UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

Patología cardiovascular y enfermedad renal. Búsqueda de biomarcadores de riesgo y diagnóstico temprano a nivel proteómico y metabólico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Posada Ayala

Directores

Fernando Vivanco Martínez,
Gloria Álvarez Llamas

Madrid, 2014

© María Posada Ayala, 2014

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR Y ENFERMEDAD RENAL. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE RIESGO Y DIAGNÓSTICO TEMPRANO A NIVEL PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO.

Tesis Doctoral

MARÍA POSADA AYALA, 2013

Directores: Dr. Fernando Vivanco Martínez
Dra. Gloria Álvarez Llamas

RESUMEN

La Tesis Doctoral presentada aborda un problema de salud de elevada prevalencia en nuestro país y a nivel internacional como es la enfermedad renal crónica (ERC). En la práctica clínica actual existen una serie de limitaciones de cara a realizar un diagnóstico preciso de la misma y, particularmente, de modo temprano. Los marcadores clínicos tanto de presencia como de evolución de la enfermedad no cuentan con la especificidad y sensibilidad adecuada en estadios tempranos. En este contexto, el principal objetivo de la tesis es la búsqueda de nuevos marcadores de enfermedad renal crónica en fluidos biológicos accesibles como son la orina y el plasma, que sirvan de apoyo a un diagnóstico fiable, temprano y personalizado así como a un seguimiento de la misma. De modo particular, se han descubierto metabolitos marcadores de enfermedad cardiovascular asociada; patología de alta prevalencia en este grupo clínico ERC.

Se empleó la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), en la fase de descubrimiento, y la cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas triple cuadrupolo por la metodología MRM, en la fase de validación. Un grupo de 7 metabolitos fue encontrado respondiendo particularmente a ERC en los estadios más avanzados (IV-V) por sí misma, en muestras de orina (Guanidoacetato, TMANO, Glutamato, AFAG, 5-Oxoprolina, Citrato y Taurina). 6 de los 7 metabolitos (Guanidoacetato, TMANO, Glutamato, AFAG, 5-Oxoprolina y Citrato), responden ya en los estadios iniciales de la ERC (I-II). Un panel específico de 4 metabolitos fue asociado a individuos con ERC con EAC (Leucina, Treonina, Citrato y Homocisteína). Se evaluó la respuesta de estos metabolitos en una fase de validación en muestras de plasma, encontrándose nuevos datos de metabolitos asociados a ERC en estadios avanzados (IV-V) (5-Oxoprolina, Leucina, Treonina, Glutamato, Citrato y Homocisteína). 2 de los 7 metabolitos responden a estadios iniciales de ERC en muestras de plasma (5-Oxoprolina y Glutamato). Sin embargo, tres metabolitos que en orina respondían a EAC en ERC (Leucina, Treonina y Homocisteína), en muestras de plasma responden a ERC por sí misma. Sólo se encontraron dos metabolitos en muestras de plasma que respondían cuando la EAC está asociada a ERC (Treonina y Citrato).

Tras estos hallazgos donde dos de los metabolitos alterados están implicados en el catabolismo del Glutatión vía 5-Oxoprolina (5-Oxoprolina y Glutamato), se realizó un estudio de las tres enzimas implicadas en la catalización de las reacciones que dan paso a estos dos metabolitos, encontrándose éstas alteradas tanto en orina como en plasma de individuos con ERC: 5-Oxoprolinasa (OPLA), gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) y Glutamato-cisteínaligasa (GSH).

De modo complementario, se abordó un análisis diferencial de las proteínas de la orina de estos individuos con ERC con y sin EAC asociada por marcaje con iTRAQ LC MS/MS, en la fase de descubrimiento y cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas triple cuadrupolo por la metodología MRM, en la fase de validación. Como proteínas alteradas en ERC avanzada se encontraron: KING1, CD59, PIGR, WAP,

AMBP y β-2-MG. En los estadios iniciales de ERC encontramos RBP4. Cuatro proteínas fueron encontradas alteradas en respuesta a EAC: NID1, ZA2GP, KING1 y AMBP.

En un intento de abordar la compresión de los mecanismos operantes en el desarrollo de la ERC, a nivel de tejido renal, se investigó el perfil metabolómico del tejido renal de rata con nefropatía diabética en un modelo temprano por la metodología ^{1}HRMAS. Esta técnica no destructiva permite un análisis metabolómico directo del tejido. Su posterior análisis por la metodología MRM, dando como resultado 5 metabolitos alterados en tejido (Aldosterona, TMANO, *Myo*inositol, Glutamato y PDC).

SUMMARY

1. INTRODUCTION

The prevalence of chronic kidney disease (CKD) is rising, becoming a major public health problem worldwide with great impact on national healthcare budgets because of the cost of renal replacement therapy and a shortened life expectancy. CKD is an independent cardiovascular risk factor, and cardiovascular disease (CVD) accounts for 50% of the mortality of CKD patients [(1)]. The natural history of CKD was thought to be relentless progression to stage 5 or end-stage renal disease (ESRD) requiring renal replacement therapy. However, it has now become clear that it is not currently possible to predict progression in individual patients, as many patients stabilize or even improve after treatment. In fact, the majority does not reach CKD stage 5 as they either become stable or die prematurely from CVD. With this perspective, there is an urgent need to discover novel indicators of disease progression, biomarkers of kidney damage and cardiovascular risk which facilitate an early diagnosis, prognosis and follow-up of drug therapy effects in clinical intervention [(3)]. In the present work, we propose the application of several–omics strategies to approach the non-biased, non-targeted, study of CKD and associates cardiovascular risk. The main advantage relies on the fact that there is no pre-selection of candidate molecules (metabolites or proteins) to be investigated for a potential influence on the disorder under study. The role of proteomics [(8)] and metabolomics [(9;10)] in the study of renal and cardiovascular diseases has been recently reviewed. However, few studies have investigated the whole sub-set of low molecular weight compounds present in a biological fluid or tissue and their relation to the development or progression of CKD and associated CVD.

2. METHODS

2.1. Metabolomic analysis in the context of CKD in human biological fluids.

Urine and plasma samples from CKD patients (stages I-V) were collected at the Nephrology Department in IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid (Spain) and in 12 de Octubre Universitary Hospital Madrid (Spain).

Urine samples from CKD (IV-V) were diluted with sodium trimethylsilyl propionate (TSP) solution (as internal reference for spectra calibration) in D_2O, buffered with Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 to pH 7.0. All NMR [(11)] experiments were performed at 277K (to

minimize metabolic changes) on a Bruker AVANCE III 700 instrument. For pattern recognition analysis, ^{1}H NMR spectra were data reduced using the software program AMIX (Analysis of MIXtures version 3.6.8, Bruker Rheinstetten, Germany). Non-supervised principal components analysis (PCA) and partial least squares (PLS) were applied to the bucket tables of spectra (no scaling). Loading plots were also calculated to show how principal component analysis is related to the original buckets and thus to identify differential metabolites. Correlation spectroscopy (COSY), total correlation spectroscopy (TOCSY) and heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy (HSQC) spectra were acquired for precise metabolite identification.

For validation of metabolites found significantly alterated in the discovery phase, a new cohort of urine CKD patients was recruited for LC-MS/MS analysis in MRM mode [(12)] in a Triple Quad G6460 mass spectrometry (Agilent Technologies). Alterations of those significant metabolites found in urine at advances stages of CKD. Were also investigated by MRM alterations at earlier stages of CKD in urine and additionally, at early and advance CDK stages in plasma. Statistical analysis was performed by Graphpad software.

2.2. Alterations of renal tissue metabolome an animal model of early Diabetic Nephropathy.

Ten 5-week-old male Wistar Kyoto rats (Criffa, Barcelona, Spain) weighting 230±23g were used. Diabetes was induced in 5 rats by a single intraperitoneal injection of STZ (Sigma, St. Louis, MO), 50 mg/kg in 0.01M citrate buffer (pH 4.5) [(8)]. Five control rats received the STZ vehicle. Rats were sacrificed 8 weeks after induction of diabetes.

Kidney central slices were cut from each of the radial regions were collected. The radial regions comprise the cortex, and medulla. Analysis of the tissue was directly performed by HRMAS without any sample pretreatment required. Spectra were recorded on a Bruker NMR System 500 MHz spectrometer. Spectra were data reduced using the software program AMIX (Analysis of MIXtures version 3.6.8, Bruker Rheinstetten, Germany). Non-supervised principal components analysis (PCA) and partial least squares (PLS) were applied to the bucket tables of spectra (no scaling). Loading plots were also calculated to show how principal component analysis is related to the original buckets and thus to identify differential metabolites. Correlation spectroscopy (COSY)

and total correlation spectroscopy (TOCSY) spectra were acquired for precise metabolite identification. Significatly alterated metabolites were analyzed by MRM LC MS/MS as complementary technique for confirmation.

2.3. Proteomic analysis in the context of CKD in human bilogical fluids.

a. Study of the Glutation pathway´s enzymes: 5 - oxoprolinase (OPLA), gamma - glutamilciclotransferasa (GGCT) and glutamate - cisteínaligasa (GSH).

CKD patients (stages I-V) were recruited and individual urinary and plasma were collected. Protein fraction was isolated and purified accordingly prior to reduction, alkylation and digestion with sequencing grade modified bovine trypsin (Roche). Peptides digests were analyzed in MRM mode using a 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS on-line connected to nano-chromatography in a Chip-format configuration (ChipCube interface, Agilent Technologies).

b. Differential proteins associated to CKD.

Urine samples from CKD (stages I-V) patients were collected at the Nephrology Department in IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid (Spain) and in 12 de Octubre Universitary Hospital Madrid (Spain).

CKD (stages IV-V) samples were analyzed by iTRAQ methodology following manufacturer´s recomendations. Before, urine samples were processed: urine were concentrated with Ultrafiltration Amicon centrifugal devices (10-kDa molecular mass cutoff, Millipore), urine samples were desalted in Protein Desalting Spin Columns (Thermo) and depleted with Albumin and IgG, using Sigma ProteoPrep immunoaffinity columns (Sigma-Aldrich) following manufacturer’s instructions. After that, proteins were precipitated. Prior the iTRAQ labeling reaction, proteins were reduced, alkylated and digested with recombined bovine trypsin (Promega). Once labeled peptide mixture was fractionated by isoelectric focusing in OFFGEL (Agilent technologies) and all fractions were analyzed on the mass spectrometry in a LTQ Orbitrap Velos (Thermo). For validation of significantly different proteins in the discovery phase, a new cohort of individuals, control and CKD (stage I-V) urine samples, was recruited for LC-MS/MS analysis in MRM mode [(12)].

3. RESULTS

3.1. Alterations of metabolome level in the search for markers of CKD in urine and plasma samples.

Urine metabolites found altered in CKD (affected or not by CAD) by NMR experiments, and for validation an additional cohort of samples were analyzed by MRM methodology. In a first discovery stage, we analyzed by NMR the urine metabolome of CKD patients with and without previously reported CAD compared to healthy subjects, finding a classification pattern of individuals not only responding to CKD but also to CVD. A panel of seven metabolites was found to particularly respond to CKD (IV-V) in urine samples, itself (Guanidoacetate, TMANO, Glutamate, AFAG, 5-Oxoproline, Citrate and Taurine). Out 6 of these7 metabolites respond to urine early stages of CKD (Guanidoacetate, TMANO, Glutamate, AFAG, 5-Oxoproline and Citrate). A specific panel of four potential biomarkers (Leucine, Threonine, Citrate and Homocysteine) was associated to CADin urine samples. A new study was carried out in plasma samples, 5-oxoproline, Leucine, Threonine, Glutamate, Citrate and Homocysteine were found to be alterated in CKD (IV-V) context. Out 2 of these7 metabolites respond even to early stages of CKD (I-II) (5-oxoproline and Glutamate). Interestingly, 3 of these 7 metabolites, which respond to CAD associated to CKD in urine samples (Leucine, Threonine and Homocysteine), were found to respond to CKD in plasma samples itself. Properly responding to CAD only two metabolites were found in plasma samples (Threonine and Citrate).

3.2. Altered metabolites in renal tissue in reponse to early Diabetic Nephropathy in a rat model.

In a complementary study, we investigated the metabolic profiles at renal tissue by ^{1}HRMAS. Renal tissues were obtained from diabetic and control rats to look for early metabolic markers. Observations corroborate that a series of molecular events have happened. A total of 18 metabolites were found with alterated levels in renal tissue. For confirmation those18 metabolites significantly different, samples were analyzed by MRM in a LC-(QQQ) MS instrument. Data were confirmed for 5 metabolites: Aldosterone, TMANO, *Myo*inositol, glutamate and Phosphatidylcholine (PDC).

3.3. Study of alterations at the proteome level in response to CKD.

3.3.1. Study of the Glutation pathway´s enzymes: 5-Oxoprolinase (OPLA), gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) and Glutamate-cisteínaligasa (GSH).

Data show a clear decrease in 5-oxoproline and an increase of glutamate in urine and an increase in 5-oxoproline and a decrease of glutamate in plasma of CKD patients. Both metabolites are related in the catabolic pathway from glutathione to glutamate via 5-oxoproline. MRM analysis reveals three enzymes; which are component of Glutation pathway, with altered levels in urine and plasma: 5-Oxoprolinase (OPLA) (with 5 transitions), gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) (with 5 transitions) and glutamate-cisteínaligasa (GSH) (with 3 transitions). In the all case, trends found significantly alterated for the three enzymes investigated were in accordance with variations observed for Glutamate and 5-Oxoproline.

3.3.2. Differential proteins in urine as candidate markers CKD.

A urine sample preparation workflow for the iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) technique was established. The reproducibility of this platform was evaluated and applied to discover proteins with differential levels between urine samples from CKD patients and control samples. A total of 40498 urine proteins were identified. Among them, 139 proteins consistently showed >2-fold differences between sample sets. Multiple Reaction Monitoring (MRM) analyses were made for confirmation in an independent cohort of patients and healthy subjects. Trends observed in the discovery phase (iTRAQ quantitative analysis) were confirmed for CKD (IV-V) itself by MRM for KING1 (with 6 transitions), CD59 (with 3 transitions), PIGR (with 6 transitions), WAP (with 3 transitions), AMBP (with 5 transitions) and β-2-MG (with 2 transitions). In early stages of CKD (I-II) significant variations were obtained for RBP4 (with 5 transitions). Four proteins were found alterated in response to CAD in CKD: NID1 (with 4 transitions), ZA2GP (with 2 transitions), KING1 (with 6 transitions) and AMBP (with 5 transitions).

4. CONCLUSIONS

We have identified a urine metabolic fingerprint associated with chronic kidney disease (CKD) in early and advanced stage in urine for TMANO, AFAG, Taurine ,

Guanidoacetate and Citrate and two cycle components of Glutathione catabolism :5-oxoproline and glutamate . The variation of these metabolites to CKD evolution.

Additionally, we have identified a potential metabolic fingerprint in urine for identifying coronary artery disease (CAD) associated to CKD advance stages (IV-V) composed by Homocysteine , Threonine, Leucine and Citrate.

Leucine, Threonine and Homocysteine responsed to CKD itself in plasma samples, and only Threonine and Citrate responded to CAD in CKD.

[1]HRMAS tissue study revealed 18 metabolites in rat kidney tissue with altered levels in early diabetic nephropathy compared to controls. Confirmation by LC-MS/MS (MRM) provided five significantly altered metabolites: Aldosterone, Myoinositol, Phosphatidylcholine (PDC), Trimethylamine-N-oxide (TMANO) and Glutamate.

Two components variation shown catabolism cycle Glutathione Glutamate 5 - oxoproline and led us to confirm the variation of the enzymes which catalyze transformation step, confirmed by LC-MS/MS (MRM). The variation of these enzymes, 5 - Oxoprolinase (OPLA) , gamma - Glutamilciclotransferasa (GGCT) and Glutamate-cisteínaligasa (GSH) , is reflected at the level of urine and plasma I-V stage of CKD.

By proteomic differential analysis KNG1, CD59, PIRG , WAP, AMBP, RBP4 and β-2-MG were found in urine as potential markers of CKD.

Four proteins were found to CAD associated to CKD: NID1, ZA2G, KNG1 and AMBP, but only 2 of these proteins (NID1 and ZA2G) responded to this situation and not to CKD itself.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. Circulation 2007; 116(1):85-97.

(2) Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular

Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Circulation 2003; 108(17):2154-69.

(3) Cerezo C, Ruilope LM, Segura J, Garcia-Donaire JA, de la Cruz JJ, Banegas JR et al. Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression. J Hypertens 2012; 30(1):204-9.

(4) Taal MW, Brenner BM. Renal risk scores: progress and prospects. Kidney Int 2008; 73(11):1216-9.

(5) Barri YM. Hypertension and kidney disease: a deadly connection. Curr Hypertens Rep 2008; 10(1):39-45.

(6) Spasovski G, Ortiz A, Vanholder R, El Nahas M. Proteomics in chronic kidney disease: The issues clinical nephrologists need an answer for. Proteomics Clin Appl 2011; 5(5-6):233-40.

(7) Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, Coombes JS, Cooper MA, Hoy WE. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. Kidney Int 2011; 80(8):806-21.

(8) Smith MP, Banks RE, Wood SL, Lewington AJ, Selby PJ. Application of proteomic analysis to the study of renal diseases. Nat Rev Nephrol 2009; 5(12):701-12.

(9) Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. Nat Rev Nephrol 2012; 8(1):22-33.

(10) Barderas MG, Laborde CM, Posada M, de la CF, Zubiri I, Vivanco F et al. Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases. J Biomed Biotechnol 2011; 2011:790132.

(11) Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C. Human urine as test material in 1H NMR-based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. Anal Chem 2007; 79(3):1181-6.

(12) Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Mol Syst Biol 2008; 4:222.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 29

1. Enfermedad Renal Crónica. definición. etiología y patogenia. 31

2. Marcadores de la Enfermedad Renal Crónica en investigación clínica. 33

3. Nuevos abordajes en el estudio de la Enfermedad Renal Crónica. aproximaciones "ómicas". 37

4. Proteómica. 38

4.1. Definición. 38

4.2. Preparación de la muestra para el análisis proteómico. 39

4.3. Técnicas de separación en el análisis de proteínas. 39

4.4. Técnicas instrumentales de análisis. Detección por Espectrometría de masas (MS). 41

4.5. Análisis de expresión diferencial de proteínas. Proteómica Cuantitativa. 44

4.5.1. Metodología "Multiple Reaction Monitoring" "MRM". 44

4.5.2. Análisis diferencial mediante espectrometría de masas con marcaje iTRAQ. 46

5. Metabolómica. 47

5.1. Definición. 47

5.2. Preparación de muestra para el análisis metabolómico. 47

5.3. Análisis metabolómico. 48

5.3.1. Análisis por Resonancia magnética nuclear (RMN). 48

5.3.2. Análisis por Resonancia magnética nuclear mediante ángulo mágico HRMAS. 51

5.3.3. Técnicas instrumentales de análisis. Cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas (MS). 52

5.3.4. Análisis estadístico multivariable. Quimiometria. Identificación de metabolitos y proteínas. 53

OBJETIVOS 55

MATERIAL Y MÉTODOS **59**

1. Metabolitos asociados a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina y plasma. 61

1.1. Selección de pacientes. 61

1.2. Pretratamiento de muestras de orina y plasma de individuos con Enfermedad Renal Crónica. 62

1.3. Fase de descubrimiento: Análisis de metabolitos en la muestra de orina mediante ^{1}H resonancia magnética nuclear. 63

1.3.1. Adquisición de espectros de ^{1}H RMN. 63

1.3.2. Análisis estadístico de los datos generados en los experimentos de ^{1}H RMN. 64

1.3.3. Identificación de metabolitos mediante RMN bidimensional. 64

1.4. Fase de validación: Análisis de metabolitos de muestras de orina y plasma mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en línea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS). 65

1.4.1. Adquisición de espectros. 65

1.4.2. Tratamiento estadístico de los datos generados mediante LC MS/MS (MRM). 68

2. Estudio del metaboloma del riñón de rata con nefropatía diabetica mediante la metodologia ^{1}HRMAS. 68

2.1. Selección de muestras de tejido. 68

2.2. Fase de descubrimiento: Análisis mediante ^{1}H-HRMAS. 69

2.2.1. Adquisición de espectros. 69

2.2.2. Análisis estadístico de los datos generados en los experimentos de ^{1}HRMAS. 70

2.3. Fase de validación: Análisis de metabolitos de tejido mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en línea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS). 71

2.3.1. Extracción de los metabolitos del tejido. 71

2.3.2. Adquisición de espectros. 71

2.3.3. Análisis estadístico de los datos generados mediante LC MS/MS (MRM). 72

3. Estudio de las enzimas del ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina en muestras de orina. 73

3.1. Selección de pacientes. 73

3.2. Pretratamiento de muestra de orina y plasma. 74

3.3. Análisis de proteínas mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en línea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS). 75

3.3.1. Adquisición de espectros. 75

3.3.2. Análisis estadístico de los datos generados mediante LC MS/MS (MRM). 76

4. Estudio diferencial de las proteínas asociadas a la Enfermedad Renal Crónica en orina en muestras de orina. 77

4.1. Selección de pacientes. 77

4.2. Fase de descubrimiento: Estudio de expresión diferencial de proteínas por marcaje isotópico iTRAQ 8plex. 78

4.2.1. Pretratamiento de muestras de orina y diseño experimental. 78

4.2.2. Digestión y marcaje iTRAQ de muestra de orina. 80

4.2.3. Fraccionamiento mediante isoelectroenfoque en muestra en solución (OFFGEL). 81

4.2.4. Separación multidimensional de los péptidos y análisis por espectrometría de masas. Análisis de los péptidos de cada fracción de OFFGEL mediante LC-MS/MS. 81

4.2.5. Identificación y cuantificación relativa de proteínas usando el programa Protein Pilot. 82

4.2.5.1. Criterios de identificación. 82
4.2.5.2. Criterios de cuantificación diferencial. 83

4.3. Fase de validación: Análisis de proteínas en muestras orina mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en línea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS). 84

4.3.1. Tratamiento muestras. 84

4.3.2. Adquisición de espectros. 84

4.3.3. Tratamiento estadístico. 87

RESULTADOS 89

1. Estudio de los metabolitos asociados a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina y plasma. 91

1.1. Fase de descubrimiento: Análisis mediante RMN. 91

1.1.1. Desarrollo del método de análisis de orina mediante Resonancia Magnética Nuclear. 91

1.1.2. Estudio de la Enfermedad Renal Crónica en estadios avanzados en muestras de orina mediante RMN. 92

1.2. Fase de validación 98

1.2.1. Desarrollo de métodos de análisis en muestra de orina mediante LC MS/MS MRM. 98

1.2.2. Análisis de un panel de metabolitos alterados en la Enfermedad Renal Crónica en estadios avanzados en muestras de orina mediante LC MS/MS MRM. 99

1.3. Estudio de las alteraciones del metaboloma en las muestras de orina en individuos en estadios iniciales de la Enfermedad Renal Crónica. 105

1.4. Estudio en muestras de plasma de los metabolitos asociados a ERC en muestras de orina. 109

2. Estudio del metaboloma del tejido en un modelo de nefropatía diabética mediante ^{1}HRMAS. 115

2.1. Fase de descubrimiento: Análisis del tejido renal en un modelo temprano de nefropatía diabética en rata mediante ^{1}HRMAS. 116

2.2. Fase de validación: Análisis metabolómico del tejido renal en un modelo temprano de nefropatía diabética en rata mediante LCMS/MS MRM. 121

3. Estudio de las enzimas del ciclo del glutatión vía 5-Oxoprolina en muestras de orina y plasma. 124

3.1. Desarrollo del método LC MS/MS MRM para proteínas con el equipo CHIPCUBE LC (QQQ) MS de Agilent Technologies. 125

3.2. Estudio de las enzimas que controlan el ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina en muestras en muestras de orina. 127

3.2.1. 5-Oxoprolinasa (OPLA) en muestras de orina. 129

3.2.2. gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) en muestras de orina. 130

3.2.3. Glutamato-cisteínaligasa (GSH) en muestras de orina. 131

3.3. Estudio de las enzimas que controlan el ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina en muestras de plasma. 132

3.3.1. 5-Oxoprolinasa (OPLA) en muestras de plasma. 133

3.3.2. gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) en muestras de plasma. 134

3.3.3. Glutamato-cisteínaligasa (GSH) en muestras de plasma. 135

3.4. Resumen del comportamiento de las enzimas del ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina. 136

4. Estudio de expresión diferencial de las proteínas en muestras de orina asociadas a la Enfermedad Renal Crónica. 137

4.1. Fase de descubrimiento: análisis diferencial por iTRAQ LC MS/MS en muestras de orina. 138

4.1.1. Identificación de proteínas. 138

4.2. Fase de validación: Estudio de las proteínas alteradas en la Enfermedad Renal Crónica mediante LC-MS/MS MRM en muestras de orina. 148

4.2.1. Estudio de las proteínas diferenciales en Enfermedad Renal Crónica frente individuos control en orina. 148

4.2.2. Estudio de las proteínas diferenciales en Enfermedad Renal Crónica con Enfermedad Arterial Coronaria asociada en muestras de orina. 157

DISCUSIÓN **165**

1. Estudio de los metabolitos asociados a la Enfermedad Renal Crónica en muestras orina y plasma. **169**

2. Metabolitos indicadores de la Enfermedad Arterial Coronaria asociada a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina y plasma. **171**

3. Estudio de los metabolitos alterados en el tejido renal de rata en un modelo temprano nefropatía diabética. **173**

4. Estudio de las enzimas implicadas en el ciclo del Glutatión

vía 5-Oxoprolina. **174**

5. Estudio de las proteínas asociadas a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina. **176**

6. Metabolitos indicadores de la Enfermedad Arterial Coronaria asociada a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina y plasma. **181**

7. Análisis global del estudio en la Enfermedad Renal Crónica. **182**

CONCLUSIONES **187**

BIBLIOGRAFÍA **191**

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo.

ADMA: Dimetilarginina Asimétrica.

AFAG: α-Fenilacetilglutamina.

AMBP: α-1-microglobulina/bikunina

AMIX : Analysis of MIXtures. Programa de BrukerBioSpin Ltd.

AMIX: Analysis of MIXtures.

B2MG: β-2-microglobulina.

Blast®: Basic Local Alignment search tool.

BUN: Nitrógeno Ureico.

CD59: Complemento CD 59.

CE: Energía de Colisión.

CID-HCD: Colision Induced Disociation-Hight Colision Disociation.

COSY: Correlation Spectroscopy.

DM: Diabetes Mellitus.

2D-DIGE: Bidimensional Difference gel electrophoresis. Electroforesis bidimensional.

DP: Potencial de Declustering.

DTT: Ditiotreitol.

EAC: Enfermedad Arterial Coronaria.

EF: factor de error.

ERC: Enfermedad Crónica Renal

ESI: Electrospray.

FDR: número de falsos positivos.

FG: Filtración Glomerular.

FID: Free Induction Decay.

GC: Cromatografía de Gases.

GC-MS: Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas.

GGCT: gamma-Glutamilciclotransferasa.

GPC: Glicerofosfocolina.

GSH_0 :Glutamato-cisteina ligasa reguladora.

GSH_1 :Glutamato-cisteina ligasa catalítica.

HDL: High Density Lipoprotein.

HILIC: Columnas de interacción hidrofílica.

HMDB :Human Metabolome DataBase.

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.

HRMAS: Resonancia de protón Magic Angle Spinning.

HSQC: Heteronuclear single-quantum Correlation Spectroscopy.

HTA: Hipertensión arterial.

IA: Yodoacetoamida.

IEF: Isoelectroenfoque.

IT: Trampa iónica.

iTRAQ: isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification.

KDOQI: National Kidney Foundation Outcomes Quality Iniciative.

KIM1: Molécula del daño renal 1.

KKS: Kalikrein-Kininogen.

KNG1: Kininogen 1.

LC: Cromatografía Líquida.

LC-MS/MS: Cromatografía Líquida- Espectrometría de Masas en tándem.

LC-MS: Cromatografía Líquida- Espectrometría de Masas (sistemas acoplados).

LDL: Low Density lipoprotein.

m/z: Masa/carga del ión.

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization.

METLIN: Metabolites and Tandem MS database.

MMCD: Madison Metabolomics Consortium Database.

MRM: Multiple Reaction Monitoring.

MS: Espectrometría de Masas.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NGAL: Neutrofila gelatinasa asociada a lipocalina.

NID1: Nidogen 1.

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy.

OPLA : 5-Oxoprolinasa.

PCA :Principal Component Analysis

PCA: Principal Component Analysis.

PCR: Proteína C reactiva.

PDC: Fosfatidilcolina.

pI: Punto Isoeléctrico.

PIRG: Receptor polimérico de inmunoglobulina

PLS: Partial Least Squares ó mínimos cuadrados parciales.

PLS: Partial Least Squares.

PLS-DA: Partial Least Squares ó mínimos cuadrados parciales-Análisis discriminante.

PLS-DA: Partial Least Squares-Discriminant Analysis.

PNA: Péptidos Natriurético Atrial.

PNC: Péptidos Natriurético Cerebral.

Q: Cuadrupolo.

QqQ: Triple cuadrupolo.

RAAS: Renina-Angiotensina-Aldosterona.

RBP4: Retinol-binding protein 4.

rf: Radiofrecuencias.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RP: Reverse Phase.

SAX: Strong Anion Exchange.

SC: Strong Cation Exchange.

SCR: Síndrome Cardio-renal.

SEC: Size Exclusion Cromatography.

STZ: Estreptozotocina.

TMANO: Trimetilamina-N-oxido.

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy.

TOF: Tiempo de vuelo.

TSP: Trimetilsililpropianato de sodio.

UniProtKB/Swiss-Prot : UniProt Knowledgebase.

VLDL: Very low density proteins

WAP: Whey acidic proteins.

ZA2G: Zinc-α-2-glicoproteína.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA. DEFINICIÓN. ETIOLOGÍA Y PATOGENIA.

La función del riñón es mantener la homeostasis del organismo. Esta función la realiza tanto en composición, eliminando productos metabólicos de desecho en forma de orina, como en volumen, filtrando la sangre (aproximadamente 200 litros de plasma, producen aproximadamente un litro de orina al día). Este proceso se realiza principalmente a través de las unidades de filtración denominadas nefronas. La nefrona es la unidad estructural y funcional de los riñones y participa en procesos de filtración, reabsorción y secreción. Además el riñón también tiene una función hormonal: realiza la segunda hidroxilación de la vitamina D la cual activa para su función; produce eritropoyetina en la médula renal y prostaglandinas, en él ocurre el catabolismo de la insulina y además participa en el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (1) .

La insuficiencia renal crónica es una situación en la cual los riñones son insuficientes para mantener la homeostasis del medio interno de una manera adecuada a causa de una lesión estructural irreversible presente a lo largo de un periodo de tiempo. Así se denomina enfermedad renal crónica (ERC) a cualquier daño renal o presencia de un filtrado glomerular menor de 60 ml ml/min/1,73 m^2 durante 3 meses (1).

Respecto a la etiología varía según la zona geográfica. En Europa las causas más frecuentes son las Glomerulonefritis y la Diabetes mellitus, le siguen la Nefropatía Vascular Hipertensiva o Nefroangioesclerosis, siendo esta la causa más común en la población mayor de 65 años. Se cree que más del 11% de la población mundial pueda estar afectada (2;3) (4).

La ERC encierra procesos fisiopatológicos con múltiples causas y cuya consecuencia es la pérdida inexorable del número y funcionamiento de nefronas. Las que quedan sufren un mecanismo compensatorio terminando en una hipertrofia, que se conoce como hiperfiltración (1). Este mecanismo produce a largo plazo esclerosis en las nefronas que quedan aún funcionales. Además, la ERC se caracteriza por glomeruloesclerosis, infiltración intersticial de leucocitos atrofia tubular y fibrosis tubulointersticial (6) (3) (5). Existen factores de progresión de la disfunción renal que son factores independientes de la causa, como la hipertensión arterial (HTA) y la proteinuria que son causa y consecuencia de la insuficiencia renal, la hiperlipidemia, hiperfosforemia y el tabaco (4;6).

La sintomatología asociada a la insuficiencia renal es llamada uremia o síndrome urémico. Actualmente se distinguen 5 estadios en la enfermedad de acuerdo con la National Kidney Foundation Outcomes Quality Iniciative (KDOQI) (6) (7):

Estadio I: No hay una manisfestación clínica clara. Existe hiperfiltración glomerular y los niveles de creatinina sérica y orina son normales. El filtrado glomerular es igual o mayor de 90 ml/min/1,73 m^2.

Estadio II: Daño renal con descenso leve de la filtración glomerular. El filtrado glomerular está entre 60-89 ml/min/1,73 m^2.

Estadio III: Comienza a elevarse la creatinina serica y la urea. Empieza a tener complicaciones moderadas. El filtrado glomerular está entre 30-59 ml/min/1,73 m^2.

Estadio IV: Empieza la sintomatología urémica. Hay un grave descenso de la filtración glomerular que está entre 15-29 ml/min/1,73 m^2.

Estadio V: Fallo renal. El filtrado glomerular es menor de 15 ml/min/1.73 m^2.

En estos pacientes, de estadio V, aparece además un mal control del agua y las sales, acidosis metabólica, hiperpotasemia, alteraciones endocrino-metabólicas, alteraciones hematológicas, osteodistrofia, disminución en la eliminación del fosforo, complicaciones digestivas, neurológicas, cutáneas y cardiovasculares (1).

La mortalidad de estos individuos es causa en un 50% complicaciones cardiacas, en un 25% de infecciones y 6% de complicaciones cerebrovasculares. Esto lleva a los investigadores a realizar multitud de estudios para encontrar las causas de esta patología, específicamente asociadas a la ERC que supone un riesgo particularmente elevado respecto a la población general. Así podemos ofrecer a los nefrólogos la posibilidad de realizar un diagnóstico temprano y preciso, una buena prognosis por si se pudiera combatir y unas dianas para los posibles fármacos.

En las complicaciones cardiovasculares hay tendencia a la ateroesclerosis acelerada siendo el infarto agudo de miocardio la primera causa de muerte en estos pacientes. Esto se produce por el aumento de LDL, VLDL y triglicéridos que se depositan en las arterias y además en el tejido renal. Aparece también HTA sobre todo en la fase terminal de la ERC. El aumento de la presión arterial a su vez es causa de la progresión de la ateroesclerosis a arterioesclerosis, y esto a su vez ocasiona la progresión de la insuficiencia renal (1). A esto tenemos que añadir factores como la hipopotasemia, frecuente en el fracaso renal ya que el 90% de la eliminación del potasio (K+) se realiza en los riñones, lo que puede producir alteraciones cardiacas.

En definitiva todos los pacientes con ERC tienen altísimo riesgo según las guías KDOQI de padecer enfermedades cardiovasculares. Constituyen del 40 al 50% de las muertes en ERC (8). Esto incluye enfermedad coronaria, cerebrovascular, enfermedad vascular periférica e insuficiencia cardiaca.

El desorden fisiopatológico que afecta al Corazón y Riñón, en el cual se potencian sus efectos de forma que el daño renal y el miocárdico progresan de forma acelerada y retroalimentándose en forma aguda o crónica, se llama Síndrome Cardio-renal (SCR)

(9). Este síndrome está en fase de definición y el estudio de su patogénesis y fisiopatología, reúne a distintas especialidades médicas por su complejidad, ya sea internistas, cardiólogos o nefrólogos. Son dos sistemas concomitantes lo que resulta difícil sobre todo a la hora de su manejo y pronóstico (10;11). El deterioro de la función renal es frecuente en los pacientes con cardiopatías, especialmente en aquellos con insuficiencia coronaria, pero no es menos frecuente el compromiso cardiovascular y miocárdico expresado como insuficiencia cardiaca en los pacientes con ERC.

Las respuestas que desde el punto de vista clínico (12;13) respecto a estas patologías son:

- La identificación de la ERC en su estadio más temprano.
- Predecir cómo va a progresar la ERC o cómo se mantiene estable.
- Poder identificar a los pacientes que prematuramente sufren enfermedad cardiovascular o presenta un mayor riesgo.
- Poder diagnosticar dentro de la ERC con especificidad, la patología concreta y la poder predecir respuesta a una terapia aplicada.

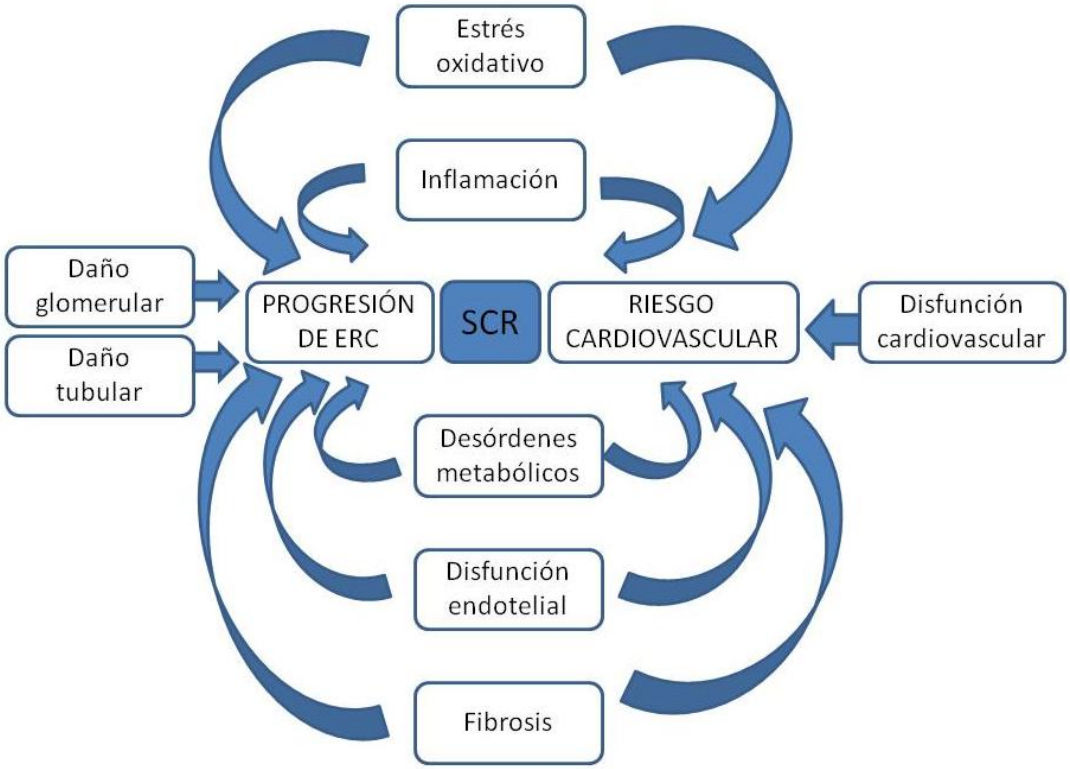

Figura 1. Síndrome Cardio-renal (SRC) (11;14).

2. MARCADORES DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA.

No se conocen a fondo los mecanismos moleculares responsables de la ERC, lo que trae como consecuencia en muchos casos de una intervención temprana adecuada (15). Los objetivos terapéuticos actuales pasan por disminuir la presión sanguínea y reducir la proteinuria/albuminuria. La inhibición del sistema renina-angiotensina tiene la doble ventaja de retardar la progresión de la enfermedad renal y disminuir el riesgo cardiovascular (16) (1).Sin embargo, el diagnóstico es complicado al tratarse de un proceso operante silencioso y asintomático hasta en un 50% de los casos. En este sentido y como se comentó con anterioridad, es fundamental y prioritario contar con nuevas herramientas que posibiliten un diagnóstico seguro, complementario, no invasivo, y que permita la clasificación de los pacientes con ERC según su riesgo cardiovascular.

La combinación de la medida del filtrado glomerular, Creatinina serica y altos niveles de proteínas en orina (proteinuria) y os altos niveles de Albúmina en orina (albuminuria) es la práctica más extendida para medir la progresión de la disfunción renal (1), sin embargo, estas medidas tienen sus limitaciones. La ERC tiene diferentes causas y está asociado por tanto a diferentes procesos patofisiológicos. La existencia de mecanismos que desencadenan la aparición de de la proteinuria pueden ser diferentes y, que exista un gran filtrado de proteínas plasmáticas no está completamente ligado con el daño renal, ya que hay veces que estos niveles se mantienen constantes y sin embargo el riñón continúa su deterioro (17). En las glomerulopatías como glomerulonefritis y nefropatía diabética predomina la proteinuria a expensas de la Albúmina. Esto quiere decir, que aunque existan proteínas en orina, no necesariamente es albúmina, por ejemplo cuando hay daño tubular. En otras patologías renales donde predomina la lesión tubular sobre la glomerular existe proteinuria manteniéndose constantes o ligeramente elevados los niveles de albúmina (1). Existen dos tipos de proteinuria patológica donde las proteínas del plasma son filtradas a la orina: la proteinuria glomerular, donde la albúmina y la Serotransferrina son las principales proteínas implicadas, y la proteinuria tubular, donde predominan proteínas de bajo peso molecular como la proteína de Tamm-Horsfall, también conocida como Uromodulina, β-2-microglobulina, lisozima y cadenas ligeras de inmunoglobulinas (2;18) . La diferencia entre estas dos causas de proteinuria no está en la cantidad excretada, está en las diferencias de pesos moleculares. La Creatinina, también muy utilizada en la práctica clínica, sobre todo su medida en suero, no es tampoco un buen parámetro. Cuando empieza a elevarse ya existe una reducción considerable en el filtrado glomerular que puede llegar al 50%. Su medida en orina puede estar sobrestimada por la secreción tubular de la misma y esto es más notable cuando el filtrado glomerular es bajo (19). Además la Creatinina puede tener un valor alterado ya que es dependiente de la edad, sexo, peso, hidratación, estado nutricional y masa muscular. También utilizado en la práctica clínica para ver el funcionamiento del riñón el nitrógeno ureico (BUN). Con él se mide la Urea de la sangre, producto de degradación proteica (20). Los riñones son los encargados de de

filtrar la Urea, en el caso de fracaso renal tenderá a acumularse en sangre. Otras posibles causas de BUN elevado incluyen la deshidratación y la insuficiencia cardíaca. Como pruebas invasivas y para el diagnóstico de la nefropatía concreta se recurre a la biopsia del tejido renal mediante los estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Por otro lado, las pruebas de imagen *in vivo* se puede estudiar, con sus limitaciones la lesión renal. Sin embargo, no son pruebas diagnósticas rutinarias y sólo se indican en los casos específicos con complicaciones adicionales. Con una combinación de estas medidas y pruebas se llega a emitir el diagnóstico clínico (3) (21).

Algunos de los marcadores actuales, aún en investigación y sujetos a controversia son por ejemplo, la proteína C reactiva (PCR) (22). Es una molécula pequeña (13KDa), metabolizada en el propio riñón después de la absorción tubular y es independiente de la masa muscular. Aumenta durante los procesos inflamatorios. Con ello, aunque estudios demuestren que puede ser marcador de progresión de la ERC, pero es orientativa porque puede ser elevada por otras causas. La Cistatina C, también es usada para el diagnóstico en enfermedades cardiovasculares. Numerosos estudios han demostrado que altos niveles en plasma reflejan, en pacientes sin enfermedad renal, enfermedad arterial coronaria severa. En consonancia, otros estudios en pacientes con ERC han encontrado sus altos niveles plasmáticos relacionados con accidentes cardiovasculares e insuficiencia cardiaca (23-27). Neutrofila gelatinasa asociada a lipocalina (NGAL) es una lipocalina transportadora de hierro, está altamente expresada en el epitelio tubular de la nefrona distal y aparece como marcador temprano del daño renal. Puede aparecer con diferentes formas moleculares como dímero o monómero pero es una evidencia que el incremento de sus niveles tanto en orina como en suero reflejan el fracaso renal en un amplio espectro de las patologías asociadas a la ERC (28-31). La molécula del daño renal 1 (KIM1), es una proteína de la transmembrana tubular con una función inespecífica. No es detectable en el riñón sano pero sus niveles se disparan en el caso de daño renal. No sólo ha sido observada en el tejido, sino que también es detectable en orina incrementando sus niveles en el fracaso renal. También ha sido relacionada con el daño producido por toxinas o fármacos (28-30). La dimetilarginina asimétrica (ADMA) reduce la producción de oxido nítrico y por tanto la vasodilatación, disfunción endotelial y el daño renal. Es fácil, por ello, entender porque este aminoácido alquilado es marcador de ateroesclerosis y está asociado al incremento de la tensión sanguínea. Ha sido asociado recientemente a la progresión en la ERC, pero no hay estudios suficientes para confirmarlo(28;32;33).

Otras moléculas relacionadas con ERC son los llamados péptidos natriuréticos, atrial (PNA) y cerebral (PNC), con 28 y 32 aminoácidos respectivamente. El PNA tiene efecto dilatador y es liberado como respuesta al aumento de tensión arterial. Tiene efectos fisiológicos a nivel renal, vascular y cardiaco. El PNC posee actividad diurética, puede ayudar a bajar la resistencia vascular y su acción fisiológica es similar a PNA. PNA tiene un efecto neto, baja volumen sanguíneo y el gasto cardiaco. Ambos son usados para la detección y diagnostico de la insuficiencia cardiaca (25;27;29).La glicoproteína Apolipoproteína A IV ha sido encontrada tanto en estadios tempranos

como en los últimos estadios de la ERC. Ligada al transporte de colesterol es un reflejo de la función renal (14).

Cambios en aminoácidos específicos, en ácidos grasos de cadena corta, aminas y sus derivados, productos derivados del metabolismo de los fosfolípidos, intermedios del ciclo de la urea y del ciclo del ácido cítrico, osmolitos orgánicos (relacionados con la progresión del daño del riñón), derivados de los azúcares y también moléculas como el Lactato, Cresil-sulfato y Hipurato, todos ellos han sido relacionados en diferentes estudios con la ERC. Alguno de estos compuestos está relacionado con el transporte activo a través del riñón, quiere decir que si existe daño renal este transporte es alterado y puede ser reflejado en la orina. Este es el caso de los aminoácidos libres (34-36).

En la insuficiencia renal el resultado de algunos trabajos muestra cambios en aminoácidos específicos y una relación de l ERC con el metabolismo de los fosfolípidos. Otras veces, se muestra alterado el perfil metabólico de pacientes en prediálisis, aumentando el nivel de los metabolitos polares y bajando las concentraciones de lípidos en plasma (34;37). Otras observaciones sugieren trastorno en el catabolismo de los triglicéridos y β-oxidación en pacientes con uremia (36;38). Un marcador que se encontró efectivo fue la 1-metillinosina, para estimar la dosis adecuada en hemodiálisis (34;39).

Estos cambios metabólicos pueden ser lógicos, aunque en algunos estudios estén correlacionados con el descenso del filtrado glomerular, puede ser, como es el caso del Cresil-sulfato y Hipurato que estén asociados a otras patologías con lo que necesitan ser validados, antes de confirmar su valor como potenciales marcadores (40-42).

Por otro lado, no hay marcadores fuertemente asociados a patologías renales concretas, sí existen más estudios centrados en la nefropatía diabética, probablemente por alta prevalencia de la diabetes dentro de la ERC. La mayor parte de estos estudios comparan individuos con nefropatía diabética con individuos sanos, sin corroborar resultados con otras nefropatías. Los cambios producidos en estos pacientes corresponden sobre todo con cambios en ácidos grasos libres, fosfolípidos y lipoproteínas HDL y LDL, debido al síndrome metabólico que suele acompañar a la enfermedad diabética. También han sido relacionados con esta patología los intermedios del ciclo del ácido cítrico, pero sin ser específicos de ella. La alteración de los lípidos es común en ERC, pero algunos estudios han enfocado esta alteración a la glomerulonefritis primaria. Análisis llevados a cabo por resonancia magnética nuclear (RMN) asocian a la nefropatía mesangial IgA (enfermedad de Berger), metabolitos que otros estudios han visto en varias nefropatías y que corresponden al fracaso renal (34;43).

Existen muchos otros potenciales marcadores que están siendo evaluados para su uso en clínica. En cualquier caso es preciso realizar una validación a largo plazo en estudios clínicos prospectivos y probados en diferentes tipos de población para eliminar la variabilidad producida por sexo, edad, raza, tipo de situación nutricional, etcétera. La utopía sería definir con seguridad que estos trastornos metabólicos proceden de la

propia enfermedad. Algunos de estos compuestos están en el plasma unidos a la albúmina, si ésta aparece con el daño en el filtrado glomerular es lógico que aparezcan también las moléculas unidas a ella, sin tener ninguna relación con un posible trastorno metabólico causado por la patología. Ciertos estudios proponen posibles marcadores cuya alteración parece estar más asociados a la técnica utilizada que a la propia enfermedad. Hace falta en este tipo de análisis comprobarlo por diferentes técnicas analíticas, ya que los metabolitos poseen naturaleza química muy diferente y no se puede abarcar su estudio con una sola tecnología.

3. NUEVOS ABORDAJES EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA. APROXIMACIONES "OMICAS".

El análisis "omico" es de tipo global, sin sesgo ni preselección de antemano de moléculas diana particulares, lo que proporciona un gran potencial en la identificación de potenciales nuevas moléculas implicadas en diferentes patologías.

Si bien es cierto que las técnicas "-ómicas" tienden a generar un cúmulo de datos que, al margen de su calidad, no siempre son fáciles de interpretar, manejar, extrapolar y traducir al campo clínico-asistencial (44;45). Aún así proporcionan la mejor estrategia conocida hasta la fecha para abordar en bastante amplitud el estudio de estas moléculas (46).

3.1. La selección de la muestra en el análisis proteómico y metabolómico.

El conocimiento previo del sistema biológico es necesario en este tipo de análisis. Esto nos permitirá diseñar protocolos de preparación de muestra adecuados en función de las características de la muestra. La mayoría de los análisis clínicos se llevan a cabo con fluidos biológicos como suero/plasma u orina debido a su facilidad de obtención y por ser un reflejo directo del metabolismo de un individuo u organismo. Ambos tipos de muestras proporcionan información complementaria sobre el estado de un organismo.

El plasma/suero muestra el estado de un individuo en el momento de la toma de la muestra y su composición refleja los procesos catabólicos y anabólicos que ocurren en él. Por otro lado, la orina proporciona un registro promedio de los metabolitos polares descartados por un organismo como resultado de los procesos catabólicos.

La orina, es una gran fuente de estudio en metabolómica. El suero o plasma está limitado por la presencia de una elevada concentración de proteínas que interfieren en la detección de metabolitos (21). El análisis directo de la orina sin pretratamiento minimiza las pérdidas generadas por la manipulación, pero tiene la limitación de que son muestras con alto contenido salino y pueden presentar fenómenos de supresión de ionización, formación de aductos poco frecuentes y afectar de forma negativa al funcionamiento de la instrumentación para el análisis espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear. Además es un fluido relativamente estable en cuanto a

términos de composición de proteínas/péptidos si lo comparamos con otros biofluidos como el plasma o suero, donde la degradación proteolítica por las proteasas endógenas es frecuente durante la manipulación (47).

El análisis de tejidos mediante espectrometría de masas ofrece la posibilidad de estudiar "in situ" mecanismos fisiopatológicos así como la caracterización espacial de la distribución de las moléculas, pudiendo ver el perfil de las mismas distribuidas en las distintas regiones de tejido. Este tipo de estudio tiene inconvenientes como el carácter invasivo en la extracción de muestra, la heterogeneidad y la escasa disponibilidad de la misma de origen humano (48).

La recogida y transporte almacenamiento para la conservación óptima para las muestras también es clave. Las muestras mal conservadas pueden experimentar descomposición microbiológica y cambios químicos no deseados. Por ello, el control de las fuentes de variabilidad es crucial para evitar errores en la interpretación de los resultados. Las principales vías de variabilidad vienen de la toma de muestra y los pretratamientos en los laboratorios antes de su análisis, como los ciclos de congelación/descongelación o las condiciones de almacenamiento inadecuadas.

Es importante tener en cuenta que sea cual sea el origen de las muestras biológicas, deben evitarse fuentes potenciales de artefactos durante el proceso de recogida de las mismas con el fin de obtener resultados que posean una buena calidad y fiabilidad.

En los apartados correspondientes se detallarán los protocolos empleados.

