. Laborde, L. Mourino-Alvarez, M. Posada-Ayala, G. Alvarez-Llamas, M. G. Serranillos-Reus, J. Moreu, F. Vivanco, L. R. Padial, and M. G. Barderas, “Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome,” *Metabolomics*, pp. 1–11, 2013.
- [267] I. Oudman, P. V. Kewalbansingh, I. van Valkengoed, A. H. Zwinderman, J. F. Clark, G. A. van Montfrans, and L. M. Brewster, “Creatine kinase is associated with failure of hypertension treatment,” *J. Hypertens.*, vol. 31, no. 5, pp. 1025–31, 2013.
- [268] M. Huemer, D. R. Carvalho, J. M. Brum, ??zlem ??nal, T. Coskun, J. D. Weisfeld-Adams, N. L. Schragar, S. Scholl-B??rgi, A. Schlune, M. G. Donner, M. Hersberger, C. Gemperle, B. Riesner, H. Ulmer, J. H??berle, and D. Karall, “Clinical phenotype, biochemical profile, and treatment in 19 patients with arginase 1 deficiency,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, pp. 1–10, 2016.
- [269] F. Andrade, J. Rodríguez-Soriano, J. A. Prieto, J. Elorz, M. Aguirre, G. Ariceta, S. Martin, P. Sanjurjo, and L. Aldámiz-Echevarría, “The Arginine-creatine pathway is disturbed in children and adolescents with renal transplants,” *Pediatr. Res.*, vol. 64, no. 2, pp. 218–222, 2008.
- [270] M. Liang, “Hypertension as a mitochondrial and metabolic disease,” *Kidney Int.*, vol. 80, no. 1, pp. 15–6, 2011.
- [271] G. Ruiz-Hurtado, L. Condezo-Hoyos, H. Pulido-Olmo, I. Aranguez, M. Del Carmen González, S. Arribas, C. Cerezo, J. Segura, M. Praga, M. S. Fernández-Alfonso, and L. M. Ruilope, “Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression,” *J. Hypertens.*, vol. 32, no. 10, pp. 2082–91; discussion 2091, 2014.
- [272] A. Panov, P. Schonfeld, S. Dikalov, R. Hemendinger, H. L. Bonkovsky, and B. R. Brooks, “The neuromediator glutamate, through specific substrate interactions, enhances mitochondrial ATP production and reactive oxygen species generation in nonsynaptic brain mitochondria,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 21, pp. 14448–14456, 2009.
- [273] A. Atlante, T. M. Seccia, L. De Bari, E. Marra, and S. Passarella, “Mitochondria from the left heart ventricles of both normotensive and spontaneously hypertensive rats oxidize externally added NADH mostly via a novel malate/oxaloacetate shuttle as reconstructed in vitro,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 177–186, 2006.
- [274] N. A. Yousri, D. O. Mook-Kanamori, M. M. E.-D. Selim, A. H. Takiddin, H. Al-Homsi, K. A. S. Al-Mahmoud, E. D. Karoly, J. Krumsiek, K. T. Do, U. Neumaier, M. J. Mook-Kanamori, J. Rowe, O. M. Chidiac, C. McKeon, W. A. Al Muftah, S. A. Kader, G. Kastenmüller, K. Suhre, W. A. Al Muftah, S. A. Kader, G. Kastenmüller, and K. Suhre, “A systems view of type 2 diabetes-associated metabolic perturbations in saliva, blood and urine at different timescales of glycaemic control,” *Diabetologia*, vol. 58, no. 8, pp. 1855–1867, 2015.
- [275] T. Huo, Z. Xiong, X. Lu, and S. Cai, “Metabonomic study of biochemical changes in urinary of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of sulfonylurea antidiabetic drugs based on ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 29, no. 1, pp. 115–122, 2015.