4. PROTEÓMICA.

4.1. Definición.

La proteómica (49) no sólo incluye la identificación y cuantificación de proteínas, también la determinación de sus localizaciones, modificaciones, interacciones, actividades y funciones. Es decir, 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 (49;50). El término proteoma, entendido como el conjunto de todas las proteínas expresadas por un genoma dado, no fue definido hasta finales de 1994 (50). El término “proteome”, que surge de la abreviación de la expresión inglesa “PROTEin complement of the genOME”, sólo hace referencia al conjunto de proteínas expresadas por la célula (49), pero, según su naturaleza dinámica, el proteoma debe entenderse como el conjunto de proteínas expresadas en un tiempo y espacio dado, debido a que la composición del mismo varía. Así, la composición de un proteoma es dependiente de una gran variedad de factores internos y externos tales como el medio ambiente, edad, sexo, enfermedad, etcétera. La importancia de las proteínas se ve resaltada por su participación en la mayoría de

procesos y funciones celulares. Su análisis para un mayor conocimiento de todos estos procesos es cada vez más interesante por su importante papel en todos los organismos vivos.

4.2. Preparación de la muestra para el análisis proteómico.

El origen de la muestra a estudiar puede ser muy diverso; por ello la preparación de la muestra para su análisis proteómico es un paso crítico que va a limitar la cantidad y la calidad de los datos obtenidos. En cualquier caso es fundamental que las estrategias de extracción, purificación proteica, concentración, limpieza, etc. sean compatibles con el tipo de análisis posterior seleccionado. Los procedimientos elegidos serán altamente dependientes del tipo de muestra y el análisis a realizar.

La facilidad con la que pueden introducirse contaminantes en la muestra, así como la de que parte del contenido proteico pueda degradarse durante su manipulación, subraya la importancia de la primera etapa de todo experimento. La muestra debe ser manejada con el máximo cuidado, prestando especial atención a evitar cualquier contaminación. La habitual presencia de queratina humana, proteína contaminante que con mayor frecuencia se encuentra en los análisis proteómicos, enfatiza la importancia de un manejo cuidadoso de la muestra durante su preparación. Además, muchos de los agentes químicos utilizados, como por ejemplo, la extracción de proteínas desde la matriz deben ser cuidadosamente eliminados de antes de su análisis por espectrometría de masas, dado que la presencia de los mismos también influye negativamente en los resultados finales obtenidos (51).

4.3. Técnicas de separación en el análisis de proteínas.

La instrumentación en el campo de la proteómica ha mejorado la última década, aún así el conjunto total de proteínas que constituye cualquier proteoma es demasiado complejo para ser medido en una sola aproximación. El fraccionamiento de la muestra permite separar las proteínas presentes en una muestra dando lugar a fracciones más sencillas que serán analizadas por separado, permitiendo incrementar el número de proteínas identificadas y favorecer la detección de aquellas presentes en menor concentración. Según la muestra en estudio y la técnica elegida para su análisis, el fraccionamiento se podrá llevar a cabo basándose en distintos parámetros y empleando distintos sistemas; así las proteínas podrán ser separadas según su carga (cromatografía de intercambio iónico), tamaño (SDS-PAGE), polaridad (cromatografía de fase reversa) o punto isoeléctrico.

En proteómica se utiliza frecuentemente la cromatografía líquida, ya que puede ser directamente acoplada a la espectrometría de masas y puede aplicarse tanto a proteínas como de péptidos. Según la propiedad física o química en base a la cual se lleve a cabo la separación de las proteínas existen varios tipos de fase estacionaria. Los más

comunes en proteómica son RP (Reverse Phase), de exclusión molecular (SEC, Size Exclusion Cromatography), de intercambio catiónico (SCX, Strong Cation Exchange) o aniónico (SAX, Strong Anion Exchange) y de afinidad (52).

La forma de fraccionamiento llamada OFFGEL (Agilent Technologies). Consiste en un fraccionameinto de proteínas o péptidos en disolución. Está técnica utiliza el isoelctroenfoque para lograr una separación por el punto isoeléctrico (pI) aprovechando esta propiedad de las proteínas. Las fracciones resultantes en disolución hacen más fácil el análisis por LC-MS que los un fraccionamiento en gel con resultados altamente reproducibles (53).

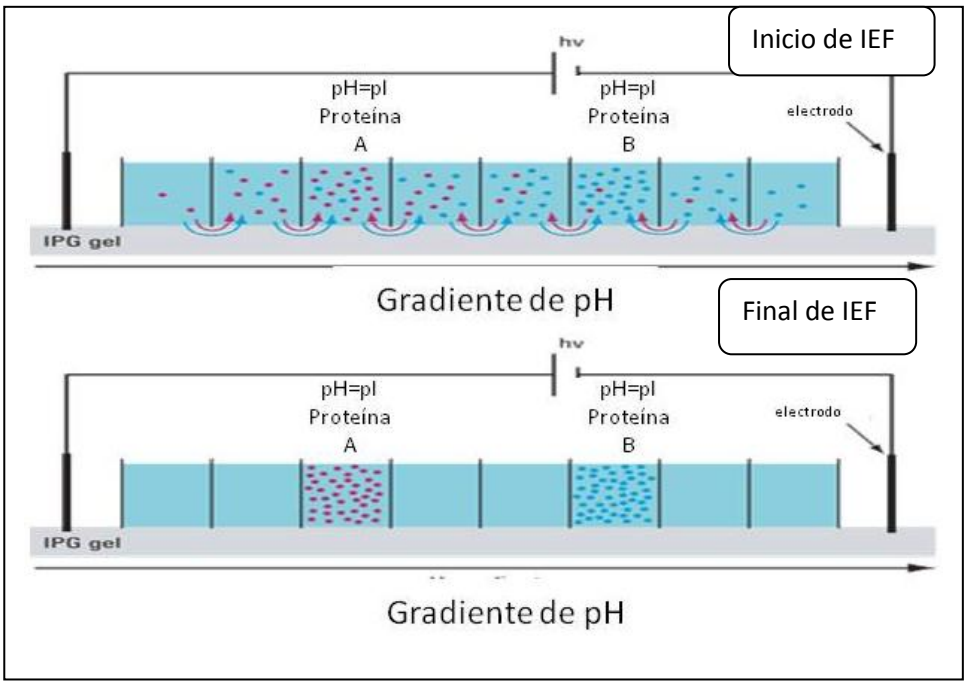

Figura 2. Fraccionamiento proteico por la tecnología OFFGEL (Agilent Technologies). En la figura se muestra las proteínas A y B separándose a lo largo del gradiente de pH.

La cromatografía en fase reversa consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica modificada con cadenas hidrofóbicas en la matriz de las columnas con RMe_2SiCl, dónde la R es una cadena alquil tal como $C_{18}H_{37}$ o C_8H_{17}, por ello se denominan C18 o C8 respectivamente. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente (menor tiempo de retención). Las columnas de fase reversa permiten su empleo para llevar a cabo la separación de una mezcla de proteínas o péptidos en base a su hidrofobicidad.

En cromatografía de afinidad, las proteínas se separan en base a su unión específica a ligandos de la matriz de la columna. Una columna de afinidad puede retener específicamente a una o varias proteínas o péptidos, lo que implica el uso de anticuerpos unidos a la matriz, o puede unir grupos específicos de proteínas y péptidos basándose en la afinidad por determinadas moléculas (54).

En este apartado y siguientes se hace referencia en particular a las empleadas en el desarrollo de la esta tesis doctoral.

4.4. Técnicas instrumentales de análisis. Detección por Espectrometría de masas (MS).

La espectrometría de masas es un método analítico que se basa en medir la relación de la masa respecto a la carga de las moléculas (ratio m/z). Se lleva a cabo mediante ionización de las mismas, separación de los iones resultantes de acuerdo con su relación masa/carga, y la posterior detección de las abundancias de los mismos.

Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos, que en orden secuencial de actuación en un análisis por espectrometría de masas son: fuente de ionización (MALDI, ESI), analizador de masas (cuadrupolo, tiempo de vuelo, trampa iónica, etc.) y detector. La fuente de ionización convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que pasen al analizador de masas, donde son separadas según su relación masa/carga. Las señales llegan de manera secuencial al detector donde son captadas e integradas por un sistema informático que genera los correspondientes espectros de abundancia en ordenadas y la relación m/z en abscisas. Por comparación con los espectros recogidos en las bases de datos (NCBI, UniProt…) y empleando los motores de búsqueda adecuados (Mascot, Sequest..) se procederá a la identificación de las proteínas. Los diferentes analizadores se pueden combinar haciendo referencia a lo que se llama espectrometría de masas en tamdem. Las configuraciones más habituales de estas combinaciones hasta la fecha son: Triple cuadrupolo (QQQ), cuadrupolo y tiempo de vuelo (Q-TOF), trampa iónica (IT), cuadrupolo-cuadrupolo-trampa iónica lineal (Q-Q-LIT), Trasformada de Fourier (FT) y Orbitrap.

Explicaremos brevemente las fuentes de ionización y los analizadores utilizados en este trabajo. Se ha trabajado con las siguientes fuentes:

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) (MALDI): El analito se mezcla con una matriz, consistente de un compuesto aromático en presencia de un compuesto orgánico y se deposita en una superficie metálica. Al evaporarse el compuesto orgánico la matriz cristaliza junto con el analito. La placa metálica se introduce en la cámara de vacío del espectrómetro de masas, y a continuación se incide con un láser pulsado, sobre ella que según el instrumento puede ser de distinto origen como nitrógeno. La energía del láser expulsa iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y moléculas neutras, que crean

una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y formando complejos con pequeños cationes. La acción de un campo eléctrico produce el movimiento de los iones del analito hacia el analizador de masas (54) (55).

Electrospray (ESI): Se introduce el analito disuelto en un solvente volátil y es llevado a un fino capilar que está sometido a un alto voltaje. Debido al alto voltaje se produce una repulsión de cargas y la disolución pasa a forma de espray de gotas cargadas positiva o negativamente según el modo de trabajo. En proteómica se suele trabajar en modo positivo. Al entrar en la cámara de vacío del espectrómetro de masas, son sometidas a la acción de una corriente de gas a alta temperatura, lo que elimina el disolvente restante, los analitos se repelen entre ellos, vencen la tensión superficial y se mueven hacia en analizador (56).

CHIPCUBE: La tecnología CHIPCUBE (Agilent Technologies) presenta una superior sensibilidad, reproducibilidad en tiempos de retención y definición de los picos cromatográficos respecto a sistemas convencionales de nLC; el QQQ, dotado de un sistema "Jet Stream", que mejora la formación del espray y favorece la entrada de la muestra ya ionizada al detector, presenta a su vez superior sensibilidad, especificidad y selectividad. Se trata de una tecnología específica para fuente nanospray LC-MS, donde en un CHIP se unen una precolumna o columna de enriquecimiento y una columna cromatográfica. Esto elimina las tediosas y complejas conexiones que comprenden a los sistemas de este tipo. Reduce así la posibilidad de fugas y elimina volúmenes muertos. Este chip, a su vez está integrado en un sistema CHIPCUBE, que consiste en un cubo donde están todas las conexiones con una válvula para cambiar de precolumna a columna y la fuente de nanoESI. El sistema está colocado ortogonalmente y acoplado en línea al MS y dada la reducción de volúmenes muertos y conexiones, proporciona mayor sensibilidad y robustez. Otra ventaja es que se evitan muchas contaminaciones al tener una manipulación mínima (57).

Para el análisis de proteínas con el CHIP se trabaja en modo de ionización positivo, por dos razones: porque los péptidos y proteínas ionizan mejor en este modo y porque esta tecnología de momento no permite la ionización en modo negativo. El voltaje es más bajo que cuando se trabaja en una fuente ESI. Normalmente se suele trabajar en ESI con voltajes de 3500-4000 V, con el CHIPCUBE el voltaje optimizado es de 1700 V, se puede subir hasta 2000V (voltajes de espray).

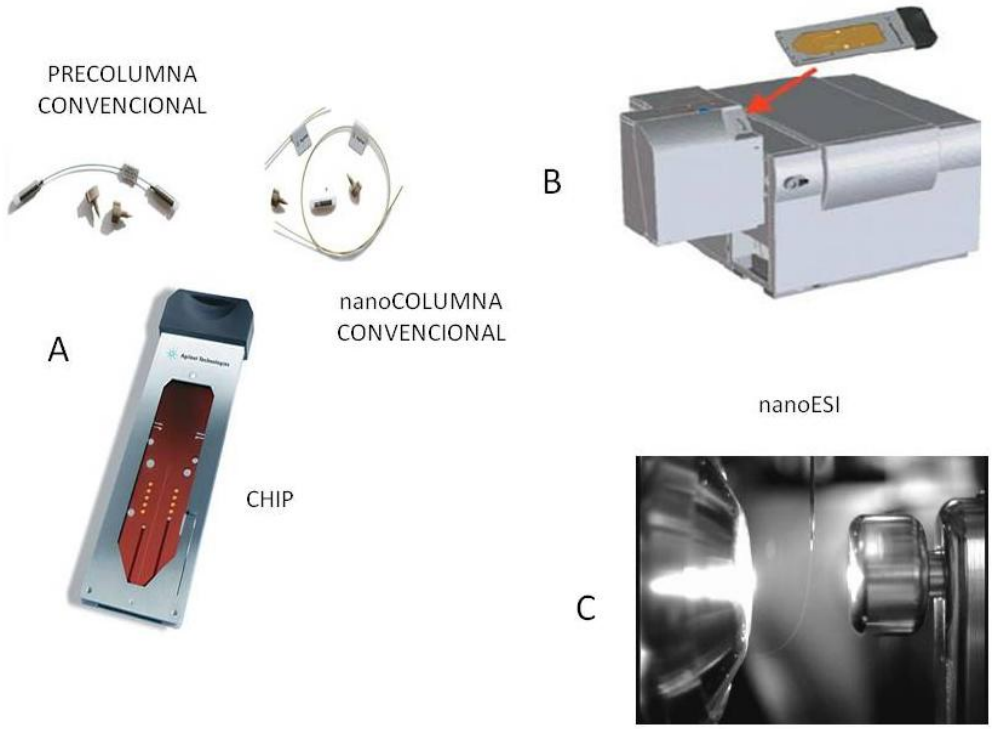

Figura 3. A) Comparación del tamaño de las nanocolumnas y precolumnas convencionales con el sistema CHIP. B) Equipo 6460 QqQ en línea al CHIPCUBE y sistema LC 1200 Series. C) Foto del nanospray obetnido con el CHIPCUBE.

Como analizadores tenemos:

Cuadrupolo (*quadrupole*, Q): está formado por cuatro barras conductoras de sección hiperbólica alineadas paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario situado sobre el eje Z, donde los electrodos opuestos están conectados y los electrodos adyacentes están eléctricamente aislados. Se aplica una combinación de corriente continua (DC) y voltajes de radiofrecuencia (RF) sobre los pares de barras/electrodos. La magnitud del voltaje de radiofrecuencia determina la relación masa/carga que es capaz de describir una trayectoria tal que atraviesa el analizador y alcanza el detector. De modo que variando dicha magnitud se podrán detectar los fragmentos iónicos cargados que se generaron en la fuente de ionización y que son característicos de cada compuesto. Actualmente se suelen emplear hexapolos u octapolos, aunque el analizador de masas sigue conservando su denominación de cuadrupolo (57;58).

Tiempo de vuelo (time of flight, TOF): En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Las partículas aceleradas pasan entonces a un tubo analizador sobre el que no actúa ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma

energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas (55).

Trampa iónica (ion trap, IT): Una trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados en toma de tierra. Los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrómetro de masas los iones quedan atrapados en el interior de la trampa mediante la aplicación de los voltajes y radiofrecuencias adecuados. Los iones que no interesan se eliminan de la trampa y se deja el que nos interesa estudiar hasta que es seleccionada su masa (59;60) .

Orbitrap: En este tipo de analizador, los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es contrarrestada por la fuerza centrífuga. Así los iones dan vueltas alrededor del electrodo central. Adicionalmente los iones también se mueven delante y detrás a través del eje del electrodo central. Los iones con una específica relación masa-carga se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central, la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga (m/z o m/q). La trampa puede ser utilizada como un analizador de masa (60-62)

4.5. Análisis de expresión diferencial de proteínas. Proteómica Cuantitativa.

4.5.1. Metodología “Multiple Reaction Monitoring” “MRM”

Existen diversas formas de combinar las técnicas de separación con las técnicas de análisis para lograr una mayor aproximación al objeto de estudio. Es frecuente que la cromatografía líquida esté acoplada a un espectrómetro de masas con fuente ESI. Habiendo muchas más metodologías de trabajo, en esta introducción explicaremos la metodología “multiple reaction monitoring” (MRM) por ser la más utilizada para trabajar en un triple cuadrupolo y empleada en múltiples estudios que integran la presente tesis doctoral. Es una metodología idónea para la detección sensible y selectiva de un conjunto de moléculas seleccionado de antemano, con gran capacidad de muestreo ("high throughput") y haciéndolo especialmente idóneo para estudios de validación de candidatos a marcador de diagnóstico, pronóstico y respuesta a

intervención farmacológica en todo tipo de patologías, así como análisis cuantitativo de proteínas y metabolitos objeto de interés(63;64).

El analizador triple cuadrupolo (QqQ), consiste en tres cuadrupolos conectados en serie. El cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) funcionan como dos analizadores de tipo cuadrupolo conectados en serie. El cuadrupolo 2 (q2), o celda de colisión, se sitúa entre de Q1 y Q3. El q2 es representado con minúsculas por no ser un cuadrupolo en sí mismo. Es un cuadrupolo especial en el que se aplica una energía, llamada energía de colisión (CE), que permite fragmentar los iones obtenidos en la fuente de ionización. Esta energía puede tomar diferentes valores, lo que permite obtener espectros de masas en los que aparecen diferentes fragmentos con diferentes relaciones de intensidad entre ellos (65).

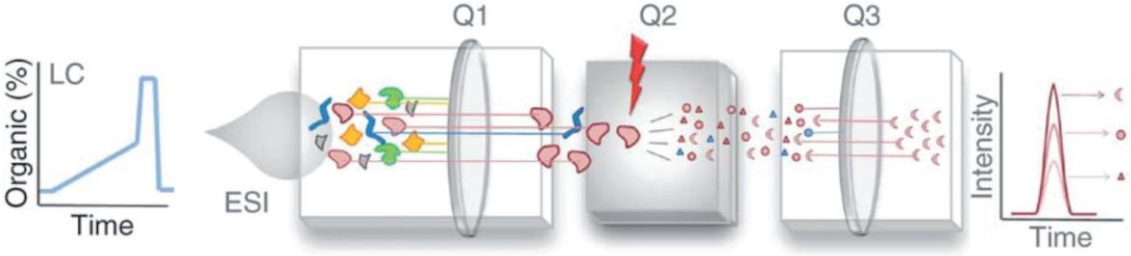

Figura 4. Figura a modo de esquema en la que podemos observar los diferentes componentes y funcionamiento de un triple cuadrupolo (QqQ).

Fijándonos en la figura 4, donde se representan el esquema de los cuadrupolos, en el cuadrupolo 1 (Q1), la masa del analito se selecciona intacta, cuando pasa al cuadrupolo 2 (q2) es fragmentado por colisión de un gas, que suele ser N_2, esos fragmentos pasan al cuadrupolo 3 (Q3). Así tenemos dos selecciones masa/carga (m/z): m/z 1 y m/z 2. De cada m/z 1(precursor) se obtienen varios m/z 2 (fragmentos). A cada para m/z 1->m/z 2 se le llama transición. A este método se le llama monitorizar la reacción y se nombra en plural múltiple, ya que de un precursor se miden varios fragmentos y además es posible monitorizar varias transiciones por análisis. Así tenemos: “multiple reaction monitoring” en inglés (“MRM”) (66;67)

Esto nos proporciona una forma de cuantificación y a su vez de validación única, ya que no vamos a detectar una mezcla de compuestos, sino que sólo observaremos nuestro compuesto a estudio, de modo específico y dirigido.

Este modo de trabajo, permite obtener espectros de masas altamente selectivos, con gran sensibilidad. Es muy útil en los procesos en los que se requiere analizar sustancias concretas, de las que se conoce el peso molecular y el patrón de fragmentación.

4.5.2. Análisis diferencial por espectrometría de masas con marcaje iTRAQ.

En los últimos años se ha producido un avance en los métodos de cuantificación asociados a la espectrometría de masas. La medida de la abundancia de proteínas de expresión diferencial cuantitativa, puede realizarse, entre otras opciones, utilizando marcadores isotópicos estables incorporados en la estructura molecular de los aminoácidos. Esto permite la identificación de un gran número de moléculas utilizando poca cantidad de muestra.

Siendo una de las aproximaciones proteómicas empleadas en este trabajo, resumiremos brevemente sus fundamentos. iTRAQ, cuyas siglas en inglés quiere decir: isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification (Applied Biosystems), es una metodología que permite cuantificar y observar modificaciones proteicas mediante un marcaje químico. A diferencia del 2D-DIGE, no se basa en geles sino en una digestión peptídica de las muestras proteicas, posterior marcaje de los péptidos resultantes y análisis final por LC-MS/MS. Emplea un marcaje con moléculas isobáricas (de igual masa nominal) que constan de tres regiones: 1) una activa de unión a péptido a través de un grupo N-hidroxisuccimida, capaz de reaccionar con el grupo amino N-terminal de los péptidos y el grupo amino de la cadena lateral de las lisinas; 2) una región señal de masa variable, que permite identificar cada una de las muestras a analizar sin alterar la carga ni la eficiencia de ionización del péptido marcado y 3) un grupo balance para que la masa total sea igual en todos los marcajes. Los cuatro grupos señal aparecen en el espectro de masas en m/z 114, 115, 116 y 117, si se trata de un marcaje 4 plex y 113, 114,115, 116,117, 118,119, y 121si se trata de un marcaje 8 plex (51;68-70).

Las muestras proteicas son digeridas con proteasas y los péptidos resultantes de cada muestra se marcan con los diferentes reactivos iTRAQ por separado, un marcaje por muestra. Una vez marcadas, las muestras se combinan y analizan por LC-MS/MS. Como el marcaje es isobárico, los péptidos idénticos pero con una marca diferente según la muestra de la que procedan, no se distinguen cuando son analizados por MS. En cambio, mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se consigue, por un lado, la identificación de las proteínas presentes mediante la búsqueda en bases de datos y por otro lado, el análisis semicuantitativo de las mismas por comparación de las intensidades relativas de los iones señal, que son detectables en la parte de masas bajas del espectro de fragmentación de cada péptido. Variaciones en dichas intensidades se traducen en una variación en los niveles de la proteína que dio lugar a dicho péptido.

Una vez digeridas y marcadas se fraccionan para que el análisis resulte más sencillo y el abordaje más completo. Esto es de gran importancia en el estudio vía iTRAQ, ya que las muestras a analizar suelen ser de gran complejidad. Las fracciones resultantes se analizan por LC-MS/MS.

Los reactivos de iTRAQ suponen un avance en los métodos de marcaje al permitir el análisis simultáneo de hasta ocho muestras en la versión actual de los mismos. Al

incorporarse a todos los péptidos presentes en la muestra, se incrementa la confianza de las identificaciones proteicas realizadas al alcanzarse con ellos un mayor porcentaje de cobertura de las secuencias polipeptídicas de las proteínas.

5. METABOLÓMICA

5.1. Definición

Entendemos por metabolómica la obtención de una manera simultánea y global, de perfiles correspondientes a múltiples concentraciones de metabolitos y de sus fluctuaciones sistémicas y celulares en respuesta a fármacos, dieta, genética, estilo de vida, entorno y estímulos, de forma que sea posible caracterizar los efectos adversos y beneficiosos de esas interacciones (71-73)

Al contrario que las proteínas o los genes, las cuales, en muchos casos, para ser activas necesitan modificaciones post-traduccionales o epigenéticas, respectivamente, los metabolitos sirven como indicadores directos e la actividad bioquímica de la célula en un momento determinado.

Al igual que en proteómica, el análisis metabolómico es de tipo global, sin sesgo ni preselección de antemano de moléculas diana particulares, lo que proporciona un gran potencial en la identificación de potenciales nuevas moléculas implicadas. La metabolómica persigue la descripción analítica de muestras biológicas complejas, e intenta caracterizar y cuantificar todas las moléculas pequeñas de ese tipo de muestras. Sin embargo, medir el metaboloma es un reto analítico considerable. Esto es debido a la naturaleza lábil de los metabolitos, el rango ampliamente dinámico y diverso de muchos de ellos, la complejidad química y heterogénea de los mismos, la falta de técnicas analíticas automatizadas que puedan medir cuantitativamente un gran número de metabolitos de estructura desconocida, el rendimiento de las mediciones y la naturaleza elaborada de los protocolos de extracción (71).

5.2. Preparación de muestra para el análisis metabolómico.

Como ya se ha mencionado para el estudio de las proteínas por técnicas proteómicas, la extracción de metabolitos es también una etapa clave. La extracción de metabolitos nos facilita análisis, al eliminar interferencias que puedan dificultarlo (sales, especies macromoleculares) y obtener de un extracto compatible con la técnica analítica. A veces es necesario concentrar la muestra porque el objeto de estudio se encuentra a nivel de trazas.

5.3. Análisis metabolómico.

Las plataformas para las medidas del metaboloma deben ser capaces de discriminar un gran número de metabolitos. No es posible analizar con una única técnica analítica la diversidad de metabolitos complejos. Las técnicas con mayor poder de resolución emplean un paso inicial de separación de los metabolitos mediante cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos (LC) y posteriormente su identificación mediante espectrometría de masas (MS). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) cuenta con un gran poder de separación, la ausencia de efectos de supresión iónica, donde la co-elución de varios metabolitos hace que sus señales analíticas se sub-estimen, y cuenta con bibliotecas de compuestos como National Institute of Standard and technology (NIST) donde a través del espectro de masas obtenido se asigna e identifica fácil e inequívocamente el metabolito que lo originó. Sin embargo, los compuestos que por su naturaleza no son volátiles deben ser sometidos previamente a una reacción de derivatización donde se les convierta en moléculas que puedan volatilizarse y así ser analizadas por GC-MS. El análisis por cromatografía líquida (LC) se impone como técnica complementaria para compuestos no derivatizables y altamente polares (metabolitos hidrofílicos) o apolares (metabolitos hidrofóbicos). Sin embargo, cuenta con el inconveniente de la supresión iónica para compuestos co-eluyentes. En este punto el empleo de espectrómetros que sean capaces de medir masa exacta como el tiempo de vuelo (TOF) es un requisito para la identificación de compuestos inequívocos (74;75).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN), técnica que en su plataforma de imagen es altamente utilizada en medicina, es usada en el campo de la metabolómica como técnica espectroscopia. Con ella podemos obtener información simultánea sobre cientos de metabolitos por muestra sin necesidad de que éstos sean separados previamente y con la ventaja de ser una técnica no destructiva. Estas plataformas proporcionan una amplia información estructural y conformacional. Las tres técnicas (GCMS, LCMS y RMN) poseen diferentes ventajas y desventajas desde el punto de vista técnico y suelen ofrecer información complementaria.

5.3.1. Análisis por Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN permite el análisis directo y es una de las primeras técnicas elegidas para estudiar la molécula pequeña (76;77). No requiere preparación de muestra (78),o una preparación mínima, lo que la hace muy ventajosa frente a otras. La RMN es una técnica no invasiva y no destructiva que no interacciona el equilibrio biológico, permitiendo el análisis de biofluidos, lo que proporciona una información sobre las estructuras moleculares en solución. Además, la espectroscopia de RMN es una técnica muy fiable y reproducible.

La espectroscopia de RMN fue desarrollada a finales de los años cuarenta para estudiar los núcleos atómicos. En 1951, los químicos descubrieron que la espectroscopia de resonancia magnética nuclear podía ser utilizada para determinarlas estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de 1H, 13C, 19F y 31P. Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín alfa (α), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín beta (β). Existen más núcleos en el estado de espín α que en el β pero aunque la diferencia de población no es enorme sí que es suficiente para establecer las bases de la espectroscopia de RMN (79-81).

La diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β, depende de la fuerza del campo magnético aplicado H0. Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín.

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β. Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (RF) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación RF. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β. El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación RF. Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación RF a la que son sometidos. Si un espectrómetro de RMN posee un imán potente, éste debe trabajar a una mayor frecuencia puesto que el campo magnético es proporcional a dicha frecuencia. Así por ejemplo, un campo magnético de 14,092 T requiere una frecuencia de trabajo de 600 MHz. Hoy en día los espectrómetros de RMN trabajan a 500, 600, 700, 800 MHz e incluso 1GHz.

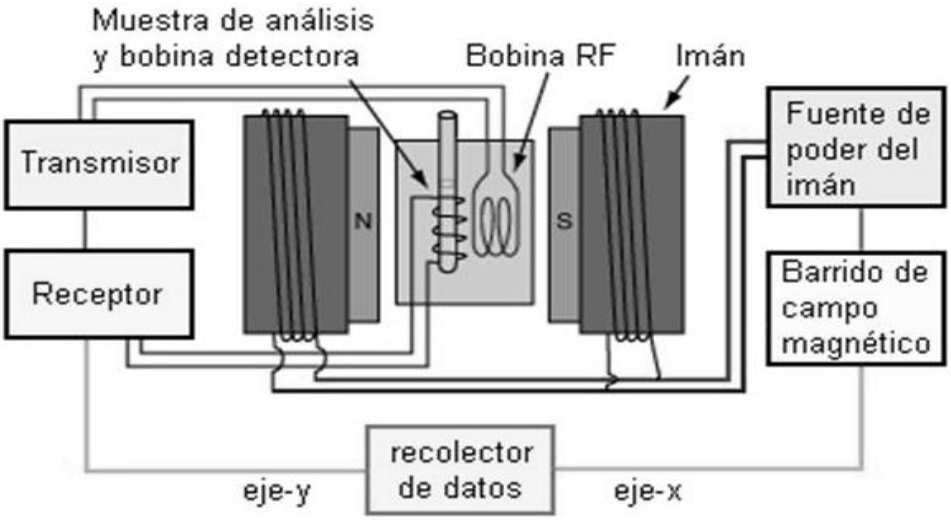

Figura 5. Esquema de las diferentes partes de un espectrómetro de RMN [* http://la-mecanica cuantica.blogspot.com.es/2009/08/espectroscopias-de-resonancia-iv.html]

En RMN-2D se utiliza una segunda transformada de Fourier para convertir la dependencia temporal durante la evolución en una segunda frecuencia, lo que permite diseñar experimentos de diversa índole, muy ricos en información. La idea original sobre RMN-Bidimensional (RMN-2D) se debe a Jeener (1971), aunque fue llevada a la práctica por Ernst y colaboradores en 1976. La RMN-2D corresponde a la generación de espectros de RMN con dos frecuencias como variables independientes. Estos espectros RMN-2D se generan registrando "Free induction decay" (FID) (tB2B) al final de una secuencia de pulsos con variación sistemática de otro parámetro, más comúnmente el tiempo de evolución tB1B entre un par de pulsos. Los FIDs sucesivos se adquieren por incremento de los tiempos de evolución y se almacenan como filas en una matriz de datos. El espectro 2D se obtiene por una doble transformación de Fourier (82;83).

El espectro Correlation Spectroscopy (COSY) nos permite correlacionar las señales de los núcleos (1H) directamente acoplados. El experimento de correlación Total correlation spectroscopy (TOCSY) también suministra correlaciones entre núcleos (1H) directamente acoplados, pero incluye además correlaciones entre todos los espines de un sistema, incluso los que no estén directamente acoplados. Podemos correlacionar en principio mediante el TOCSY todos los núcleos de un sistema de espines y de aquí su nombre de espectroscopia de correlación total. La habilidad del TOCSY para detectar transferencia de coherencia a través de una cadena es muy útil sobre todo en biomoléculas complejas donde están presentes sistemas de espines aislados, en unidades discretas (79;80).

Para la correlación heteronuclear inversa a un enlace se utilizan los experimentos de correlación heteronuclear múltiple cuántica (HMQC, "Heteronuclear Multiple Quantum Correlation") y la correlación heteronuclear a simple cuanto (HSQC, "Heteronuclear Single Quantum Correlation"). HSQC presenta una mayor resolución, ventaja que es

explotada particularmente en espectros muy cargados de señales como son los de los biopolímeros. Estos experimentos nos permiten correlacionar las señales de los carbonos (13C) con las de los protones (1H) directamente enlazados.

5.3.2. Análisis por Resonancia magnética nuclear por ángulo mágico HRMAS

La técnica espectroscópica HRMAS (Resonancia de protón Magic Angle Spinning) se ha aplicado a diferentes muestras de tejidos biológicos (84;85). Es una herramienta que permite el análisis de tejidos intactos sin necesidad de ninguna preparación previa de la muestra. Partiendo de pequeñas cantidades del tejido es posible obtener el perfil metabolómico de diferentes regiones en tejidos heterogéneos.

El ensanchamiento de señales en los espectros de muestras tejido se debe principalmente a la movilidad restringida de las especies macromoleculares y a la heterogeneidad de la muestra. La movilidad restringida implica la existencia de constantes dipolares residuales entre los núcleos, cuyo valor es proporcional a

$r^{-3}(3\cos^2\theta-1)$, donde r es la separación entre los núcleos y θ el ángulo que forma el vector que une los núcleos con el campo magnético. Por otro lado, la mezcla tejido/disolvente es extremadamente heterogénea, lo que implica la existencia de diferencias significativas de susceptibilidad magnética en distintos puntos de la muestra. Este aspecto no se suele considerar en la RMN de sólidos, ya que normalmente el ensanchamiento que producen no es tan significativo como el debido a las constantes dipolares o a la anisotropía de desplazamiento químico. La dependencia angular del gradiente de susceptibilidad magnética es también proporcional a $(3\cos^2\theta-1)$.

Este problema del ensanchamiento de señales se puede reducir rotando la muestra a un ángulo de 54,7º (ángulo mágico), que hace que el término angular $(3\cos^2\theta-1)$ se promedie a cero, tal como ocurre en la resonancia de sólidos.

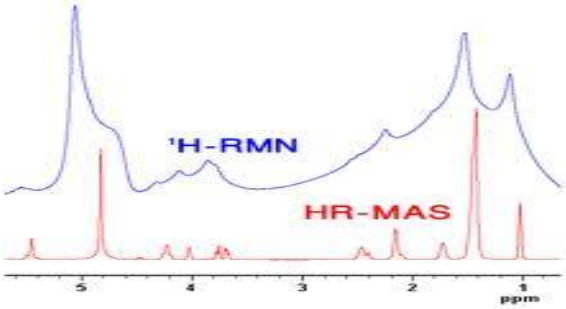

Figura 6. Resultados obtenidos sobre una muestra de tejido ejemplo analizada mediante espectroscopia RMN y espectroscopia mejorada con la incorporación del ángulo mágico HRMAS [* http://la-mecanica cuantica.blogspot.com.es/2009/08/espectroscopias-de-resonancia-iv.html].

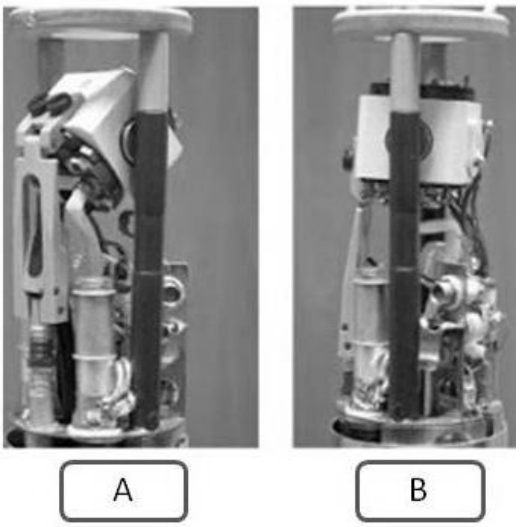

Figura 7. Ángulo mágico A) con el mecanismo rotor que se le agrega al espectrómetro para sostener la muestra. El rotor está inclinado en el ángulo mágico. B) nos muestra al rotor alineado verticalmente en la dirección del campo magnético [* http://la-mecanica cuantica.blogspot.com.es/2009/08/espectroscopias-de-resonancia-iv.html].

5.3.3. **Técnicas instrumentales de análisis. Cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas (MS)**

La espectrometría de masas es una herramienta de análisis muy poderosa ya que provee sensibilidad, rapidez, calidad y análisis potencialmente cuantitativo de una gran cantidad de moléculas. Por otro lado, la espectrometría de masas es una técnica que permite analizar con gran precisión diferentes compuestos químicos. De igual forma que en el estudio de las proteínas en el estudio de metabolitos la metodología utilizada fue “Multiple Reaction Monitoring “(MRM) ya explicada en el apartado 4.5.1.

5.4. Análisis estadístico multivariable. Quimiometria. Identificación de metabolitos y proteínas.

Para poder procesar los datos generados es crucial contar con un análisis estadístico. Los métodos de análisis estadístico multivariable proporcionan un medio de optimizar la extracción de la información contenida en los espectros de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de mezclas complejas (86). La normalización es el primer paso para procesar los datos. Esto elimina la variación atribuida a las variables externas. Lo que se tiene son perfiles multivariables. Para analizar estos perfiles, resulta muy útil la aplicación de lo que se denominan métodos multivariantes de análisis. Estos reducen la dimensionalidad de los datos basándose en la proyección de los mismos. Esto permite detectar además agrupaciones y tendencias, ya que puntos que se encuentran cercanos corresponden a perfiles multivariables relativamente similares. De forma opuesta, puntos que se encuentran alejados unos de otros presentan descriptores muy diferentes.

Existen una gran variedad de métodos que pueden emplearse en el análisis de datos metabolómicos. Uno de los métodos más empleados de análisis multivariable son los denominados PCA (Principal Component Analysis) en inglés ó análisis de componentes principalesy PLS (Partial Least Squares ó mínimos cuadrados parciales) (87). El PCA es un método no supervisado que se emplea para revelar la estructura interna de un conjunto de datos sin que medie ningún tipo de conocimiento previo del sistema. PLS, sin embargo, es un método supervisado para regresión. En este caso, el objetivo es predecir las respuestas en un conjunto de datos. Empleando una barrera de corte, PLS puede emplearse también para análisis basados en la clasificación y discriminación (PLS-DA, "Partial Least Squares-Discriminant Analysis"). Existen programas como AMIX ("Analysis of MIXtures", BrukerBioSpin) que permiten realizar todas las etapas descritas anteriormente.

Otras pruebas estadísticas que nos ayudan entender los datos que se generan y que han sido utilizadas en la presente tesis doctoral, son el test Mann-Whitney-Wilcoson y el test de Kruskal-Wallis. Para la comparación de 2 muestras independientes y para comprobar la heterogeneidad de de las 2 muestras se utiliza el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoson. La extensión de dicho test para 3 o más muestras es el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Prueba utilizada para ver si los datos provienen de una misma población. Las dos pruebas son realizadas por programas estadísticos como GraphPad.

Para la identificación de metabolitos y de proteínas contamos con la ayuda de las bases de datos. Hay que tener en cuenta que las bibliotecas, sobre todo las de metabolitos, no son completas y que no todas las moléculas halladas pueden ser identificadas directamente a través de las bases de datos. Como bases de datos en este trabajo se ha contado con "METLIN: Metabolites and Tandem MS database" (88), MMCD ("Madison Metabolomics Consortium Database")(89) y HMDB ("Human Metabolome DataBase") (90).

Para la identificación de proteínas tenemos NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (91) y UniProtKB/Swiss-Prot (UniProt Knowledgebase) (92).

Todo lo explicado anteriormente, será empleado para abordar la tesis doctoral que se presenta a continuación.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar los mecanismos moleculares asociados a la enfermedad renal crónica (ERC) y enfermedad cardiovascular (CV) asociada, a nivel del metaboloma y del proteoma de tejido renal y fluidos biológicos como orina y plasma. Su estudio nos proporcionará valiosa información de cara a ahondar en los mecanismos fisiopatológicos que operan en el binomio cardio-renal y a descubrir potenciales candidatos a marcadores de diagnóstico temprano, pronóstico, seguimiento y evaluación del riesgo cardiovascular asociado a la ERC.

A continuación se detallan los objetivos particulares abordados:

1. Descubrimiento de una huella metabolómica en orina asociada a ERC. Análisis diferencial de los metabolitos de la orina y establecimiento de un panel de candidatos a marcador de ERC y riesgo CV asociado, con potencial uso en diagnóstico temprano y evaluación de la progresión del daño renal. Se desarrollarán metodologías de análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) y Multiple Reaction Monitoring (MRM) LC-MS/MS.

2. Estudio del reflejo que presentan en plasma los metabolitos encontrados significativamente alterados en orina, tanto en ERC como en enfermedad cardiovascular asociada.

3. Estudio por ^{1}HRMAS de las alteraciones metabolómicas asociadas a nefropatía directamente sobre tejido renal. Para ello se empleará un modelo animal de nefropatía temprana.

4. En consonancia con el objetivo 1, se abordará el análisis proteómico diferencial en la búsqueda de un panel de proteínas de la orina, potenciales marcadores de ERC y enfermedad cardiovascular asociada. Se llevará a cabo por iTRAQ) LC MS/MS y MRM.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. METABOLITOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN MUESTRAS DE ORINA Y PLASMA.

1.1. Selección de pacientes.

Los individuos con enfermedad renal crónica (ERC) fueron seleccionados por el Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España) y de la Unidad de Hipertensión del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España). El estudio se realizó en orina y plasma en individuos en todos los estadios de la ERC (I-V). Los estadios de la enfermedad fueron definidos por la ecuación MDRD-4 para el cálculo de la filtración glomerular (ml/min/1,73m^2). En la fase de descubrimiento la orina de 15 individuos con ERC establecida, es decir, en estadio IV-V se recogió exclusivamente del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España). Para la validación se recogió un grupo adicional de 16 individuos de las mismas características clínicas del mismo centro. Para las dos fases se contó con un grupo de individuos sanos, 15 en la primera parte de descubrimiento y 15 en la validación. Éstos no presentaban historia de diabetes, hipertensión arterial, enfermedad renal o algún tipo de enfermedad inflamatoria. Tampoco recibían medicación que pudiera influir en el estudio y fueron macheados por edad y sexo. Se descartaron aquellos individuos que sufrieran además afecciones graves de otro tipo, como enfermedades hepáticas, pulmonares, infecciosas o cáncer. La orina de 5 nuevos individuos con ERC y 7 individuos sanos fue recogida para realizar un estudio ciego. Las características medias de los individuos que componen el estudio están recogidas en la tabla 1.

Tabla 1. Datos clínicos medios de los individuos que fueron reclutados para el estudio en ERC.

Casos	**sexo**	**edad**	**FG (ml/min/1.73m2)**	**Creatinina sérica (mg/dl)**	**proteínas orina (mg/24h)**	**DM**	**EAC**
Fase de descubrimiento	8M/7H	69	19	3.4	1592	4	5
Fase de validación	7M/9H	67	23	3.1	1295	3	4
Test ciego	5M/2H	63	27		383	no	3
ERC inicial	24M/23H	62	76.58	1.09	352.96 (Alb)	no	7
Controles	**sexo**	**edad**	**FG (ml/min/1.73m2)**		**proteínas orina (mg/24h)**	**DM**	**EAC**
Fase de descubrimiento	7M/8H	62	>90		6.5	no	no
Fase de validación	8M/7H	60	>90		5.4	no	no
Test ciego	4M/3H	49	>90		4.5	no	no
Controles inicial	13M/12H	57	>90			no	no

La orina de un grupo de 47 individuos con ERC incipiente fue recogida en las mismas condiciones. De ellos 37 pertenecen a Unidad de Hipertensión del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España) y 10 de Servicio de Nefrología de la

Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España). Sus características clínicas se muestran en la tabla 1.

De los individuos expuestos en las tablas anteriores, 9 sufren enfermedad arterial coronaria (EAC) en individuos con ERC avanzada y 7 en individuos con ERC inicial. Las características están recogidas en la tabla 1.

Para completar el estudio se extrajo sangre de 11 individuos con ERC en estadios avanzados de algunos de los pacientes de la primera parte del estudio. Se recolectó también sangre de 37 individuos en estadios tempranos de Unidad de Hipertensión del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España). Asimismo 25 individuos sanos, todos donantes del Banco de sangre de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España) y del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España).

Tabla 2. Datos clínicos medios de los individuos que fueron reclutados para el estudio en ERC en plasma.

Casos	**sexo**	**edad**	**FG (ml/min/1.73m2)**	**Creatinina sérica (mg/dl)**	**proteínas orina (mg/24h)**	**DM**	**EAC**
ECR avanzada	4M/7H	71	18.72	3.7	1638.66	no	6
ECR inicial	21M/16H	61	85.40	0.88	**albúmina (mg/g) 11.37**	no	6
Controles	13M/12H	57	>90			no	no

De estos individuos 6 sufren enfermedad arterial coronaria (EAC) con ERC avanzada y 6 individuos con ERC inicial con enfermedad vascular asociada. Para completarlo se contó con un grupo de 5 individuos con ERC avanzada sin enfermedad vascular asociada, un grupo de 6 individuos ERC temprana sin enfermedad vascular asociada y un grupo de 10 individuos sanos.

Todos los participantes en el estudio fueron debidamente informados. Se recogieron los consentimientos informados de los sujetos y el estudio fue aprobado por los comités éticos correspondientes.

1.2. Pretratamiento de muestras de orina y plasma de individuos con Enfermedad Renal Crónica.

La primera orina de la mañana en ayunas de los pacientes fue recogida en frascos estériles y transportado al laboratorio. Se centrifugó (31000g, 15min, 4ºC) para eliminar el primer desecho celular y el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -80ºC para su posterior análisis.

La sangre se recolectó en tubos de EDTA como anticoagulante en diferentes momentos de día, se trasladó al laboratorio y se centrifugó (1300 g, 10min, 4ºC) para poder extraer el plasma. Después de alicuotó y se guardó a -80ºC para su posterior análisis.

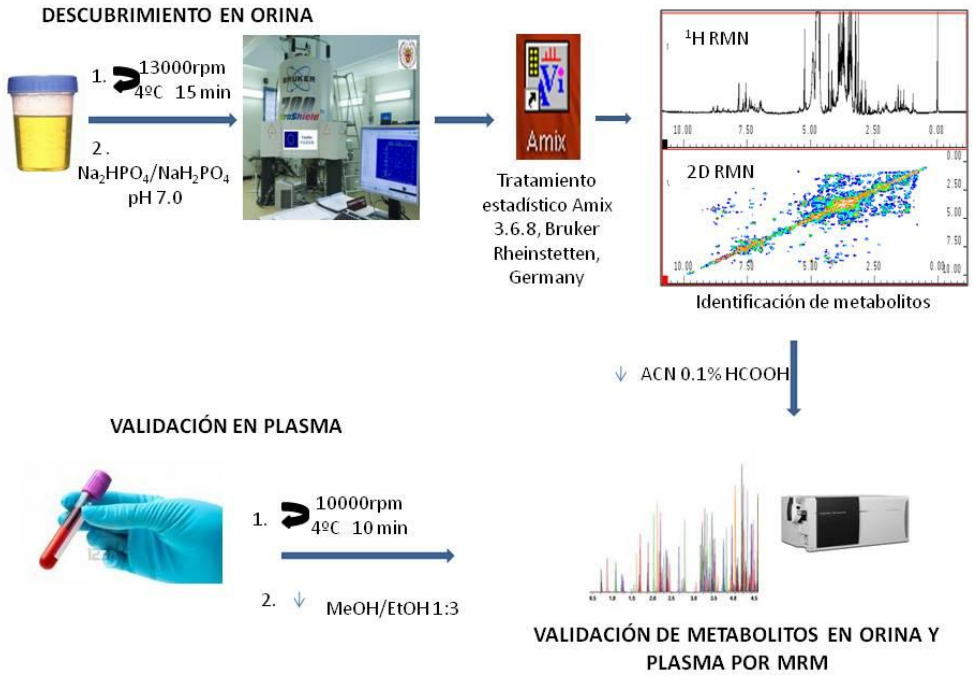

Figura 1. Esquema de trabajo indicando el procedimiento experimental, donde se muestra en la parte superior la fase de descubrimiento y en la parte inferior la parte de validación.

1.3. Fase de descubrimiento: Análisis de metabolitos en la muestra de orina mediante ^{1}H resonancia magnética nuclear.

1.3.1. Adquisición de espectros de ^{1}H RMN.

De la orina de los individuos designados para la fase de descubrimiento se tomaron 300 µl y fueron diluidos con 300µl de 0,1% de trimetilsililpropianato de sodio (TSP) de Sigma Aldrich (utilizado como referencia interna para la asignación espectral) en un tampón de 200mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 a pH 7 en óxido de deuterio (D_2O 99.9%) de Merck. El tampón fue añadido para disminuir los efectos del equilibrio proteico y así garantizar el pH de la muestra para una buena asignación espectral.

Tras una breve centrifugación (13000rpm, 1min), el sobrenadante fue transferido a un tubo de RMN de 5mm de diámetro interno (Norell). Todos los experimentos fueron realizados a 277K (para minimizar el deterioro de los metabolitos o los posibles cambios metabólicos). Los experimentos RMN se realizan en un instrumento Bruker AVANCE III 700 con una criosonda TCI de 5mm equipada con bobina de gradientes en el eje Z, y operando a una frecuencia de 700,17 MHz para ^{1}H. Los espectros se obtuvieron con 256 barridos y 32K puntos de datos sobre una anchura espectral de 8417,51 Hz, resultando en un tiempo de adquisición de 1,94s. Un tiempo de repetición de 2s garantiza el tiempo de relajación T1 entre sucesivos barridos. La señal del disolvente se suprime mediante la secuencia Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (noesypr1d. Bruker Biospin Ltd.). Las FIDs (Free induction decay) se multiplican por

una función exponencial correspondiente a un valor de lb de 0,3Hz. Los espectros se corrigen y se referencian al singlete del TSP.

Todos los espectros fueron adquiridos y procesados usando el programa TOPSPIN (version 1.3, Bruker Biospin Ltd.). La FID, resultado de la adquisición se multiplicó por una función exponencial correspondiente a una anchura de línea de 0,3 Hz, previo a realizar la transformada de Fourier. Los espectros fueron puestos en fase y corregidos su línea base. La anchura espectral fue de 14 ppm y se referenciaron respecto a la señal del TSP a un desplazamiento químico (δ) de 0 ppm. Los experimentos fueron realizados en colaboración con el Centro de Apoyo a la investigación de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense de Madrid (CAI-RMN UCM).

1.3.2. Análisis estadístico de los datos generados en los experimentos de ^{1}H RMN.

Para un tratamiento estadístico de los datos obtenidos por los espectros de utilizó el programa AMIX (Analysis of MIXtures version 3.6.8, Bruker Rheinstetten, Germany).

Las regiones individuales del espectro se normalizaron en base a la suma absoluta de intensidades del espectro (intensidad total del espectro) excluyendo la señal del agua. Cada espectro con una ventana espectral de 10,00ppm a 0,1ppm se segmentó en regiones de 0,04ppm de anchura (buckets) para reducir el número de variables experimentales y compensar pequeñas variaciones espectrales de cara al análisis estadístico. Se realizó una regresión no supervisada de componentes principales (PCA) y una regresión de mínimos cuadrados parciales-análisis discriminante (PLS-DA) con un 95% de confianza. Estos dos métodos de análisis fueron aplicados a los buckets del espectro (no escalado).

Se obtuvieron gráficos de distribución de cargas o buckets ("loading plots") mostrando los desplazamientos químicos con mayor contribución a la separación de los grupos (control y casos) como paso previo a la identificación de metabolitos diferenciales. Se consideran con mayor contribución a la separación de grupos aquellos más alejados del centro.

1.3.3. Identificación de metabolitos mediante RMN bidimensional

Una vez obtenido el resultado del tratamiento estadístico se procedió a la identificación de los metabolitos, correspondientes a los desplazamientos químicos responsables de la separación de grupos, por resonancia magnética bidimensional. Para la adquisición de los espectros se hicieron mezclas de orina de 20 individuos sanos y 13 individuos con enfermedad renal crónica. Los experimentos fueron de correlación homonulear ^{1}H-^{1}H (COSY), de correlación homonuclear total ^{1}H-^{1}H (TOCSY) y correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C (HSQC).

Se adquirieron espectros COSY 45 con las siguientes condiciones: presaturación de agua durante 1s, anchura espectral de 7002,8 Hz en ambas dimensiones y un número de

barridos de 64, 2048 puntos de datos en f_2 y 256 incrementos en f_1. Se aplicó una función seno en ambas dimensiones y predicción lineal en dimensión f_2. ^{1}H-^{1}H TOCSY se registró en modo sensible con fase Status-TPPI usando una secuencia DIPSI2, con presaturación de agua durante un tiempo de 1s. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: anchura espectral de 7002,8 Hz en ambas dimensiones y 70ms de tiempo de mezcla; 100 barridos; 2048 puntos de datos en f_2 y 256 incrementos en f_1. Se aplicó predicción lineal en f_2 y una función de pesada seno-cuadrado en ambas dimensiones antes de la transformada de Fourier. Los experimentos ^{1}H-^{13}C-HSQC se llevaron a cabo en modo sensible a la fase utilizando el modo "Echo-Antiecho" con desacoplamiento durante la adquisición y pulsos adiabáticos, con presaturación durante el tiempo de relajación (1s). Los parámetros de adquisición fueron: 64 barridos, 2048 puntos de datos para ^{1}H y 192 para ^{13}C, 9328 Hz (^{1}H) y 29239 Hz (^{13}C) de anchura espectral, 0,109s de tiempo de adquisición y un valor de 145 Hz de ^{1}J (^{1}H-^{13}C). Los espectros se referenciaron respecto a la señal de la Urea.

1.4. Fase de validación: Análisis de metabolitos de muestras de orina y plasma mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en línea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS).

1.4.1. Adquisición de espectros.

Después de la fase de descubrimiento mediante análisis RMN, se procedió a la validación de los metabolitos con variación real diferencialmente significativa entre grupos mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM). Para ello se recogieron orinas de una cohorte independiente de 16 individuos con ERC avanzada (características clínicas en la Tabla 1) y 15 individuos sanos (tabla 1). Se tomaron 300 µl de orina, las proteínas presentes en las muestras se eliminaron por precipitación en ACN 0,1% HCOOH) (ACN (Merck) y HCOOH Fluka) al 50%, se centrifugaron (11000g durante 5 min) descartándose el sedimento y recogiendo el sobrenadante para su análisis metabolómico. Éste se filtró en filtros de 0,20µm y se mezcló en proporción 1:1 con fase móvil A (0,1% HCOOH (Fluka) en H_2O MilliQ) para su posterior análisis por LC-(QQQ) MS en modo MRM. En el estudio de orina de una cohorte mayor de individuos en estadios iniciales de ERC, se procedió de la misma manera con las muestras. Se analizaron 47 individuos con ERC inicial y 47 individuos control (tablas 1 y 2). La optimización de metabolitos fue realizada con las moléculas comerciales proporcionadas por Sigma-Aldrich.

En el estudio con plasma se tomaron 11 individuos con ERC avanzada, 25 ERC inicial y 25 individuos control. Para la extracción de metabolitos del plasma, se toman 100µl de plasma y se precipitan las proteínas con un agente precipitante (MeOH/EtOH 1:3) en relación 1:1. Se centrifugaron las muestras a 11000g durante 5 minutos. Se filtra el sobrenadante con filtros de 0,20 µm.

El sistema de HPLC empleado constaba de un degasificador, dos bombas binarias y un muestreador automático termostatizado a 4ºC (1200 Series, Agilent Technologies). En cada análisis, se inyectó un volumen de muestra de 10µl en una columna de fase reversa C18 Atlantis T3, 3µm, 2,1x100mm (Waters) termostatizada a 40ºC. La separación de los metabolitos de la orina se realizó a 0,4ml/min en un gradiente de ACN: 0%B durante 5min, 0-10%B en 2min, 10%B durante 10min, 10-80%B en 20min y 80-100%B en 0,5min, manteniendo durante 5 minutos adicionales 100%B (fase B: ACN 0,1% ácido fórmico; fase A: 0,1% HCOOH (Fluka) en H_2O MilliQ). El sistema de HPLC estaba acoplado en línea a un espectrómetro de masas 6460 Triple Cuadrupolo (Agilent Technologies), controlado por el software Mass Hunter Software (v4.0). El espectrómetro de masas operaba en modo positivo a 3500 V y en modo negativo a 3000 V, el nebulizador trabajaba a 45 psi, con una temperatura de 325ºC y un flujo de 11 l/min de gas portador. El potencial del "fragmentador" se optimizó para cada metabolito en un rango 130-175V. Se empleó un tiempo de barrido en cada transición (Dwell time) de 50ms y un voltaje de fotomultiplicador de 400V. La energía de colisión se optimizó para cada transición MRM y el valor óptimo se seleccionó en base a experimentos previos donde se analizaron en modo de infusión directa estándares comerciales de cada uno de los metabolitos, inyectados individualmente por separado. Para la optimización del "fragmentador" y de la energía de colisión se empleó el programa Optimizer Software (Agilent Technologies).

Tabla 3.Metabolitos potencialmente diferenciales a evaluar en la fase de validación. Transiciones (m/z precursor->m/z producto). (* CE: Energía de Colisión. *Modo: modo de ionización en espectrometría de masas).

Metabolito (HMDB ID)	m/z precursor	m/z producto	CE (eV)	Modo
Citrato (HMDB00094)	193,01	111,1	14	Negativo
Homocisteina (HMDB00742)	136,04	90,0	20	Negativo
L-Tirosina (HMDB00647)	182,08	136,0	20	Positivo
L-Treonina (HMDB00167)	120,13	102,9	26	Positivo
*Myo*inositol (HMDB00211)	181,07	109,0	20	Positivo
Prolibetaina (HMDB04827)	144,19	58,2	30	Positivo
L-Leucina (HMDB00687)	132,18	44,0	22	Positivo
L-Serina (HMDB00187)	105,9	60,1	20	Positivo
L-Arginina (HMDB00517)	175,21	116	26	Positivo
Acetilglutamina (HMDB06029)	189,09	172,0	26	Positivo
5-oxoprolina (HMDB00267)	130,0	84	20	Positivo
Taurina (HMDB00251)	125,02	108,0	30	Positivo
Betaina (HMDB00043)	117,9	58,0	29	Positivo
Dimetilglicina (HMDB00092)	104,91	51,1	30	Positivo
Isobutirato (HMDB01873)	89,07	58,0	14	Positivo
Alfa-fenilacetil-L-glutamina (HMDB06344)	265,28	143,9	22	Positivo
Histamina (HMDB00870)	111,09	95	24	Positivo
L-Fenilalanina (HMDB00159)	166,2	120,1	14	Positivo
D-Treitol (HMDB04136)	123,06	89,1	22	Positivo
Guanidoacetato (HMDB00128)	118,10	72,2	34	Positivo
Trimetilamina-N-oxido (HMDB00925)	76,07	58,1	22	Positivo
Hipurato (HMDB00714)	180,20	134,9	14	Negativo
Cresilsulfato (HMDB11635)	189,21	108	26	Positivo
Glutamato (HMDB60475)	147,9	102,1	14	Positivo
Malato (HMDB00744)	135,08	89,1	20	Positivo
L-Alanina (HMDB00161)	90,09	44,1	22	Positivo
L-Glicina (HMDB00123)	76,06	48,3	16	Positivo
L-Valina (HMDB00883)	118,14	72	24	Positivo
Creatinina (HMDB00562)	114,06	44,2	16	Positivo

1.4.2. Tratamiento estadístico de los datos generados mediante LC MS/MS (MRM).

El área de las señales individuales se normalizó en base al valor TIC ("total ion currrent"), calculándose cocientes del área de la transición correspondiente a cada metabolito dividido por el área del TIC para el análisis comparativo. El análisis estadístico se realizó mediante Graph Path Prism 5 software, realizándose análisis no paramétricos Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.

Destacamos que no normalizamos en base a la Creatinina excretada ya que en humano, los cambios de este metabolito debidos al stress, dieta, actividad, edad, raza y sexo influyen de manera significativa (93;94). En este estudio concreto hay una significación estadística en Creatinina en orina cuando comparamos individuos con ERC con el grupo control (resultados apartado 1).

2. ESTUDIO DEL METABOLOMA DEL RIÑÓN DE RATA CON NEFROPATÍA DIABETICA MEDIANTE LA METODOLOGIA ^{1}HRMAS.

2.1. Selección de muestras de tejido.

Las muestras de tejido de riñón de rata con nefropatía diabética fueron tomadas de un modelo animal realizado previamente en nuestro laboratorio. El modelo era un modelo temprano de diabetes con daño renal. Se produjo la hiperglucemia mediante inyección de Estreptozotocina (STZ).

Se emplearon diez ratas macho, Wistar Kyoto (Criffa, Barcelona, Spain) de 5 semanas de edad, 230±23 g de peso y conocida sensibilidad a la Diabetes Mellitus inducida por Estreptozotocina (STZ). A cinco de esas ratas se les provocó el desarrollo de diabetes mediante una única inyección intraperitoneal de STZ (Sigma, St. Louis,MO). La dosis inyectada fue de 50 mg/kg empleando una disolución 0,01M citrato (pH 4.5) como vehículo. A las cinco ratas restantes se les inyectó el vehículo sin el tóxico, para poder emplearlas como control. Todos los animales fueron sacrificados ocho semanas después de la inducción de la diabetes. Todo el estudio se llevo a cabo respetando la normativa de la Unión Europea. A los animales diabéticos se les administraba de 1 a 4 unidades de insulina, en función de la glucemia presentada por estos, (Insulatard NPH; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) mediante una inyección subcutánea cada tres días, con el propósito de evitar la muerte de estos animales pero sin corregir totalmente la hiperglucemia. La administración de insulina comenzó siete días después de la inyección con STZ, una vez se hubo comprobado que la glucemia de los animales era superior a 400 mg/dl (Glucocard; Menarini, Barcelona) (95).

Los riñones se perfundieron con solución salina fría para su disección. Una vez extraídos y decapsulados, una parte de cada riñón se separó y congeló en N2 líquido para los estudios.

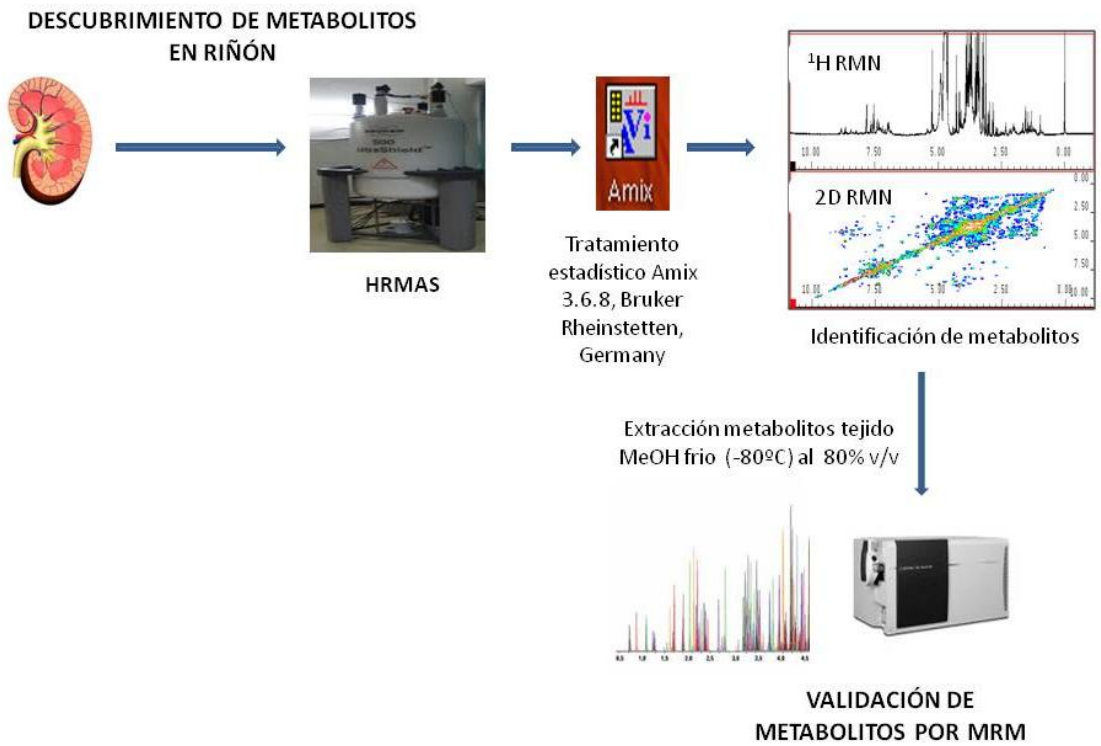

Figura 2. Esquema de trabajo indicando el procedimiento experimental, donde se muestra en la parte superior la fase de descubrimiento y en la parte inferior la parte de validación.

2.2. Fase de descubrimiento: Análisis mediante ^{1}H-HRMAS

2.2.1. Adquisición de espectros.

El tejido del riñón intacto fue analizado usando la tecnología de alta resolución de ángulo mágico (HRMAS) operando a 4ºC para minimizar la degradación del tejido. Los riñones fueron cortados en láminas y fue escogida para el análisis la región radial. La región radial compromete a la medula y el cortex. Los espectros fueron adquiridos a 500,13 MHz usando un equipo de Bruker AMX500 de 11,7T. Las muestras fueron traspasadas a un rotor de óxido de zirconio de 50 µl con un inserto cilíndrico en su interior y con una velocidad de giro de spin de 400 Hz.

La supresión de la banda de agua fue adquirida utilizando 16 puntos y 256 scans en un total de 7 minutos utilizando el primer incremento de la secuencia NOESY. El tiempo de relajación para adquirir la FID fue 90º-t_1-90º-t_m-90º en el cual se aplicó una irradiación de radiofrecuencia secundaria aplicada a la supresión de la banda de agua durante un tiempo de relajación de 2s y durante un periodo de tm de 150ms y un tiempo fijo t1 de 3 µs. La anchura espectral fue de 8333,33 Hz. Todos los espectros fueron procesados por el programa TOPSPIN versión 1.3 (Bruker Rheinstetten, Germany). Previamente antes de realizar la transformada de Fourier, la FID fue multiplicada por una función exponencial correspondiente a una anchura de línea de 0,3 Hz. Los

espectros fueron puestos en fase, corregidos la línea base del espectro y referenciados con el singlete de sodio (3-trimetilsilil)-2,2,3,3-tetradeuteriopropianato a δ 0ppm.

Los experimentos en 2 dimensiones homonucleares fueron adquiridos con un gradiente COSY90 bajo las condiciones: anchura espectral de 8333,3 Hz en ambas dimensiones, 2K de puntos de datos en f2 y 384 en f1. Una función sinusoidal fue aplicada en ambas dimensiones con un llenado de ceros en f1 que fue realizado antes de la transformada de Fourier. La supresión de la banda de agua fue realizada durante el tiempo de relajación.

El espectro ^{1}H, ^{1}H TOCSY fue registrado en fase TPPI en modo sensitivo, la supresión de la banda de agua fue realizada durante el tiempo de relajación de 1s. La anchura espectral fue de 8333,3 Hz en ambas dimensiones y un periodo de 70 ms, 2K de puntos de datos en f2 y 384 en f1. Una función sinusoidal fue aplicada en ambas dimensiones con un llenado de ceros en f1 que fue realizado antes de la transformada de Fourier. Se referenciaron para su interpretación con la señal residual de la banda de agua. Los experimentos fueron realizados en colaboración con el Centro de Apoyo a la investigación de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense de Madrid (CAI-RMN UCM).

2.2.2. Análisis estadístico de los datos generados en los experimentos de ^{1}HRMAS.

Para un tratamiento estadístico de los datos obtenidos por los espectros de utilizó el programa AMIX (Analysis of MIXtures version 3.6.8, Bruker Rheinstetten, Germany).

Las regiones individuales del espectro se normalizaron en base a la suma absoluta de intensidades del espectro, con escalado de intensidad total. Cada espectro con una ventana espectral de 10,2ppm a 0,1ppm se segmentó en regiones de 0,04ppm de anchura (buckets) para reducir el número de variables experimentales y compensar pequeñas variaciones espectrales de cara al análisis estadístico. Se realizó una regresión no supervisado de componentes principales (PCA) y una regresión mínimos cuadrados parciales-análisis discriminante (PLS-DA) con el 95% de confianza. Estos dos métodos fueron aplicados a los buckets del espectro.

Se obtuvieron gráficos de distribución de cargas o bukects (“loading plots”) mostrando los desplazamientos químicos con mayor contribución a la separación de los grupos (control y casos) como paso previo a la identificación de metabolitos diferenciales, tal y como se describió en el apartado anterior de análisis de orina por ^{1}H RMN.

2.3. Fase de validación: Análisis de metabolitos de tejido mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en lìnea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS).

2.3.1. Extracción de los metabolitos del tejido.

Se seccionan cortes de tejido renal (60mg por muestra) y se añadió 500 µl de MeOH (Merck) frio (-80ºC) al 80% v/v. Se pulverizó en un mortero manteniendo en hielo seco y homogeneizamos (vortex 1minuto). Después la muestra se incubó a 4ºC durante 4 horas a -80ºC. Tras una centrifugación (30000g, 10 min, 4ºC) se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se guardó a -80ºC. Se volvió a añadir 400µl de MeOH frio (-80ºC) al 80% v/v seguido de una incubación de 30 minutos a -80ºC. Después de un centrifugado fuerte, separamos el nuevo sobrenadante y lo juntamos con el anterior. Se evaporó el disolvente en Speed-Vac sin calor para evitar degradación del tejido. Después se reconstituyó en HCOOH 0,1%/MeOH 3:1 (Fluka/ Merck) para su análisis por cromatografía líquida en línea con espectrómetro de masas (96).

2.3.2. Adquisición de espectros.

La optimización de metabolitos fue realizada con las moléculas comerciales proporcionadas por Sigma-Aldrich.

El sistema de HPLC empleado constaba de un degasificador, dos bombas binarias y un muestreador automático termostatizado a 4ºC (1200 Series, Agilent Technologies). En cada análisis, se inyectó un volumen de muestra de 10µl en una columna de fase reversa C18 Atlantis T3, 3µm, 2,1x100mm (Waters) termostatizada a 40ºC. La separación de los metabolitos de la orina se realizó a 0,4ml/min en un gradiente de ACN: 0%B durante 5min, 0-75%B en 5min, 100%B en 2min, 100%B durante 2min. (fase B: ACN 0,1% HCOOH; fase A: H_2O MiliQ 0,1% HCOOH). El sistema de HPLC estaba acoplado en línea a un espectrómetro de masas 6460 Triple Cuadrupolo (Agilent Technologies), controlado por el software Mass Hunter Software (v4.0). El espectrómetro de masas operaba en modo positivo a 3500 V y en modo negativo a 3000 V, el nebulizador trabajaba a 45 psi, con una temperatura de 300ºC y un flujo de 11 l/min de gas portador. El potencial del "fragmentador" se optimizó para cada metabolito en un rango 128-175V. Se empleó un tiempo de barrido (Dwell time) para cada transición de 100ms y un voltaje de fotomultiplicador de 600V. La energía de colisión se optimizó para cada transición MRM y el valor óptimo se seleccionó en base a experimentos previos donde se analizaron en modo de infusión directa estándares comerciales de cada uno de los metabolitos, inyectados individualmente por separado. Para la optimización del "fragmentador" y de la energía de colisión se empleó el software Optimizer Software (Agilent Technologies).

Tabla 4.Metabolitos identificados de la fase de descubrimiento para evaluar en la fase de validación. Transiciones (m/z precursor->m/z producto). (* CE: Energía de Colisión. *Modo: modo de ionización por espectrometría de masas).

Metabolito (HMDB ID)	m/z precursor	m/z producto	CE (eV)	Modo
Betaina (HMDB00043)	117,9	58,0	29	Positivo
Glutamato (HMDB60475)	147,9	102,1	14	Negativo
L-Glicina (HMDB00123)	76,06	48,3	16	Positivo
L-Leucina (HMDB00687)	132,18	44,0	22	Positivo
*Myo*inositol (HMDB00211)	181,07	109,0	20	Positivo
L-Fenilalanina (HMDB00159)	166,2	120,1	14	Positivo
Taurina (HMDB00251)	125,02	108,0	30	Positivo
Trimetilamina-N-oxido (HMDB00925)	76,07	58,1	22	Positivo
L-Tirosina (HMDB00647)	182,08	136,0	20	Positivo
L-Valina (HMDB00883)	118,14	72	24	Positivo
Glutamina (HMDB00641)	147,2	84,1	25	Positivo
Lisina (HMDB00182)	147,0	130,0	10	Positivo
D-Xilosa (HMDB00098)	151,0	87,0	25	Positivo
Acetoacetato (HMDB00060)	104	58	25	Negativo
Aldosterona (HMDB00037)	364,4	343,3	20	Positivo
GPD (HMDB00086)	441,55	258	20	Negativo
PDC (HMDB08790)	707,98	103,8	28	Negativo

2.3.3. Análisis estadístico de los datos generados mediante LC MS/MS (MRM).

El área de las señales individuales se normalizaron en base al valor TIC ("total ion current"), calculándose cocientes del área del metabolito dividido por el área del TIC para el análisis comparativo. El análisis estadístico se realizó mediante Graph Path Prism 5 software, realizándose análisis no paramétricos Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.

3. ESTUDIO DE LAS ENZIMAS DEL CICLO DEL GLUTATIÓN VÍA 5-OXOPROLIN EN MUESTRAS DE ORINA.

3.1. Selección de pacientes

Los individuos con enfermedad renal crónica fueron seleccionados por el Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España) y de la Unidad de Hipertesión del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España). El estudio se realizó en orina y plasma en individuos en los últimos estadios de la ERC (IV-V) y en individuos en los primeros estadios de la enfermedad (I-II). Los estadios de la enfermedad fueron definidos por la ecuación MDRD-4 para el cálculo de la filtración glomerular (ml/min/1.73m^2). Se realizó un estudio con un grupo de 23 individuos con ERC establecida (estadio IV-V), 25 individuos con ERC inicial y 25 individuos sanos. El grupo de individuos sanos no presentaban historia de diabetes, hipertensión arterial, enfermedad renal o algún tipo de enfermedad inflamatoria. Tampoco recibían medicación que pudiera influir en el estudio y fueron macheados por edad y sexo. Se descartaron aquellos individuos que sufrieran además afecciones graves de otro tipo, como enfermedades hepáticas, pulmonares, infecciosas o cáncer. Las características de los individuos que componen el estudio están recogidas en la tabla 5.

Tabla 5. Datos clínicos medios de los individuos que fueron reclutados para el estudio de las enzimas del ciclo del Glutatión en ERC en muestras de orina.

Casos	sexo	edad	FG (ml/min/1.73m2)	Creatinina sérica (mg/dl)	albúmina (mg/g)	DM
ECR avanzada	11M/12H	67	20.58	3.38	1390.13	no
ERC temprana	14M/11H	62	85.83	0.89	12.37	no
Controles	11M/14H	59	>90		5.85	no

Para completar el estudio se extrajo sangre de 11 individuos con ERC en estadios avanzados de algunos de los pacientes de la primera parte del estudio (ver anexo 1), 25 individuos en estadios tempranos y 25 individuos sanos, todos donantes del Banco de sangre de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España). Los individuos en estadios tempranos corresponden Unidad de Hipertensión del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España).

Tabla 6. Datos clínicos medios de los individuos que fueron reclutados para el estudio de las enzimas del ciclo del Glutatión en ERC en muestras de plasma.

Casos	sexo	edad	FG (ml/min/1.73m2)	Creatinina sérica (mg/dl)	proteínas (mg/24h)	orina
ECR avanzada	4M/7H	71	18.72	3.7	1638.66	
ECR temprana	14M/11H	62	85.83	0.89	12.37	
Controles	13M/12H	57	>90			

Se recogieron los consentimientos informados de todos los sujetos y el estudio fue aprobado por los comités éticos correspondientes.

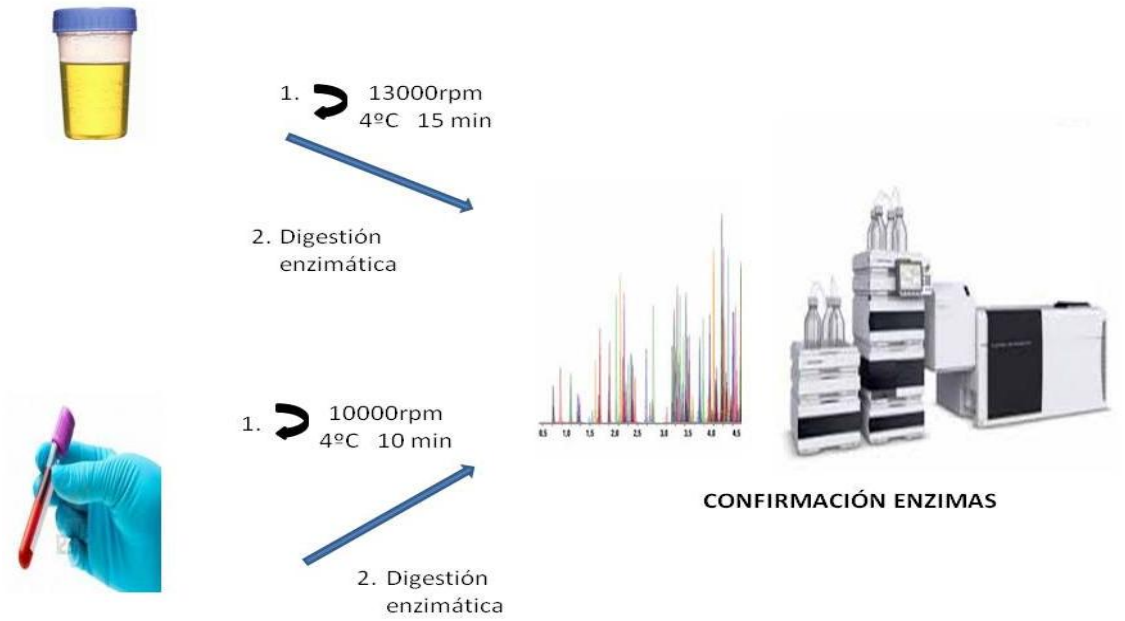

Figura 3. Esquema de trabajo indicando el procedimiento experimental.

3.2. Pretratamiento de muestra de orina y plasma.

La primera orina de la mañana en ayunas de los pacientes fue recogida en frascos estériles y transportado al laboratorio. Se centrifugó (31000g, 15min, 4ºC) para eliminar el primer desecho celular y el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -80ºC para su posterior análisis.

La sangre se recolectó en diferentes momentos de día en tubos de EDTA, se trasladó al laboratorio y se centrifugó (1300 g, 10min, 4ºC) para poder extraer el plasma. Después de alicuotó y se guardó a -80ºC para su posterior análisis.

El contenido de proteína total de la muestra se determinó por el método Bradford. Para la digestión de las proteínas presentes en la orina se tomaron 20 µg de proteína total. Desalinizamos la muestra con columnas Protein Desalting Spin Columns (Thermo) según el protocolo comercial. Añadimos el agente reductor ditiotreitol (DTT) de BioRad hasta una concentración final 10 mM. Incubar a 37ºC durante 1h. Las cisteínas reducidas se bloquearon añadiendo yodoacetoamida (IA) de BioRad hasta una concentración final de 55 mM. Se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Se diluyó la muestra con $NaHCO_3$ 50mM 1:4, en este caso por dos razones, para diluir la concentración de interferentes (Urea endógena) y asegurar el pH de actuación de la enzima. Una vez comprobado el pH de la muestra, que debe ser 8,5 añadimos la tripsina bovina de grado secuencia (Roche) en relación 1:50 (enzima: proteína). Después de incubar a 37ºC durante toda la noche, se detuvo la digestión con Trifluoroacético (TFA) hasta 0,1% v/v. La mezcla de péptidos trípticos obtenida se

sometió a un proceso de limpieza con columnas C18 ("spin columns") (Protea Biosciences) siguiendo el protocolo comercial. La muestra se diluyó 1:1 en fase móvil A (ACN 5%, HCOOH 0,1%) con un 10% de ACN (Merk).

El contenido de proteína total de la muestra se determinó por el método Bradford. Así, 20 µg de proteína total de las muestras de plasma se diluyeron en 10 µl con $NaHCO_3$ 25mM. Se redujeron los puentes disulfuro, se alquilaron por el procedimiento anteriormente descrito y se añadió la enzima tripsina en relación 1:50 con la cantidad de proteína. Cuando terminó la digestión se procedió a su limpieza de la forma detallada para la orina. No fue necesaria la depleción de la Albúmina (apartado 4); sin embargo ésta se monitorizó por MRM y después se procedió a eliminar su señal de la señal de las muestras restándola de la señal del TIC (apartado 3.3.3). La abundancia de las enzimas tanto en orina como en plasma nos facilita esta opción, lo que nos permite la mínima manipulación de la muestra.

3.3. Análisis de proteínas mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en línea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS).

3.3.1. Adquisición de espectros.

Las muestras se analizaron en modo MRM empleando un triple cuadrupolo 6460 LC MS/MS (Agilent Technologies) conectado en línea a un HPLC-chip cube (Agilent Technologies) y a cromatografía líquida de la serie 1200 (Agilent Technologies)

La separación cromatográfica de los péptidos de las muestras de orina se llevo a cabo en chip ProtID Zorbax 300SB-C18-5 µm con una columna analítica de 43 mm x 75µm y una columna de enriquecimiento de capacidad 40 nL y 4mm (Agilent Technologies). Se inyectaron 1 µl de muestra impulsada por la bomba capilar con un flujo de 4 µl/min hasta la columna de enriquecimiento. La separación se produjo con un flujo de 0,4 µl/min en un gradiente para la bomba nanoanalítica de 5%B durante 1 min, 40% en 4 minutos, 95%B en 7min y manteniéndose en el 95% 2 min (fase B: ACN 0,1% HCOOH; fase A: H_2O MiliQ 0,1% HCOOH). El control del sistema se gestionó empleando el programa informático MassHunter Software (v4.0). El espectrómetro de masas trabajó en modo de positivo con un voltaje capilar de 1990 V, la fuente de gas a una temperatura de 325ºC y un flujo de 5 L/min. El "fragmentador" se fijo en 135V y un tiempo de barrido "dwell time" de para cada transición 50 ms; el EMV a 400 V y la energía de colisión se optimizo para cada transición MRM. Para la optimización del "fragmentador" y de la energía de colisión se empleó el programa Skyline (v.1.1.0.2905).

Para la separación de las muestras con plasma se utilizó un chip ProtID Zorbax 300SB-C18-5µm con una columna analítica de 150 mm x 75µm y una columna de enriquecimiento de capacidad 160 nL (Agilent Technologies). Se inyectaron 1 µl de

muestra impulsada por la bomba capilar con un flujo de 4 µl/min hasta la columna de enriquecimiento. La separación se produjo con un flujo de 0,4 µl/min en un gradiente de 5%B durante 1 min, 40% en 4 minutos, 95%B en 7min y manteniéndose en el 95% 2 min (fase B: ACN 0,1% HCOOH; fase A: H_2O MiliQ 0,1% HCOOH).

Tabla 7. Enzimas del ciclo del catabolismo del Glutatión vía 5-Oxoprolina. Péptidos con sus transiciones (m/z precursor->m/z producto)(* CE: Energía de Colisión).

proteína (UniProt ID)	secuencia peptídica	m/z precursor (carga)	m/z producto (carga)(ión)	CE (eV)
OPLA_HUMAN 5-oxoprolinase (O14841)	GHDPSAHVLACFGGAGGQHACAIAR	839,7 (3+)	1040,5(+)(y10)/985,5(+)(b10)	21
	ELGFTHVSLSSEAMPMVR	664,3(3+)	745,4(2+)(b14)/685,3(+)(b6)	15
	YQGTDCALMVSAHQHPATAR	738,7(3+)	796,3(+)(b7)/780,4(+)(y7)	18
	LLSEDPANYADAPTEGIR	644,6(3+)	655,3(+)(b6)	15
GGCT_HUMAN Gamma-glutamylcyclotransferase (O75223)	SNLNSLDEQEGVK	716,8(2+)	804,4(+)(y7)	21
		478,2(3+)	594,3(2+)(b11)	8
	SYLMTNYESAPPSPQYK	659,383+)	806,9(2+)(y14)/769,8(2+)(b14)/677,8(2+)(b12)	15
GSH0_HUMAN Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit (P48507)	QFDIQLLTHNDPK	784,9(2+)	959,5(+)(b8)	25
	CPSTHSEELHDCIQK	614,3(3+)	663,3(+)(y5)/928,3(+)(b8)	13
GSH1_HUMAN Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit (P48506)	FKPPPPNSDIGWR	504,3 (3+)	531,3(+)(y4)	9
	WGVISASVDDR	602,8(2+)	591,3(+)(y5)/662,3(+)(y6)	12

Las transiciones teóricas se diseñaron empleando el programa Skyline (v.1.1.0.2905) y se revisaron manualmente. La especificidad de los péptidos para una proteína (péptidos proteotípicos) se confirmó mediante el uso del programa Blast® (Basic Local Alignment search tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) con restricción taxonómica a Homo sapiens, y se seleccionaron los péptidos proteotípicos para el análisis MRM (tabla 3). Las señales individuales se normalizaron en base al TIC (total ion current) y las áreas de los picos fueron integradas para llevar a cabo la comparación.

Los parámetros de optimización por el programa Skyline fueron:

Enzima: Tripsina
Modificaciones fijas: carboxiamidometilación de Cisteínas
Motor de búsqueda: Skyline v.1.1.0.2905
Base de datos: NIST Human.
Carga de iones: 1+, 2+ y 3+.
Tipo de iones: iones y; iones b.

3.3.2. Análisis estadístico de los datos generados mediante LC MS/MS (MRM).

El área de las señales individuales se normalizaron en base al valor TIC ("total ion current"), calculándose los cocientes del área de la transición dividido por el área del TIC para el análisis comparativo y restando del TIC la señal correspondiente a la Albúmina. El análisis estadístico se realizó mediante Graph Path Prism 5 software, realizándose análisis no paramétricos Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.

Destacamos que no normalizamos en base a la Creatinina excretada ya que en humano, los cambios de este metabolito debidos al stress, dieta, actividad, edad, raza y sexo influyen de manera significativa (93;94). En este estudio concreto hay una significación estadística en Creatina en orina cuando comparamos individuos con ERC con el grupo control (resultados apartado 1).

4. ESTUDIO DIFERENCIAL DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN ORINA EN MUESTRAS DE ORINA.

4.1. Selección de pacientes

Los individuos con enfermedad renal crónica (ERC) fueron seleccionados por el Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España) y de la Unidad de Hipertensión del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España). El estudio se realizó en orina en individuos en los últimos estadios de la ERC (IV-V) y otro estudio con un nuevo cohorte para confirmar resultados posterior en individuos en los primeros estadios de la enfermedad (I-II). Los estadios de la enfermedad fueron definidos por la ecuación MDRD-4 para el cálculo de la filtración glomerular (ml/min/1,73m^2) En la fase de descubrimiento la orina de 15 individuos con ERC establecida, es decir, en estadio IV-V se recogió exclusivamente del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España). Para la fase de validación se recogió un grupo adicional de 23 individuos de las mismas características clínicas del mismo centro. Para las dos fases se contó con un grupo de individuos sanos, 15 en la primera parte de descubrimiento y 25 en la validación. Éstos no presentaban historia de

diabetes, hipertensión arterial, enfermedad renal o algún tipo de enfermedad inflamatoria. Tampoco recibían medicación que pudiera influir en el estudio y fueron macheados por edad y sexo. Se descartaron aquellos individuos que sufrieran además afecciones graves de otro tipo, como enfermedades hepáticas, pulmonares, infecciosas o cáncer.

La orina de un grupo de 25 individuos con ERC incipiente fue recogida en las mismas condiciones. De ellos 15 pertenecen a Unidad de Hipertensión del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (España) y 10 a Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España). Sus características clínicas se muestran en la tabla 8.

De estos individuos 16 sufren enfermedad arterial coronaria (EAC) en pacientes con ERC avanzada y 7 en pacientes con ERC inicial (tabla 8).

Tabla 8. Datos clínicos medios de los individuos que fueron reclutados para el estudio en ERC en la fase de descubrimiento.

Fase de descubrimiento: Casos	**sexo**	**edad**	**FG (ml/min/1.73m2)**	**Creatinina sérica (mg/dl)**	**EAC**	**proteínas orina (mg/24h)**
ERC avanzada	8M/7H	69	19	3.4	6	1592
Controles	**sexo**	**edad**	**FG (ml/min/1.73m2)**		no	6.5
	7M/8H	62	>90			
Fase de validación: Casos	**sexo**	**edad**	**FG (ml/min/1.73m2)**	**Creatinina sérica (mg/dl)**		**albúmina (mg/g)**
ECR avanzada	11M/12H	67	20.58	3.38	10	1390.13
ERC inicial	14M/11H	62	85.83	0.89	7	12.37
Controles	11M/14H	59	>90		no	5.85

4.2. Fase de descubrimiento: Estudio de expresión diferencial de proteínas por marcaje isotópico iTRAQ 8plex.

4.2.1. Pretratamiento de muestras de orina y diseño experimental.

La primera orina de la mañana en ayunas de los pacientes fue recogida en frascos estériles y transportado al laboratorio. Se centrifugó (31000g, 15min, 4ºC) para eliminar el primer desecho celular y el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -80ºC para su posterior análisis.

En la figura 4 se muestra el procedimiento experimental seguido en el estudio.

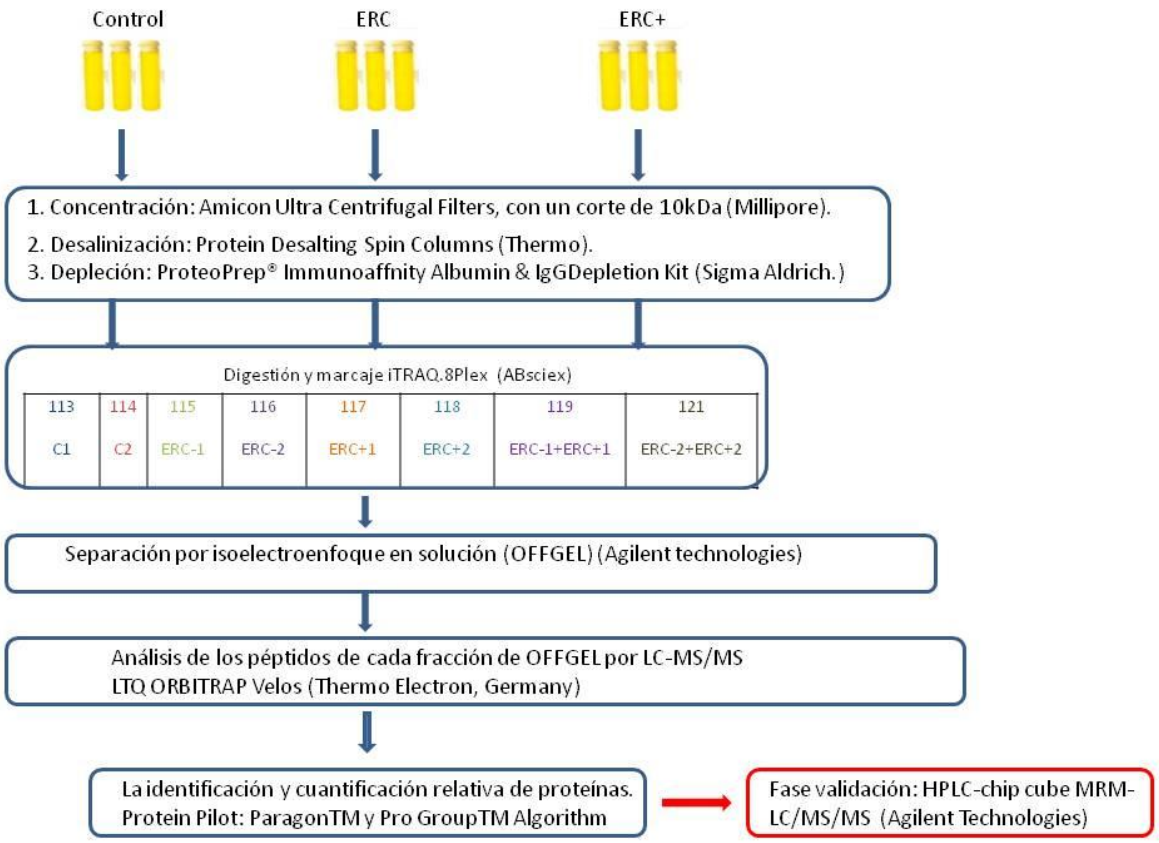

Figura 4.Esquema del procedimiento experimental. En azul el procedimiento correspondiente a la parte de descubrimiento y en rojo el correspondiente a la parte de validación.

Los experimentos de iTRAQ fueron realizados en colaboración con el Centro de Apoyo a la investigación Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid-Parque Científico de Madrid (CAI-RMN UCM-PCM).

Para el estudio se tomaron dos replicas biológicas por grupo a comparar: control, (C1 y C2), ERC (ERC 1 y ERC 2) y ERC con EAC asociada (ERC+1 y ERC+2). Se hicieron otros dos grupos mezclando dos de los grupos anteriores según el esquema: réplica 1 (ERC 1+ERC+1) y la réplica 2 (ERC 2+ERC+2).

Cada réplica biológica se compuso de una mezcla de C1 (7 individuos), C2 (8 individuos), ERC 1 (4 individuos), ERC 2 (5 individuos), ERC+1 (3 individuos) y ERC+2 (3 individuos) (tabla anexo1).

Tabla 9. Esquema del etiquetado de iTRAQ con los grupos a los que corresponde.

113	114	115	116	117	118	119	121
C1	C2	ERC1	ERC2	ERC+1	ERC+2	ERC1+ERC+1	ERC2+ERC+2

Cada muestras de orina individual, que contienen las mezclas correspondientes a las réplicas biológicas, se concentró con dispositivos Amicon Ultra Centrifugal Filters, con

un corte de 10kDa (Millipore). Para eliminar las sales presentes en la muestra concentrada propias de las muestras de orina, se utilizaron columnas Protein Desalting Spin Columns (Thermo) siguiendo el protocolo comercial.

Los individuos con ERC presentan de modo característico una elevada concentración de proteínas en la orina (proteinuria), siendo la Albúmina la proteína mayoritaria. La cuantificación de estas muestras ricas en Albúmina nos estaría falsificando el dato de proteína total respecto a los individuos control. Además dificulta la detección de proteínas minoritarias. Realizamos el paso de la depleción de Albúmina, al contrario que en el apartado 3 en el estudio de enzimas que componen el ciclo del Glutatión, porque se trata de un estudio de descubrimiento donde necesitamos ver el máximo de proteínas posibles sin que la Albúmina y la IgG (proteínas mayoritarias) nos enmascaren los resultados (97;98). La depleción de la albúmina presente y de IgG se realizó utilizando un kit ProteoPrep® Immunoaffnity Albumin & IgGDepletion Kit (Sigma Aldrich), siguiendo el protocolo comercial, excepto en el tampón comercial que es cambiado por el tampón de fosfato (PBS) al contener el tampón comercial TRIS, el cual es incompatible con el marcaje de iTRAQ (99). Después de la depleción, las muestras se precipitaron en acetona fría (-20ºC) durante toda la noche.

Después de la centrifugación, los precipitados son resuspendidos en DB2 (20 mM TEAB, 0.5 % Deoxicolato sódico) (Sigma-Aldrich). Se cuantificaron pro Bradford (BioRad).

Como comprobación de la homogeneidad de la mezcla de muestras (réplicas biológicas) se usaron 2,5 µg de proteína por réplica biológica, teniendo en cuenta la cuantificación anterior, para correr un gel SDS-PAGE al 10%, teñido con Azul Coomassie coloidal (G-250) (BioRad).

4.2.2. Digestión y marcaje iTRAQ de muestra de orina.

La digestión de las muestras se realizó usando un filtro de exclusión molecular de 10 K (NANO SEP 10K Omega), conocido como método FASP. Para ello, 30µg de proteína total en cada réplica biológica (tabla 10) son reducidos con 25 mM de DTT a 60ºC durante 1 h y después se transfieren a los filtros de exclusión molecular. Aquí, las muestras se alquilaron con 50 mM de IA. El exceso de agentes reductores y alquilante se lavó con la solución de DB2 (Sigma-Aldrich). La tripsina recombinante bovina (Roche) se añadió en una proporción 1:20 (enzima:proteína) y se incubó durante toda la noche a 37ºC. Los péptidos eluidos de la digestión, se lavaron con etilacetato para eliminar el exceso de deoxicolato y se llevó la muestra a sequedad por Speed-Vac. A continuación se resuspendieron en 50 µl de 500 mM TEAB.

El marcaje se realizó utilizando los reactivos comerciales de iTRAQ 8 plex (ABsciex) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Los reactivos iTRAQ son resuspendidos

en 50 µl de isopropanol y añadidos a cada una de las muestras digeridas, siguiendo el diseño experimental de la figura 4 y tabla 9.

Tabla 10. En la tabla se refleja el volumen tomado para digerir 30µg de proteína total. En las columnas de los extremos se muestran las etiquetas de iTRAQ 8 plex.

Etiquetas iTRAQ	Muestras	iTRAQ con 30 µg	
113	**C1**	21,1 ul	
114	C2	28,4 ul	
115	ERC1	52,2 ul	
116	ERC2	21,1 ul	
117	ERC+1	38,8 ul	
118	ERC+2	12,5 ul	
119	**ERC1+ERC+1**	26,1 ul	19,4 ul
121	**ERC2+ERC+2**	10,5 ul	6,2 ul

Tras 2 horas de incubación, antes de mezclar las muestras marcadas individualmente, se comprobó el marcaje (usando 0.5 µl de cada una de ellas y fragmentando algún péptido de cada una de las muestras en el MALDI TOF/TOF (ABsciex). Se comprobó que el marcaje era correcto, y se procedió a mezclar y secar hasta 200 µl la muestra.

4.2.3. Fraccionamiento mediante isoelectroenfoque en solución (OFFGEL)

Antes de la separación por isoelectroenfoque en solución (OFFGEL, Agilent technologies), las muestras marcadas con iTRAQ, se acidificaron y se limpiaron usando una columna de C18 (Sep-Pak C18 3 cc, Waters,). Se eliminó el disolvente de las muestras eluídas con Speed-Vac y resuspendieron en 5% Glicerol y 1% Anfolitos 3-10 (BioRad). A continuación, tras rehidratar la tira IEF 3-10L (GE Healthcare) sobre la que se realiza la separación, se procedió a separar la muestra inicial en 12 pocillos en el sistema de OFGEL (Agilent technologies). El isoelectroenfoque se realizó a 50 µA hasta alcanzar 50 KVhr. Los péptidos de las diferentes fracciones de pI se recogieron para ser concentrados y lavados mediante POROS R2 (ABSiex) antes de continuar su proceso de separación.

4.2.4. Separación multidimensional de los péptidos y análisis por espectrometría de masas. Análisis de los péptidos de cada fracción de OFFGEL mediante LC-MS/MS.

Los péptidos de las fracciones de OFFGEL fueron separados utilizando nano-cromatografía líquida y analizado por Electrospray (nanoLC-MS/MS). El experimento

se llevo a cabo en un sistema nano HPLC de Eksigent acoplado on line a un espectrómetro de masas LTQ ORBITRAP Velos (Thermo Electron, Germany) equipado con una fuente de ionización nanospray (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark). Se cargaron 5 µl de cada fracción de OFFGEL y los péptidos fueron preconcentrados y lavados en una precolumna C18-A1 ASY-Column 2 cm precolumn (Thermo Scientific) durante 15 minutos. Posteriormente separados en una columna análitica Biosphere C18 con un diámetro interno 75 µm, 15 cm de longitud y 3 µm de tamaño de partícula (NanoSeparations) a una velocidad de flujo de 250 nl/min. Se utilizaron, como buffer A, 0.1% de HCOOH / 2% ACN y como buffer B, 0.1% de HCOOH en ACN 100%. El gradiente utilizado fue el siguiente: 0-220 min 0-35% de Buffer B, 220-230 min 35-45% de Buffer B y 230-240 min 45-95% de Buffer B.

La LTQ Orbitrap Velos operó en modo de ionización positivo y "data-dependent", para cambiar automáticamente de MS a MS/MS. Se realizó el barrido MS en el Orbitrap entre 350 y 1750 m/z con una resolución de 60000 FWHM para un m/z igual a 400. Se seleccionaron hasta 10 precursores de los más intensos, con carga mayor o igual a 2, que superaban una señal de 1000 cuentas para ser fragmentados con CID-HCD (Colision Induced Disociation-Hight Colision Disociation) y se incorporaron en una lista de exclusión durante 60 sec. La identificación de péptidos se realiza teniendo en cuenta tanto los espectros CID como HCD, mientras que la cuantificación se llevo a cabo en los espectros adquiridos por HCD.

La fragmentación HCD se llevo a cabo con exceso de Energía de colisión para maximizar la abundancia de los iones "reporter" o etiquetados de iTRAQ. Para la fragmentación por CID la Energía de colisión normalizada fue de 35% con una resolución de 10000 y de 42% y 50000 respectivamente para la fragmentación HCD. De esta forma se adquirieron 183789 espectros MS/MS.

4.2.5. Identificación y cuantificación relativa de proteínas usando el programa Protein Pilot

a. Criterios de identificación.

La identificación de proteínas se llevó a cabo de forma automática utilizando el motor de búsqueda ParagonTM y Pro GroupTM Algorithm, ambos incluidos en el programa ProteinPilot v 4.5 de ABSciex. Los espectros de fragmentación MS/MS se enfrentaron contra la base de datos Uniprot con restricción taxonómica a Homo sapiens. Así mismo, ProteinPilot nos permitió estimar el número de falsos positivos (FDR), utilizando una base de datos reversa y la herramienta PSEP tools, incluida también en el programa Protein Pilot.

Los parámetros de búsqueda fueron:

Enzima: Ninguna
Modificaciones fijas: iTRAQ 8-plex peptide label y carboxiamidometilación de Cisteínas
Motor de búsqueda: Protein Pilot v.4.5
Base de datos: UniProt Human. (Número de entradas: 1093299 sequences; 340342787 residues)
Umbral de aceptación de los espectro empleado: CI>95%
FDR Analysis: Estimación de falsos positivos: PSEP tools.
Las proteínas se agrupan utilizando el Algoritmo Progroup.

La especificidad de corte de los péptidos identificados calculados por ProteinPilot se muestra en la tabla

Tabla 10. Frecuencias del corte C-terminal causados por la enzima tripsina calculados por el programa ProteinPilot.

Tipo de péptido	***% de corte de la Tripsina***
Lisina	**19.9%**
Arginina	**59.7%**
Otras	*20.4%*

Se consideran proteínas correctamente identificadas las que superan un "Unused score" de 1.3 (CI>95%) y que están por debajo de un FDR de 1%.

b. Criterios de cuantificación diferencial.

La cuantificación relativa se realiza en función las áreas de los picos para cada "reporter" o etiqueta. Se relaciona la variación en la cantidad de proteína para las dos condiciones con el ratio de las áreas de las etiquetas de los péptidos que las identifican.

Los ratios son normalizados directamente en el programa Protein Pilot en base a "Bias correction" (corrección de sesgo o muestreo), para corregir las diferencias experimentales a la hora de elegir la muestra y corregir también los problemas que pudiera haber en la concentración de las muestras.

Se consideran proteínas cuantificables aquellas que se identifican con más de 2 péptidos con un nivel de confianza mayor o igual 95% y que tengan un ratio con un p valor

menor o igual a 0,05 y un factor de error (EF) menor de 2 con cada una de las etiquetas elegidas como referencia. También se tuvo en cuenta que no fuesen significativos entre las mismas replicas biológicas. Esta cuantificación se realiza utilizando el Algoritmo Progroup dentro del programa Protein Pilot.

4.3. Fase de validación: Análisis de proteínas en muestras orina mediante la metodología "multiple reaction monitoring" (MRM), mediante cromatografía líquida acoplada en línea a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS).

4.3.1. Tratamiento muestras.

Para la digestión de las proteínas presentes en la orina se tomaron 20 µg de proteína total. Desalinizamos la muestra con columnas Protein Desalting Spin Columns (Thermo) según protocolo comercial. Añadimos el agente reductor ditiotreitol SIGMA Aldrich (DTT) hasta una concentración final 10 mM y se incubar a 37ºC durante 1h. Las cisteínas se bloquearon añadiendo yodoacetoamida SIGMA Aldrich (IA) hasta una concentración final de 55 mM. Se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Se diluye la muestra con bicarbonato amónico 50mM, en este caso por dos razones para diluir la concentración de interferentes (urea endógena) y asegurar el pH de actuación de la enzima. Una vez comprobado el pH de la muestra, para la tripsina es 8.5, añadimos la tripsina bovina de grado de secuencia (Roche) en relación 1:50 con la cantidad de proteína. Después de incubar a 37ºC durante toda la noche, se detuvo la digestión con TFA hasta 0,1% v/v. La mezcla de péptidos trípticos obtenida se sometió a un proceso de limpieza con unas columnas C18 ("spin columns") (Protea Bioesciences) siguiendo el protocolo comercial. La muestra se llevó a sequedad en un speed-vac y se resuspendió en fase móvil A (ACN 3%, HCOOH 0,1%) con un 10% de ACN (Merk).

4.3.2. Adquisición de espectros.

Las muestras se analizaron en modo MRM empleando un triple cuadrupolo 6460 LC/MS/MS (Agilent Technologies) conectado en línea a un HPLC-chip cube (Agilent Technologies) y a cromatografía líquida de la serie 1200 (Agilent Technologies)

La separación cromatográfica de los péptidos se llevo a cabo en chip ProtID Zorbax 80SB-C18-5 µm con una columna analítica de 150 mm x 75µm y una columna de enriquecimiento de capacidad 500 nL y 25 mm (Agilent Technologies). Se inyectaron 1 µl de muestra impulsada por la bomba capilar con un flujo de 4 µl/min hasta la columna de enriquecimiento. La separación se produjo con un flujo de 0,4 µl/min en un gradiente de 5%B durante 1 min, 40% en 4 minutos, 95%B en 7min y manteniéndose en el 95% 2 min (fase B: ACN 0,1% HCOOH; fase A: H_2O MiliQ 0.1% HCOOH). El control del sistema se gestionó empleando el programa informático MassHunter Software (v4.0). El espectrómetro de masas trabajó en modo de ion positivo con un voltaje capilar de 1990 V, la fuente de gas a una temperatura de 325ºC y un flujo de 5 L/min.

El “fragmentador “se fijo en 135V y un tiempo de barrido “dwell time” para cada transición de 20 ms; el EMV a 600 V y la energía de colisión se optimizo para cada transición MRM.

Tabla 12. Proteínas diferenciales en ERC en la fase de descubrimiento para evaluar en la fase de validación. Transiciones (m/z precursor->m/z producto). (* CE: Energía de Colisión).

proteina (UniProt ID)	secuencia peptídica	m/z precursor (carga)	m/z producto (carga)(ión)	CE (eV)
KNG1_HUMAN Kininogen1 (P01042)	SLWNGDTGECTDNAYIDIQLR	814,3 (3+)	1010,5(2+)(y18)	20
	DIPTNSPELEETLTHTITK	713,7(3+)	956,0(2+)(y17)/856,0(2+)(y15)/756,0(2+)(y13)/967,47(+)(b9)	17
		1070,0(2+)	956,0(2+)(y17)	39
CD59_HUMAN CD59 glycoprotein (P13987)	TVLLLVTPFLAAAWSLHP	650,4(3+)	605,3(2+)(y11)/612,0(3+)(b7)	15
		975,1(2+)	370,7(2+)(b7)	34
RET4_HUMAN Retinol-binding protein 4 (P02753)	WVWALLLLAALGSGR	542,7(3+)	670,9(2+)(y13)	10
		813,5(2+)	995,6(+)(b8)/882,5(+)(b7)	20
	GNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCR	898,4(3+)	1046,5(2+)(y18)	32
	LLNLDGTCADSYSFVFSR	689,0(3+)	905,5(+)(y7)	20
PIGR_HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor (P01833)	ANLTNFPENGTFVVNIAQLSQDDSGR	936,5(3+)	961,0(2+)(y18)	25
	VPGNVTAVLGETLK	699,4(2+)	649,9(2+)(y13)/738,4(+)(b8)	20
	LSLLEEPGNGTFTVILNQLTSR	801,4(3+)	831,5(+)(y7)	20
	LDIQGTGQLLFSVVINQLR	705,4(3+)	736,4(2+)(b14)/793,0(2+)(b15)	16
WFDC2_HUMAN WAP four-disulfide core domain protein(Q14508)	DQCQVDSQCPGQMK	840,8(2+)	848,4(+)(y7)	22
		560,9(3+)	187,4(3+)(y5)	11
	EGSCPQVNINFPQLGLCR	697,0(3+)	821,4(2+)(b15)	16
B2MG_HUMAN Beta-2-microglobulin (P61769)	SVALAVLALLSLSGLEAIQR	675,4(3+)	704,9(2+)(b15)	15
	SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK	852,1(3+)	899,4(+)(b7)	22

Tabla 13. Proteínas diferenciales en ERC con EAC asociada en la fase de descubrimiento para evaluar en la fase de validación. Transiciones (m/z precursor->m/z producto). (* CE: Energía de Colisión).

proteína (UniProt ID)	secuencia peptídica	m/z precursor (carga)	m/z producto (carga)(ión)	CE (eV)
KNG1_HUMAN Kininogen-1 (P01042)	SLWNGDTGECTDNAYIDIQLR	814,3 (3+)	1010,5(2+)(y18)	20
	DIPTNSPELEETLTHTITK	713,7(3+)	956,0(2+)(y17)/856,0(2+)(y15)/756,0(2+)(y13)/967,47(+)(b9)	17
		1070,0(2+)	956,0(2+)(y17)	39
NID1_HUMAN Nidogen-1 (P14543)	QDLGSPEGIAVDHLGR	555,3(3+)	696,4(+)(y6)/727,3(+)(b7)	11
	ALEGLQYPFAVTSYGK	582,0(3+)	485,3(2+)(y9)/612,3(+)(b6)	12
ZA2G_HUMAN Zinc-alpha-2-glycoprotein (P25311)	HVEDVPAFQALGSLNDLQFFR,	801,7(3+)	580,3(+)(b5)/608,7(3+)(y16	19
AMBP_HUMAN Protein AMBP (P02760)	MTVSTLVLGEGATEAEISMTSTR	795,4(3+)	826,9(2+)(y16)/1031,5(+)(b10)	20
	AFIQLWAFDAVK	704,9(2+)	830,5(+)(b7)	20
	EYCGVPGDGDEELLR	570,3(3+)	590,2(2+)(b11)	11

Las transiciones teóricas se diseñaron empleando el programa Skyline (v.1.1.0.2905) y se revisaron manualmente. La especificidad de los péptidos para una proteína (péptidos proteotípicos) se confirmó mediante el uso del programa Blast® (Basic Local Alignment search tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) con restricción taxonómica a Homo sapiens, y se seleccionaron los péptidos proteotípicos para el análisis MRM (tablas 12 y 13). Las señales individuales se normalizaron en base al TIC (total ion current) y las áreas de los picos fueron integradas para llevar a cabo la comparación.

4.3.3. Tratamiento estadístico.

Las señales individuales se normalizaron en base al valor TIC ("total ion current"), calculándose cocientes del área de la transición dividido por el área del TIC para el análisis comparativo. El análisis estadístico se realizó mediante Graph Path Prism 5 software, realizándose análisis no paramétricos Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.

Destacamos que no normalizamos en base a la Creatinina excretada ya que en humano, los cambios de este metabolito debidos al stress, dieta, actividad, edad, raza y sexo influyen de manera significativa (93;94). En este estudio concreto hay una significación estadística en Creatina en orina cuando comparamos individuos con ERC con el grupo control.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN MUESTRAS DE ORINA Y PLASMA.

1.1. Fase de descubrimiento: Análisis mediante RMN.

1.1.1. Desarrollo del método de análisis de orina por Resonancia Magnética Nuclear.

Dada la complejidad de las matrices biológicas en general y de la orina en particular, se obtuvieron espectros de resonancia de protón (^{1}H RMN) en un equipo de alto campo (700MHz). En un estudio preliminar se analizó una misma tanda de muestras en dos equipos de RMN de 500MHz y 700MHz, observando muy poca resolución en los espectros de primera dimensión obtenidos con el equipo de más bajo campo para los mismos tiempos de adquisición. Se tomó así la decisión de realizar los experimentos en el equipo de 700MHz AVIII (Bruker). Los espectros obtenidos para el conjunto de muestras de pacientes y controles son tratados con el programa AMIX (Bruker) y se realiza un análisis estadístico de componentes principales que identifica regiones significativamente diferenciales. Dichas regiones se evalúan en profundidad y se lleva a cabo la identificación de los desplazamientos químicos responsables de dichas variaciones. Para una mayor elucidación y para resolver el problema de solapamientos que encontramos en la primera dimensión, recurriremos a los experimentos de segunda dimensión. A través de ellos se procedería a la identificación inequívoca de los metabolitos.

Adicionalmente se ensayaron dos temperaturas de adquisición, 25ºC y 4ºC. Comparando la resolución espectral de las dos medidas, observamos que a 4ºC la resolución era mayor y la variabilidad menor, sin observar turbidez en las muestras de orina, que pudiera interferir con los experimentos (100).

De modo paralelo y acorde con la literatura (100), se observó que el valor del pH influía en el desplazamiento químico de algunos metabolitos dependientes de éste o más sensibles a él, como en el caso de Alanina, Tirosina, Citrato o Creatinina. Para poder solucionar el problema y que la comparación entre controles y pacientes tuviese la menor variabilidad posible se realizaron pruebas con tampón de fosfato ajustando finalmente el pH a un valor de 7.

Para suprimir la banda residual de agua, cuya señal es tan amplia que impide ver el resto de las señales, se utilizó la secuencia de resonancia (NOESYPRESAT1D) "Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy". Esta secuencia, propia de los experimentos de 2D, consiste en aplicaron pulso de 90º con el fin de hacer la banda de agua más pequeña para que se puedan apreciar el resto de las señales.

En las condiciones óptimas (equipo 700MHz, 4ºC y tampón fosfato 200mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 a pH 7), se analizaron muestras las de orina.

1.1.2. Estudio de la Enfermedad Renal Crónica en estadios avanzados en muestras de orina mediante RMN.

Si nos fijamos en la figura 1, se muestra un esquema del flujo de trabajo, donde se muestran las dos partes del experimento. La fase de descubrimiento realizada mediante RMN y la fase de validación realizada mediante (LC-MS/MS MRM). En la fase de validación también se realizó un test ciego por RMN.

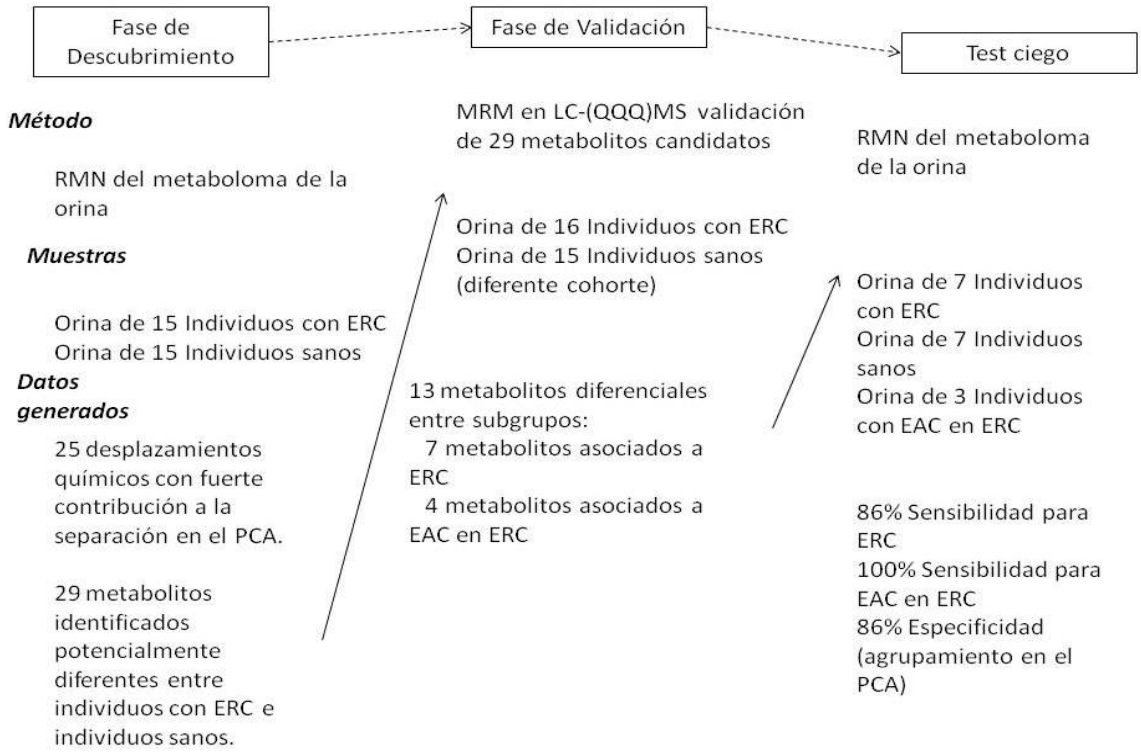

Figura 1. Esquema de trabajo. A la izquierda, la fase de descubrimiento seguido, según indican las flechas, de la fase de validación y por último el test ciego realizado. (* Enfermedad renal crónica (ERC), Enfermedad arterial coronaria (EAC)).

Así, la orina de 15 individuos con ERC y de 15 individuos sanos (tabla 1) fue analizada mediante resonancia de protón. Llamaremos a todas Enfermedad Crónica Renal (ERC) englobando a todas las nefropatías que en sí misma encierra. Para su análisis e interpretación el espectro fue dividido en regiones espectrales con una anchura de 0,04ppm, los cuales se han llamado “buckets”. Es decir, dividimos el espectro en partes iguales con una anchura optimizada de 0,04ppm. Se probó con una anchura de 0,02ppm, pero no proporcionaba información adicional. En este estudio, contamos con una variable dependiente que toma los valores 0 o 1 (Control o Paciente) y 236 variables independientes correspondientes al valor que toma el espectro para 236 buckets diferentes. Para poder analizar estos datos se realiza un estudio quimiométrio por el

método de componentes principales (PCA). Este procedimiento únicamente se centra en las variables independientes. Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico empleando un procedimiento que busca componentes basándose en la relación existente entre las variables independientes y la variable dependiente y que representa la asociación entre ellas. En esto se basa el modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales-análisis discriminante (PLS-DA). En ambos métodos la región espectral analizada fue 0,1-10 ppm.

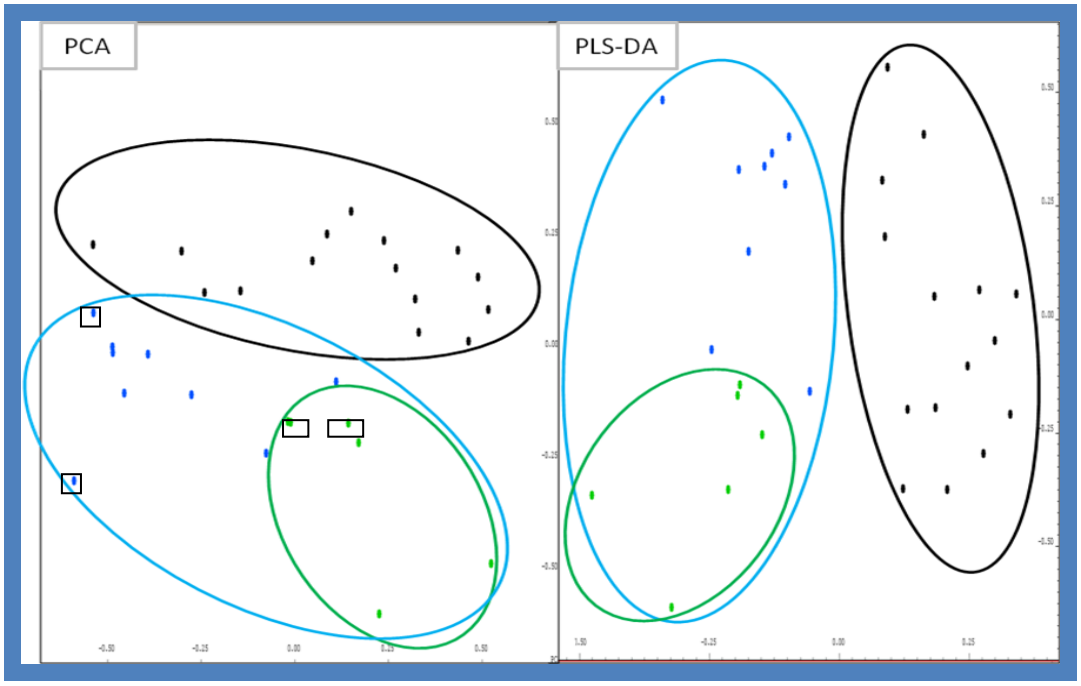

Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) y Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales-análisis discriminante (PLS-DA) generados de los datos de RMN. Los puntos negros corresponden a los individuos control, los puntos azules corresponden a individuos con ERC sin EAC asociada y los puntos verdes corresponden a individuos con ERC con EAC asociada. El círculo azul engloba a todos los individuos con ERC y el círculo verde a los individuos que dentro de ERC sufren EAC documentada. En el círculo negro se encuentran los individuos sanos (control). Rodeados con un cuadro negro se muestran los individuos diabéticos con ERC.

El análisis por PCA de todas las señales/desplazamientos químicos muestra una buena separación entre casos y controles, como también el PLS (figura 2). El primer gráfico muestra la componente 1 frente a la componente 2. Se puede ver que estas dos componentes realizan una separación muy buena de pacientes y controles (controles dentro del círculo negro y pacientes dentro del círculo azul), al igual ocurre en el análisis por PLS-DA. Se puede imaginar una línea recta que separe las dos nubes de puntos. Tras el análisis del espectro y de su posterior análisis estadístico mediante estos dos métodos, no atribuimos la separación de grupos a la edad, sexo, medicación o la fecha de recogida de la orina (se recogieron a lo largo de un año), puesto que si tenemos en cuenta estas variables los individuos se entremezclan en el PCA o el PLS. Aunque

existen estudios que reflejan diferencias entre sexo y edad en la orina, en el análisis que aquí se muestra estas diferencias no influyen significativamente en la separación de grupos y esta clara separación entre controles y pacientes la podemos atribuir a la propia enfermedad renal.

La contribución de cada región o bucket a esta separación está representada en la figura 3. En esta figura se representa la importancia que cada señal del espectro tiene en la construcción de la componente a la hora de hacer el estudio por PCA o PLS. Por lo tanto representan la importancia de cada señal del espectro de cara a discriminar entre casos y controles. Si nos fijamos en la figura 3, donde se representa la contribución de cada desplazamiento químico en el eje de abscisas, y la carga que tiene en el espectro en el eje de ordenadas. Observamos que cuanto más se aleja del eje X, más contribución tiene a la separación en el análisis mediante PCA y PLS.

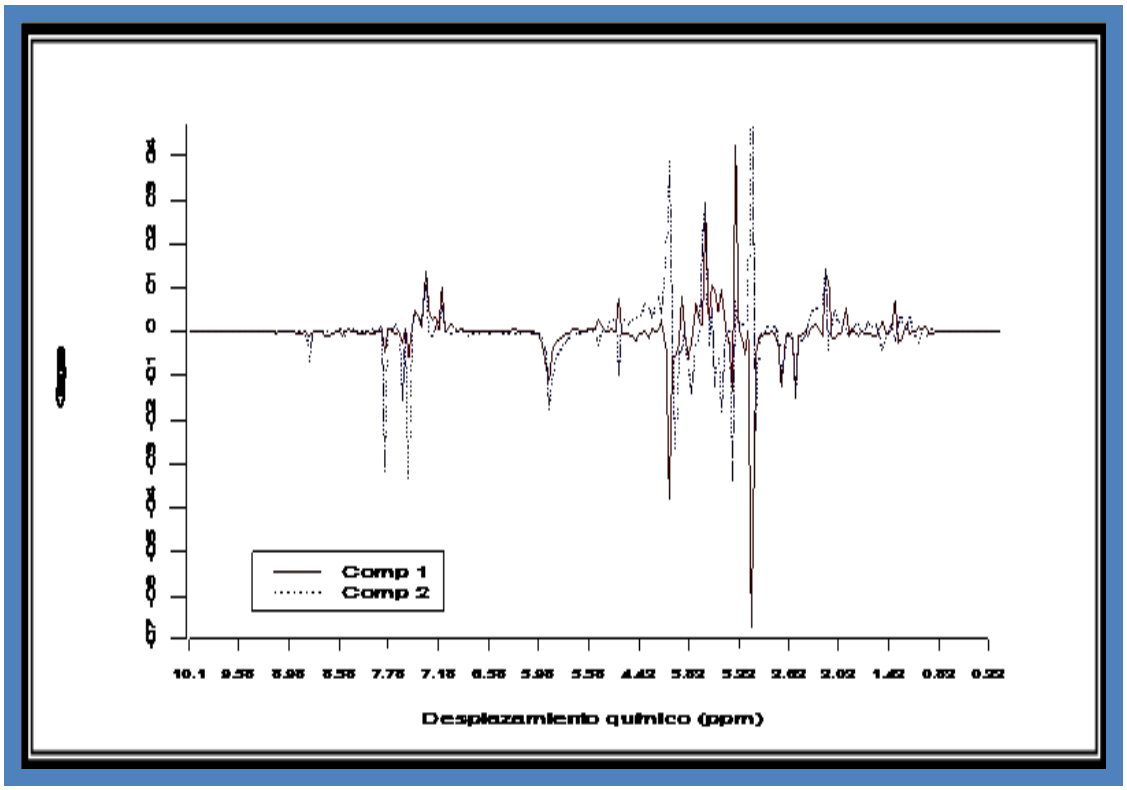

Figura 3. Gráfica donde se representan las contribuciones de cada bucket traducido a desplazamiento químico a lo largo del espectro de RMN.

Del análisis estadístico se obtienen adicionalmente los desplazamientos químicos (ppm) que contribuyen a esas diferencias y que tienen por tanto más peso en el espectro.As, un total de 25 desplazamientos químicos fueron seleccionados como los contribuyentes principales a la división en el PCA y PLS-DA, los cuales fueron detectados en todas las muestras individuales. En la figura 4, se muestra un espectro ^{1}H RMN a modo de ejemplo de la orina de un individuos con ERC. Dos de los desplazamientos con más peso en el espectro fueron los dos singletes de la Creatinina (3,06ppm y 4,06ppm). Otro singlete característico en el espectro es el singlete ancho de la Urea (5,80 ppm), debido

al intercambio de protones continuo. En este estudio nos centramos en metabolitos (moléculas de bajo peso molecular, por debajo de 1000Da) descartando las especies macromoleculares, ya que éstas producen ensanchamiento en los picos de resonancia, reducen la difusión rotacional y el tiempo de relajación ocasionando problemas a la hora de elucidar el espectro. Estos problemas son más notables en los pacientes donde es conocida su alta proteinuria. Por ello, el ajuste de la fase de los pacientes es más complejo y el solapamiento de señales es mayor, haciendo en estas zonas (1-5 ppm) más difíciles la identificación de señales en experimentos de protón en primera dimensión. Si nos fijamos en el campo alto hay muchas señales solapadas, las grandes moléculas como las proteínas ensanchan la señal de resonancia y apantallan a otros núcleos, lo que dificulta la interpretación precisa del espectro. Para una mayor elucidación y para resolver el problema de solapamientos que encontramos en la primera dimensión, recurrimos a los experimentos de segunda dimensión en resonancia magnética nuclear (2D RMN).

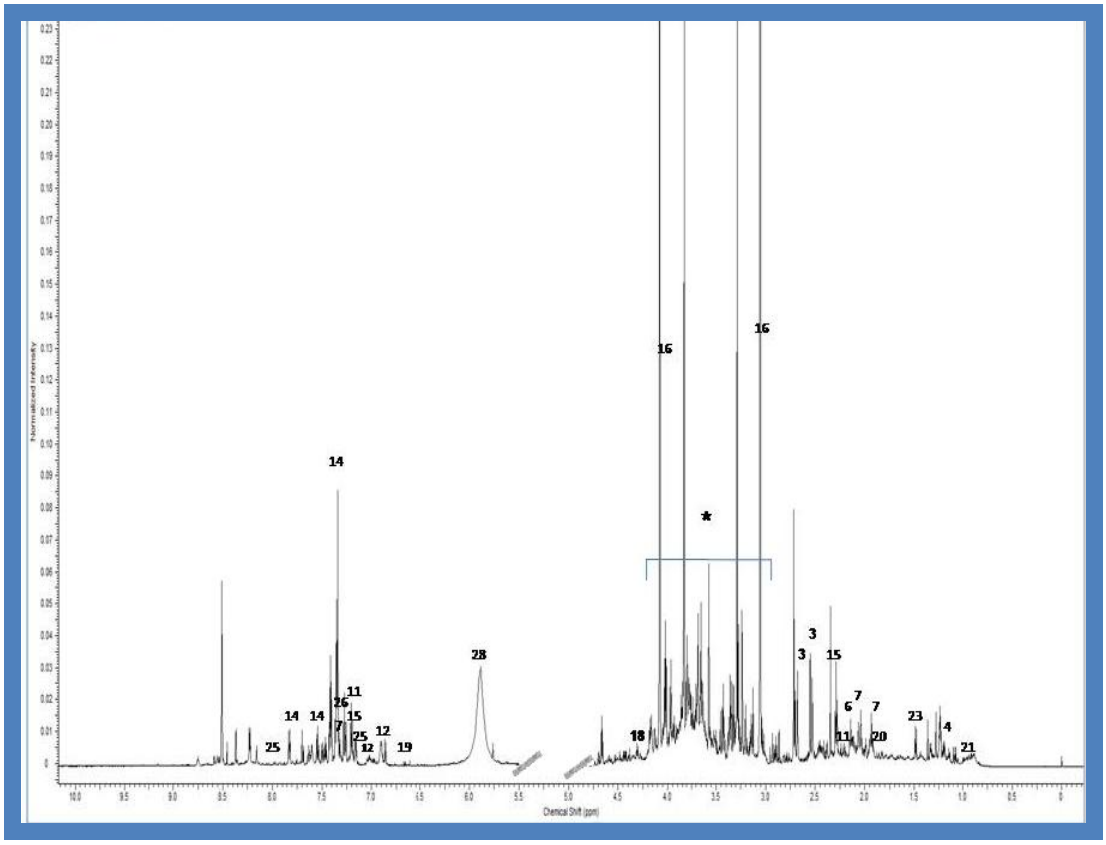

Figura 4. Espectro de ^{1}H RMN. Metabolitos identificados por 2D señalados en un espectro 1D-RMN. *Myoinositol, *Treitol, ^{3}Citrato, ^{4}Isobutirato,' *Taurine, ^{6}Homocisteina, ^{7,*}Acetil-Glutamina, *Serina, *Guanidoacetato, *Dimetilglicina, ^{11,*} α-Fenilacetilglutamina (AFAG), ^{12,*}Tirosina, *Trimetilamina-N-oxido (TMANO), ^{14,*}Hipurato, ^{15}O-Cresilsulfato, ^{16}Creatinina, *Betaina, ^{18,*}Malato, ^{19}5-Oxoprolina, ^{20,*}Prolibetaina, ^{21,*}Leucina, *Treonina, ^{23,*}Alanina, *Glicina, ^{25,*}Histamina, ^{26,*}Fenilalanina, *Arginina, ^{28}Urea. * Área donde solapan los desplazamientos de metabolitos que deben ser identificados en experimentos de segunda dimensión.

Para la identificación de los metabolitos a partir de los desplazamientos químicos se realizaron experimentos en dos dimensiones (COSY, TOCSY y HSQC). Así se llegó a la identificación de 29 metabolitos, los cuales eran potenciales candidatos a marcadores asociados a ERC (figura 5).

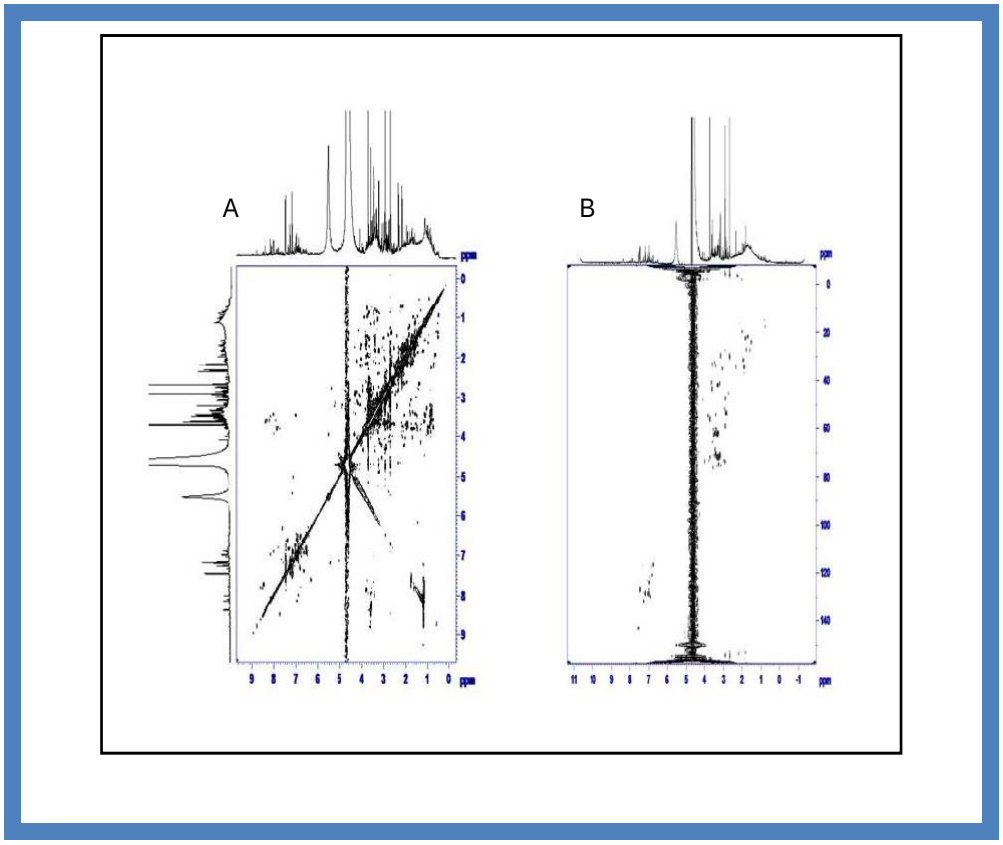

Figura 5. Experimentos 2D-RMN. Espectros: A, Total correlation spectroscopy (TOCSY) y B, heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy (HSQC) adquiridos para la identificación de metabolitos.

Tabla 1. Metabolitos identificados por experimentos de 2D-RMN.

Metabolito	Desplazamiento químico (ppm)
Histamina	7.14 (s), 3.30 (t), 3.03(m), 7.99 (s)
*Myo*inositol	3.28 (t), 3.52 (dd), 3.61 (t), 4.05 (t)
Citrato	2.67 (d), 2.64 (d), 2.54 (d), 2.51 (d)
L-Fenilalanina	7.42 (m), 7.36 (m), 7.32 (d), 3.98 (dd), 3.19 (m)
Isobutirato	1.21 (d9, 2.59 (m)
Taurina	3.25(t), 3.42 (t)
Homocisteina	2.14 (m), 2.65 (ddd), 3.87 (dd)
D-Treitol	3.61 (m), 3.70 (m)
L-Serina	3.83 (dd), 3.95 (m)
Guanidoacetato	3.78 (s)
Betaina	3.89 (s), 3.25 (s)
Dimetilglicina	2.91 (s), 3.71 (s)
L-Tirosina	3.02 (dd), 3.17 (dd), 3.92 (dd), 6.87 (m), 7.17 (m)
Alfa-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)
Trimetilamine N-oxido (TMANO)	3.25 (s)
L-Treonina	1.31 (d), 3.57 (d), 4.24 (m)
Hipurato	7.54 (m), 7.82 (dd), 7.62 (t), 3.96 (d)
O-Cresilsulfato	2.35 (s), 7.20 (d), 7.28 (d)
Acetilglutamina	2.01 (s), 2.11 (m), 2.45 (m), 4.20 (d), 7,01 (s), 7.35 (s)
L-Arginina	1.90 (m), 1.68 (m), 3.23 (t), 3.76 (t)
Glutamato	2.04 (m), 2.11 (m), 2.34 (m), 3.74 (dd)
Prolibetaina	3.11 (s), 3.31 (s), 4.01 (d), 1.94 (m), 2.06 (m)
Malato	2.35 (dd), 2.66 (dd), 4.29 (dd)
L-Leucina	0.94 (t), 1.70 (m), 3.72 (m)
5-oxoprolina	6.67 (d), 2.19 (m), 1.90 (m), 2,59 (m), 2.23 (m),4.23 (d)
L-Alanina	1.48 (d), 3.79 (t)
L-Glicina	3.55 (s)
L-Valina	0.97 (d), 1.02 (d), 2.26 (m), 3.60 (d)
Creatinina	3.06 (s), 4.06 (s)

Si nos fijamos en el PCA correspondiente a la ERC (figura 2) aparecen clasificados en dos áreas el grupo de individuos sanos y el grupo de individuos con ERC, como se ha comentado anteriormente. Si nos fijamos en el grupo con ERC hay una pequeña clasificación en una zona concreta (en la figura 2, dentro del círculo que engloba los pacientes reflejados en puntos verdes). Para poder explicar la razón de esa clasificación, se procedió a revisar las historias clínicas de todos los individuos con ERC, descubriendo que todos los individuos clasificados en esa zona del PCA (puntos verdes de la figura 2) seguían un mismo patrón, si tenemos en cuenta la enfermedad vascular asociada a este grupo de individuos con ERC del estudio.

Otro dato interesante observado en la figura 2, es el comportamiento de los individuos que sufren Diabetes Mellitus (DM) en el análisis por PCA (ver tabla 1 en Material y Métodos). Dentro de los diabéticos, enfermedad con un alto riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular, dos individuos que se aproximan más a la zona de evento según nos movemos por la componente 1 y otros dos quedan alejados (En la figura 2 están señalados con una cuadrícula). Este hecho se explicaría teniendo en cuenta que uno de los individuos que se aproximan a la zona de evento cardiovascular lleva 30 años diagnosticado de diabetes y el otro individuo tiene actualmente 85 años y presenta una insuficiencia cardiaca, mientras que los individuos diabéticos más alejados de esta región de riesgo son diabéticos de reciente diagnóstico. Naturalmente con este escaso número de muestras es imposible predecir ningún resultado. Sería interesante confirmar las observaciones mencionadas por un estudio aumentando el número de individuos diabéticos.

1.2. Fase de validación

1.2.1. Desarrollo de métodos de análisis en muestra de orina mediante LC MS/MS MRM.

Para poder realizar esta parte del estudio, se trabajó en la puesta a punto y optimización del sistema LC-MS con la configuración de Jet Stream, ajustando una serie de parámetros que influyen en la eficacia de la ionización y en la sensibilidad de detección metabolitos. Esto influye a la hora de obtener una buena resolución espectral. Por tanto un cuidadoso ajuste de estos parámetros es esencial antes del análisis y estudio de las muestras biológicas, para futuras validaciones por “multiple reaction monitoring” (MRM) de metabolitos diferenciales.

El equipo tiene dos modos básicos de operación. El modo barrido “scan”, que no proporciona una medida de masa exacta y no es una opción para la identificación de compuestos, dado que la resolución y la exactitud de masa del triple cuadrupolo son limitadas.

Para abordar la fase de validación, se ha desarrollado un esquema de trabajo y puesta a punto de la metodología “multiple reaction monitoring” o MRM. Esto nos proporciona una forma de cuantificación y a su vez de validación única, ya que no vamos a detectar

una mezcla de compuestos, sino que sólo observaremos nuestro compuesto a estudio. Este método de trabajo es posible una vez identificada nuestra molécula de interés por otras técnicas. La puesta a punto, para la validación de los metabolitos ya identificados por las técnicas arriba mencionadas, pasa por el ajuste de ciertos parámetros, los cuales se detallan a continuación. Se parte del modo barrido "scan". De esta forma hacemos un barrido en el Q1 de todas las masas que ve el equipo de la muestra. El Potencial de "declustering" (DP), parámetro dependiente de la masa que se aplica a la entrada del primer cuadrupolo (Q1), se va aumentando en incrementos de 2 para una buena optimización, haciendo una rampa de voltajes en Q1. Es importante ajustarlo porque de él dependen el proceso de desolvatación y disociación. Con el modo "product ion" podemos obtener el espectro de fragmentación. Para ello ajustamos parámetros como la energía de colisión (CE), energía necesaria para producir la fragmentación en la celda de colisión (q 2) con flujo de gas auxiliar que, mediante choques moleculares con las moléculas de nitrógeno, produce la fragmentación de una molécula concreta con una masa concreta (m/z 1) de forma que ésta sea máxima para los fragmentos deseados. Se realiza con una rampa de voltaje de 5 a 120V (en incrementos de 2). Una vez obtenido el espectro de MS/MS elegimos el fragmento de la molécula más estable (m/z 2) que puede ser o no el mayoritario viendo la reproducibilidad de éste y lo hacemos pasar a través del tercer cuadrupolo (Q 3) hasta el detector. Otro parámetro que nos queda por ajustar es el "Dwell time". El "Dwell time" es el tiempo que se emplea para monitorizar este proceso descrito, dando lugar a una señal cuantificable correspondiente a la llamada transición (m/z 1-> m/z 2). Con los datos de m/z 1, m/z 2, DP, "Dwell time" y CE de cada compuesto y según su naturaleza química, podemos desarrollar y aplicar la metodología MRM. Así es como se abordará el estudio de la validación de los metabolitos diferenciales.

Al ser una forma de trabajo acoplada on-line a la cromatografía líquida, también se optimiza el método cromatográfico según la naturaleza de la muestra. Esto se realiza para cubrir el mayor número de metabolitos posible, contando en nuestro caso, con el equipo de cromatografía líquida 1200 series de Agilent Technologies como herramienta de trabajo. En este estudio se decidió utilizar una columna de Waters C18 T3 diseñada para trabajar en fases acuosas y para retener tanto compuestos polares como hidrofóbicos y así cubrir un mayor rango de moléculas.

1.2.2. Análisis de un panel de metabolitos alterados en la Enfermedad Renal Crónica en estadios avanzados en muestras de orina mediante LC MS/MS MRM.

Para validar los resultados de la fase de descubrimiento y ver realmente los metabolitos asociados a ERC, se analizó una cohorte independiente (16 individuos con ERC y 15 individuos sanos) (Tabla 1 en Material y Métodos) utilizando la tecnología de (LC MS/MS MRM).

En el texto cuando se hable de individuos con ERC con EAC asociada se llamarán (ERC+), y cuando se hable de individuos con EAC con ERC asociada se llamarán (ERC). A este último grupo sin EAC asociada en la figuras se nombrará como (ERC-). Llamaremos EAC a la Enfermedad Arterial Coronaria.

Tabla 2. Metabolitos significativamente alterados en muestras de orina en individuos con ERC frente a individuos control e individuos con y sin EAC asociada a ERC. (* Individuos ERC con EAC asociada (ERC+), individuos con ERC sin EAC asociada (ERC-)).

METABOLITO	ERC+ *vs* Control Mann-Whitney		ERC+ *vs* ERC- Mann-Whitney		ERC- *vs* Control Mann-Whitney		Kruskal-Wallis (Test Comparación Multiple de Dunn)			
	Ratio	p-valor	Ratio	p-valor	Ratio	p-valor	p-valor	Control/ ERC+	ERC+/ ERC-	Control/ ERC-
Citrato	0.025	0.0002***	0.512	0.0350*	0.093	0.0009***	<0.0001***	***	-	*
Guanidoacetato	7.549	0.0006***	-	-	6.002	0.0001***	<0.0001***	**	-	**
Taurina	0.436	0.024*	-	-	0.593	0.0343*	0.0344*	*	-	-
Trimetilamina N-oxido (TMANO)	4.240	0.0004***	-	-	3.423	0.0002***	0.0002***	***	-	*
Hipurato	-	-	2.486	0.026*	-	-	0.0282*	-	*	-
Leucina	0.400	0.0007***	0.582	0.0360*	-	-	0.0034**	**	-	-
Homocisteína	2.440	0.0001***	2.320	0.0002***	-	-	0.0002***	***	**	-
*Myo*inositol	0.460	0.006*	-	-	-	-	0.0321*	*	-	-
Serina	0.445	0.0015**	-	-	-	-	0.0022**	**	-	-
Treonina	0.242	0.006*	0.320	0.0224*	-	-	0.0090**	**	-	-
Glutamato	2.453	0.0005***	-	-	2.110	0.0001***	0.0001***	*	-	***
α-Fenilacetilglutamina (AFAG)	1.734	0.0006***	-	-	1.836	0.0071**	0.0016**	**	-	*
5-Oxoprolina	0.144	0.0002***	-	-	0.166	0.0001***	<0.0001***	***	-	***

En la tabla 1 se muestran los metabolitos que se analizaron para su validación. De los 29 metabolitos potencialmente significativos en la fase de descubrimiento, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en 7 para la ERC y 4 para la EAC en ERC. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Entre los 7 estadísticamente significativos para ERC (comparación de ERC- frente a Control), se encuentran: 5-Oxoprolina, Glutamato, Guanidoacetato, Trimetilamina-N-

oxido (TMANO), Taurina, Citrato y α-Fenilacetilglutamina (AFAG). Respecto a los 4 asociados a EAC en ERC se encuentran: Homocisteína, Leucina, Treonina y Citrato. Tanto 5-Oxoprolina, como Glutamato, TMANO, Guanidoacetato y Citrato tienen una fuerte significación estadística según el test no paramétrico Mann-Whitney realizado cuando comparamos el grupo de ERC (ERC sin EAC asociada) con el grupo control. Si nos fijamos dentro de la tabla 2 en la columna donde se compara por el mismo test el grupo con ERC+ (ERC con EAC asociada) con ERC, observamos que ninguno de los anteriores, con excepción de Citrato, tiene significación. Esto es importante y nos indica que están asociados a la ERC sin que otra variable como la EAC afecte. De modo similar puede observarse que Homocisteína, Treonina y Leucina no muestran significación entre ERC sin EAC asociada y el grupo de individuos sanos. Hipurato muestra significación entre ERC con EAC asociada y sin ella, pero no vamos a considerarlo por no dar significación entre ERC+ y el grupo control (tabla 2). Los cambios producidos, en los distintos metabolitos, se irán comentando en los siguientes apartados.

En la figura 6, se muestran los cromatogrmas de LC- MS/MS MRM para los metabolitos significativamente diferentes en ERC.

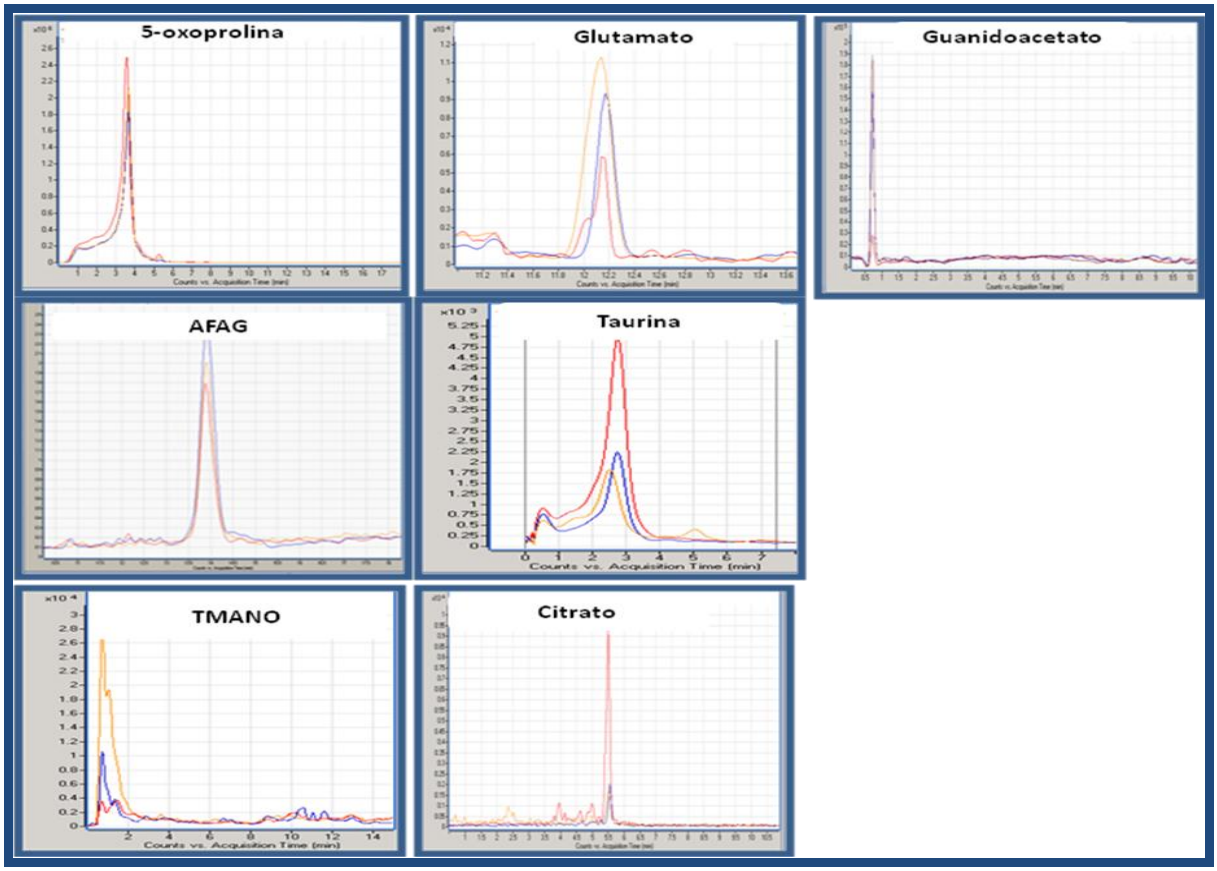

Figura 6. Cromatogramas del análisis por MRM de los metabolitos asociados a ERC en orina: Linea amarilla corresponde a ERC +, línea azul a ERC- y línea roja a individuos control. (*alfa-Fenilacetilglutamina (AFAG), Trimetilamina-N-oxido (TMANO)).

Los datos mostrados en la tabla 2, se obtienen tras normalizar con la intensidad total del cromatograma (TIC) para contrarrestar los efectos de la variabilidad derivada de la ingestión de fluidos orales. Con una asociación significativa a la ERC se encontraron el Glutamato, alfa-Fenilacetilglutamina (AFAG), Guanidoacetato y Trimetilamina-N-oxido (TMANO). Todos ellos están incrementados en individuos con ERC. Igualmente, la 5-Oxoprolina, Taurina, y Citrato, se encontraron en concentraciones relativas más bajas en respuesta a la ERC. En la figura 7 podemos observar gráficamente lo datos de lo descrito anteriormente.

Las gráficas donde se muestren datos de orina estarán dentro de un cuadrado de color azul.

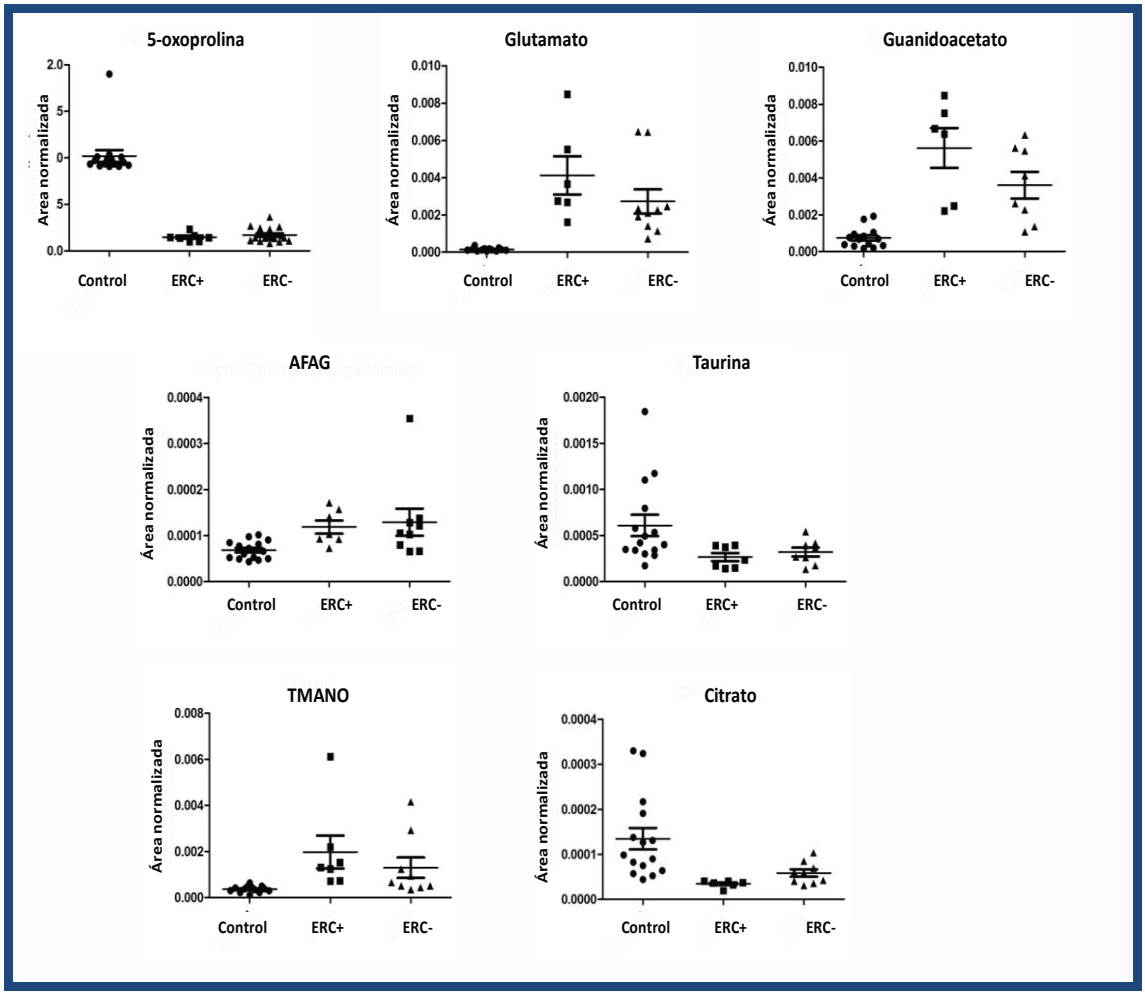

Figura 7. Panel de 7 metabolitos correspondientes a muestra de orina de individuos con ERC. Las gráficas corresponden a los datos obtenidos por MRM: control (individuos sanos), ERC+ (individuos con EAC asociada a ERC) y ERC- (individuos sin EAC asociada a ERC). (*alfa-fenilacetilglutamina (AFAG), Trimetilamina-N-oxido (TMANO)).

En la figura 8 se muestran las variaciones encontradas para 4 metabolitos significativamente alterados en individuos con EAC asociada a ERC. Se observan variaciones en Homocisteína, que se encuentra incrementada en individuos con EAC en ERC, mientras que Leucina, Treonina y Citrato presentan niveles disminuidos cuando la EAC está asociada a ERC.

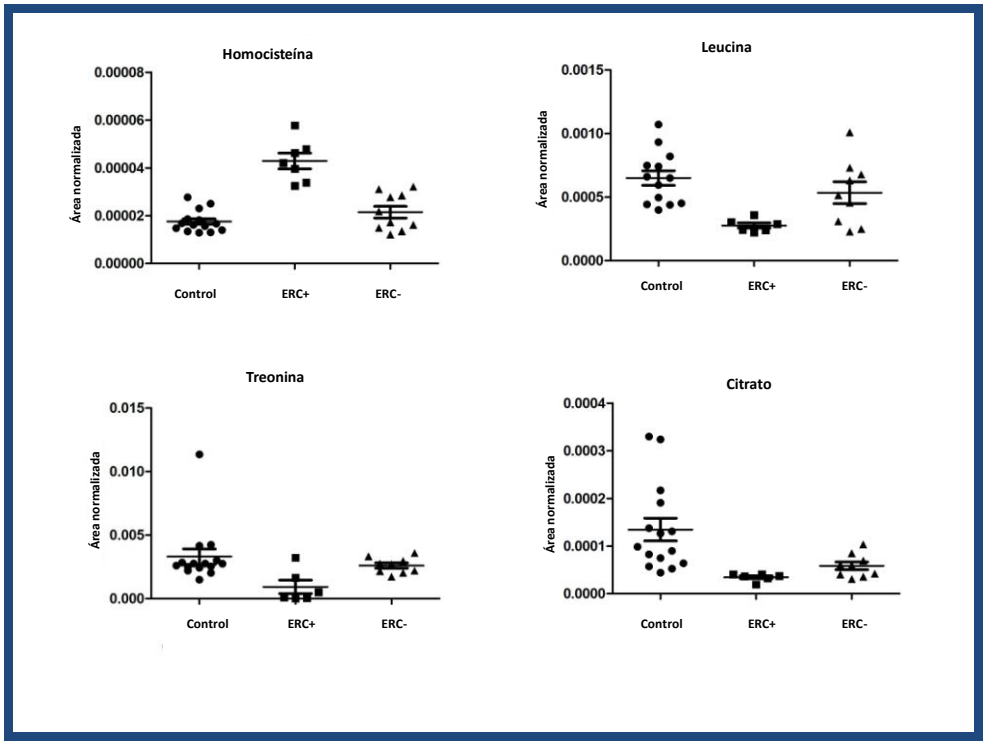

Figura 8. Panel de 4 metabolitos correspondientes a las muestras de orina de individuos con EAC asociada a ERC. Las gráficas corresponden a los datos obtenidos por MRM: control (individuos sanos), ERC+ (individuos con EAC asociada a ERC) y ERC- (individuos sin EAC asociada a ERC).

En la figura 9, se muestran los cromatogramas de LC- MS/MS MRM para los metabolitos significativamente diferentes en individuos con EAC asociada a ERC.

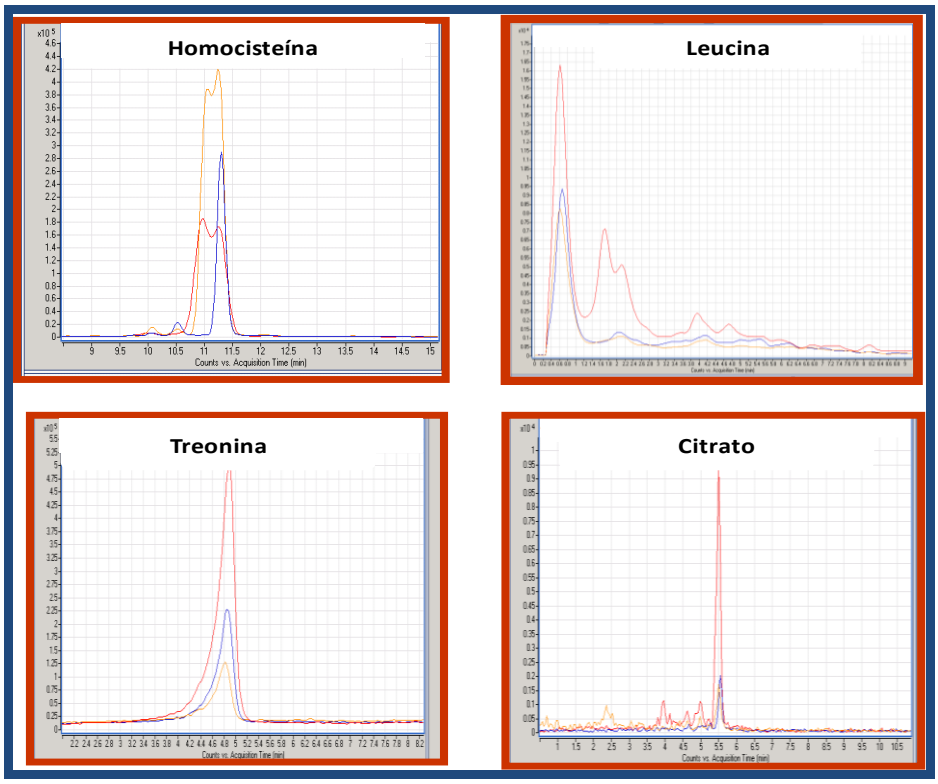

Figura 9. Cromatogramas del análisis por MRM de los metabolitos correspondientes a EAC asociada a ERC en orina: Línea amarilla corresponde a ERC +, línea azul a ERC- y línea roja a individuos control.

Adicionalmente, la orina de 14 nuevos individuos fue analizada en un estudio ciego por ^{1}H RMN y los datos fueron analizados nuevamente por el programa estadístico Amix, obteniéndose un nuevo PCA, que se muestra en la figura10. En este estudio confirmamos las diferencias encontradas entre grupos. De los 7 nuevos individuos con ERC, 6 fueron perfectamente agrupados (86% de sensibilidad). De 3 individuos con EAC asociada a ERC, 3 fueron agrupados en el área cardiovascular (100% de sensibilidad). De los 7 individuos sanos, 6 fueron localizados en el área de los controles (86% de especificidad).

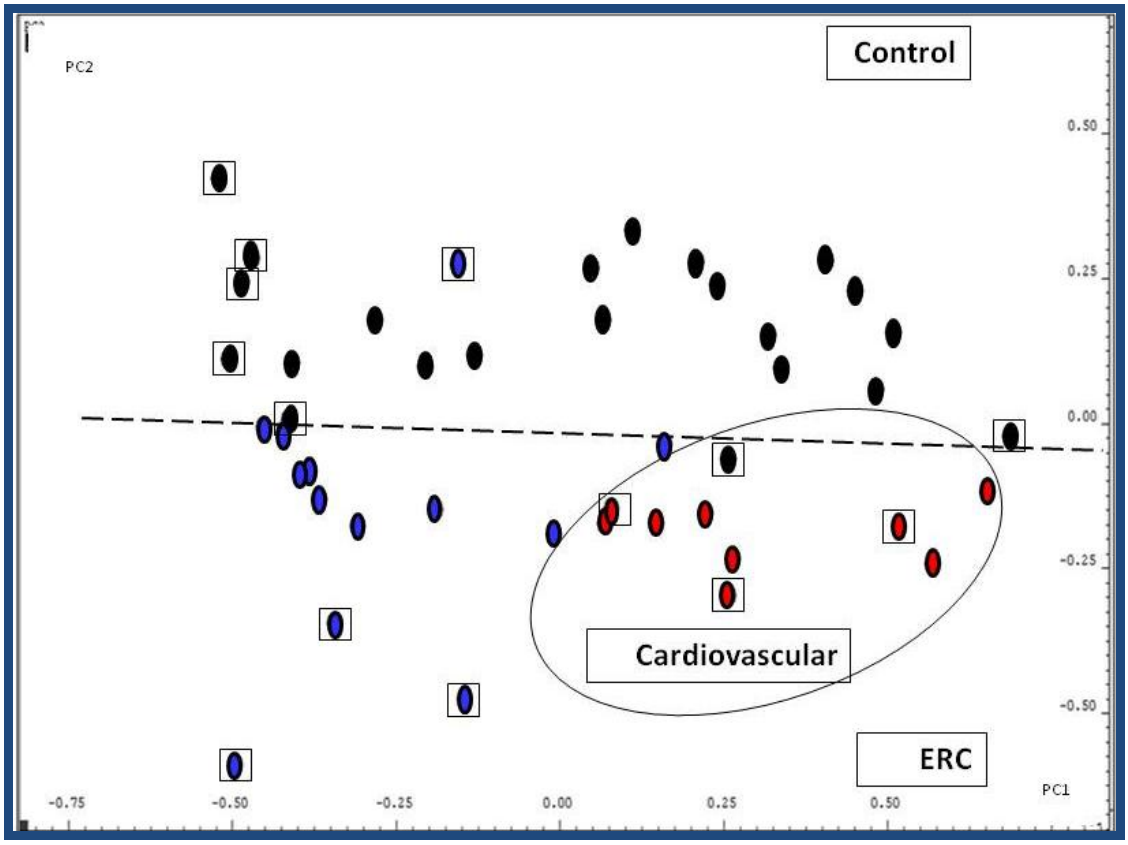

Figura10. Análisis por PCA en muestras de orina donde se muestran los datos obtenidos de 14 nuevos individuos. En la gráfica se muestran en azul ERC-, en rojo ERC+ y en negro los individuos control. En un recuadro se encuentran

1.3. **Estudio de las alteraciones del metaboloma en las muestras de orina en individuos en estadios iniciales de la Enfermedad Renal Crónica.**

Tras observar los datos obtenidos en pacientes con ERC establecida (IV-V), se realizó un estudio con individuos en estadios iniciales (estadios I y II). Tras realizar un análisis por cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas por MRM, siguiendo la metodología descrita anteriormente para el estudio de validación, se observó que existe una alteración en el mismo sentido que la observada en los individuos con nefropatía avanzada. Una nota importante es que estos metabolitos diferenciales no se asocian a la presencia de Diabetes Mellitus ya que todos los individuos eran no diabéticos. La Diabetes Mellitus presenta por la propia etiología de la enfermedad, grandes alteraciones metabólicas. Por esas alteraciones que pueden llevar a confundir o enmascarar resultados, se optó por estudiar únicamente a individuos no diabéticos.

Se analizaron las muestras de orina de 47 individuos con ERC inicial sin diabetes asociada y 47 individuos sanos por la metodología anterior.

En la figura 11, se muestran los resultados del estudio realizado en los estadios iniciales de la ERC frente a individuos sanos. Se observa como 5-Oxorolina, Citrato y Taurina, tienen disminuidos sus niveles respecto a los individuos sanos y Glutamato, Guanidoacetato, AFAG y TMANO encuentran incrementados sus niveles respecto al grupo de individuos sanos. Todos ellos con significación estadística, salvo la Taurina, como lo encontrado en ERC cuando ya está establecida, es decir, en los estadios más avanzados de la enfermedad renal. En el caso de la Taurina, sólo podemos observar una tendencia a disminuir sus niveles en la ERC inicial pero sin llegar a ser significativo. Respecto a Guanidoacetato si sorprende la mayor significación estadística respecto a la nefropatía avanzada.

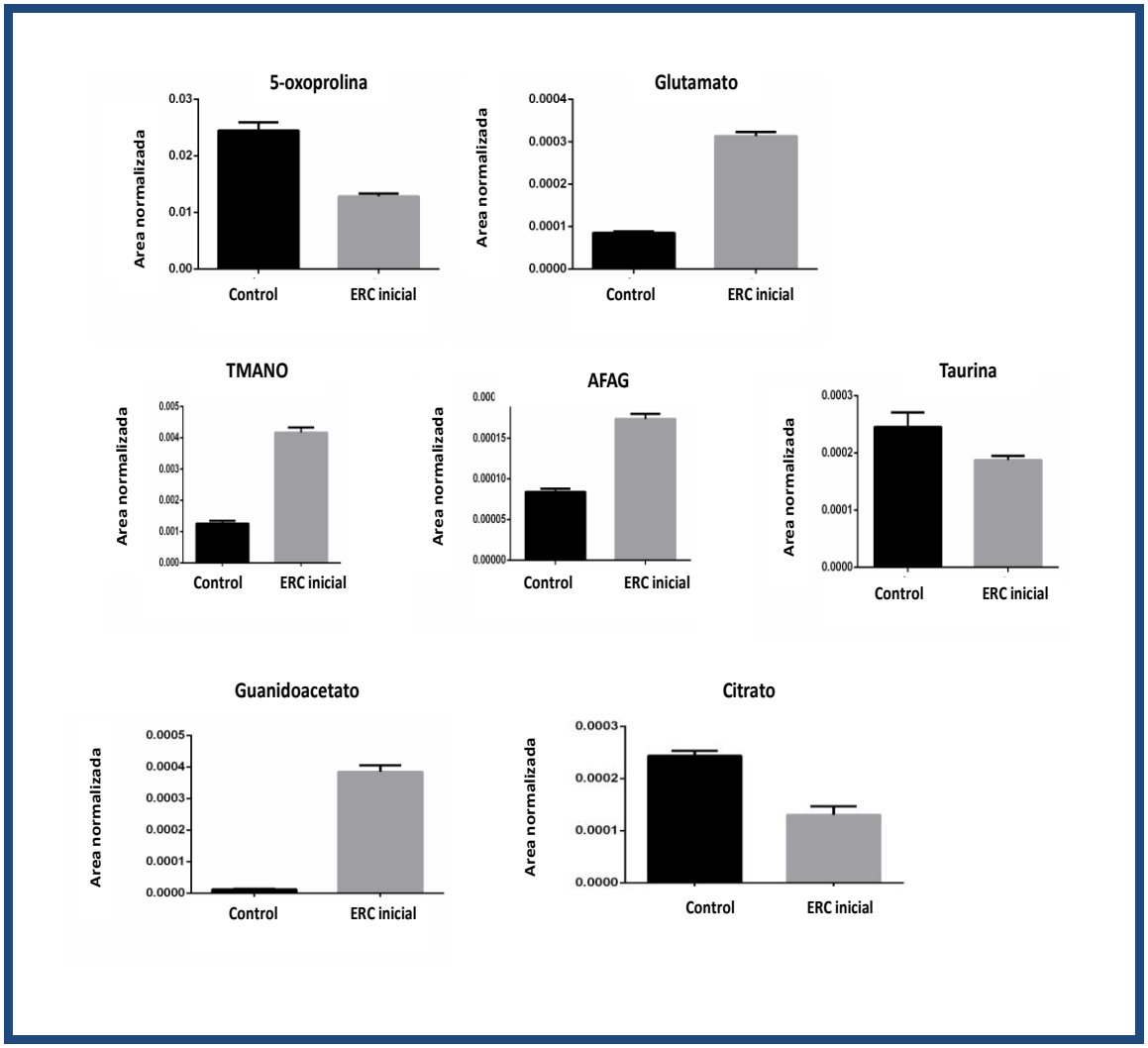

Figura 11. Análisis, de los 7 metabolitos alterados en ERC avanzada, correspondiente a los estadios iniciales de ERC en muestras de orina. Las gráficas corresponden a los datos obtenidos por MRM: control (individuos sanos), y ERC- (individuos sin EAC asociada a ERC). (*alfa-Fenilacetilglutamina (AFAG), Trimetilamina-N-oxido (TMANO)). Test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Tabla 3. Metabolitos significativamente alterados en muestras de orina en individuos con ERC inicial (ERCi) frente a individuos control.

METABOLITO	ERCi *vs* Control	
	Ratio	p-valor
Citrato	0.53	<0.0001****
Guanidoacetato	32.08	<0.0001****
Taurina	-	-
Trimetilamina-N-oxido (TMANO)	3.33	<0.0001****
Glutamato	3.69	<0.0001****
α-Fenilacetilglutamina (AFAG)	2.06	<0.0001****
5-Oxoprolina	0.52	<0.0001****
Glutation	-	-

Como se comentará más adelante tanto 5-Oxoprolina como el Glutamato son intermediarios del ciclo del catabolismo del Glutatión vía 5-Oxoprolina. Así, adicionalmente se midieron los niveles de Glutatión al observar la variación de éstos.

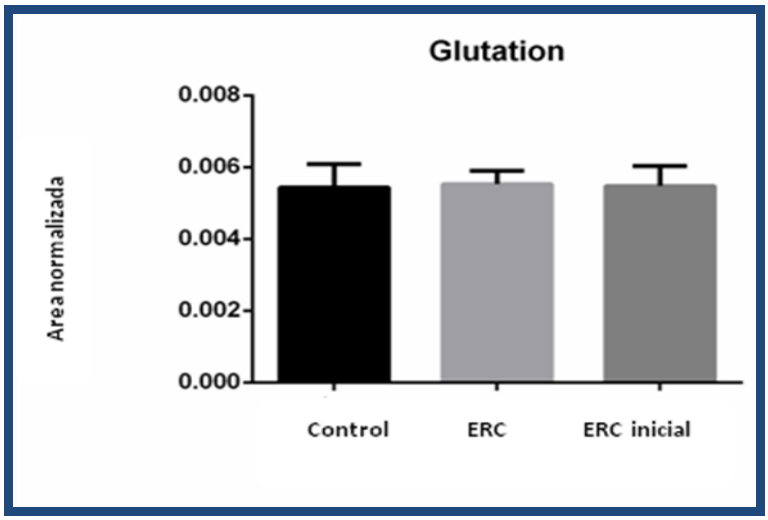

Figura 12. Gráfica de los niveles del Glutatión en muestras de orina, correspondientes a los datos obtenidos por MRM: control (individuos sanos), ERC (individuos sin EAC asociada a ERC en estadios avanzados) y ERC inicial (individuos sin EAC asociada a ERC en estadios iniciales). Test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Curiosamente parece que no existe variación alguna. Tampoco se observó en la fase de descubrimiento en los estudios de RMN.

De modo similar, se realizó un nuevo estudio para comprobar si los metabolitos alterados en muestras de orina en individuos con EAC asociada a ERC avanzada, ya aparecían en las primeras fases de la ERC. Para ello se analizaron 7 individuos con EAC en ERC en estadios tempranos (I-II) y 8 individuos con ERC en estadios tempranos (I-II) sin EAC asociada. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13 y en la tabla 4.

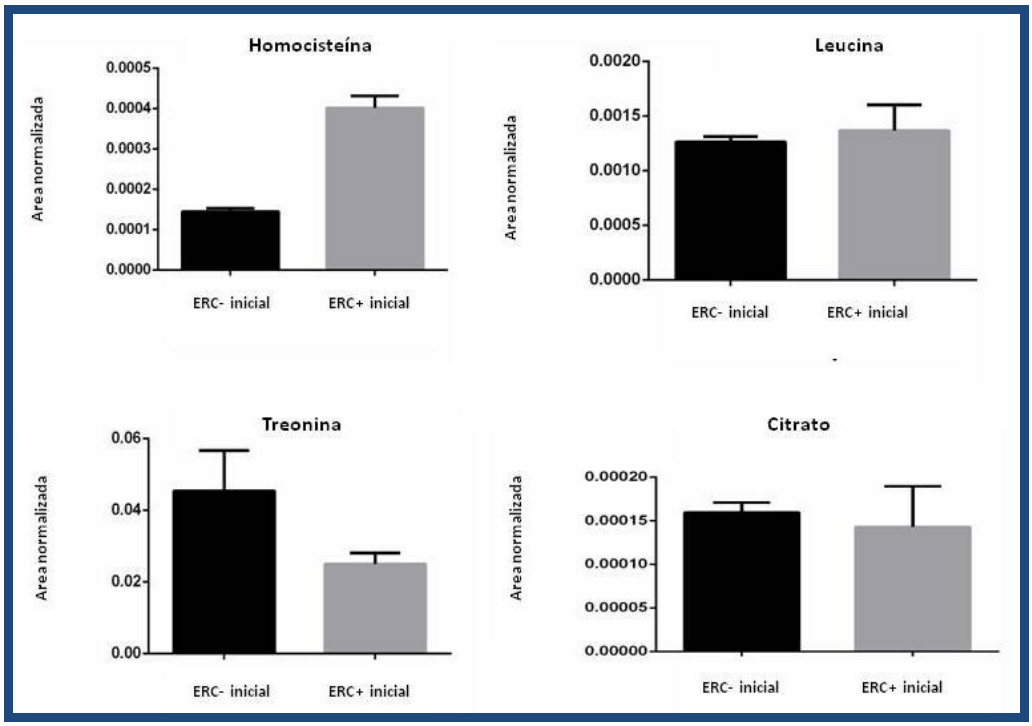

Figura 13. Análisis, de los 4 metabolitos alterados en EAC asociada a ERC avanzada, correspondientes a los estadios iniciales de EAC asociada a ERC en muestras de orina. Las gráficas corresponden a los datos obtenidos por MRM: ERC inicial+ (individuos con EAC asociada a ERC inicial) y ERC inicial- (individuos sin EAC asociada en ERC inicial). Test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Tabla 4. Metabolitos significativamente alterados en muestras de orina en individuos con EAC asociada a ERC en estadios iniciales frente a individuos sin EAC asociada a ERC en estadios iniciales.

METABOLITO	ERCi+ *vs* ERCi-	
	Ratio	p-valor
Citrato	-	-
Homocisteína	2.78	0.0006***
Treonina	-	-
Leucina	-	-

De los cuatro, 3 de ellos no son estadísticamente significativos. Sin embargo, sí podemos observar un aumento significativo de los niveles de Homocisteína en ERC con EAC asociada, coincidiendo con lo observado en estadios avanzados. Treonina cumple tendencia, aunque no de forma significativa.

1.4. Estudio en muestras de plasma de los metabolitos asociados a ERC en muestras de orina.

Una vez analizados los cambios a nivel de metaboloma en orina de individuos con ERC, es interesante ver lo que puede estar ocurriendo en el plasma.

Se estudiaron los metabolitos que en orina se han encontrado asociados al fracaso renal (tabla 2). En este caso, se analizaron directamente por MRM los metabolitos concretos que resultaron estadísticamente significativos en orina cuando comparamos ERC con el grupo de individuos control (5-Oxoprolina, Glutamato, TMANO, AFAG, Citrato, Guanidoacetato y Taurina) y los metabolitos que resultaron estadísticamente significativos en orina cuando comparamos ERC con y sin EAC documentada (Homocisteína, Citrato, Leucina y Treonina). Aún teniendo en cuenta las diferencias de matriz, que puede afectar a la ionización, las señales fueron cuantificables.

El estudio se realizó para los metabolitos que dieron significación en ERC en sí misma (5-Oxoprolina, Glutamato, TMANO, AFAG, Citrato, Guanidoacetato y Taurina), comparando individuos control, individuos con ERC en estadios avanzados e individuos

con ERC en estadios iniciales (ninguno presentaba EAC documentada). Con ello, igual que se estudió en la orina se quiso ver si había un reflejo de una posible evolución de estos pacientes dentro de la enfermedad renal a nivel de metaboloma. Se tomó el plasma de 11 individuos con ERC avanzada (estadios IV-V), 37con ERC inicial (estadios I-II) y 25 individuos sanos (tabla 2 en Material y Métodos).

La figura 14 representa las gráficas con los datos obtenidos en casos con ERC avanzada, casos con ERC inicial y controles (tabla 5). En este caso sólo están representados los metabolitos estadísticamente significativos cuando comparamos ERC con el grupo control. Estos son 5-Oxoprolina, Glutamato y Citrato. Nos sorprende encontrarnos la tendencia justo contraria a la obtenida en la orina, en los casos de 5-Oxoprolina, Glutamato. AFAG, no representada cumple también la tendencia contraria a la que cumplía en las muestras de orina, sin llegar a ser significativa en plasma. Observamos los niveles de 5-Oxoprolina elevados respecto a los individuos sanos, y los niveles de Glutamato disminuidos respecto a éstos.

Otro metabolito con diferencias estadísticamente significativas es el Citrato, cuyos niveles se encuentran disminuidos en ERC avanzada, igual que en el caso de la orina visto anteriormente, aunque no se observan variaciones en estadios iniciales. Sin embargo, respecto a la orina, éste tiene menor significación pero el ratio es mayor en plasma.

Las gráficas donde se muestren datos de plasma estarán dentro de un cuadrado de color verde.

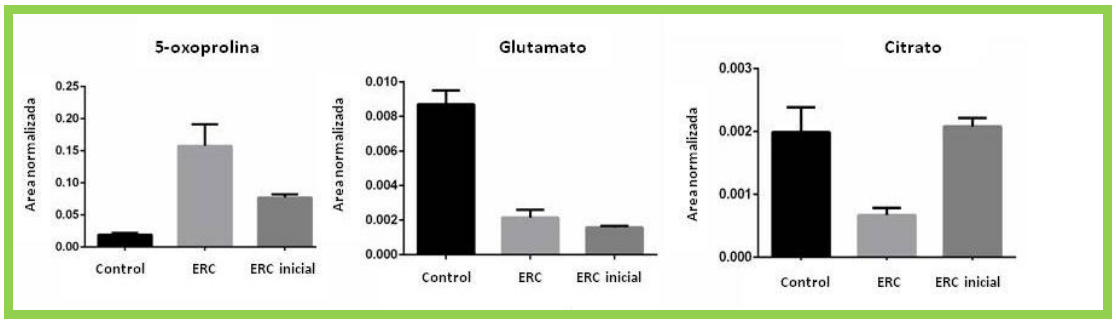

Figura 14. Metabolitos medidos en muestras de plasma correspondientes a individuos con ERC. Las gráficas corresponden a los datos obtenidos por MRM: control (individuos sanos), ERC (individuos ERC en estadios avanzados) y ERC inicial (individuos ERC en estadios iniciales). Test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Si comparamos los individuos control con los primeros estadios de la ERC, vemos que existe una variación significativa tanto en 5-Oxoprolina como en Glutamato. En 5-Oxoprolina se puede apreciar un aumento de sus niveles ya en los primeros estadios de ERC y continúa aumentando según avanza la enfermedad. En cuanto al Glutamato

parece que los niveles desciendan bruscamente ya en los inicios de la enfermedad sin haber variación significativa respecto a los estadios avanzados. Tampoco existe una variación significativa de Citrato en estadios iniciales aunque si en estadios avanzados. El resto de los metabolitos, Taurina, TMANO, AFAG y Guanidoacetato, no resultaron estadísticamente significativos ni en ERC establecida, ni en sus primeros estadios.

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados del estudio estadístico. El resultado de los metabolitos en ERC avanzada y ERC inicial frente a individuos control en muestras de plasma (tabla 5) y el resultado de metabolitos en ERC avanzada e inicial con y sin EAC asociada en muestras de plasma (tabla 6).

Tabla 5. Metabolitos significativamente alterados en muestras de plasma en individuos con ERC avanzada y ERC inicial frente a individuos control.

METABOLITO	ERCavanzada *vs* ERC inicial		ERC inicial *vs* Control		ERC avanzada *vs* Control	
	Ratio	p-valor	Ratio	p-valor	Ratio	p-valor
Citrato	-	-	-	-	0.21	0.0016**
Guanidoacetato	-	-	-	-	-	-
Taurina	-	-	-	-	-	-
Trimetilamina-N-oxido (TMANO)	-	-	-	-	-	-
Glutamato	-	-	0.73	0.0001***	0.30	0.0007***
α-Fenilacetilglutamina (AFAG)	-	-	-	-	-	-
5-Oxoprolina	-	-	1.27	0.0146*	9.38	0.0007***

Tabla 6. Metabolitos significativamente alterados en muestras de plasma en individuos con EAC asociada a ERC en estadios avanzados e iniciales. Metabolitos significativamente alterados en muestras de plasma en individuos con ERC avanzado e inicial sin EAC asociada frente a individuos control. (* ERC con EAC asociada (ERC+) y ERC sin EAC asociada (ERC-)).

METABOLITO	**ERCinicial + *vs* ERCinicial -**		**ERCi- *vs* Control**	
	Ratio	**p-valor**	**Ratio**	**p-valor**
Citrato	0.74	0.0283*	-	-
Leucina	-	-	-	-
Homocisteina	-	-	0.52	0.003***
Treonina	0.77	0.0081**	1.70	0.0081**
METABOLITO	**ERCavanzada+ *vs* ERCavanzada -**		**ERCavanzada- *vs* Control**	
	Ratio	**p-valor**	**Ratio**	**p-valor**
Citrato	-	-	0.21	0.0016**
Leucina	0.48	0.0079**	1.13	0.0013**
Homocisteina	0.31	0.0079**	0.40	0.028*
Treonina	-	-	7.43	0.0007***

Una vez estudiado el reflejo de la ERC en el metaboloma del plasma, se estudió la influencia de EAC asociada del mismo modo que se hizo en orina, con los metabolitos que resultaron significativos alterados en ERC en EAC. Estos son Homocisteína, Treonina, Leucina y Citrato. Para ello primero se compararon un grupo de 10 individuos sanos, 6 individuos con EAC en ERC avanzada y 5 individuos con ERC avanzada sin patología vascular asociada (tabla 2 en Material y Métodos).

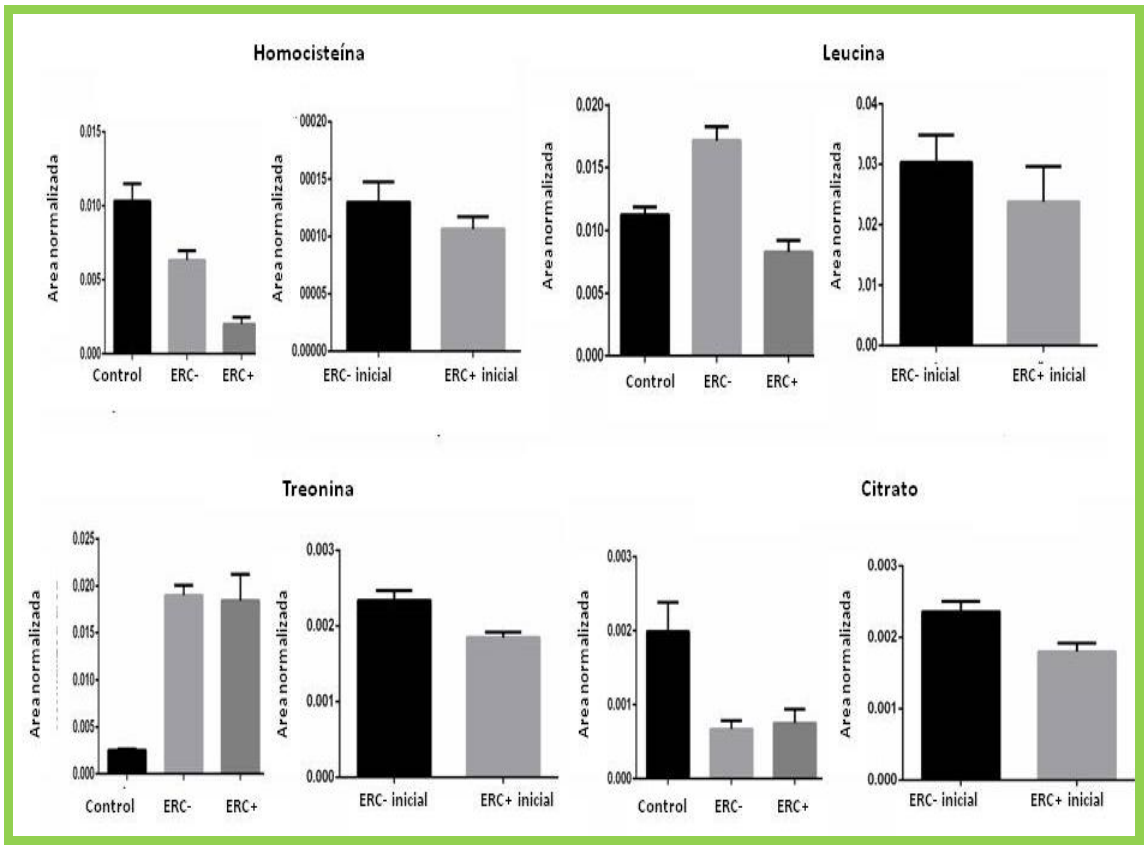

Figura 15. Panel de 4 metabolitos analizados en muestras de plasma de individuos con ERC avanzada e inicial y con y sin EAC asociada. Las gráficas corresponden a los datos obtenidos por MRM. (*ERC + (individuos con EAC asociada a ERC avanzada), ERC- (individuos sin EAC asociada a ERC avanzada) e individuos control. ERC inicial+ (individuos con EAC asociada a ERC inicial) y ERC inicial- (individuos sin EAC asociada a ERC inicial)). Test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Comparando individuos con ERC con y sin EAC documentada todos ellos en avanzado estado de la enfermedad renal (tabla 5), podemos observar una alteración de los niveles de Homocisteina y Leucina. Los niveles de estos dos metabolitos tienden a estar disminuidos cuando los individuos con ERC presentan EAC, respecto a los individuos que no la presentan. Si comparamos con lo encontrado en orina, observamos que la Homocisteína presenta un comportamiento contrario en las muestras de plasma a lo encontrado en las muestras de orina. En orina los niveles de ERC con EAC se encontraron elevados frente al grupo de individuos sanos y en plasma, en Homocisteína

la existencia de EAC supone un agravamiento en la alteración propia observada en ERC. Por el contrario los niveles en ERC con EAC de Leucina en orina y plasma presentan el mismo comportamiento. Treonina y Citrato no presentan diferencias entre estos dos grupos.

Cuando comparamos los niveles observados en individuos sanos con individuos con ERC presentan una disminución en los niveles de Homocisteína y Citrato, también se observa un aumento en los niveles de Treonina. En orina no se aprecian diferencias significativas entre estos dos grupos, excepto en Citrato que coincide con lo descrito en orina. Estos datos muestran nuevas alteraciones en ERC que no se observaban en orina.

2. ESTUDIO DEL METABOLOMA DEL TEJIDO EN UN MODELO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA MEDIANTE ^{1}HRMAS.

Una vez estudiado el metaboloma en orina y plasma humano en respuesta al daño renal en ERC, estudiamos a nivel molecular lo que ocurría en el tejido del riñón. Se eligió un modelo temprano de nefropatía diabética (8 semanas). Contamos con 6 ratas sanas (control) y 5 ratas con nefropatía diabética. Este modelo ha sido descrito y caracterizado en trabajos previos en nuestro laboratorio (figura16). (Tesis doctoral Irene Zubiri UCM Mayo 2013).

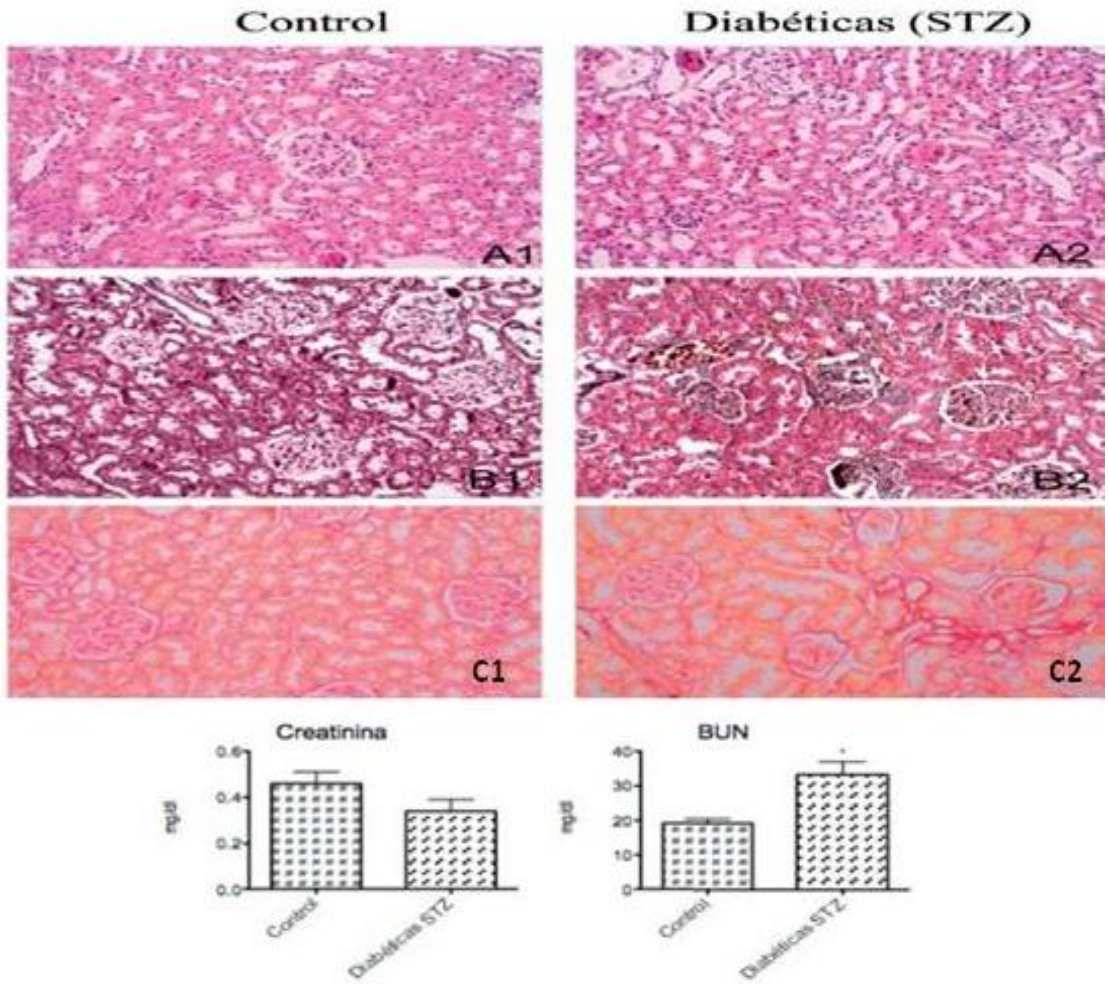

Figura16. Imágenes representativas de microscopía óptica de la morfología del tejido del riñón de ratas sanas (A1, B1, C1) y diabéticas (A2, B2, C2). Aumento 200X. Se evaluó el daño renal empleando la tinción de hematoxilina eosina (A1, A2) y tricrómico de Masson (B1, B2). La tinción de rojo sirio (C1, C2) se utilizó para evaluar la fibrosis intersticial. La analítica de la sangre mostró diferencias significativas para BUN *p<0,0244, en los niveles de derivados nitrogenados de la urea BUN entre grupos. Test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Se compararon los tejidos individuales de los dos grupos, con la misma estrategia de trabajo que en el apartado anterior pero empleando la metodología de RMN con el llamado el ángulo mágico para poder estudiar el tejido directamente y sin tratamiento previo a nivel molecular.

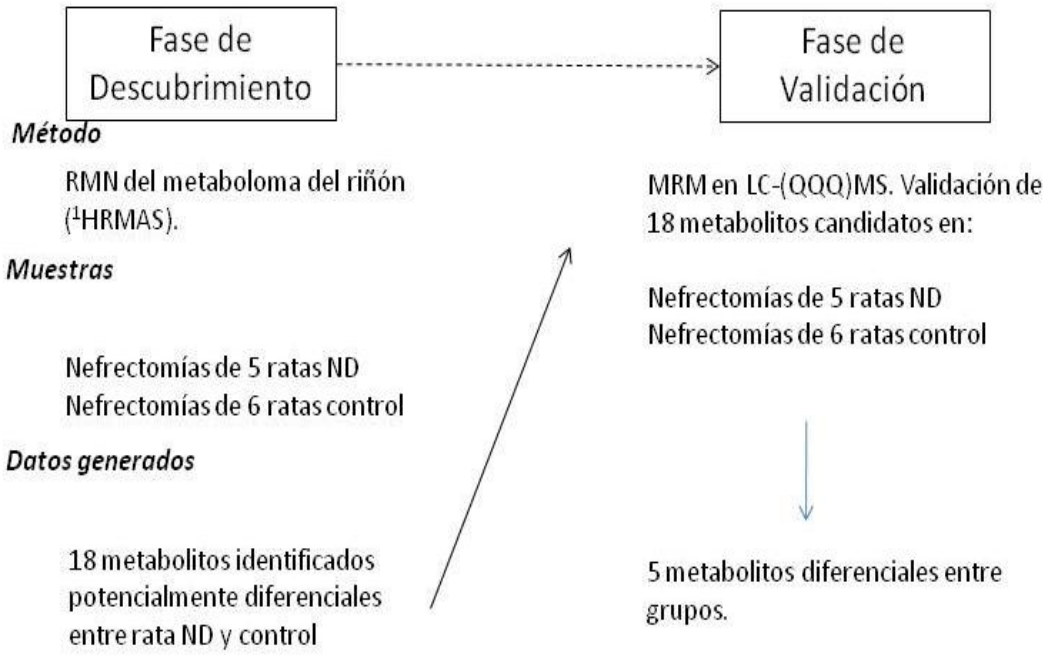

Figura 17. Esquema de trabajo donde se describen los pasos a seguir en el análisis del tejido renal en un modelo temprano de nefropatía diabética en rata. A la izquierda está descrita brevemente la fase de descubrimiento con la tecnología HRMAS, las muestras utilizadas y los datos generados. A la derecha se describe la fase de validación, donde se utilizó la metodología MRM.

2.1. Fase de descubrimiento: Análisis del tejido renal en un modelo temprano de nefropatía diabética en rata mediante ^{1}HRMAS.

Está técnica, ^{1}HRMAS, nos permite estudiar los tejidos intactos a nivel molecular. Es una técnica no destructiva que además evita los errores causados por la manipulación. Al igual que lo descrito en el estudio de los metabolitos asociados a ERC en orina, inicialmente se realizó una fase de descubrimiento mediante ^{1}HRMAS. El tejido se cortó de forma transversal y homogénea para minimizar la variabilidad. Después de la adquisición de los espectros y su correspondiente procesado, podemos ver las primeras diferencias, en primera dimensión, del daño renal producido por la nefropatía diabética en ratas frente a un grupo de ratas control (figura 18).

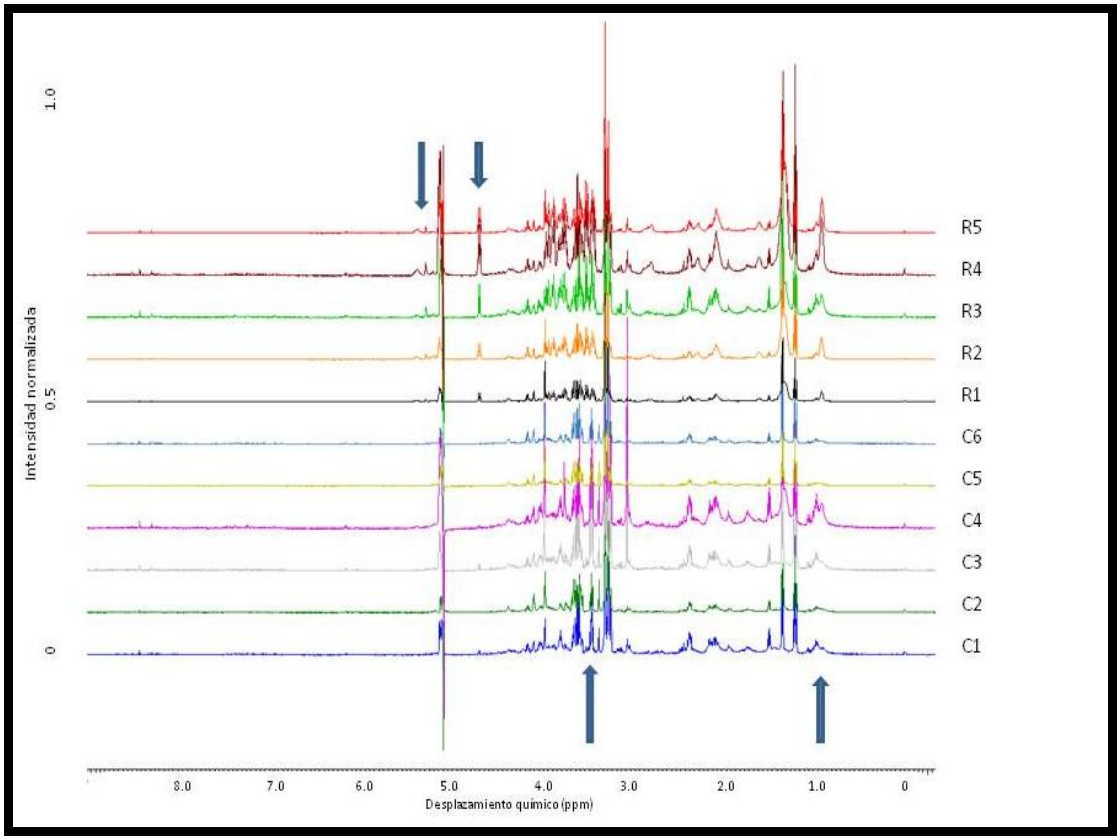

Figura 18. Espectros ^{1}HRMN con ángulo mágico (^{1}HRMAS). En la parte inferior están situados los espectros individuales de los controles (C1, C2, C3, C4, C5 y C6) y en la parte superior los espectros individuales de las ratas con nefropatía diabética ND (R1, R2, R3, R4 y R5).

Podemos observar por ejemplo, las señales de los H del carbono anomérico de la glucosa a δ=4,60 ppm, aumentadas en tejido patológico. Podemos ver a 5,25-5,35 ppm desplazamientos que podrían corresponder al colesterol, localizadas también en el riñón dañado. A 3,32 ppm un singlete que sólo vemos en controles, podría ser la fosfatidilcolina (PDC). Las señales de los carbonos alifáticos de las cadenas (-CH_2 -) de los lípidos no parecen interferir de manera significativa, de hecho no hizo falta realizar ninguna secuencia, como "CPMG", en la adquisición de los espectros para atenuar las bandas que pudieran interferir en la interpretación de los espectros. Sorprende que la señal de creatina a 3,02 ppm y a 3,92 ppm sea baja prácticamente en todas las muestras, ya que en estudios previos descritos en tejido renal tiene bastante intensidad (101-103).

A δ= 3,50 ppm y a 5,30 ppm aparecen señales sólo en las riñones dañados. Estas señales, las cuales aparecen solapadas con las señales de los azúcares, corresponden a la estreptozotocina que se inyectó a las ratas para inducir la diabetes.

También podemos ver a 1,18 ppm y a 3,66 ppm señales de EtOH, usado para limpiar el bisturí antes de llevar a cabo el corte del riñón. Afortunadamente no interfieren en el análisis al no tener una señal fuerte. Otra señal que podría interferir en el análisis es la

señal a 1,92 ppm del acetato. Este producto es fruto de la degradación del tejido, no es muy grande pero se aprecia ya una señal de descomposición.

En el análisis estadístico por PCA (figura 19), igual que en el apartado anterior, se observa una clara separación de grupos a lo largo de la componente 1. Parece que en el grupo del tejido patológico hay más dispersión entre muestras individuales, pero se mantiene en su área. Es importante el hecho de que no existan muestras de un grupo en el área del otro. Todas las muestras individuales están localizadas en el área de su grupo, a la izquierda en la figura los controles y a la derecha los patológicos (figura 19), lo cual se ve favorecido por el hecho de que sea un modelo animal controlado.

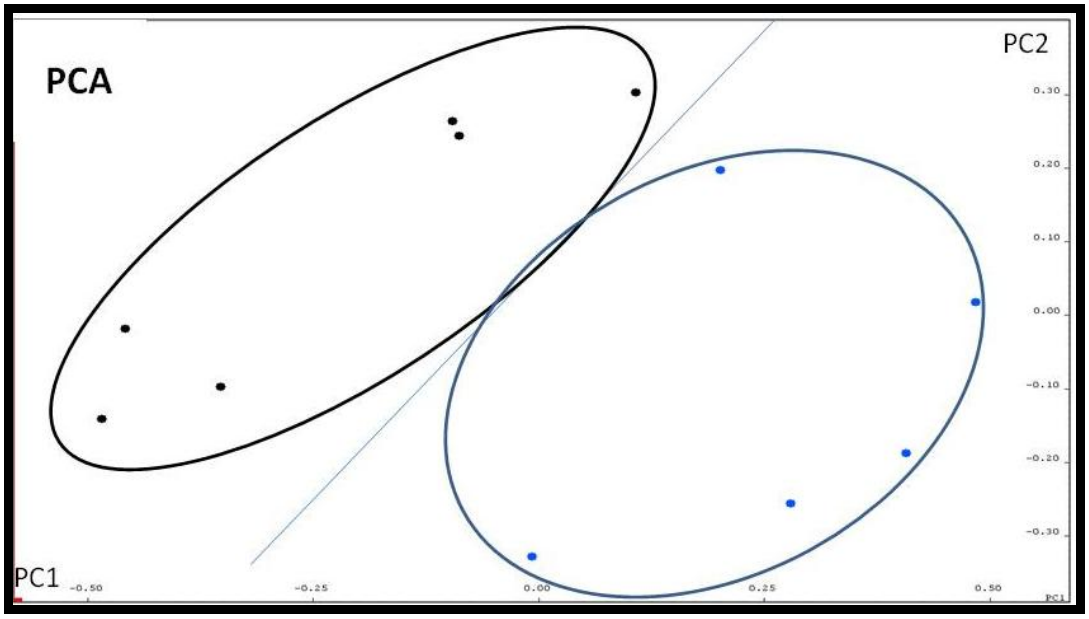

Figura 19.Estudio multivariante por PCA. Las dos áreas de mantienen claras. El área de la izquierda corresponde a los controles (en negro) y el área de la derecha a las ratas con ND (en azul).

Tal y como se realizó en los experimentos del análisis de orina descritos en el apartado anterior, con los diagramas de carga “loading plots”, que marcan las regiones responsables de la separación de estos dos grupos control-patológico en el PCA, obtenemos información que nos permite identificar los metabolitos, posteriormente en los experimentos en segunda dimensión.

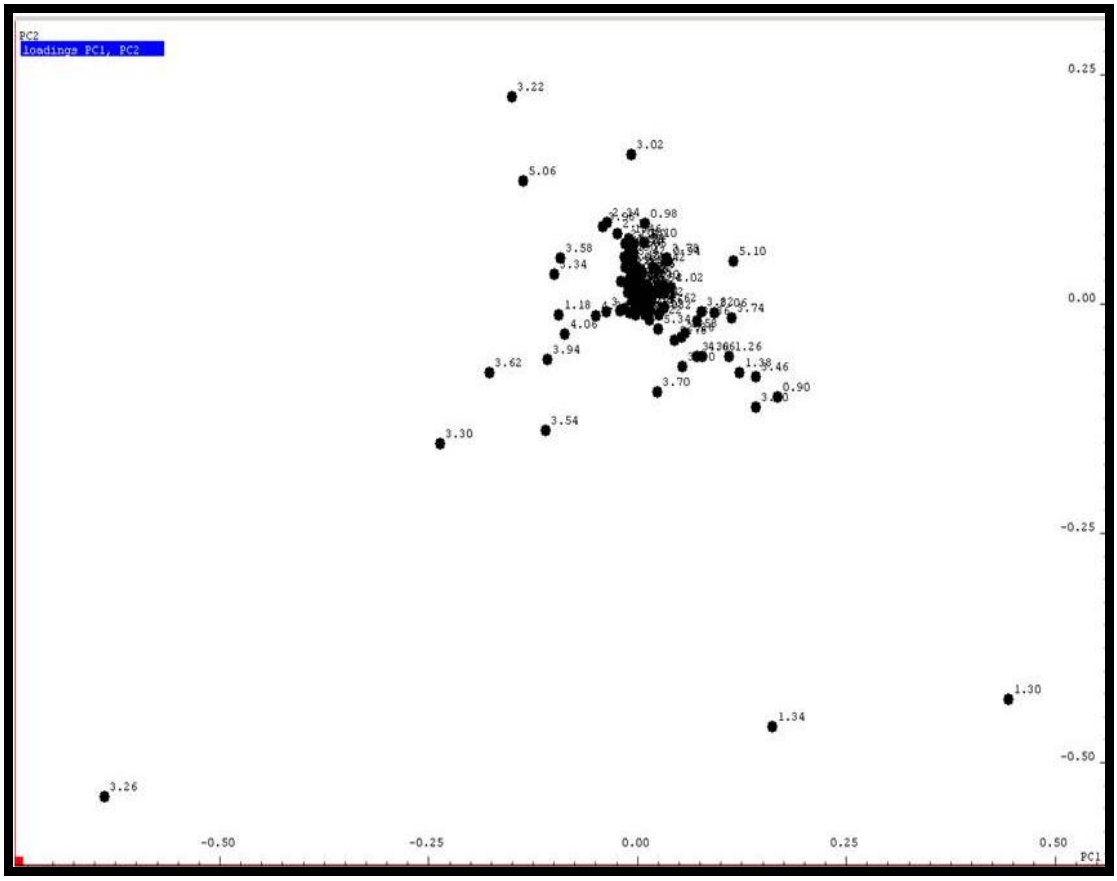

Figura 20. Se representan los “loading plots” o contribuciones de carga que marcan las regiones responsables de la separación de estos dos grupos control-patológico en el PCA. Estudio realizado mediante el programa Amix (Bruker).

Podemos certificar las observaciones hechas en los experimentos en primera dimensión, una vez realizados y completamente identificados los metabolitos con los experimentos en segunda dimensión 2D RMN. En este estudio se realizaron los experimentos homonucleares H-H: COSY y TOCSY RMN. Ambos experimentos, fueron suficientes para la identificación de los 18 metabolitos potencialmente diferenciales entre rata ND y rata control. No se realizó en este caso ningún espectro heteronuclear por la sencilla interpretación de los espectros.

Así se pudieron identificar los metabolitos reflejados en la tabla 7.

Tabla7. Metabolitos identificados en los experimentos de ^{1}HRMAS con sus desplazamientos químicos correspondientes.

METABOLITO	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (PPM)
Betaina	3.89 (s), 3.25 (s)
Glutamato	2.04 (m), 2.11 (m), 2.34 (m), 3.74 (dd)
L-Glicina	3.55 (s)
L-Leucina	0.94 (t), 1.70 (m), 3.72 (m)
Myoinositol	3.28 (t), 3.52 (dd), 3.61 (t), 4.05 (t)
L-Fenilalanina	7.42 (m), 7.36 (m), 7.32 (d), 3.98 (dd), 3.19 (m)
Taurina	3.25(t), 3.42 (t)
Trimetillamina-N-oxido	3.25 (s)
L-Tirosina	3.02 (dd), 3.17 (dd), 3.92 (dd), 6.87 (m), 7.17 (m)
L-Valina	0.97(d), 1.02(d), 2.28(m), 3.61(d)
Glutamina	2.13(m), 2.39(m), 3.76(t)
Lactato	1.33(d)
Lisina	1.47(m), 1.70(m), 1.90(m), 3.02(t)
D-xilosa	3.21(dd), 3.31(dd), 3.42(t), 3.51(dd), 3.63(m), 3.91(dd), 4.57(d), 5.19(d)
Acetato	1.92(s)
Aldosterona	0.98(d), 1.02(m), 1.17(s), 1.21(s), 1.27(m), 1.42(m), 1.58(m), 1.77(m), 1.91(m), 1.99(dd), 2.08(m), 2.24(m), 2.37(m), 2.84(t), 3.18(ddd), 4.03(ddd), 4.43(d), 4.62(s), 4.84(s), 5.26(s), 5.62(s)
Glicerofosfocolina (GPC)	3.24(s), 3.67(dd), 3.78(m), 4.36(m)
Fosfatidilcolina (PDC)	3.32(s)

Como observamos en la tabla 7, algunos de los metabolitos que se podían prever en la primera dimensión, fueron identificados como ciertos en los experimentos 2D RMN. Uno de ellos, Fosfatidilcolina (PDC), ya en los espectros de primera dimensión podíamos decir que era significativamente diferente. Como se aprecia en la figura 18, el singlete a 3,30 ppm se distingue muy bien en tejido control, sin embargo en individuos la señal es muy pequeña. TMANO, en primera dimensión aparece solapado con la Betaina a 3,26 ppm, con lo cual ha sido necesario recurrir a la espectrometria de masas para poder diferenciarlos cuantitativamente. Glutamato y *Myo*inositol, tampoco se aprecian de forma inequívoca en 1D RMN. Aldosterona, es una molécula grande que contiene muchas señales en el espectro de 1D RMN. En algunas de las cuales, sobre todo en alto campo, sí se puede observar la diferencia entre tejido control y tejido dañado.

Estos 18 metabolitos se analizaron, tal y como se describe a continuación, mediante otra técnica analítica y así confirmar que realmente son los responsables de las variaciones.

2.2. Fase de validación: Análisis metabolómico del tejido renal en un modelo temprano de nefropatía diabética en rata mediante LCMS/MS MRM.

Para confirmar los metabolitos responsables del daño renal en este modelo temprano de nefropatía diabética en rata, se analizaron las muestras de tejido mediante LC MS/MS MRM).

De los 18 metabolitos, potencialmente significativos en la fase de descubrimiento, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en 5 metabolitos. Estos están representados en la figura 21 y su significación estadística está recogida en la tabla 8.

Las señales correspondientes a cada metabolitos se normalizaron con la intensidad total del cromatograma (TIC) para contrarrestar los efectos de la variabilidad. Se encontraron 3 metabolitos, significativamente diferenciales con niveles más bajos en el tejido patológico. Estos son Glutamato, TMANO y PDC. El caso contrario lo encontramos en Aldosterona y *Myo*inositol, que se encontraron en niveles de abundancia relativas más altos en tejido patológico (tabla 8).

Tabla8. Metabolitos significativamente alterados en tejido renal en un modelo de nefropatía diabética en rata.

METABOLITO	ND *vs* Control	
	Ratio	p-valor
Aldosterona	2.38	0.0022**
Myoinisitol	2.84	0.02*
Fosfatidilcolina (PDC)	0.29	0.0008***
Trimetilamina-N-oxido (TMANO)	0.13	0.0043**
Glutamato	0.52	0.0022**

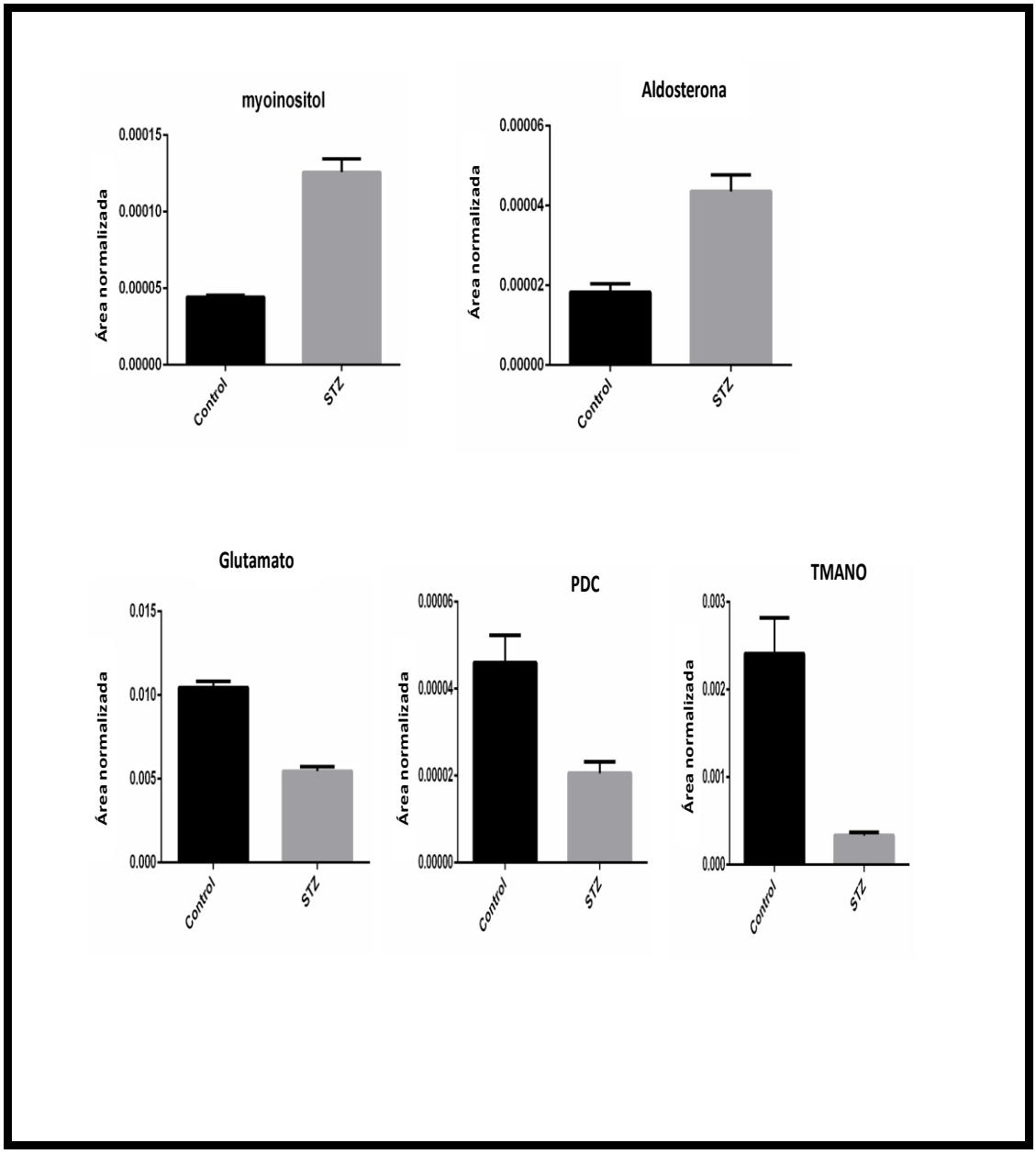

Figura 21. Panel de 5 metabolitos en tejido renal correspondientes al modelo animal de ND. Las gráficas corresponden a los datos obtenidos por MRM: control y STZ (siglas de Estreptozotocina). (*TMANO (Trimetilamina-N-oxido) y PDC (siglas en inglés de fosofatidilcolina)). Test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Destacamos que el resto de los metabolitos estudiados no son significativos porque aparecen al mismo nivel entre tejido control y tejido patológico, teniendo así la misma abundancia en los dos grupos.

Dos de los metabolitos encontrados con niveles alterados en riñón se encontraron alterados en la orina y en el plasma humano de individuos con ERC frente a individuos sanos (control). La presencia de Glutamato se encuentra disminuida en el tejido dañado respecto al sano. En plasma humano, cuando comparamos plasma de individuos sanos

con plasma de individuos con ERC, encontramos la misma tendencia, teniendo así, los niveles más bajos en los individuos con ERC. Sin embargo, en la orina humana encontramos la tendencia contraria. TMANO, no resultó diferencial en plasma humano, pero sí en orina, donde sigue la misma tendencia que en el tejido, aumentando sus niveles en patológico.

3. ESTUDIO DE LAS ENZIMAS DEL CICLO DEL GLUTATIÓN VÍA 5-OXOPROLINA EN MUESTRAS DE ORINA Y PLASMA.

La alteración de los metabolitos Glutamato y 5-Oxoprolina en el estudio anterior (apartado 1) en orina y plasma humano en ERC y en el estudio de tejido renal de rata con nefropatía diabética (apartado 2), nos llevó a investigar otros componentes del ciclo del glutatión vía 5-Oxoprolina, en él participan ambos metabolitos. Así se hipotetizó que se podía reflejar esta alteración también en las enzimas. Así se estudiaron 5-Oxoprolinasa, enzima que controla el paso de 5-Oxoprolina al Gutamato, la enzima gamma-Glutamilciclotransferasa que da lugar a 5-Oxoprolina desde dos vías: gamma-Glutamilcisteína y gamma-Glutamil-AA, y la enzima Glutamato-cisteína ligasa, que controla a la retroalimentación hasta el Glutamato desde el Glutatión. Está tiene dos subunidades, una catalítica y otra reguladora (104).

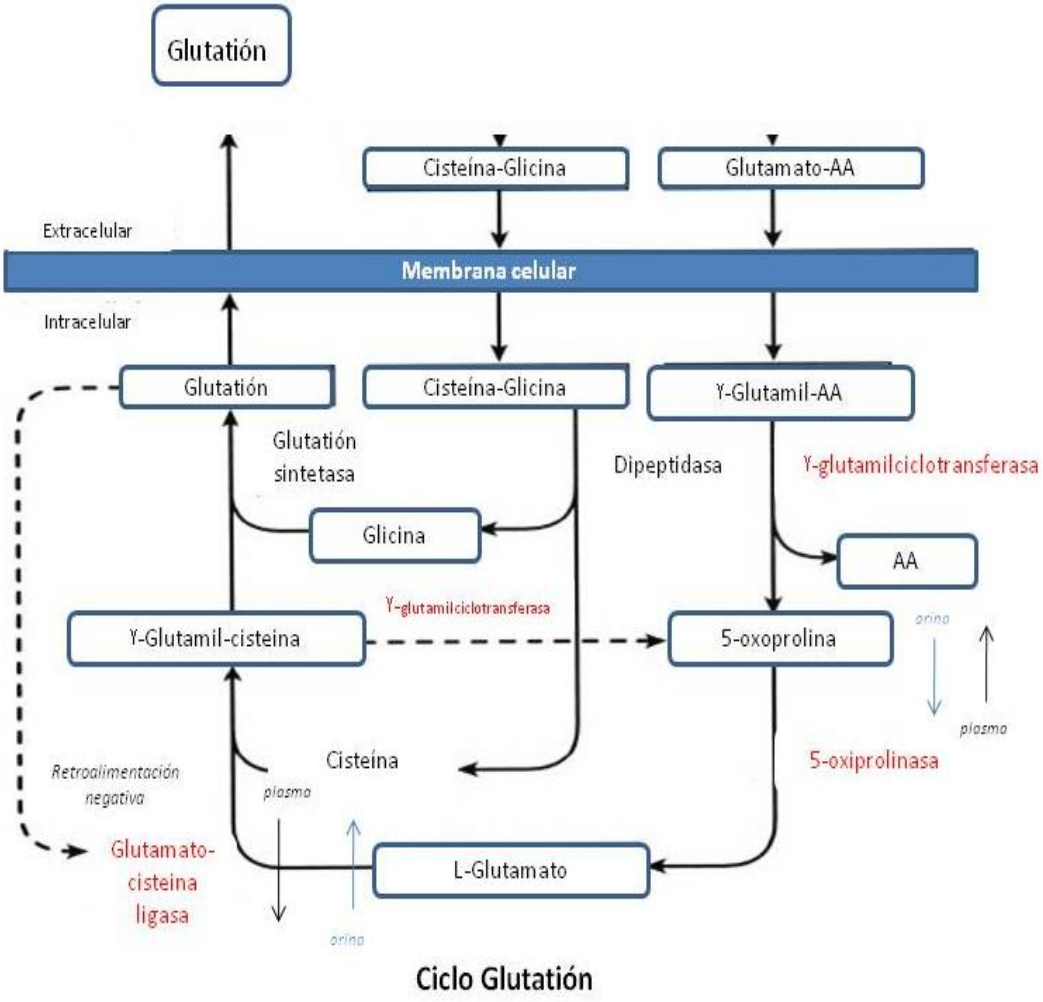

Figura 22. Ciclo del catabolismo de Glutatión vía 5-Oxoprolina. Se indica con flechas al lado de 5-Oxoprolina y al lado de Glutamato la variación en orina y en plasma en el estudios en ERC.

Para estudiar estas enzimas concretas se realizó el análisis directamente por MRM. Para ello primero se optimizó primero la metodología con el CHIPCUBE/LCMS de Agilent Technologies.

3.1. Desarrollo del método LC MS/MS MRM para proteínas con el equipo CHIPCUBE LC (QQQ) MS de Agilent Technologies.

Este apartado será común para el apartado 3 y 4. Sólo se describirá brevemente la adaptación de lo ya publicado al nuevo equipo.

El modo de trabajar en MRM está descrito en la literatura (63-65;67). El equipo LCMS utilizado, el cual se puso a punto, cuenta con una tecnología pionera única en España (CHIP CUBE acoplado a un triple cuadrupolo). Tanto es así que se ha colaborando activamente, con el servicio técnico (Xavier Maes) de la casa comercial en el desarrollo óptimo del equipo.

Primero explicaremos la cromatografía con chip, ya que este es el punto más novedoso respecto a los sistemas convencionales. Se basa en un chip que incorpora toda la separación cromatográfica (precolumna y columna analítica), como ya se ha explicado. En la columna se produce la separación cromatográfica de los péptidos que serán analizados por MS en línea. Se han tenido que ajustar los métodos cromatográficos habituales en proteómica para adaptarlos al chip y sus condiciones. Con este sistema los métodos de cromatografía son más cortos de los que se suelen usar en la nanocromatografía convencional. Este chip tiene otra novedad: además de contener el sistema de cromatografía incorpora la fuente de nanoelectrospray en el mismo sistema de del chip (llamado CHIPCUBE).

Para el análisis de proteínas con el chip se trabaja en modo de ionización positivo, ya que esta tecnología de momento no permite la ionización en modo negativo. Este punto no es importante a la hora de trabajar con proteínas. El voltaje optimizado es de 1700 V (según la casa comercial), pero se puede subir hasta 2000V (voltajes de ionización en fuente). Comparando esto con la fuente de Jet Stream, óptima para molécula pequeña en la cual podemos realizar los dos tipos de ionización positivo (con una optimización de voltaje 4000 V a 3500 V según la molécula) y el negativo (con valores de voltaje de 3500 V a 3000 V), se ha bajado el voltaje de ionización en fuente. Esto puede tener ventajas a la hora de la óptima ionización. También se ha evaluado la variación de otros parámetros como flujo de N_2, DP (potencial de “declustering”). Presión de operación, “Curtain gas”, “interfase heater”, “Dwell time”, CE (voltaje de fragmentación). Estos parámetros son propios de la metodología MRM, descritos ya en la literatura (65), e incluso el tiempo de retención en cromatografía. El método cromatográfico ha habido que cambiarlo ya que los métodos ya optimizados no resultaron adecuados para este nuevo sistema, donde la columna es más corta en longitud frente a las usadas de forma convencional (15 cm de una columna convencional frente a 150 mm columna del chip).

Se trabajó para su puesta a punto con un abanico de muestras complejas representativas en matrices como plasma y orina entre otras.

Ya que se trata de una configuración nueva se trabajó también en la optimización según la naturaleza de la matriz. Cada matriz tiene una dificultad añadida a su propia naturaleza, por ejemplo, los lípidos asociados interfieren dificultando la cromatografía, ya que se trata de una fase reversa e incluso la ionización en la fuente del detector. Se probaron dos chips diferentes: a) Un chip con columna de longitud de 43mm y una precolumna de capacidad de 40nl, b) un chip con columna de longitud de 150mm y una precolumna de capacidad de 160nl ideal para muestras de plasma. Para las muestras de orina en el estudio diferencial por iTRAQ (apartado 4) se utilizó un chip con una columna 150 mm y una precolumna con una capacidad de 500nl.No fue optimizado en su momento porque pertenece a una nueva generación de chip (Agilent Technologies).

En nuestro caso para este apartado donde se estudian las enzimas, se utilizaron para la muestra de orina una columna analítica de 43mm y para las muestras de plasma una de 150 mm, al ser este más complejo. La precolumna o columna de enriquecimiento también es mayor en el chip con mayor capacidad para la muestra de plasma (160nl) y con menor para la muestra de orina (40nl). Se intentó analizar las muestras de plasma en el chip de menor capacidad pero los mejores resultados fueron con la columna mayor. Los primeros indicios al comprobar que esta columna no era la adecuada eran que la muestra no llegaba a salir del todo en el tiempo y gradiente que corresponde a los péptidos. La mayor parte de los péptidos, por su propia naturaleza química, se eluyen todos cuando se obtiene con la fase móvil B (fase orgánica) un porcentaje respecto a la fase acuosa de un 40-60%. Sin embargo en la columna de menor capacidad aparecían en el cromatograma a altos porcentajes de componente orgánico. Esto sería un falso positivo ya que a ese porcentaje aparecen interferentes que se suman a la señal del analito dando áreas en exceso y confundiendo un posible resultado.

Otro punto no tan novedoso y previo al estudio cromatográfico es la optimización de los péptidos según el modo de trabajo MRM. Se sigue el mismo procedimiento que el descrito en el estudio de los metabolitos (apartado 1.2.1), pero con la particularidad de que las proteínas tiene un tamaño mayor y por tanto una conformación estructural diferente. Así para el estudio de proteínas por MRM es necesario estudiar por péptidos propios (tras una digestión) y no con la proteína entera, según el procedimiento descritos en la bibliografía (65).

Como se explicó anteriormente es necesario comprobar qué transición (Introducción apartado 3.5.) es la más adecuada para analizar nuestra molécula de interés (en nuestro caso las enzimas del ciclo del catabolismo del Glutatión) (65). Llamamos más adecuado sobre todo a que sea cuantificable y para ellos tenemos que garantizar su buena ionización en la fuente (para ello se ajustará el “fragmentor”) y su ruptura en un producto estable que llegue al detector dando una señal optima y cuantificable (la denominada energía de colisión CE) (apartado 1).

Se intentó optimizar primero con el programa “Optimazer for peptides” de Agilent Technologies. Este programa es más manual que el programa Skyline, teniendo que hacer un barrido “scan” previo de la muestra y viendo que péptidos eran más abundantes. El triple cuadrupolo propiamente dicho, no es el instrumento más adecuado para hacer un estudio por barrido “scan”. Siendo muy sensible para trabajar en MRM, no lo es tanto para trabajar en modo barrido “scan”. No permite hacer digestiones *in silico* siendo un inconveniente a la hora de decidir los péptidos candidatos. Después del barrido “scan” se procede a la optimización del “fragmentor” y luego la CE. Al optimizar esta energía es necesario ir por rangos pequeños. Se recurrió a otro programa libre y diseñado por la Universidad de Washington (103).

El programa Skyline sin embargo nos permite hacer una optimización de forma automática de las proteínas estudiadas. No vamos a describir todo el programa porque está publicado en las guías de aplicación. Lo primero será realizar una digestión *in silico* de las proteínas, donde elegimos la enzima, en nuestro caso tripsina, que nos va a cortar en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina. Una vez obtenidos los péptidos trípticos es necesario comprobar los péptidos de la secuencia que son proteotípicos de la proteína estudiada. Para ello se recurre a las bases de datos Blast® (Basic Local Alignment search tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) (92) con restricción taxonómica a Homo sapiens. Se probaron varias estrategias para conseguir una buena optimización de las transiciones. Al final se decidió, probar las cargas del precursor +1 y +2 y del producto +2 y +3 al ser las más probables. El péptido tiene que tener una longitud máxima de 25 y mínima de 6. Se programó para que tuviese en cuenta a la aquilación del grupo protector que proporciona la IA en las cisteínas de la secuencia y que no tuviese ningún salto en el corte enzimático. Una vez optimizado el método se procede al análisis.

3.2. Estudio de las enzimas que controlan el ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina en muestras en muestras de orina.

Se observó una variación de los metabolitos del ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina en la orina y en el plasma de individuos con ERC. El metabolito 5-Oxoprolina encuentra sus niveles notablemente más bajos y existe una excreción fuerte de Glutamato, principal fuente a la hora de la formación del Glutatión. En plasma observamos la tendencia contraria. Por ello, se estudiaron las enzimas que controlan este ciclo y en especial el paso de 5-Oxoprolina a Glutamato.

Se realizó un estudio con 25 individuos por grupo (ERC inicial e individuos sanos) y 23 individuos con ERC avanzada, donde corroboramos lo anteriormente visto en el estudio inicial (tabla 5 en Material y Métodos).

En la tabal 9 se muestra el resultado del estudio estadístico en orina de las enzimas del ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina después de analizar las transiciones correspondientes a cada enzima por la metodología MRM.

Tabla 9. Enzimas con las transiciones significativamente alterados en individuos con ERC avanzada y ERC inicial frente a individuos control en muestras de orina. (* 5-Oxoprolinasa (OPLA), gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) y Glutamato-cisteina ligasa reguladora (GSH_0) y Glutamato-cisteina ligasa catalítica (GSH_1)).

Enzima	Secuencia Péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
OPLA	R.GHDPSAHVLACFGGAGGQHACAIAR.A	839.7->985.5	6.23	<0.0001****	-	-
	R.YQGTDCALMVSAHQHPATAR.S	738.7->796.3	6.53	<0.0001****	-	-
	R.ELGFTHVSLSSEAMPMVRI	644.6->655.3	8.91	<0.0001****	0.43	<0.0001****
		664.3->685.3	4.41	<0.0001****	-	-
		664.3->745.4	3.49	<0.0001****	-	-
Enzima	Secuencia Péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
GGCT	K.SNLNSLDEQEGVK.S	716.8->694.4	0.41	<0.0001****	0.43	<0.0001****
		478.2->694.3	0.36	0.0120*	0.16	<0.0001****
	R.SYLMTNYESAPPSPQYK.K	659.3->677.8	0.41	<0.0001****	0.50	<0.0001****
		659.3->769.8	0.39	<0.0001****	0.19	<0.0001****
		659.3->806.9	0.22	<0.0001****	0.089	<0.0001****
Enzima	Secuencia Péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
GSH_0	K.QFDIQLLTHNDPK.E	784.9->959.5	1.53	0.0012**	0.84	0.0029**
	K.CPSTHSEELHDCIQK.T	614.3->663.3	1.66	0.0021**	0.58	0.0080**
		614.3->928.3	1.68	0.0054**	0.66	0.0023**
Enzima	Secuencia Péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
GSH_1	R.FKPPPPPNSDIGWR.V	504.3->531.3	-	-	0.88	0.0486*
	R.WGVISASVDDR.T	602.8->591.3	-	-	-	-
		602.8->662.3	-	-	0.12	0.00118*

3.2.1. 5-Oxoprolinasa (OPLA) en muestras de orina.

La 5-Oxoprolinasa es una enzima que cataliza la conversión de 5-Oxoprolina a Glutamato.

En la figura 23 están representadas las transiciones correspondientes a esta enzima y en la tabla 9 la significación entre grupos. En la 5-Oxoprolinasa se optimizaron 9 transiciones, 5 de ellas el resultado más significativo es para los individuos con ERC avanzada comparado con el grupo control. La transición 839,7->985,5, correspondiente al péptido RGHDPSAHVLACFGGAGGQHACAIARA demuestra un aumento en los niveles de esta proteína en individuos con ERC avanzada, seguido de individuos con ERC inicial. Sin ser estadísticamente significativa, si podemos observar la tendencia a aumentar los niveles en orina. En este caso, este péptido con 25 aminoácidos y dos de ellos cisteínas en su secuencia, es un péptido con un valor confianza en Blast® del 80-200% de pertenecer a la enzima en cuestión. Además es un péptido cuya digestión se considera un éxito (la digestión es un proceso difícil de controlar), repetido el proceso en cuatro ocasiones, dando siempre el mismo resultado.

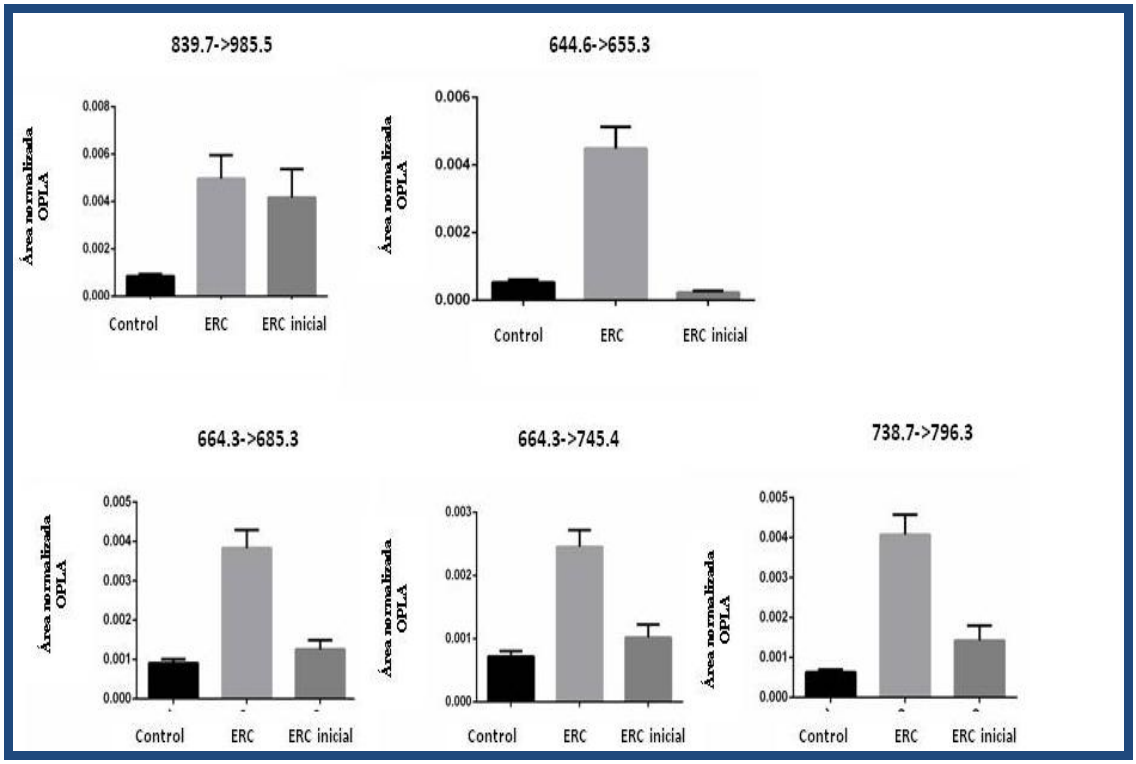

Figura 23. Transiciones de la enzima 5-Oxoprolinasa (OPLA) en muestras de orina. Datos obtenidos por MRM. Tres grupos: control, ERC y ERC inicial. Test no paramétrico de Mann-Whitney entre Control frente a ERC y Control frente a ERCi. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Los datos anteriores se corroboraron con el péptido YQGTDCALMVSAHQHPATARS con la transición (738,7-> 796,3), el péptido RELGFTHVSLSSEAMPMVRI con la transiciones (664,3-> 754,4 y 685,3) y el péptido KLLSEDPANYADAPTEGIRR con

una transición (644,6->655,3). Obteniendo las mismas observaciones, salvo para las transiciones (738,7-> 796,3) y (664,3-> 745,4 y 685,3) que siguen un mismo patrón, reflejando el mismo comportamiento de los grupos en las tres transiciones (figura 23). Podemos comprobar en la tabla 9 que no resulta estadísticamente significativo el grupo de ERC inicial frente al grupo control, excepto en la transición (644.6->655.3), donde es significativa estadísticamente en el grupo de ERC inicial pero con una tendencia contraria a la esperada.

3.2.2. gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) en muestras de orina.

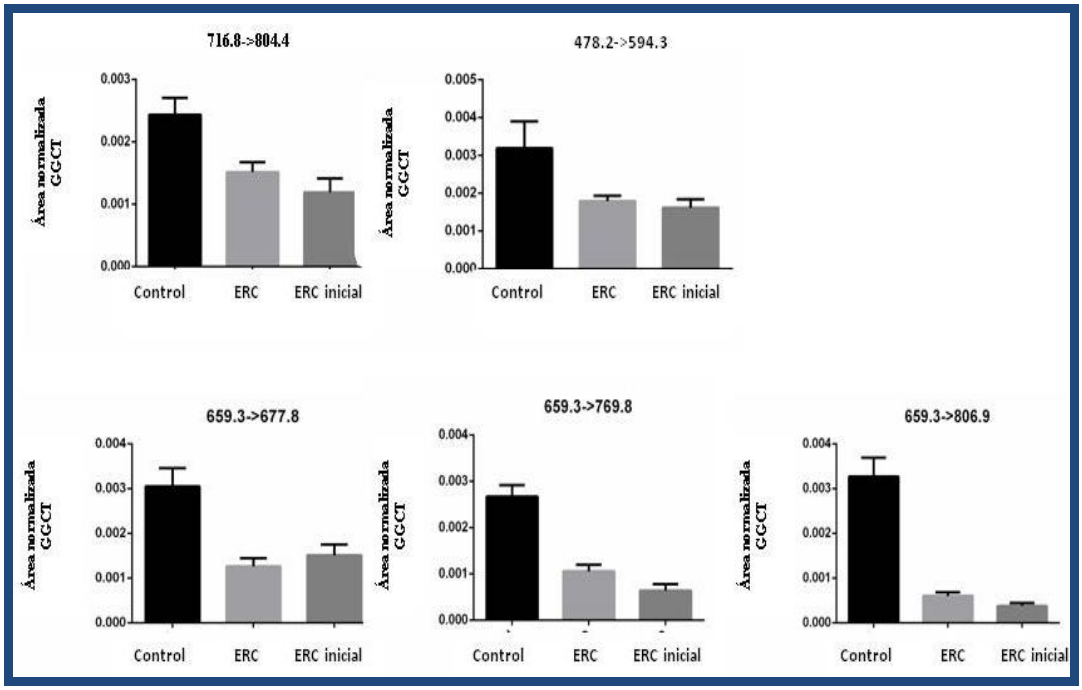

Figura 24.Transiciones de la enzima gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) en muestras de orina. Datos obtenidos por MRM. Tres grupos: control, ERC y ERC inicial. Test no paramétrico de Mann-Whitney entre Control frente a ERC y Control frente a ERCi. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

La gamma-Glutamilciclotransferasa (figura 24 y tabla 9); de los 8 péptidos que teníamos tras su digestión *in silico,* sólo 2 resultaron proteotípicos de esta proteína en Blast®. Se optimizaron 7 transiciones de esos 2 péptidos, pero sólo 5 de ellas dieron significación estadística: para el péptido KSNLNSLDEQEGVKS, 2 transiciones estadísticamente significativas (478,2-> 594,3) y (716,8->804,4) y para el péptido RSYLMTNYESAPPSPQYKK, 3 transiciones ((659,3->677,8); (659,3->769.8) y (659,3->806.9)). Esta enzima que controla los dos pasos por los cuales se llega a la 5-Oxoprolina, se encontró con niveles más bajos en orina en individuos con ERC avanzada así como en individuos con ERC inicial, donde se encuentra en grado de significación menor respecto a controles.

3.2.3. Glutamato-cisteínaligasa (GSH) en muestras de orina.

La última enzima estudiada es la Glutamato-cisteinaligasa (GSH) encargada de la retroalimentación hacía el Glutamato desde el Glutatión. Está compuesta por dos subunidades, subunidad reguladora (GSH0) y subunidad catalítica (GSH1).

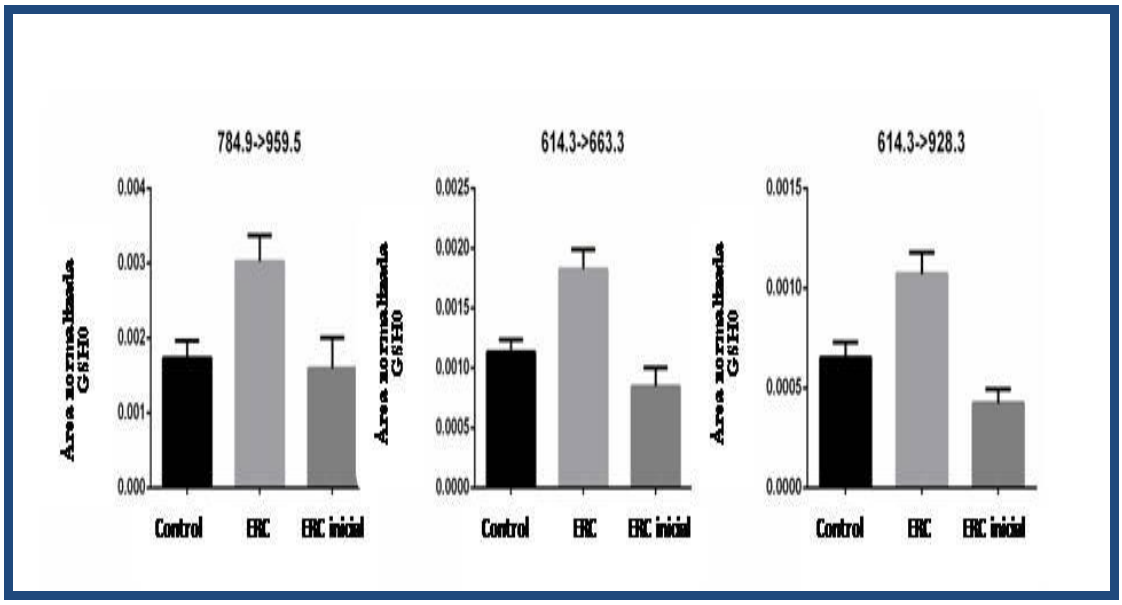

Figura 25.Transiciones de la enzima Glutamato-cisteinaligasa subunidad reguladora (GSH0) en muestras de orina. Datos obtenidos por MRM. Tres grupos: control, ERC y ERC inicial. Test no paramétrico de Mann-Whitney entre Control frente a ERC y Control frente a ERCi. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Se estudiaron 5 péptidos de la subunidad reguladora (GSH0), de los cuales 2 era proteotípicos según Blast®. De las 6 transiciones optimizadas, sólo 3 fueron estadísticamente significativas, éstas corresponden al péptido KCPSTHSEELHDCIQKT con 2 transiciones (614,3->663,3 y 928,3) y el péptido KQFDIQLLTHNDPKE con 1 transiciones (784,9->959,5) Destacamos un aumento en sus niveles en pacientes con ERC avanzada. En esta subunidad de la enzima, observamos un comportamiento similar al de la 5-Oxoprolinasa con un aumento en los niveles en individuos con ERC avanzada. Respecto a las etapas iniciales el comportamiento es similar en los grupos de ERC avanzada e individuos con ERC inicial (figura 25 y tabla 9).

Se estudió en este caso también la Glutamato-cisteina ligasa subunidad catalítica (GSH1), sin poder extraer nada relevante, excepto en las etapas iniciales donde resultó ser significativa en dos transiciones RFKPPPPNSDIGWR (504,3->531,3) y RWGVISASVDDRT (602,8->662,3), las cuales fueron significativas al contrario de lo esperado (figura 26 y tabla 9).

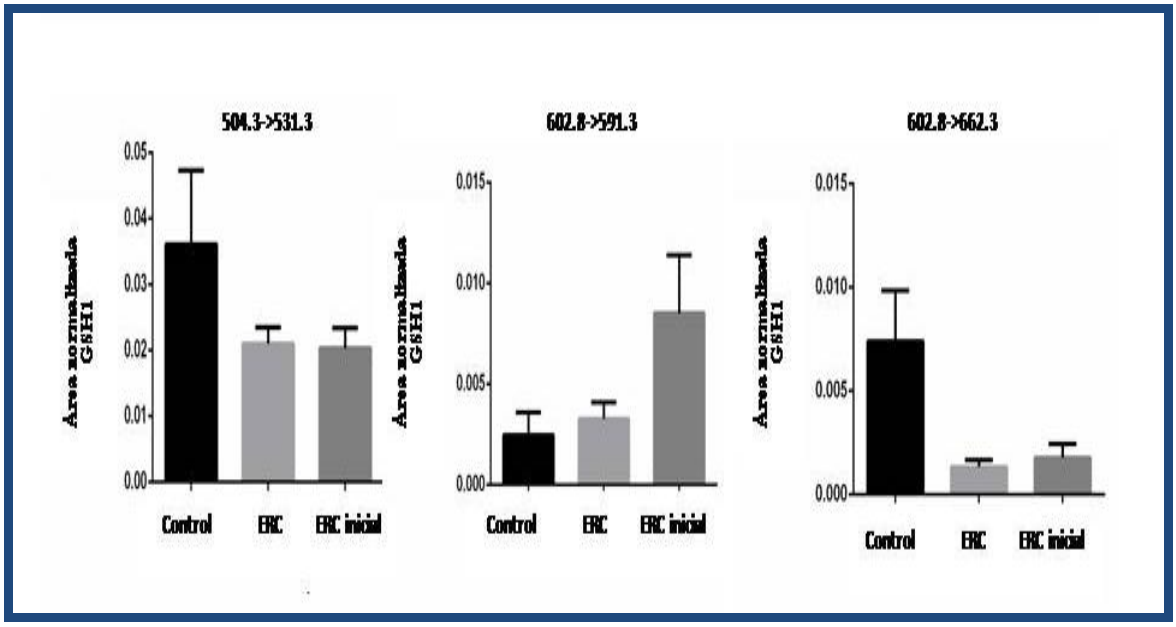

Figura 26.Transiciones de la enzima Glutamato-cisteinaligasa subunidad catalítica (GSH1) en muestras de orina. Datos obtenidos por MRM. Tres grupos: control, ERC y ERC inicial. Test no paramétrico de Mann-Whitney entre Control frente a ERC y Control frente a ERCi. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

3.3. Estudio de las enzimas que controlan el ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina en muestras de plasma.

Si estudiamos las enzimas en plasma, tenemos 3 transiciones para 5-Oxoprolinasa, que disminuyen sus niveles en individuos con ERC tanto en sus niveles avanzados como en iniciales. Para la enzima gamma-Glutamilciclotransferasa tenemos 3 transiciones cuyos niveles aumentan en la ERC avanzada. Las dos muestran el comportamiento contrario al observado en orina. Respecto a la Glutamato-cisteínaligasa tiene el mismo comportamiento que en orina, aumentando su expresión en ERC en estadios avanzados.

Tabla 10. Enzimas con las transiciones significativamente alterados en individuos con ERC avanzada y ERC inicial frente a individuos control en plasma.

Enzima	Secuencia Péptido	Transición		ERC *vs* Control	ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
OPLA	R.GHDPSAHVLACFGGAGGQHACAIARA	839.7->985.5	0.50	0.0004***	0.10	<0.0001****
		839.7->1040.5	0.50	0.0154*	0.11	<0.0001****
	R.GDLFDLAVPMPEVLYEEVLEVDER.V	926.5->928.5	0.01	0.0002***	0.01	<0.0001****
Enzima	**Secuencia Péptido**	**Transición**	**ERC *vs* Control**		**ERCi *vs* Control**	
		m1->m2	**Ratio**	**Pvalor**	**Ratio**	**Pvalor**
GGCT	K.SNLNSLDEQEGVKS	716.8->873.4	6.05	0.0028**	-	-
		478.2->594.3	5.86	<0.0001****	-	-
		478.2->565.8	4.50	0.0021**	-	-
Enzima	**Secuencia Péptido**	**Transición**	**ERC *vs* Control**		**ERCi *vs* Control**	
		m1->m2	**Ratio**	**Pvalor**	**Ratio**	**Pvalor**
GSH_0	K.CPSTHSEELHDCIQK.T	614.3->698.3	24.37	<0.0001****	-	-
		614.3->663.3	23.05	<0.0001****	-	-

3.3.1. 5-Oxoprolinasa (OPLA) en muestras de plasma.

En la figura 27 están representadas las transiciones de esta enzima y en la tabla 10 la significación entre grupos. En la 5-Oxoprolinasa 3 transiciones fueron estadísticamente significativas. El resultado más significativo fue para los individuos sanos comparados con el grupo ERC avanzada y ERC inicial. Este es un comportamiento contrario al observado en orina. Las transiciones (839,7->985,5 y 1040,5), correspondiente al péptido RGHDPSAHVLACFGGAGGQHACAIARA y la transición (926,5->928,5) correspondiente al péptido RGDLFDLAVPMPEVLYEEVLEVDERV, demuestra un descenso en los niveles de esta proteína en individuos con ERC avanzada en plasma, seguido de individuos con ERC inicial, siendo estadísticamente significativa.

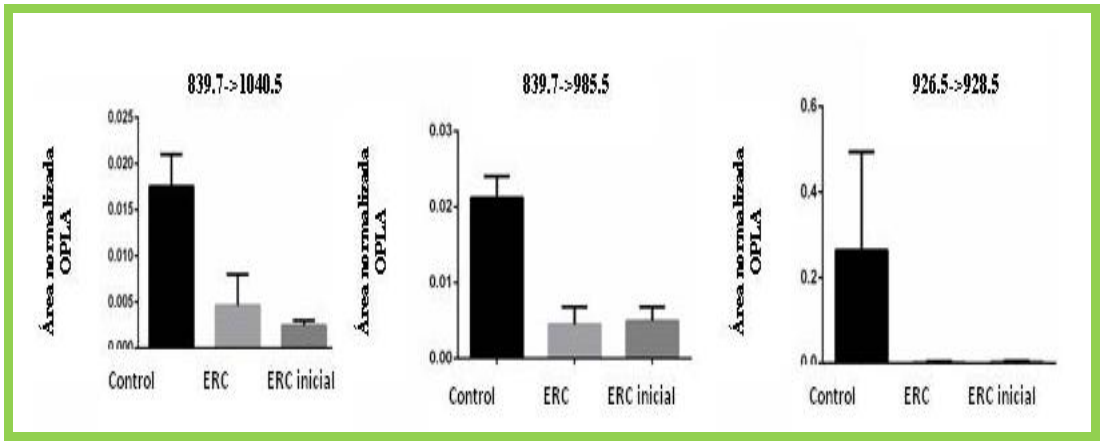

Figura 27. Transiciones de la enzima 5-Oxoprolinasa (OPLA) en muestras de plasma. Datos obtenidos por MRM. Tres grupos: control, ERC y ERC inicial. Test no paramétrico de Mann-Whitney entre Control frente a ERC y Control frente a ERCi. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

3.3.2. gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) en muestras de plasma.

En la gamma-Glutamilciclotransferasa (figura 28 y tabla 10), tenemos 1 péptido, con 3 transiciones con significación estadística. El péptido KSNLNSLDEQEGVKS, con las transiciones estadísticamente significativas (478,2-> 594,3 y 565,8) y (716,8->873,4) Esta enzima se encontró con niveles más altos en plasma en individuos con ERC avanzada. Sin embargo, no resultó significativa en individuos con ERC inicial. El comportamiento es contrario al reflejado en orina.

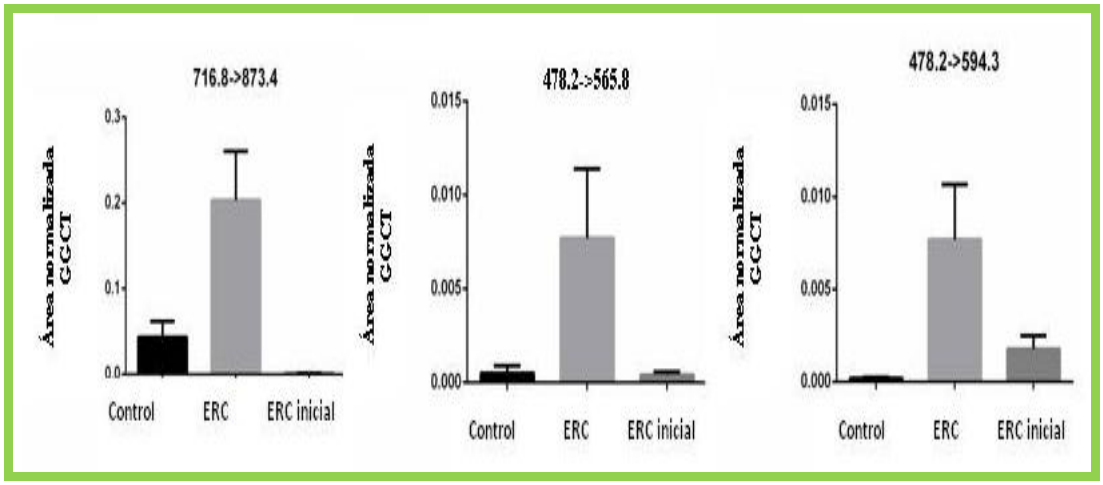

Figura 28.Transiciones de la enzima gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) en muestras de plasma. Datos obtenidos por MRM. Tres grupos: control, ERC y ERC inicial. Test no paramétrico de Mann-Whitney entre Control -ERC y Control-ERCi. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

3.3.3. Glutamato-cisteínaligasa (GSH) en muestras de plasma.

En el caso de esta enzima sólo resultó ser significativa la subunidad reguladora (GSH0), con un solo péptido KCPSTHSEELHDCIQKT con 2 transiciones (614,3->663,3 y 698,3) Destacamos un aumento en sus niveles en pacientes con ERC avanzada (figura 29 y tabla 10). Este hecho coincide con el comportamiento encontrado en orina en esta enzima.

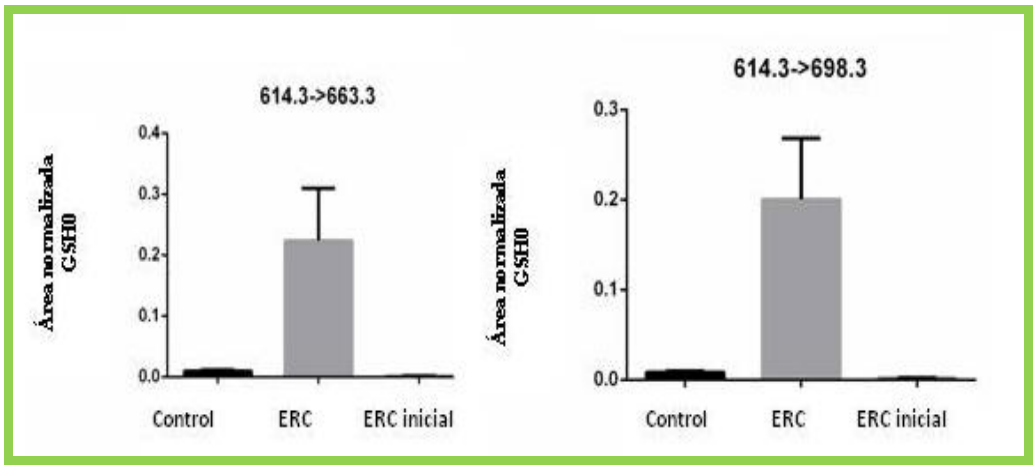

Figura 29.Transiciones de la enzima Glutamato-cisteinaligasa subunidad reguladora (GSH0) en muestras de plasma. Datos obtenidos por MRM. Tres grupos: control, ERC y ERC inicial. Test no paramétrico de Mann-Whitney entre Control frente a ERC y Control frente a ERCi. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

3.4. Resumen del comportamiento de las enzimas del ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina.

Observamos que el comportamiento de las enzimas va en el sentido esperado y es coherente en los dos fluidos con lo observado en los metabolitos 5-Oxoprolina y Glutamato (apartado 1). En el cuadro resumen (tabla11) están reflejados estos cambios. En el caso de la orina, 5-Oxoprolina desciende sus niveles y Glutamato aumenta los suyos en individuos con ERC (figura 22). Así la enzima OPLA aumenta los niveles en su paso de 5-Oxoprolina a Glutamato. En la GGCT, que da paso a 5-Oxoprolina por dos vías, observamos que sus niveles se encuentran descendidos en individuos con ERC en muestras de orina. En el caso de la retroalimentación desde el Glutatión, la enzima GSH tiene un descenso en sus niveles de abundancia. El caso contrario ocurre en el plasma.

Tabla 11. Resumen del resultado del estudio de las enzimas y metabolitos del ciclo de Glutatión vía 5-Oxoprolina en muestras de orina y plasma en individuos con ERC. Las flechas nos indican cuando los niveles aumentan o disminuyen. Las enzimas están en color negro y los metabolitos en rojo.

CICLO GLUTATIÓN VÍA 5-OXOPROLINA		ORINA		PLASMA	
		ERC INICIAL	ERC AVANZADO	ERC INICIAL	ERC AVANZADO
ENZIMA	OPLA	-	↑	↓	↓
	GGCT	↓	↓	-	↑
	GSH_0	↑	↑	-	↑
METABOLITO	5-OXOPROLINA	↓	↓	↑	↑
	GLUTAMATO	↑	↑	↓	↓

4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE ORINA ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

Igual que se estudiaron los metabolitos asociados a ERC, se realizó un estudio de las proteínas que pudieran estar implicadas en la ERC. Para ello se siguió el esquema descrito en la figura.

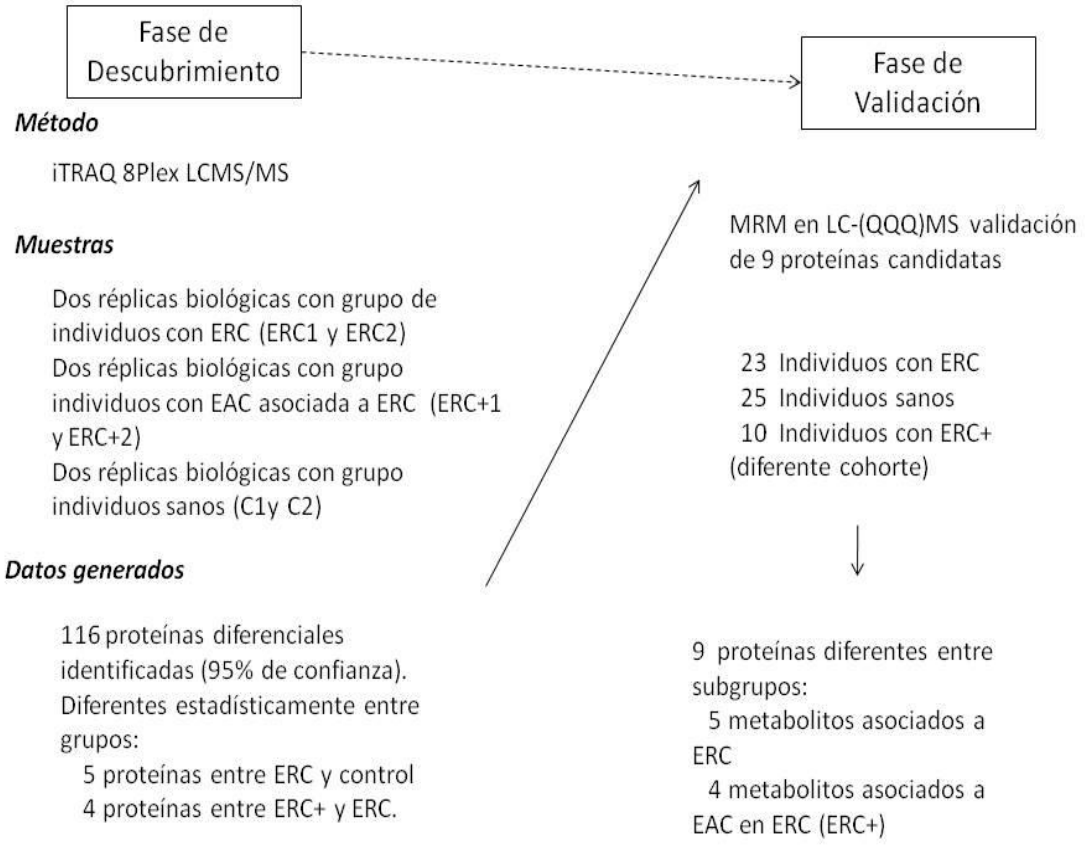

Figura 30.Esquema de trabajo. A la izquierda fase de descubrimiento seguido, según indican las flechas, de la fase de validación. (* Enfermedad crónica renal (ERC), Enfermedad crónica renal con Enfermedad coronaria asociada (ERC+) y Enfermedad coronaria asociada (EAC)).

4.1. Fase de descubrimiento: análisis diferencial por iTRAQ LC MS/MS en muestras de orina.

En la fase de descubrimiento se realizó un estudio de expresión diferencial de proteínas por marcaje isotópico iTRAQ 8plex (ABSCIEX) LCMS/MS. Para ello se tomaron dos replicas biológicas de orina humana por grupo a comparar: individuos control (C1 y C2), individuos con ERC (ERC 1 y ERC 2), individuos con EAC asociada a ERC+

(ERC+1 y ERC+2) y mezcla de individuos de la réplica 1 (ERC1y ERC+1) y la réplica 2 (ERC2 y ERC+2).

Tabla 12. Diseño del experimento de iTRAQ 8plex.

113	114	115	116	117	118	119	121
C1	C2	ERC1	ERC2	ERC+1	ERC+2	ERC1yERC+1	ERC2yERC+2

4.1.1. Identificación de proteínas.

En este estudio se compararon tres grupos: individuos con ERC, individuos con ERC y EAC asociada (ERC+) e individuos control (C). Todas ellas se han estudiado utilizando el etiquetado iTRAQ 8 Plex (ABSCIEX) para su estudio diferencial siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar si el marcaje fue correcto antes de mezclar las muestras marcadas individualmente (material y métodos), se comprobó el marcaje fragmentando péptidos al azar de cada una de las muestras en un equipo MALDI TOF/TOF (4800 ABSiex), como se muestra en la figura 31. El marcaje fue correcto, ya que aparecen los correspondientes reporters (etiquetas) al fragmentar péptidos en cada una de las muestras.

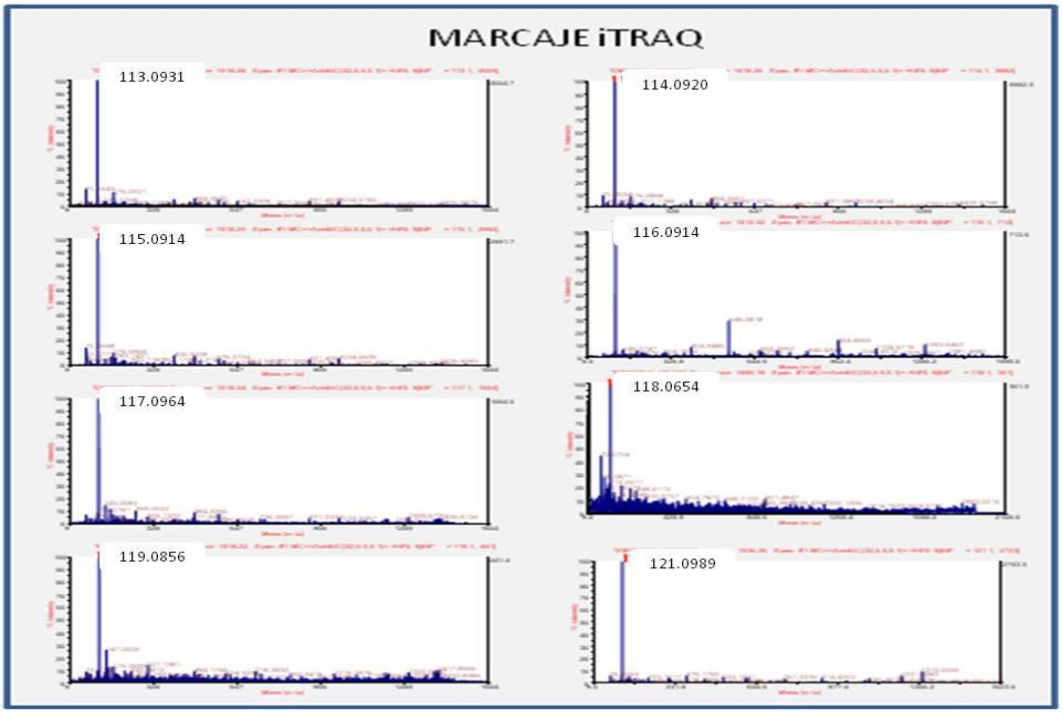

Figura 31. Espectro MSMS de un péptido seleccionado al azar en cada una de las muestras (eje de abscisas (m/z) y eje de ordenadas (intensidad relativa del espectro). Se muestra en cada uno de los espectros la etiqueta correspondiente al marcaje con iTRAQ (113-119 y 121). Aunque en la figura no se pueda apreciar bien las señales m/z en el espectro, sólo se muestra para ver la señal de las etiquetas.

Una vez obtenidos los espectros, se realizó una cuantificación de las proteínas, por el método Bradford; seguido se realizó un SDS-PAGE para ver la distribución proteica, antes de digerir.

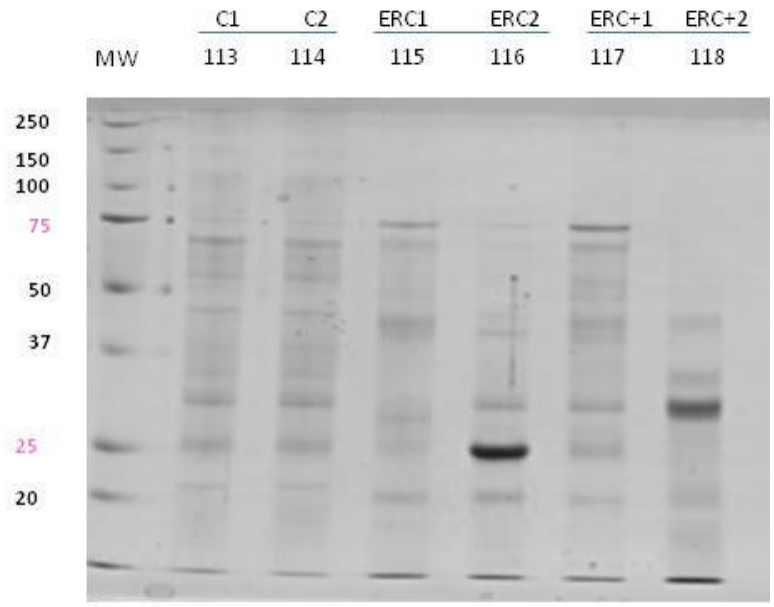

Figura 32. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie (CCB) para comprobar la cuantificación de Bradford. Los nombres de los carriles están nombrados según tabla 12, tal y como se indicó en el diseño del experimento de iTRAQ.

Según observamos en el gel las réplicas biológicas de control son muy parecidas, no tanto las réplicas 115 y 116, como ya se ha dicho. Podemos observar en la muestra 116 una banda muy marcada que no aparece con tanta intensidad en el resto. Es curioso también observar, que aunque el espectro de MALDI TOF de la figura 31 se realizará con un péptido al azar, aparezcan señales más intensas que en el resto de los espectros. Respecto a las réplicas 117 y 118 ocurre exactamente lo mismo, apareciendo en 118 una banda más intensa que el resto, que además no coincide con la banda aparecida en 116. Para que el análisis de datos sea coherente y que la existencia de una o varias proteínas no enmascaren los resultados, ni den falsos positivos (esto es porque no partiríamos de la misma cantidad de proteína en igualdad de condiciones), determinamos, aunque el análisis se realice con todas la etiquetas, considerar sólo 113 (C1), 114(C2), 115(ERC) y 117(ERC+) para evaluar las proteínas que van a ser validas. Es importante observar la eficacia de la depleción de Albúmina (Material y Métodos), ya que prácticamente no se observa banda a la altura de su peso molecular (67KDa). A la hora de la cuantificación de los péptidos responsables de las diferencias entre grupos esto es importante ya que la elevada proteinuria de los individuos con ERC frente a los individuos control podría enmascarar los resultados.

Al ser la orina un fluido biológico complejo, para un mejor estudio diferencial, se procedió a fraccionar las muestras por su punto isoeléctrico (PI) para facilitar el análisis global después de su digestión. Se eligió separarlas por el punto isoeléctrico aprovechando esta propiedad de las proteínas y de los péptidos, ya que el análisis con separación previa ayuda a resolver la complejidad de los resultados. Para ello se empleo la metodología OFF-GEL (Agilent Technologies) que permite dicho fraccionamiento de los péptidos en solución (Material y Métodos).

Tras su separación se analizaron cada una de las 12 fracciones extraídas por LCMS/MS en un LTQ ORBITRAP Velos (Thermo Electron, Germany). En la figura 33, se muestran los cromatogramas de modo representativo con la abundancia relativa de los iones detectados en el equipo de espectrometría de masas. En la figura 33 sólo pretendemos ver la distribución de los iones en cada fracción.

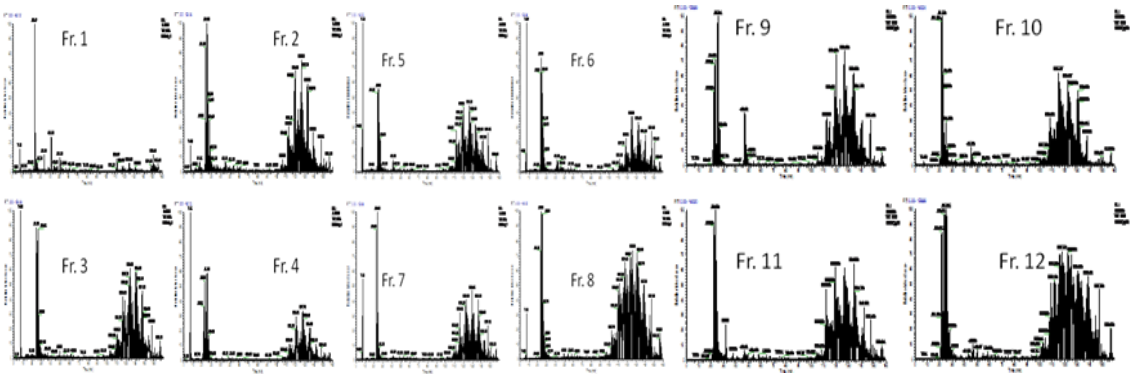

Figura 33. Cromatogramas de las 12 fracciones de OFFGEL, donde el eje de abscisas, corresponde al tiempo de retención cromatográfico (minutos) y en ordenadas, la intensidad relativa en el espectro.

Para la cuantificación de los péptidos responsables de las diferencias entre grupos según las condiciones elegidas, se analizaron todos los ratios o razones de las diferentes réplicas comparando unas con otras. Asumimos que la mayor parte de las proteínas no cambian su expresión para poder aplicar la corrección de sesgo. Con ello se corrigen el muestreo, a la hora de hacer la elección de las muestras que han sido analizadas y corregimos también la inadecuada combinación de las diferentes etiquetas. Un error en los ratios se debe probablemente a la preparación de la muestra, proceso de depleción y a proteínas contaminantes como queratinas o actinas. Como así lo demuestra también el coeficiente de correlación de las proteínas diferenciales con respecto a cada uno de los controles, que es superior al 0,99 en todos los casos (datos utilizados para el procesado de los datos obtenidos en el espectro no mostrados). El algoritmo ParagonTM utlizado, asume que las muestras son combinadas con ratos 1:1. Se observó una diferencia importante con respecto a la mediana de la distribución de los ratios, si elegimos una referencia en concreto para hacer la comprobación en algunos casos. Este es el caso de la muestra ERC 1 (115), que parece tener mucho menos cantidad de proteína que el resto de las muestras. Si comprobamos esto con lo dicho anteriormente cuando

hablábamos de la cuantificación de proteínas, podemos afirmar que las suposiciones hechas al ver la distribución de bandas en el SDS-PAGE eran ciertas. Según la figura 32, donde se muestra el gel SDS-PAGE previo al análisis y con las muestras marcadas, lo que se aprecia es una distribución de bandas algo diferente que en las otras muestras, sobre todo con respecto a su réplica biológica (ERC 2 muestra marcada con la etiqueta 116), resultando ser más parecida a ERC+1. Esto ya se comentó al ver el resultado de la cuantificación, y una vez más se corrobora que esta réplica no debería ser tenida en cuenta a la hora de determinar las proteínas realmente diferenciales.

Otro factor que hay que corregir es el fondo (background) del espectro, ya que puede ocurrir que coeluyan más péptidos con el péptido diana.

Si observamos de nuevo la figura 31 donde se comprobó la eficiencia del etiquetado por MALDI TOF/TOF (4800 ABSiex), se observa un fondo grande en el espectro de la etiqueta 118. La etiqueta 118, no pudo ser cuantificada. Aún cuando se comprobó que la muestra estaba perfectamente marcada, es posible que las áreas de esta etiqueta y la S/N del equipo de análisis, estén por debajo del límite de detección, en comparación con las otras etiquetas, para las proteínas identificadas. En la figura 32 donde se muestra el SDS-PAGE se observa que esta muestra tiene mucha menos cantidad de proteína para un gran número de bandas, aún cuando la proteína total utilizada ha sido la misma que para cualquiera de las otras muestras. En alguno de los péptidos fragmentados e identificados se observa la existencia de esta etiqueta, pero en otros muchos no aparece.

Como hemos comentado antes tenemos dos réplicas biológicas por grupo (control, ERC y ERC+) más otras dos réplicas mezclando los enfermos renales (ERC y ERC+). Estás últimas mezclas se consideran control positivo para el análisis. En un total de 183789 espectros con 40498 proteínas identificadas en las combinaciones de las réplicas biológicas, aplicamos los criterios siguientes para determinar qué proteínas consideramos diferenciales. Si aplicamos un umbral en el espectro mayor de 1,3 nos permitirá un 95% de fiabilidad. De esta forma se identificaron 40498 proteínas, de las cuales 139 fueron proteínas diferenciales. En la identificación de proteínas la tasa de descubrimientos falsos (FDR) juega un papel importante, si no permitimos más de 1% para maximizar la sensibilidad nos quedamos con 116 proteínas diferenciales identificadas, de las 139 que teníamos al principio. Esto supone que un 30,3% de los espectros MS/MS adquiridos ha superado los criterios establecidos. De las proteínas116 proteínas diferenciales, 42 han sido identificadas con 3 o más péptidos.

Con todos estos datos y las correcciones permitentes, se analizaron cuantitativamente los grupos en estudio según los criterios establecidos.

Criterios establecidos para la selección de proteínas diferenciales:

- Los ratios de las proteínas entre una réplica biológica de un grupo y otra réplica biológica de otro grupo tiene que coincidir con el ratio de las dos réplicas

biológicas de los mismos grupos comparadas. Coherencia en los ratios de las medidas. No resultar significativo entre las replicas biológicas de un mismo grupo, pero si equiparable en tendencia y orden de magnitud.

- Más de dos péptidos identificados y con un nivel de confianza mayor del 95%.
- El factor de error (EF), factor que estadísticamente calcula el error entre ratios, tiene que ser menor de 2.
- El valor de $p < 0.05$.
- El FDR no superior al 1%.

Las proteínas diferenciales entre controles 113 y 114 son escasas. Esto nos garantiza uno de los criterios de cuantificación, ya que estas etiquetas corresponden a las dos replicas biológicas del grupo de controles. Sin embargo, tenemos la etiqueta 115, que parece tener menos proteínas cuando la comparamos con la 116. Hacemos el procesado de datos con las dos, aunque prestemos especial atención a 115. La 118 consideramos que no existe, ya que no nos permite medirla, al tener poca cantidad de proteínas, con lo cual el grupo ERC+, sólo tiene una réplica biológica. Sin embargo, las dos réplicas etiquetadas con 119 y 121, réplicas correspondientes a una mezcla de individuos ERC- y ERC+, presentan muy buenos ratios entre ellas y próximos a la unidad (121/119=1,06) y (119/121=0,93).

Los resultados correspondientes a esta fase de descubrimiento se representan en la tabla 13.

Tabla 13. Proteínas diferenciales encontradas en ERC (ERC sin EAC asociada) frente a control en muestras de orina. Resultado de comparar individuos control con individuos con ERC en el experimento iTRAQ LC MS/MS.

Cobertura de secuencia %	Nº de acceso	Nombre proteína (Gen)	Especie	Péptidos (95%)
81,8	sp|P01042|KNG1_HUMAN	Kininogen-1 (GN=KNG1)	Humano	8
78,9	sp|P13987|CD59_HUMAN	CD59 glycoprotein (GN=CD59)	Humano	9
67,7	sp|P02753|RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4 (GN=RBP4)	Humano	8
82,5	sp|P01833|PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor (GN=PIGR)	Humano	4
72,6	sp|Q14508|WFDC2_HUMAN	WAP four-disulfide core domain protein 2 (GN=WFDC2)	Humano	2
85,7	sp|P61769|B2MG_HUMAN	Beta-2-microglobulin (GN=B2M)	Humano	4

La siguiente tabla muestra el p valor y el factor de error (EF) de los ratios de las proteínas que se han encontrado diferenciales entre individuos sanos e individuos con ERC. La proteína WAP, no se encontró diferencial en cuando comparamos la etiqueta 116 (ERC2-) con la 113(C1) (tabla 13) aún así se incluyó para el estudio de validación por dar significación en las otras dos réplicas de estos grupos. Si a este estudio no le siguiese una fase de validación, esta proteína no la consideraríamos diferencial.

Tabla14. Ratios de las proteínas que se han encontrado diferenciales entre individuos sanos e individuos con ERC (ERC sin EAC asociada) en muestras de orina. Los ratios corresponden a la razón entre ERC/C, como se indica en la columna de la derecha.

Nombre	P valor	Factor de error (EF)	Ratios	Etiquetas
KNG1	0,0041	1,22	0,021	115/113
	0,003	1,41	0,023	116/113
	0,0024	1,22	0,018	115/114
	0,0016	1,40	0,018	116/114
CD59	0,0099	1,14	0,012	115/113
	0,0007	1,47	0,067	116/113
	0,0113	1,14	0,012	115/114
	0,0005	1,47	0,060	116/114
RBP4	0,0475	1,15	29,107	115/113
	0,0246	1,14	42,462	116/113
	0,0471	1,15	22,698	115/114
	0,0244	1,15	40,550	116/114
PIGR	0,0338	1,18	0,220	115/113
	0,007	1,11	0,666	116/113
	0,031	1,18	0,212	115/114
	0,0034	1,10	0,619	116/114
WAP	0,0023	1,44	0,035	115/113
	0,0624	1,51	0,278	116/113
	0,0022	1,44	0,034	115/114
	0,0456	1,51	0,244	116/114
B2MG	0,0003	1,16	1,870	115/113
	0,0017	1,15	18,197	116/113
	0,0003	1,18	1,786	115/114
	0,0016	1,16	16,143	116/114

Por otro lado se encontraron 4 proteínas diferenciales fueron encontradas entre los grupos ERC (ERC sin EAC asociada) y ERC+ (ERC con EAC asociada). Tres de ellas (NIDG1, AMBP y ZA2G) con significación única entre ERC+ y ERC, es decir que no resultaron estadísticamente significativas entre el grupo de individuos control y el grupo de individuos con ERC sin EAC asociada; y otra (KNG 1) con significación entre el grupo de individuos control y el grupo de individuos con ERC también resultó ser significativa entre estos grupos (ERC vs ERC+).

Tabla 15. Proteínas diferenciales encontradas en ERC+ (ERC con EAC asociada) y ERC (ERC sin EAC asociada) en muestras de orina. Resultado de comparar individuos control con individuos con ERC en el experimento iTRAQ LC MS/MS.

Cobertura de secuencia %	Nº de acceso	Nombre (Gen)	Especie	Péptidos (95%)
81,8	sp|P01042|KNG1_HUMAN	Kininogen-1 (GN=KNG1)	Humano	8
83,8	sp|P02760|AMBP_HUMAN	Protein AMBP (GN=AMBP)	Humano	25
78,5	sp|P14543|NID1_HUMAN	Nidogen-1 (GN=NID1)	Humano	2
81,9	sp|P25311|ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein (GN=AZGP1)	Humano	5

Respecto a la proteína AMBP, que no resultó estadísticamente significativa entre el grupo de individuos control e individuos con ERC sin EAC, se estudiará en los estudios de validación la comparación de estos dos grupos, ya que se ha relacionado en estudios anteriores de nuestro laboratorio con la enfermedad renal (105).

Tabla16. Ratios de las proteínas que se han encontrado diferenciales entre individuos con ERC+ (ERC con EAC asociada) e individuos con ERC (ERC sin EAC asociada) en muestras de orina. Los ratios corresponden a la razón entre ERC+/ERC, como se indica en la columna de la derecha.

Nombre	P valor	Factor de error (EF)	Ratios	Etiquetas
KNG1	0,0176	1,14	21,677	117/115
	0,14	1,72	17,378	117/116
AMBP	0,0072	1,06	1,432	117/115
	0,3933	1,01	1,056	117/116
NID1	0,0034	1,83	0,170	117/115
	0,0071	1,54	0,127	117/116
ZA2G	0,0389	1,14	3,531	117/115
	0,0081	1,15	2,089	117/116

Como la etiqueta 118 no pudo cuantificarse, el resultado sólo se puede expresar con la etiqueta 117 (ERC+1); es decir, sólo se comparó una muestra de ERC+ con dos réplicas de los individuos con ERC (115 y 116). Como se ha mencionado anteriormente, aunque el análisis se realizará con las dos etiquetas, debido a la diferente distribución en el SDS-PAGE de la etiqueta 116 (figura 16) Destacamos KNG 1 y AMBP que sólo resultaron estadísticamente significativas cuando la comparamos con la etiqueta 115 y no con la 116. Aún así se procedió a realizar los estudios de validación.

Se realizó otro análisis comparando las réplicas correspondientes a los grupos control y una mezcla de individuos ERC y ERC+, correspondientes a las etiquetas 119 y 121. Los resultados en la tabla 17.

Tabla 17. Ratios de las proteínas que se han encontrado diferenciales entre individuos sanos e individuos con una mezcla de individuos ERC y ERC+, correspondientes a las etiquetas 119 y 121 en muestras de orina. En color negro las proteínas significativas en ERC y en rojo las proteínas ERC+. Señalados en amarillo los datos no que cumplen criterios.

Nombre	P valor	Factor de error (EF)	Ratios	Etiquetas
KNG1	0,01	1,4	0,026	121/113
	0,01	1,4	0,020	121/114
	0,03	1,3	0,100	119/113
	0,0042	1,3	0,080	119/114
AMBP	0,012	1,02	1,090	121/113
	0,27	1,08	1	121/114
	0,04	1,01	1,050	119/113
	0,7	1,02	0,901	119/114
CD59	0,002	1,57	0,027	121/113
	0,0003	1,57	0,021	121/114
	0,01	1,2	0,012	119/113
	0,01	1,23	0,011	119/114
RBP4	0,02	1,14	40,553	121/113
	0,02	1,14	38,371	121/114
	0,02	1,1	38,011	119/113
	0,02	1,1	35,315	119/114
PIGR	0,009	1,16	0,467	121/113
	0,0084	1,16	0,429	121/114
	0,0031	1,11	0,554	119/113
	0,0014	1,11	0,516	119/114
WAP	0,0038	1,9	0,023	121/113
	0,0035	1,9	0,021	121/114
	0,0084	1,4	0,175	119/113
	0,0074	1,4	0,090	119/114
NID1	0,023	>2	0,120	121/113
	0,027	>2	0,140	121/114
	0,0039	>2	0,015	119/113
	0,0042	>2	0,015	119/114
ZA2G	0,13	1,6	15,411	121/113
	0,15	1,39	13,424	121/114
	0,08	1,3	28,316	119/113
	0,1	1,3	25,351	119/114

Las proteínas que dieron significación entre los grupos control y ERC (KNG1, CD59, RBP4, PIGR y WAP) tienen que dar significación en esta comparación descrita en la tabla y cumplir además la misma tendencia que cuando comparamos ERC (ERC sin EAC alterada. Las proteínas que dieron significación estadística entre los grupos ERC+ (ERC con EAC asociada) y ERC, en este análisis no dieron significación estadística. Éstas son, las proteínas (NID1 y ZA2G) que si dieron cuando comparamos los grupos ERC y ERC+. Se confirman así los datos obtenidos de NID1 y ZA2G, pues no se esperaba ninguna significación de estas dos proteínas entre individuos sanos y enfermos renales. Destacamos la significación de AMBP en esta comparación que en la que parece poco significativa. Aún así como hemos comentado se estudiará en la fase de validación entre el grupo control y el grupo ERC.

El resumen del resultado obtenido, respecto a las proteínas diferencialmente expresadas, es:

- Proteínas diferenciales en ERC: KNG1, CD59, PIRG y WAP, las cuales tienen los niveles más bajos en ERC y RBP4 la cual tiene sus niveles más altos en ERC.

- Proteínas diferenciales en ERC con EAC: KNG1, AMBP y ZA2G se encuentran con niveles más altos cuando está asociada la EAC a ERC. NID1 sin embargo, se encuentra con niveles más bajos cuando no hay EAC asociada.

Los péptidos de estas proteínas fueron identificados con 95% de confianza. Excepto en NID1 y WAP, que sólo fueron identificadas con dos péptidos, el resto fueron identificados por más de dos péptidos. Así tenemos a KNG1 con 8, CD59 con 9, RBP4 con 8, PIRG con 4, ZA2G con 5 y AMBP con 25 péptidos.

En las tablas 14 y 16 podemos ver dos comparaciones: unas proteínas relacionadas con ERC, como son KNG1, PIGR, CD59, RBP4 y WAP y otras proteínas relacionadas con EAC en pacientes con ERC, estas son AMBP, NID1 y ZA2G. KNG1 aparece asociada también a esta última situación. En los estudios de validación se confirmarán estos resultados. En la tabla 17 podemos ver todas las proteínas comparando todos los individuos con ERC (englobando en un mismo grupo ERC con y sin EAC asociada) frene al grupo control.

4.2. Fase de validación: Estudio de las proteínas alteradas en la Enfermedad Renal Crónica mediante LC-MS/MS MRM en muestras de orina.

Para confirmar los resultados de la fase de descubrimiento y ver realmente las proteínas asociados a ERC, se analizó un estudio con una cohorte independiente (23 individuos con ERC, 25 individuos sanos y 10 individuos con EAC asociada a ERC). Se quiso a la vez estudiar los estadios tempranos de la ERC, ya que en el estudio de metabolitos diferenciales resultaron ser significativos también a este nivel. Con una cohorte de 25 ERC inicial y 7 individuos con ERC inicial con EAC asociada, se procedió al análisis (tabla 6 en Material y Métodos), utilizando la tecnología de (LCMS/MS MRM). En los siguientes apartados se muestran, por separado: proteínas alteradas ERC sin EAC asociada frente a controles (apartado 4.2.1) y proteínas alteradas en ERC con EAC asociada (apartado 4.2.2).

4.2.1. Estudio de las proteínas diferenciales en Enfermedad Renal Crónica frente individuos control en orina.

Los datos de las proteínas obtenidos en la fase de validación por MRM se muestran en la tabla 18. En primer lugar aparece KNG 1 (figura 34). Esta proteína es claramente significativa mostrando bajos niveles en ERC en estadios avanzados. De las 6

transiciones estadísticamente significativas, con 4 de ellas obtenemos el mismo orden de magnitud en el ratio. Si comparamos los datos de los ratios entre ERC y Control, obtenidos en la fase de descubrimiento, estos son del orden de 10E-2. Además corresponde a dos péptidos diferentes en la secuencia de la proteína. Destacamos que en estadios iniciales no parece haber variación, aunque si mayor dispersión en las muestras individuales.

Tabla 18. Transiciones de las proteínas significativamente alteradas en individuos con ERC avanzada frente a individuos control e individuos con ERC inicial en muestras de orina.

Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	P valor	Ratio	P valor
KNG1	K.SLWNGDTGECTDNAYIDIQLRI	814.4->1010.5	0.016	<0.0001****	1.86	0.0172*
	R.DIPTNSPELEETLTHTITK.L	713.7->956.0	0.50	<0.0001****	-	-
		713.7->856.0	0.015	<0.0001****	-	-
		713.7->756.0	0.012	0.0001***	-	-
		713.7->637.7	0.003	<0.0001****	-	-
		1070.0->956.0	0.01	<0.0001****	-	-
Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	P valor	Ratio	P valor
CD59	K.TVLLLVTPFLAAAWSLHP	650.4->605.3	0.08	<0.0001****	-	-
		650.4->612.0	-	<0.0001****	-	-
		975.1->370.7	0.04	<0.0001****	-	-
Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	P valor	Ratio	P valor
RBP4	K.WVWALLLLAALGSGR.A	542.7->670.9	-	-	7.57	0.0012**
		813.5->995.6	-	-	13.6	0.0002***
		813.5->882.5	-	-	15.2	0.0024**
	K.GNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCR.L	898.4->1046.5	-	-	3.27	0.0027**
	R.LLNLDGTCADSYSFVFSR.D	689.0->905.5	-	-	21.4	0.0066**

Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	P valor	Ratio	P valor
PIGR	R.ANLTNFPENGTFVVNIAQLSQDDSG	936.5->961.0	0.0001	<0.0001****	-	-
	K.VPGNVTAVLGETLK.V	699.4->649.9	0.003	<0.0001****	-	-
		699.4->738.4	0.009	<0.0001****	-	-
	R.LSLLEEPGNGTFTVILNQLTSR.D	801.4->831.5	0.038	<0.0001****	-	-
	R.LDIQGTGQLLFSVVINQLR.L	705.4->736.4	0.0029	<0.0001****	-	-
		705.4->793.0	0.004	<0.0001****	-	-
Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	P valor	Ratio	P valor
2-β-MGB	R.SVALAVLALLSLSGLEAIQR.T	675.4->704.9	1.30	0.0118*	10.63	0.0029**
	K.SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK.N	852.1->899.4	1.24	0.0056**	-	-
Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC *vs* Control		ERCi *vs* Control	
		m1->m2	Ratio	P valor	Ratio	P valor
WAP	R.DQCQVDSQCPGQMK.C	840.8->848.4	0.012	0.0002***	-	-
		560.9->187.4	0.013	<0.0001****	0.68	0.012*
	K.EGSCPQVNINFPQLGLCR.D	697.0->821.4	0.012	0.0175*	-	-

Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC+ *vs* ERC-		ERCi+ *vs* ERCi-	
		m1->m2	Ratio	P valor	Ratio	P valor
AMBP	R.MTVSTLVLGEGATEAEISMTSTR.W	795.4->826.9	0.28	0.0043**	-	-
	R.AFIQLWAFDAVK.G	704.9->759.4	0.097	0.0095**	-	-
		704.9->830.5	0.10	0.0016**	-	-
		470.3->579.3	0.047	0.0081**	-	-
	R.EYCGVPGDGDEELLR.F	570.3->590.2	0.019	0.0025**	-	-
		570.3->550.8	0.020	0.0012**	-	-

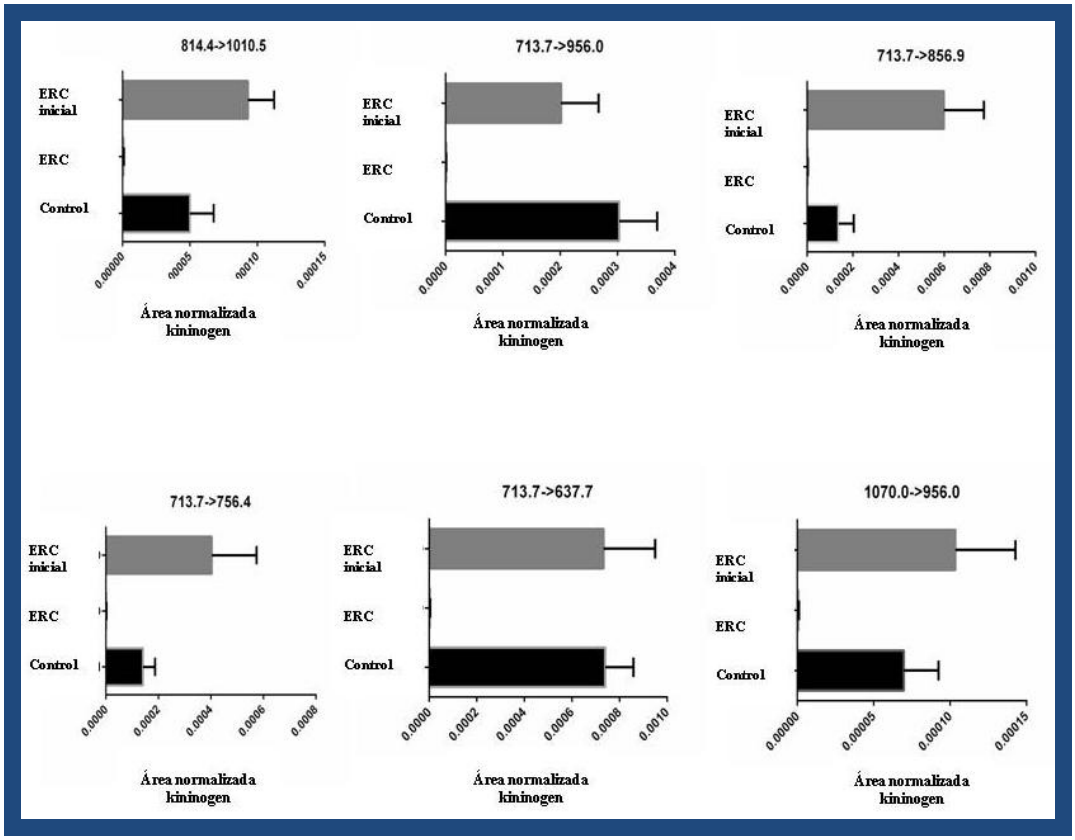

Figura 34. Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína KNG 1 donde se representan el grupo de individuos sanos (control), individuos con Enfermedad renal crónica en estadios avanzados (ERC) e individuos con Enfermedad renal crónica en estadios iniciales (ERC inicial).

En la tabla18 se muestran las transiciones de la glicoproteína CD59 (figura 35). Obtenemos como en el caso de KNG1, un descenso en los niveles de abundancia cuando la ERC ha llegado a sus estadios más avanzados. De las 3 transiciones estudiadas correspondientes al mismo péptido (tabla 18), las 3 resultaron estadísticamente significativas. Si comparamos los datos de los ratios entre ERC y Control, obtenidos en la fase de descubrimiento y los ratios obtenidos por el análisis por MRM (del orden de 10E-2) tienen concordancia, incluso dentro de la misma fase. Destacamos que en estadios iniciales no parece haber variación.

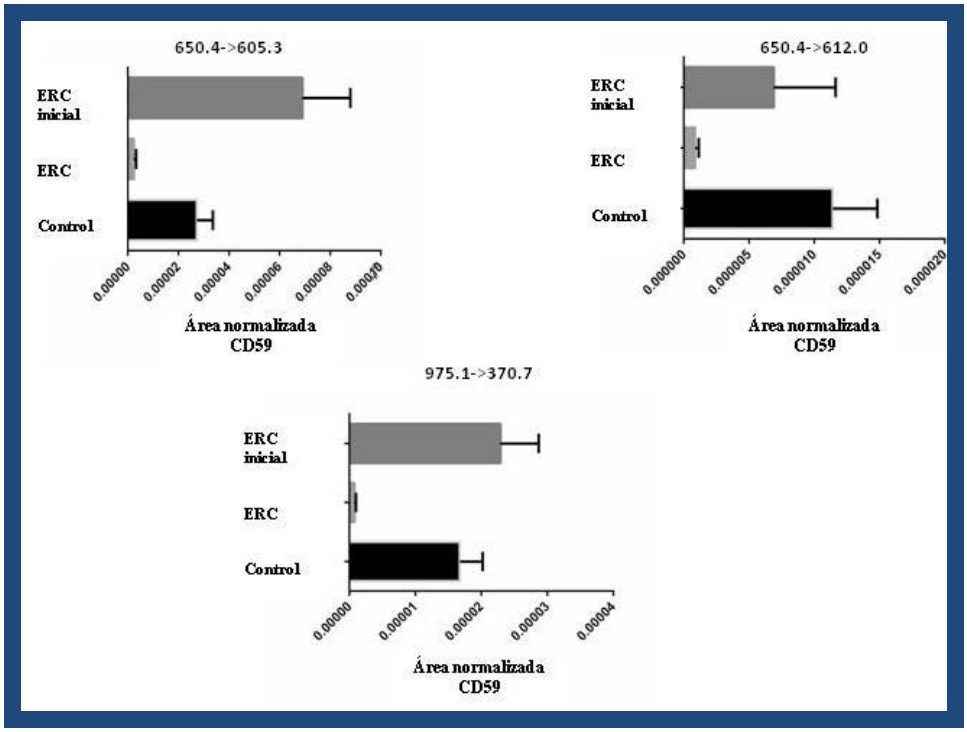

Figura 35.Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína CD59 donde se representan el grupo de individuos sanos (control), individuos con Enfermedad renal crónica en estadios avanzados (ERC) e individuos con Enfermedad renal crónica en estadios iniciales (ERC inicial).

A pesar de que la proteína, Retinol-binding protein 4 (figura 36 y tabla 18), resultó significativa en el estudio diferencial con marcaje con iTRAQ, por MRM en un grupo adicional de pacientes tanto en estadios tempranos como en avanzados, nos encontramos que en los estadios más avanzados de la enfermedad, la proteína cumplía la tendencia esperada pero sin significación estadística. Este hecho se atribuye a la alta variabilidad entre individuos en la nueva cohorte. Estas diferencias no se aprecian en el estudio de iTRAQ porque no se estudian los individuos de forma individual, compensando diferencias de unos con otros. Por ello al realizar el estudio por MRM, donde se estudian los individuos por separado, la variabilidad influye más en el análisis. Sin embargo, al contrario que las anteriores proteínas, en los comienzos de la disfunción renal, existe una variación respecto al grupo control, aumentado significativamente sus niveles en la orina. Obtuvimos datos de 5 transiciones de 3 péptidos diferentes en la proteína (tabla 18). El hecho de que de una significación en 3 péptidos diferentes en la secuencia es una garantía de la validez de los datos en esta proteína.

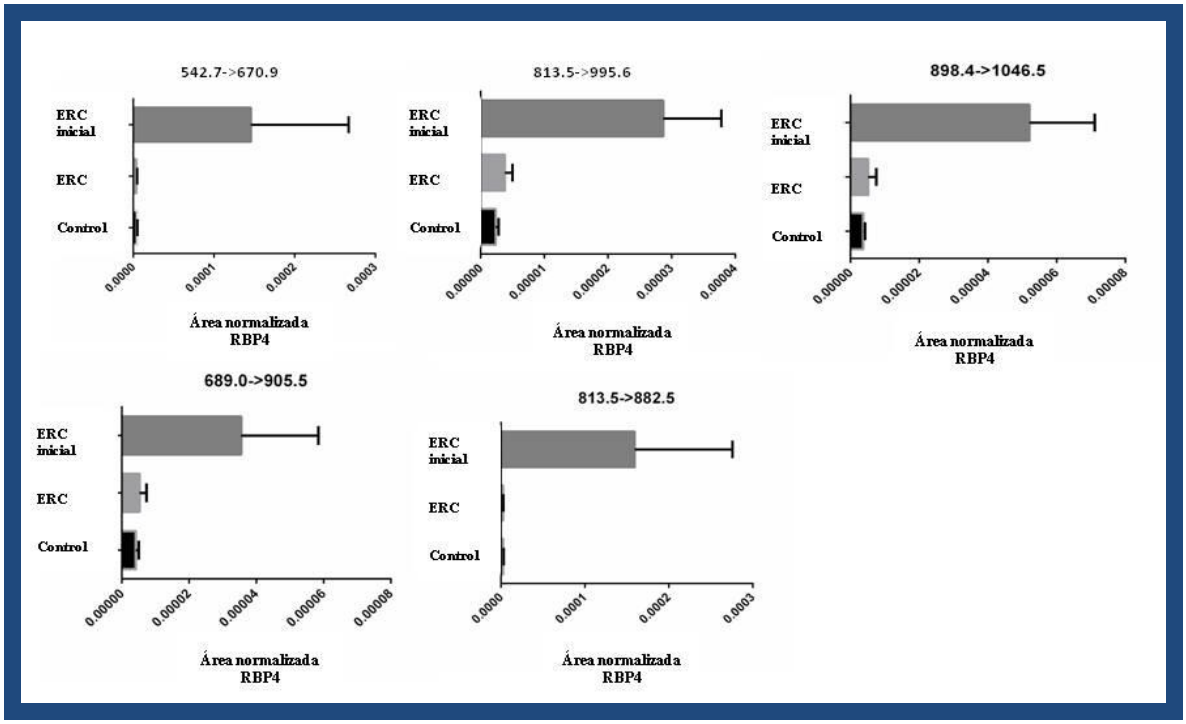

Figura 36. Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína RBP4 donde se representan el grupo de individuos sanos (control), individuos con Enfermedad renal crónica en estadios avanzados (ERC) e individuos con Enfermedad renal crónica en estadios iniciales (ERC inicial).

PIGR (figura 37), con 6 transiciones significativas, correspondientes a 4 péptidos diferentes en la secuencia de la proteína, muestra un comportamiento similar a las proteínas KNG1 y a la glicoproteína CD59. De las 6 transiciones significativas, 4 de ellas muestran un comportamiento similar en los ratios entre ERC y Control (tabla18) No existe coherencia con los ratios en la fase de descubrimiento con un orden de magnitud mayor cuando lo calculamos con la etiqueta 115 (tabla 17).

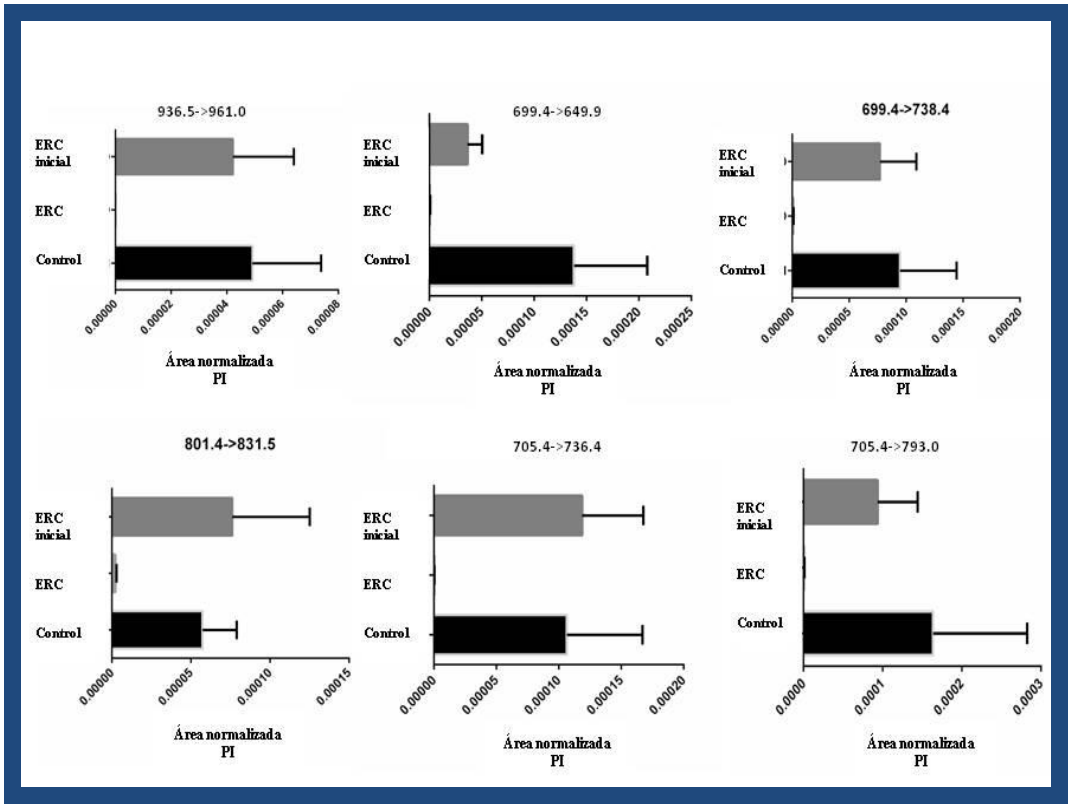

Figura 37.Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína PIGR donde se representan el grupo de individuos sanos (control), individuos con Enfermedad renal crónica en estadios avanzados (ERC) e individuos con Enfermedad renal crónica en estadios iniciales (ERC inicial).

WAP, "Whey acidic proteins", (figura 38), con 3 transiciones significativas de dos péptidos diferentes (tabla 18), confirma lo encontrado en la fase de descubrimiento. Además en esta fase existe una coherencia en los ratios entre ERC y Control. Comparados con los ratios de descubrimiento observamos que hay coherencia cuando lo miramos con la etiqueta 115. Añadimos que el resultado encontrado en individuos en estadios iniciales de ERC refleja la evolución de la propia enfermedad, aunque sólo es estadísticamente significativa en una transición (560,9->187,4). Así pues, los niveles van disminuyendo según va descendiendo el filtrado glomerular.

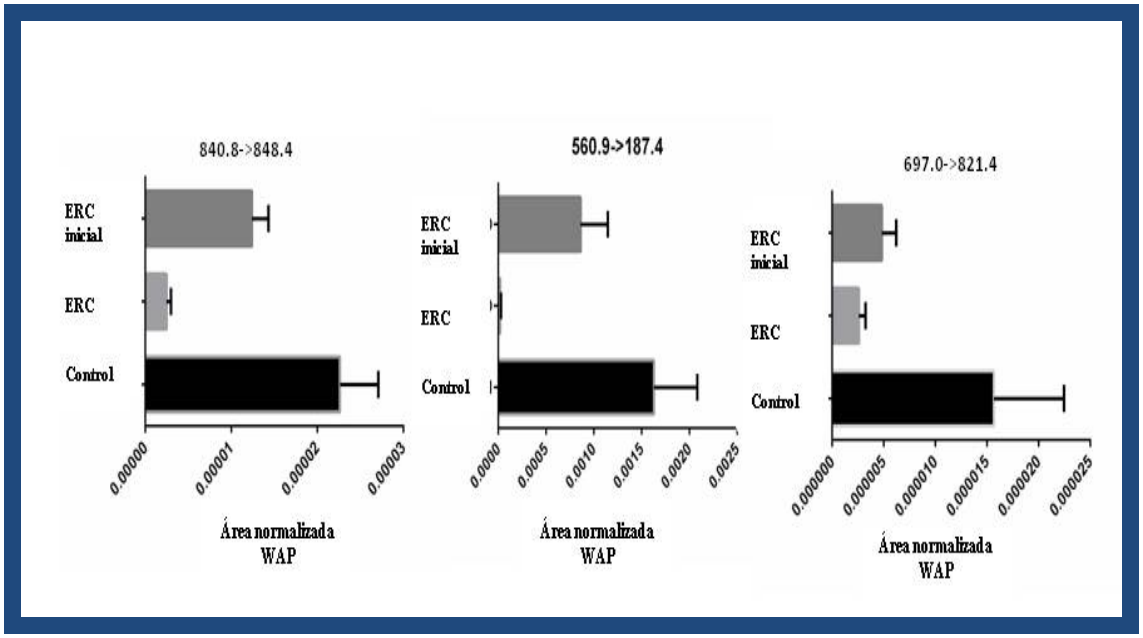

Figura 38. Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína WAP donde se representan el grupo de individuos sanos (control), individuos con Enfermedad renal crónica en estadios avanzados (ERC) e individuos con Enfermedad renal crónica en estadios iniciales (ERC inicial).

Como caso especial estudiaremos la relación de la proteína AMBP en la ERC (tabla 18 y figura 39). En la fase de validación no resultó estadísticamente significativa cuando se comparaban individuos sanos con individuos con ERC. Aún así el valor de los ratios entre ERC y Control en la fase de descubrimiento, nos indica que esta proteína tiene sus niveles aumentados en individuos control. Estudios previos en nuestro laboratorio, nos muestran los niveles de esta proteína elevados en individuos control frente a individuos con ERC diabéticos y no diabéticos en orina humana (datos no mostrados en este estudio). Sin embargo en estudios en exosomas extraídos de orina humana de individuos con ERC diabéticos (estudios también de nuestro grupo), se identificó como proteína débilmente significativa en el grupo de pacientes (105). Aquí hipotetizamos que la Diabetes Mellitus era una variable más que estaba enmascarando el resultado real por sus complicaciones vasculares, dado que esta proteína resultó ser estadísticamente significativa cuando comparamos ERC sin EAC asociada con el grupo ERC con EAC asociada (resultados que se muestran en el siguiente apartados 4.2.2). Los resultados en las muestras de este trabajo se muestran en la figura 39.

La proteína se encuentra en niveles más bajos en individuos con ERC avanzada. Estos resultados son coherentes con lo encontrado en la fase de descubrimiento donde aunque no con significación se encuentra con esta tendencia. En los estadios iniciales ya se encuentra cierta tendencia a bajar los niveles de abundancia.

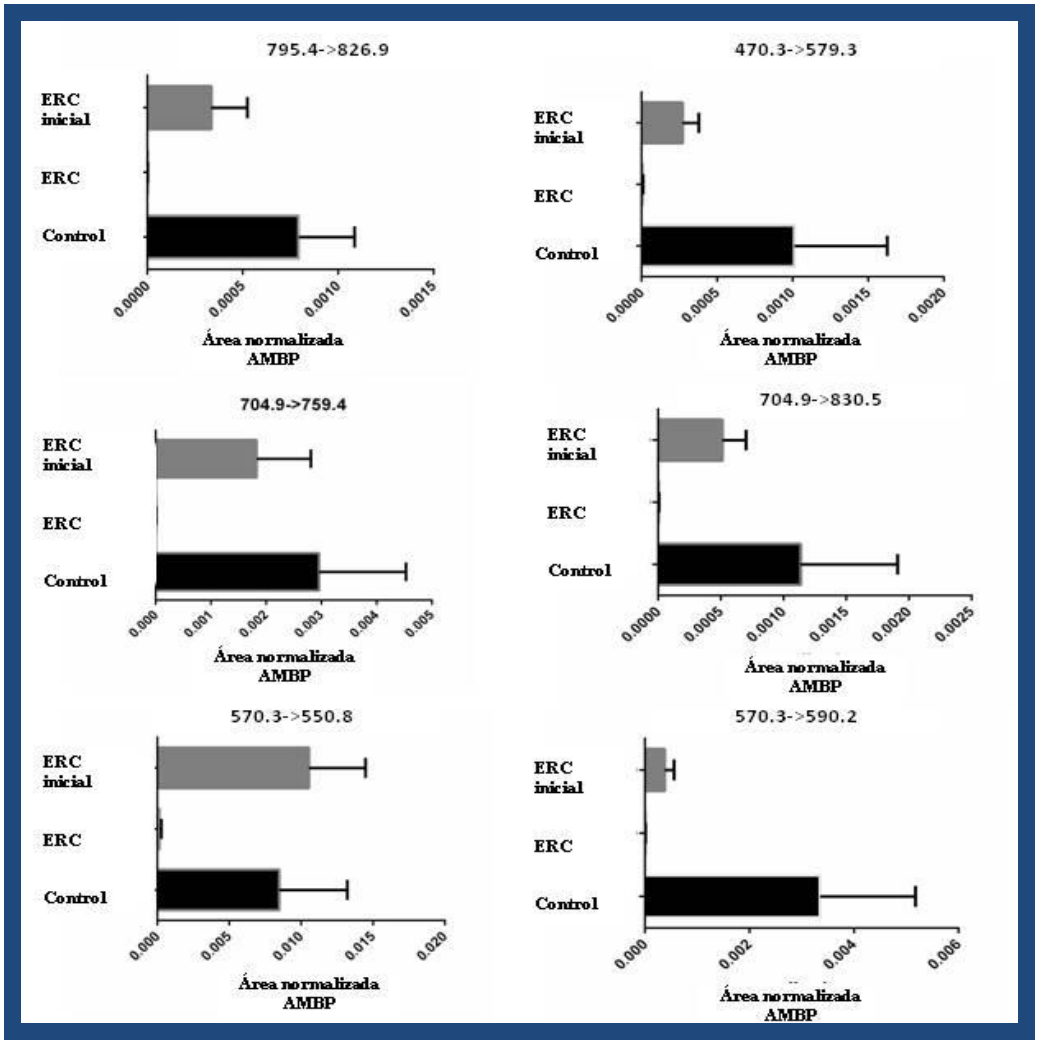

Figura 39. Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína AMBP donde se representa el grupo de individuos sanos (control), individuos con Enfermedad renal crónica en estadios avanzados (ERC) e individuos con Enfermedad renal crónica en estadios iniciales (ERC inicial).

La proteína β-2-microglobulina (figura 40 y tabla 18) está ampliamente descrita en la literatura asociada al fracaso renal. La consideramos como control positivo, analizamos dos transiciones y el resultado es el descrito, aumentando sus niveles de abundancia en ERC. Esto nos proporciona una garantía del éxito del estudio.

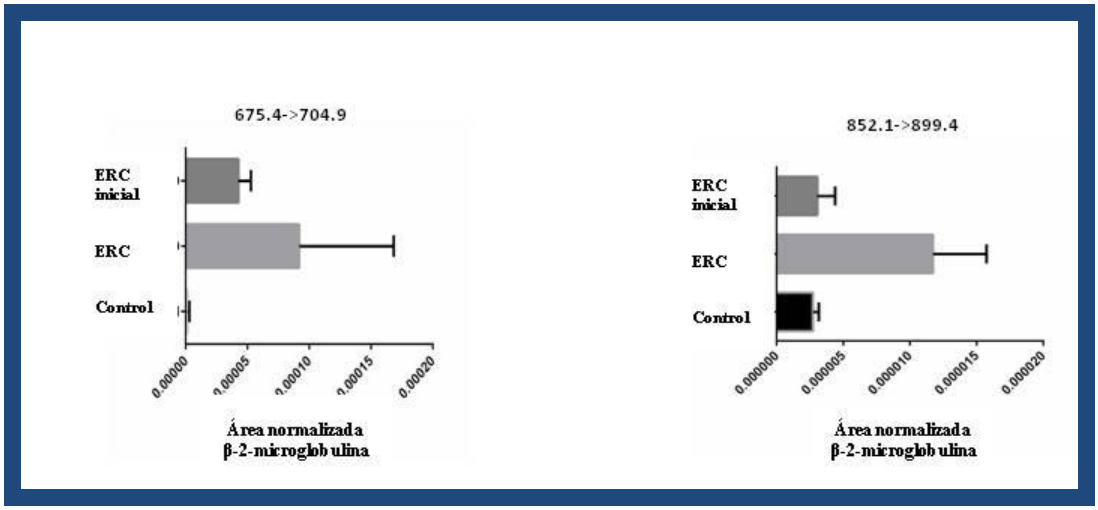

Figura 40.Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína β-2-microglobulina donde se representan el grupo de individuos sanos (control), individuos con Enfermedad renal crónica en estadios avanzados (ERC) e individuos con Enfermedad renal crónica en estadios iniciales (ERC inicial).

En resumen, tenemos las proteínas KING1, CD59, PIGR, WAP y AMBP que muestran sus niveles disminuidos en ERC en orina. Ninguna de ellas es significativa cuando hablamos de los primeros estadios de la ERC, salvo WAP con una de las transiciones, siendo un dato escaso para dar un veredicto favorable. RBP4, sin embargo, ve sus niveles aumentados solo es los primeros estadios de la ERC, sin resultar significativo es estadios avanzados.

4.2.2. Estudio de las proteínas diferenciales en Enfermedad Renal Crónica con Enfermedad Arterial Coronaria asociada en muestras de orina.

Al estudiar la relevancia de las proteínas diferenciales en ERC con EAC asociada (ERC+) frente a ERC sin EAC asociada (ERC-), se confirmó NID1, con 4 transiciones encontradas significativamente disminuidas en ERC+. ZA2G confirma su variación con 2 transiciones significativas. Estas dos proteínas son las únicas que sólo dan significación en EAC dentro de ERC (ERC+), sin dar en ERC frente al grupo control (datos descubrimiento). Las otras dos estudiadas son KNG1 y AMBP. Esta última no mostró significación en ERC cuando se comparaba con el grupo control en la fase de descubrimiento, pero si resultó que estaba alterada en ERC frente al grupo control en esta fase de validación. Las dos mostraron significación cuando comparamos ERC con EAC asociada (ERC+) frente a ERC sin EAC asociada (ERC).

En este aparatado llamaremos ERC cuando no hay EAC asociada para diferenciarla de ERC+ cuando hay EAC asociada, tal y como se hizo en el estudio de los metabolitos diferenciales.

Tabla 19.Transiciones de las proteínas significativamente alteradas en individuos con ERC avanzada con EAC asociada (ERC+) frente a individuos con ERC avanzada sin EAC asociada (ERC-), a la izquierda. A la derecha, individuos con ERC inicial con EAC asociada (ERCi+) frente a individuos con ERC inicial sin EAC asociada (ERCi-).

Proteína	Secuencia péptido	Transición	ERC+ *vs* ERC-		ERCi+ *vs* ERCi-	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
KNG1	K.SLWNGDTGECTDNAYIDIQLR.I	814.4->1010.5	11.57	<0.0001****	-	-
	R.DIPTNSPELEETLTHTITK.L	713.7->956.0	3.87	0.0036**	-	-
		713.7->856.0	3.85	0.0002***	-	-
		713.7->756.0	3.09	0.0033**	-	-
		713.7->637.7	5.79	0.0005***	-	-
		1070.0->956.0	9.04	0.0005***	-	-
Proteína		Transición	ERC+ *vs* ERC-		ERCi+ *vs* ERCi-	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
NING1	R.QDLGSPEGIAVDHLGR.N	555.3->696.4	0.1	0.0016**	0.28	0.0229*
		555.3->727.3	0.12	0.007**	0.15	0.0002***
	K.ALEGLQYPFAVTSYGK.N	582.0->485.3	0.11	0.0127*	0.18	0.0012**
		582.0->612.3	0.14	0.0013**	0.18	0.0028**
Proteína		Transición	ERC+ *vs* ERC-		ERCi+ *vs* ERCi-	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
ZA2G	K.HVEDVPAFQALGSLNDLQFFR.Y	801.7->580.3	9.28	0.0091**	2.12	0.012*
		801.7->608.7	9.24	0.001**	2.57	0.0115*
Proteína		Transición	ERC+ *vs* ERC-		ERCi+ *vs* ERCi-	
		m1->m2	Ratio	Pvalor	Ratio	Pvalor
AMBP	R.MTVSTLVLGEGATEAEISMTSTR.W	795.4->826.9	0.005	0.0357*	-	-
		795.4->1031.5	0.02	0.035*	-	-
	R.AFIQLWAFDAVK.G	704.9->830.5	0.013	0.035*	-	-
	R.EYCGVPGDGDEELLR.F	570.3->590.2	0.07	0.035*	-	-

Cuando se estudiaron los datos de la fase de descubrimiento, se observó que no había significación entre ERC frente al grupo control, como se ha mencionado anteriormente. Así en esta fase de validación no se realizó dicha comparación.

Comparamos proteínas diferenciales entre ERC+ frente a ERC, es decir, las proteínas que puedan resultar diferenciales en EAC dentro de ERC. Se estudiará comparando los estadios avanzados de la ERC (IV-V) con y sin EAC y por otro lado los estadios iniciales de ERC (I-II) con y sin EAC, con el fin de que la ERC no influya en el análisis y sólo ver la variable de EAC. Si se cumple con independencia de la ERC, podemos decir que están asociadas a EAC, naturalmente esperando experimentos de mayor número en individuos.

Nidogen1 (figura41), muestra una coherencia y concordancia de ratios entre ERC+ y ERC, en las dos fases, tanto en descubrimiento como en validación. Aún así supone una garantía que 4 transiciones estudiadas (tabla 19), cuando comparamos el grupo con ERC sin EAC asociada y el grupo de ERC con EAC asociada, fueran significativas dando niveles disminuidos de abundancia en individuos con EAC asociada. En los estadios iniciales, el resultado también es coherente con lo esperado para 4 transiciones estudiadas que resultaron ser significativas en estadios avanzados (figura 42 y tabla 19).

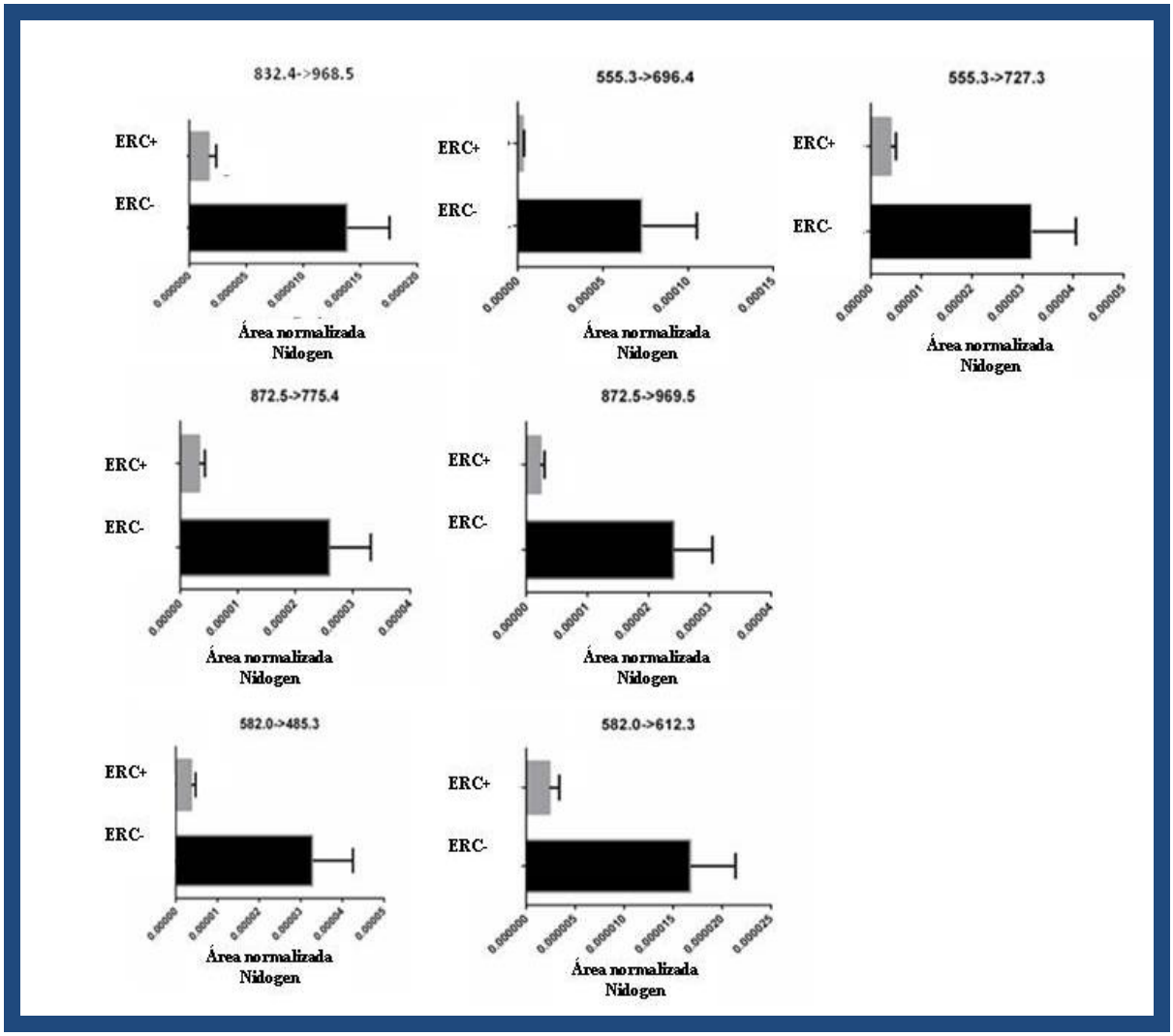

Figura 41.Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína NID1 donde se representan el grupo de individuos con ERC en estadios avanzados sin EAC (ERC-) e individuos con ERC en estadios avanzados con EAC asociada (ERC+).

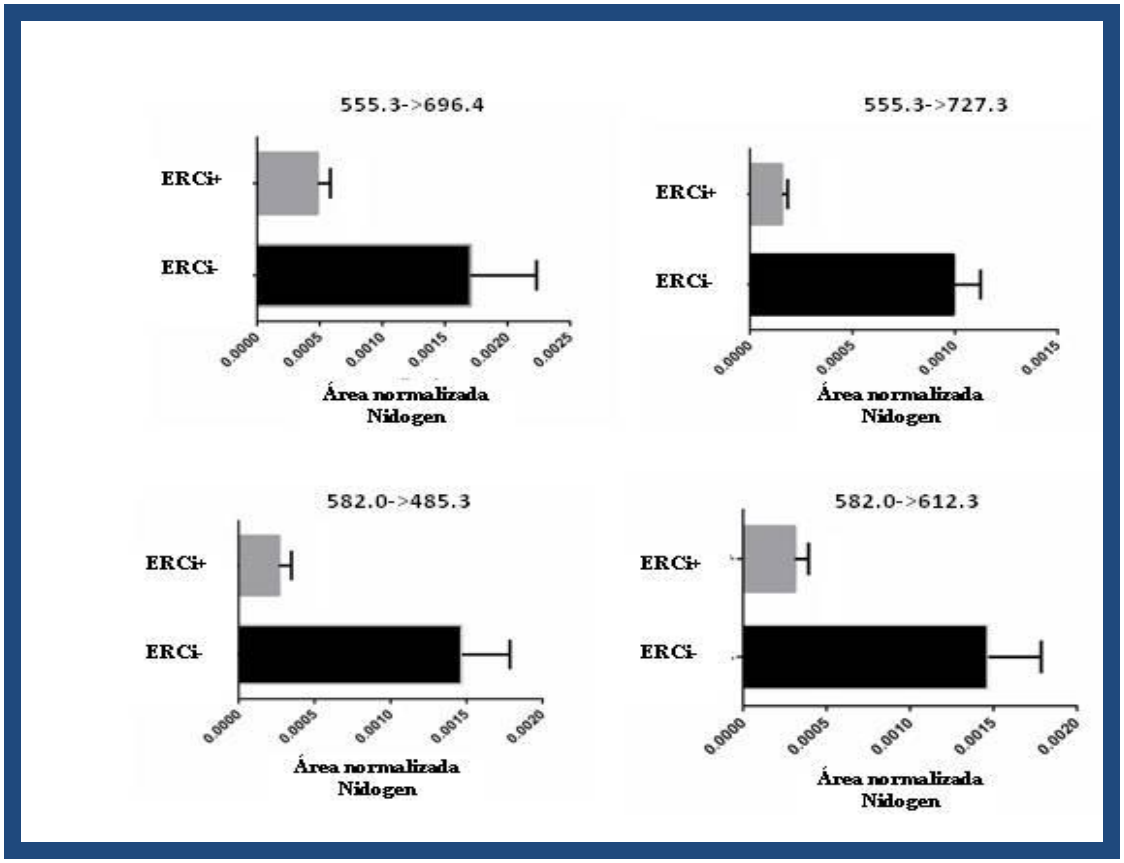

Figura42.Transiciones obtenidas por mediante LC MS/MS MRM en muestras de orina de la proteína NID1 donde se representan el grupo de individuos con ERC en estadios iniciales sin EAC (ERCi-) e individuos con ERC inicial con EAC asociada (ERCi+).

ZA2G (figura 43) encuentra sus niveles aumentados cuando EAC está asociada a ERC (ERC+) con 2 transiciones significativas (tabla19). Las otras 3, mostradas en la figura 44 siguen la misma tendencia, pero no son estadísticamente significativas. Las mismas que dieron significación en avanzados (ERC+) resultaron significativas en iniciales (ERCi+). La coherencia de ratios entre ERC+ y ERC, se mantiene.

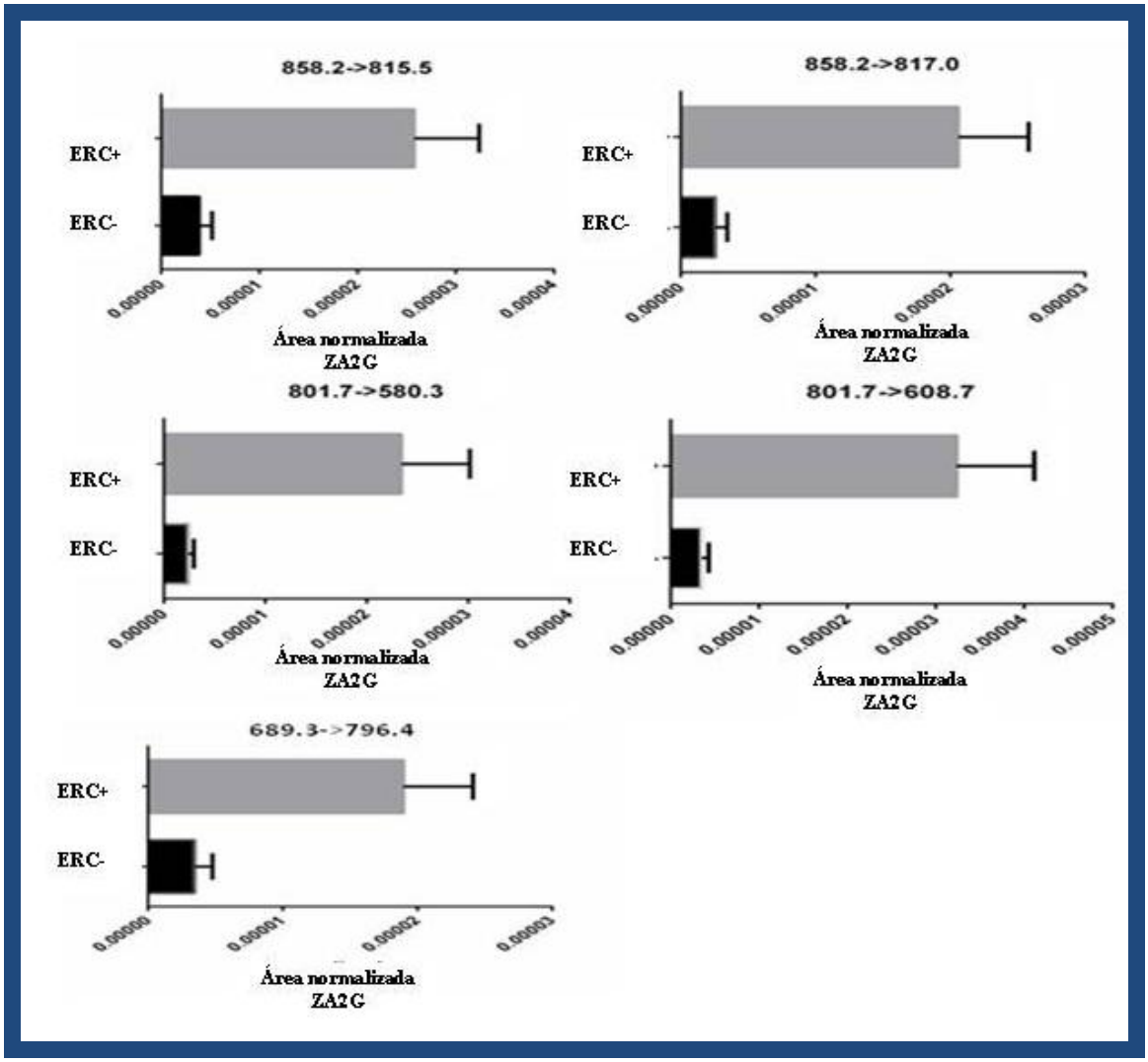

Figura 43.Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína ZA2G donde se representan el grupo de individuos con ERC en estadios avanzados sin EAC (ERC-) e individuos con ERC con EAC asociada (ERC+).

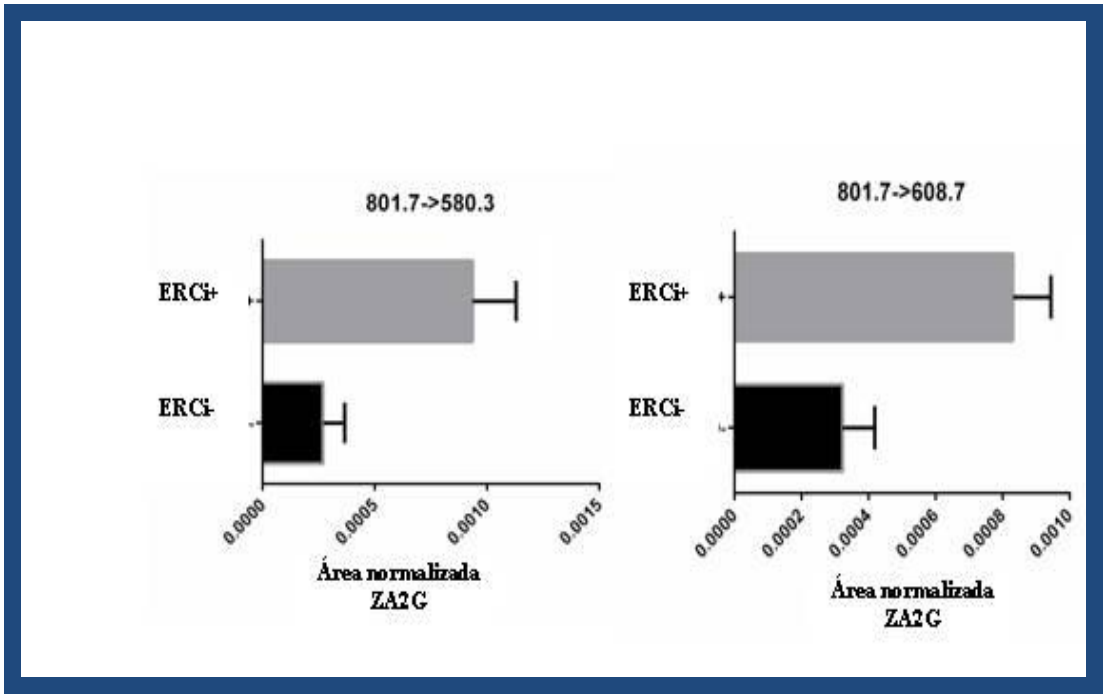

Figura 44.Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína ZA2G donde se representan el grupo de individuos con ERC en estadios iniciales sin EAC (ERC-) e individuos con ERC inicial con EAC asociada (ERC+).

KNG1 (figura45), con 6 transiciones significativas entre estos dos grupos, con 2 péptidos y 6 transiciones encuentra sus niveles aumentados cuando hablamos de ERC+. De igual modo existe una coherencia de ratios entre ERC+ y ERC.

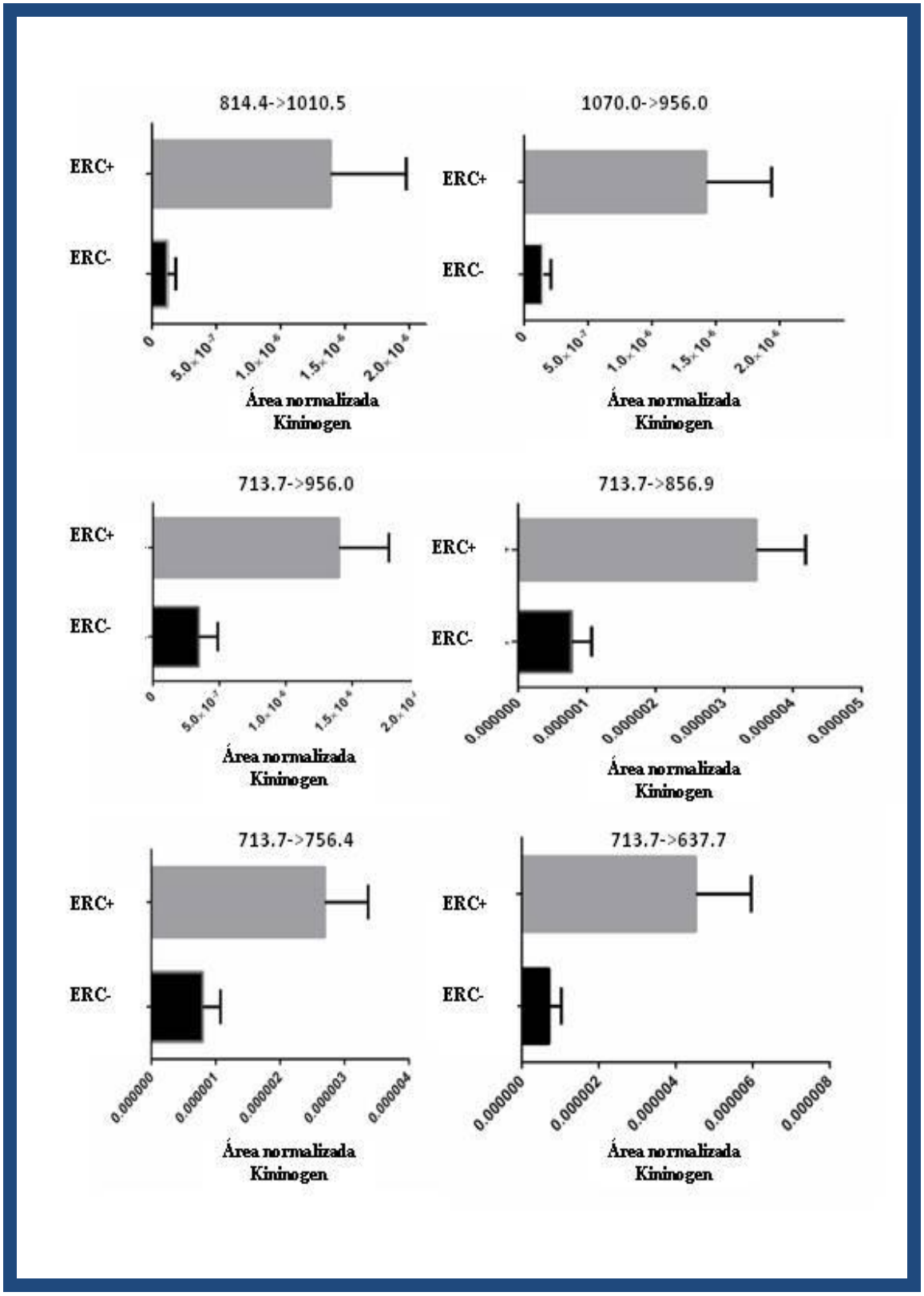

Figura 45.Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína KNG1 donde se representan el grupo de individuos con ERC en estadios avanzados sin EAC (ERC-) e individuos con ERC con EAC asociada (ERC+).

AMBP (figura 46), 4 transiciones significativas entre estos dos grupos, sus niveles aumentados cuando hablamos de ERC+. Con coherencia entre los ratios entre ERC+ y ERC, en la fase de descubrimiento y en la fase de validación.

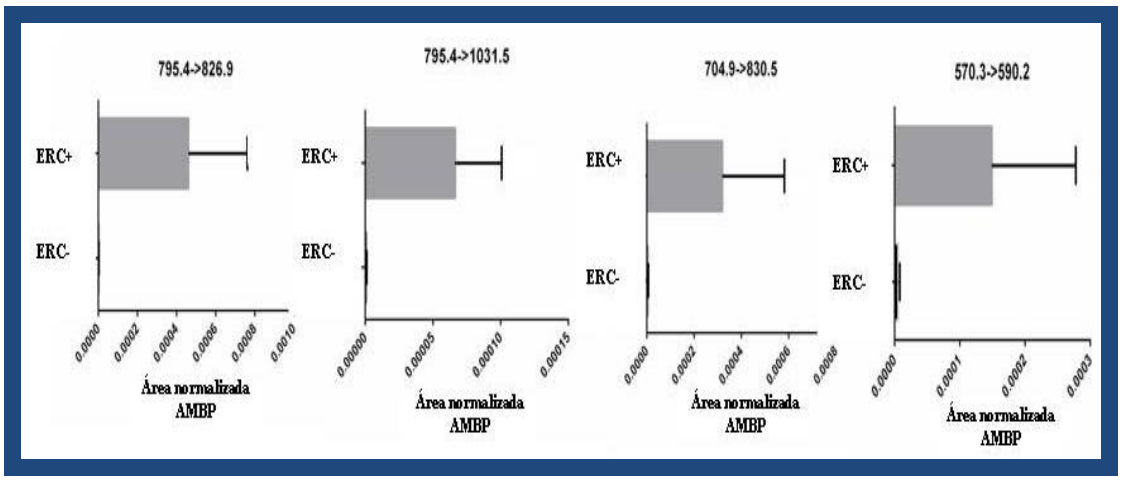

Figura46. Transiciones obtenidas mediante LCMS/MS MRM en muestras de orina de la proteína AMBP donde se representan el grupo de individuos con ERC en estadios avanzados sin EAC (ERC-) e individuos con ERC con EAC asociada (ERC+).

Ninguna de las dos proteínas AMBP ni KNG1resultaron significativas en los primeros estadios de la ERC.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) encierra procesos fisiopatológicos con múltiples causas y cuya consecuencia es la pérdida inexorable del número y funcionamiento de nefronas. La mortalidad de estos individuos viene por 50% por complicaciones cardiacas, por 25% infecciones y por 6% complicaciones cerebrovasculares. Esto lleva a los investigadores a realizar multitud de estudios para encontrar las causas que pueden llevar a ello y así poder ofrecer a los nefrólogos realizar un buen diagnóstico, una buena prognosis por si se pudiera combatir y unas dianas para los posibles fármacos.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se abordan una serie de estudios que se esquematizan a modo de resumen en la siguiente figura 1.

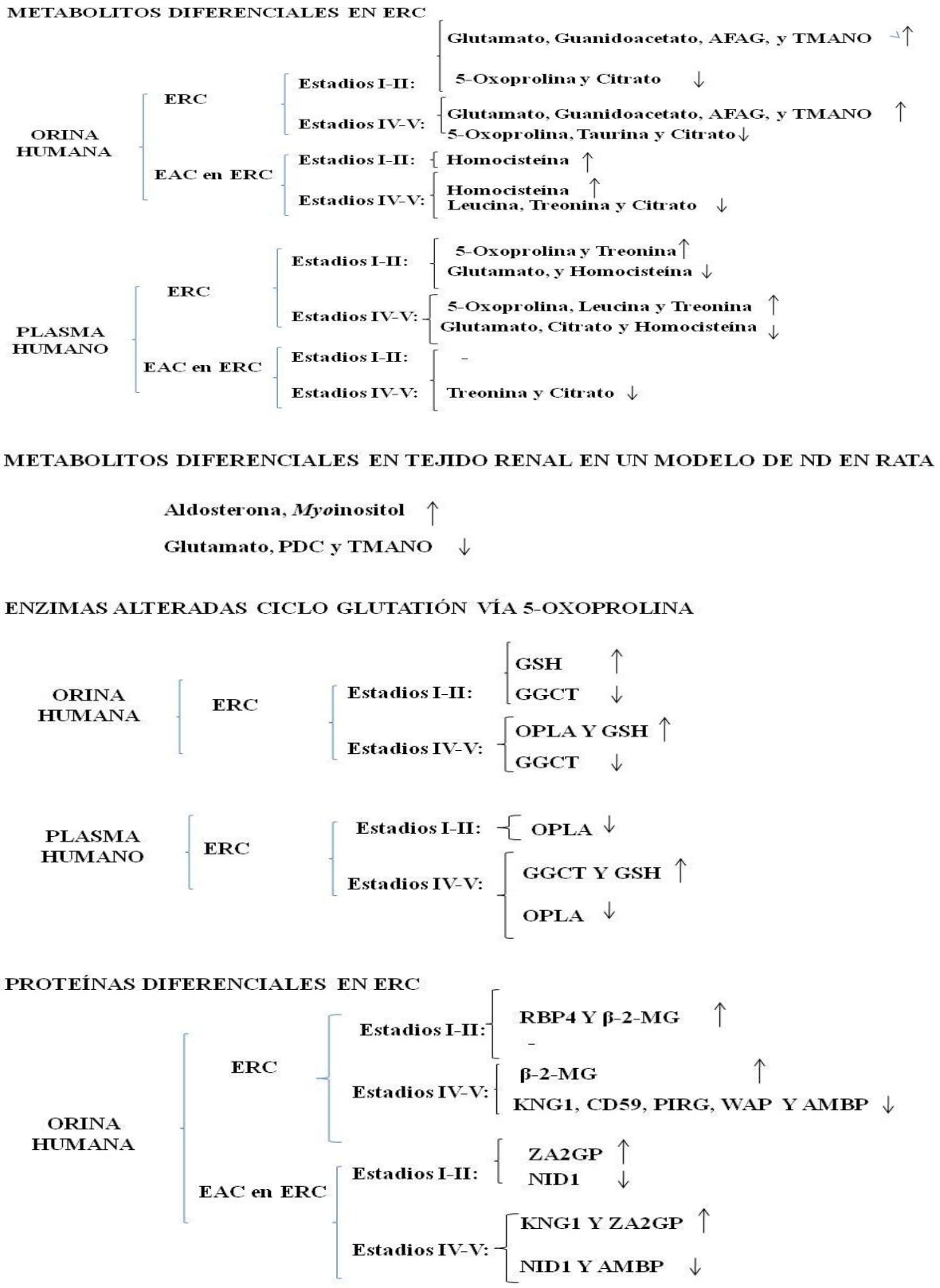

Figura 1. Esquema de los resultados obtenidos a lo largo de la tesis doctoral donde sólo se muestran los metabolitos y proteínas los cuales fueron significativos en los estudios presentados en este trabajo.

1. **Estudio de los metabolitos asociados a la Enfermedad Renal Crónica en muestras orina y plasma.**

En este trabajo se estudiaron los metabolitos de la orina y plasma en pacientes con ERC en todos los estadios de la enfermedad. Primero en estadios más avanzados y a continuación en los estadios más tempranos, con el fin de encontrar metabolitos que pudieran estar asociados a esta patología. En la orina de los casos más avanzados se encontraron 7 metabolitos que respondían a la ERC. Estos metabolitos son 5-Oxoprolina, Glutamato, Guanidoacetato, alfa-Fenilacetilglutamina (AFAG), Taurina, Trimetilamina-N-oxido (TMANO) y Citrato. Excepto la Taurina, todos los demás respondían en los estadios iniciales de la ERC. Concretamente la 5-Oxorolina y el Glutamato son dos de los metabolitos que muestran gran significación en ERC en todos los estadios frente a los controles sanos. Ambos metabolitos están relacionados directamente en el catabolismo del Glutatión vía 5-oxoProlina (106). El Glutamato, además, es un intermedio del metabolismo de la Glutamina. En este proceso, en el cual se produce ión amonio ayuda a controlar el equilibrio ácido-base (107). Debido a la disfunción renal, muchos pacientes con ERC presentan acidosis metabólica, es pues lógica la presencia de altos niveles de Glutamato debido al posible descontrol acido-base del organismo en estos pacientes. De hecho, si se representan los niveles de Glutamato encontrado en orina frente a filtrado glomerular (FG) se obtiene una línea de tendencia polinómica (U invertida). Esto nos indica que el incremento de Glutamato para un FG intermedio podría estar compensando moderadamente, pero para un FG<30 sin embargo, esta compensación puede no ser suficiente. Al no ser suficiente los niveles de Glutamato aumentarían según baja la función renal (datos no mostrados). Hemos de destacar que 5-Oxoprolina y Glutamato varían al contrario en un fluido que en el otro. Esto es, en orina 5-Oxoprolina disminuye sus niveles y Glutamato los aumenta en ERC; en el plasma tenemos la situación contraria (ver figura 1). Esto indica una activación del ciclo que comparten (catabolismo del Glutatión) en el que se ahondará posteriormente en el estudio de las enzimas que catalizan dichas reacciones.

La alfa-Fenilacetilglutamina (AFAG) es producto de la conjugación del Fenilacetato y Glutamina. Si se sigue el mecanismo de acción del profármaco Fenilbutirato puede explicar la función endógena de este metabolito. El Fenilbutirato de sodio es un profármaco que se betaoxida en Fenilacetato (compuesto metabólicamente activo) en el hígado y en el riñón. Este compuesto se conjuga enseguida con la Glutamina para formar la Fenilacetilglutamina que se excreta en la orina. El Fenilbutirato (fenilacetato) es un medicamento huérfano que está indicado en los trastornos del ciclo de la Urea, ya que permite reducir las concentraciones plasmáticas elevadas de amoníaco y de Glutamina (108). Así podemos entender porque AFAG endógeno ayuda a eliminar el amonio tóxico para el cuerpo, resultado de la desaminación proteica. En la ERC la urea se acumula como resultado del fracaso renal, para poder eliminar la Urea y el amonio se necesita esta transformación. Esto podría explicar el incremento de AFAG observado en la orina de estos pacientes, el cual favorece la excreción de nitrógeno (109). Otro metabolito que ayuda a eliminar nitrógeno del organismo fue Trimetilamina-N-oxido

(TMANO) fue encontrado asociado a fracaso renal en concentraciones altas en orina (110), igual que en nuestro caso en ERC en todos los estadios estudiados. TMANO es un osmolito, estabilizador de proteínas, que el cuerpo utiliza para contrarrestar los efectos de las altas concentraciones de Urea y Guanidina (fuerte desnaturalizante de proteínas) (111;112). Tal y como se dijo con AFAG, este osmolito puede estar ayudando a contrarestar los efectos del cúmulo de nitrógeno.Tanto el TMANO como Trimetilamina (TMA) (compuesto en el que se descompone) se estudiaron en pacientes tanto en la prediálisis como después de las sesiones de diálisis, encontrándose en concentraciones más altas en plasma en pacientes en prediálisis y bajando esa concentración después de la sesión de hemodiálisis (113). En nuestro caso, no se encontraron diferencias significativas en plasma pero si un aumento de TMANO en los niveles de orina de individuos con ERC tanto en estadios iniciales como cuando la ERC está establecida. Estos datos encontrados están justificados con lo hallado en bibliografía, ya que el hecho de que existan altos niveles de TMANO en la orina y no en el plasma, puede indicarnos que se está produciendo una buena eliminación de nitrógeno en el organismo.

No es raro encontrar Guanidoacetato con niveles aumentados en orina tanto en los estadios más avanzados de la ERC como en los estadios iniciales. Este metabolito del ciclo de la Urea, que también está implicado en el metabolismo de algunos aminoácidos como Glicina, Serina, Treonina, Arginina y Prolina, es precursor de la Creatina (ácido metilguanidoacético) y es esencial para el metabolismo energético del músculo. Es un producto del metabolismo del nitrógeno (ciclo Urea) que tiende a acumularse en el organismo en el caso de la insuficiencia renal (111). Los altos niveles de este metabolito nitrogenado en individuos con ERC frente a control nos pueden estar indicando un cúmulo del mismo en el organismo. No podemos justificar estos datos porque los niveles en plasma de Guanidoacetato no fueron estadísticamente significativos cuando se compara individuos con ERC frente a control sano.

La Taurina aunque en principio es un aminoácido esencial, puede ser sintetizada por el ser humano a partir de la cisteína siempre que esté presente la vitamina B6. La Taurina que facilita el transporte de iones como sodio, potasio, calcio y magnesio, está presente en muchos órganos, entre ellos el riñón, en el cual desempeña un papel importante en el equilibrio electrolítico de éste. Si hay fracaso renal con el consecuente desequilibrio iónico, se tendría que apreciar un desequilibrio también en la concentración de Taurina tanto en el plasma como en la orina. En este estudio, en los estadios avanzados de la ERC, se encontró disminuida la concentración de Taurina, sin embargo en los estadios iniciales en orina aunque se aprecia una tendencia al descenso de los niveles, no hay una significación importante. Bajos niveles de Taurina han sido encontrados en plasma de pacientes con insuficiencia renal (114-117). A la vez la Taurina ha sido encontrada en variedad de condiciones al tener un papel importante en muchos procesos metabolicos. En este estudio no se llegó a encontrar alterada con una significación importane en plasma. Destacamos que el ácido Glutámico, ya mencionado anteriormente, inhibe el metabolismo de la Taurina (118;119). Según nuestro datos, cuando aumenta el

Glutamato, desciende la Taurina, este resultado podría corroborar este hecho, ya que si la Taurina en inhibida es lógico encontrar bajos sus niveles de abundancia en orina.

Es sabido el desequilibrio ácido-base que presentan los individuos con ERC, por la pérdida de la función renal. En este trabajo se ve una reducción de los niveles de Citrato en pacientes con ERC tanto en plasma como en orina, esto lo atribuimos al efecto protector de las sales de Citrato en el riñón (120). Los cambios en el pH intracelular promueven la acidosis, alterando los niveles de Citrato, por lo tanto no es extraño encontrarlo también alterado en orina en los estadios iniciales de la ERC.

Es interesante observar que los datos normalizados por los niveles de Creatinina en orina (área metabolito/ área de Creatinina de cada muestra individual) confirma estas variaciones anteriormente descritas en 5-Oxoprolina, Glutamato, Guanidoacético, Citrato y TMANO (estos datos no son mostrados en este estudio).

2. Metabolitos indicadores de la Enfermedad Arterial Coronaria asociada a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina y plasma.

Los cambios en plasma y/o orina del metaboloma en respuesta a la Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) y a la Enfermedad Renal Crónica (ERC) han sido estudiados anteriormente de forma independiente (121;122). En este trabajo se aborda la EAC asociada a la ERC. Es sabido, que estos individuos tienen un mayor riesgo vascular debido a la enfermedad renal. Basándonos en la distribución de individuos en el PCA y en la buena separación que parecen tener estos individuos con EAC dentro de la ERC en sí, se lograron finalmente identificar 4 metabolitos asociados a esta situación. Estos 4 metabolitos (Homocisteína, Leucina, Treonina y Citrato) son significativamente diferentes entre individuos con ERC con EAC documentada e individuos con ERC sin ella.

La Treonina y el Citrato se encontraron en bajos niveles en pacientes con ateroesclerosis coronaria estable (123) y también en plasma a bajos niveles en el síndrome coronario agudo con y sin elevación del segmento ST (124). En nuestro caso en los individuos con EAC asociada ERC encontramos niveles inferiores de estos dos metabolitos tanto en orina como en plasma, respecto a individuos con ERC sin EAC asociada, sobre todo cuando la enfermedad renal está en sus estadios más avanzados. En la literatura se encontraron elevados los niveles plasmáticos de Treonina, respecto a un grupo control en el caso de disfunción renal (125), es decir, cuando existe ERC sin EAC asociada. Pudiera ser que el hecho de que bajen los niveles de abundancia (cuando existe EAC), tanto de Citrato como de Treonina en nuestros experimentos, respondiera ante el riesgo vascular existente en los últimos estadios de la ERC. Sería interesante un estudio planteando esta situación para poder descartar o afirmar a qué se deben las variaciones. Si miramos cómo varían estos dos metabolitos respecto a la ERC en sí misma, en la orina no observamos variación pero en el plasma se aprecia una subida de los niveles de Treonina y una bajada de los niveles de Citrato. Hecho que confunde y realmente nos

hace plantear nuevos experimentos con el fin de poder discernir a qué se deben esos cambios en los niveles de Treonina y Citrato.

Por otro lado se han encontrado bajos niveles de Leucina en plasma en ratas ateroescleróticas (126). En plasma humano, en nuestro caso, no se halló ninguna significación, pero si una tendencia a la disminución de sus niveles. En orina de individuos con EAC asociada a ERC, sin embargo, si encontramos niveles disminuidos de Leucina respecto a los individuos que no tienen asociada esta patología. Lo que sí se puede apreciar en plasma es un aumento de niveles de Leucina cuando los individuos padecen ERC sin EAC, como en el caso de la Treonina.

Resulta interesante el incremento de Homocisteína en orina en la enfermedad vascular con trombosis (127). Hecho que está en consonancia con el estudio que se presenta, donde los niveles de orina en individuos con EAC asociada a ERC están elevados respecto a ERC sin problemas vasculares asociados. La homocistinuria y la hiperhomocistinemia han sido relacionados con trombosis coronaria y cerebral por errores congénitos del metabolismo (128) (129). Sin embargo, poca información se tiene de la homocistinuria en ERC, salvo los presentados en este trabajo. Sí se relacionan los niveles altos en plasma de la Homocisteína con ERC y como un factor de riesgo vascular entre la población que sufre ERC (130). Algunos ensayos clínicos corrigen los altos niveles plasmáticos de Homocisteína con vitaminas como B6 y B12 (131). Es importante comprender la relación entre Homocisteína y ácido fólico, vitamina B12, y vitamina B6; debido a que, en la mayoría de los individuos, una nutrición óptima con respecto a estas vitaminas significa mantener bajas concentraciones de Homocisteína. Algunos datos preliminares sugieren que la terapia con vitamina B12 puede reducir el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares y retrasa la progresión de ateroesclerosis. Sin embargo, aunque parece clara la relación de la Homocisteína con las enfermedades cardiovasculares, Kerins y colaboradores (132) demostraron que la S-adenosylhomocysteine (SAH) -metabolito intermedio en la conversión de Metionina a Homocisteína es un marcador más sensible de enfermedad cardiovascular clínica que la Homocisteína plasmática. Ellos postulan que las concentraciones de SAH plasmáticas reflejan las concentraciones de SAH tisulares y su hipótesis es que la SAH podría ser el componente clave en la patofisiología de la enfermedad vascular relacionada con la Homocisteína. En nuestro estudio sin sesgo, sin embargo este intermedio no fue hallado (130). El catabolismo de la Homocisteína por la vía de la transulfuración genera compuestos sulfurados, como la Cistationina que se relacionan con la protección vascular (133). Los polimorfismos en los genes de la cistationina-β-sintasa se han estudiado como factores de riesgo de la enfermedad cerebral vascular (134;135). Así parece ser que la Homocisteína , sus intermedios y moléculas relacionadas con ellas mediante mecanismos bioquímicos sí tienen relación con lo que rodea a las diferentes patologías vasculares, pero hay diferentes tendencias respecto a cómo varía a nivel plasmático. En nuestro caso por ejemplo no resultó

significativo en plasma pero si observamos una tendencia de los niveles al contrario de cómo describen la mayoría de los estudios donde encuentran elevados.

Con esta información contradictoria entre los niveles de Homocisteína en plasma y orina, en nuestro estudio relacionamos este aumento de la Homocisteína en orina y su descenso en plasma con la EAC asociada a ERC. La Homocisteína en plasma se encuentra en relación inversa con los niveles en plasma de la Creatinina, la cual tiende a acumularse en estos individuos con ERC. Es conocido el aumento de Creatinina en suero de los individuos con fracaso renal, de hecho es uno de los parámetros que se utilizan para medir la función renal, mientras ésta sube sus niveles, la Homocisteína baja los suyos. Este hecho está en total comunión con lo hallado en nuestro estudio en los individuos con ERC. Cuanto más alto tienen la Creatinina plasmática, más bajo tienen los niveles de Homocisteína en plasma. De hecho en los niveles iniciales también es significativa. Lo que nos hace relacionarlo con la propia enfermedad renal. Tanto es así que es discutible que surge la pregunta ¿es acaso la Homocisteína un factor independiente o se está modificando con factores externos como la dieta, medicación o incluso el ejercicio?

3. Estudio de los metabolitos alterados en el tejido renal de rata en un modelo temprano nefropatía diabética.

Se estudió a nivel molecular, en un modelo temprano de 8 semanas de rata con diabetes tipo I y daño renal, lo que ocurría en el tejido del riñón. Contamos con 6 ratas sanas (control) y 5 ratas con nefropatía diabética.

En este estudio con el tejido renal intacto y sin manipulación, se encontraron altos niveles de la hormona esteroidea Aldosterona en el tejido renal de rata del modelo de Nefropatía Diabética. Este corticoide se produce en la zona glomerular de la corteza adrenal en la glándula suprarrenal, con lo cual no resulta extraño encontrarla en el riñón en este modelo (136).

La Aldosterona actúa en la conservación del Na+, secretando K+ e incrementando la presión sanguínea. Hay varios factores que producen un incremento de los niveles de Aldosterona, como los altos niveles plasmáticos de Angiotensina II y de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) o los altos niveles de K+, los cuales están presentes cuando existen deficiencias plasmáticas de Na+ (137-140). El aumento en el deterioro de la función renal aumenta la eliminación de K+ hasta un 35% (140). Se sabe que los niveles de K+ son los estimuladores más sensibles de Aldosterona, es lógico pensar que si se produce una situación de desequilibrio en el riñón por alguna patología, como pudiera ser la nefropatía diabética, causando la excreción de K+, se pudiesen activar mecanismos que aumentasen los niveles de Aldosterona, como ocurre en nuestro modelo. Cuando se detecta un aumento en los niveles de K+, la glándula suprarrenal es estimulada llevando a la liberación de Aldosterona, la cual incrementa la reabsorción de Na+ en la orina. Esto se produce mediante la despolarización de las células en la zona glomerular, que abre los canales voltaje-dependientes de calcio.

Por otro lado la Aldosterona forma parte del sistema Renina-Angiotensina directamente relacionado con diabetes y con hipertensión arterial, de hecho se utiliza para el tratamiento de esta última, bloqueando el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) (141).

Otro de los cinco metabolitos que se hallaron alterados en el riñón de rata diabética en este modelo fue la fosfatidilcolina (PDC). La PDC es uno de los principales constituyentes de las bicapas lipídicas de las membranas celulares .Se han encontrado estudios, en suero de pacientes, que la relacionan junto con otros fosfolipidos con la ERC, encontrándose más elevada cuando miden el descenso de la función renal (142). Yang y colaborares encuentran niveles en orina de PDC correlacionados con la proteinuria pero negativamente correlacionados con la Albúmina sérica (141;143;144). Nuestros datos correlacionan negativamente los niveles en tejido de PDC con la proteinuria. Los niveles de PDC en el tejido se podrían explicar con el hecho de que estén siendo liberados al medio con el consiguiente aumento en orina y/o plasma. Sin embargo esto no se pudo comprobar.

El TMANO y el Glutamato se encontraron disminuidos en el tejido patológico. Cuando estudiamos la orina humana, sin embargo, ambos se encuentran en mayor abundancia en los individuos con ERC. En consonancia con los datos observados en tejido es como si se estuviera liberando desde él por algún mecanismo. Es importante destacar la relación entre estas dos moléculas, ya que el transporte del grupo amino desde los tejidos se realiza a través del Glutamato (107). Es necesario eliminarlo ya que el cúmulo del ión amonio es tóxico para el organismo. Como ya se ha comentado en el primer apartado de esta discusión.

Importante destacar que tanto en este estudio como en el estudio los metabolitos en orina y plasma humano en ERC, se encuentran metabolitos asociado a la eliminación de nitrógeno. Ya se habló del aumento de Urea (El 80% del nitrógeno total en el cuerpo en finalmente expulsado como urea) en los individuos con ERC, que incluso era notable en los espectros de RMN. A la Urea se suman pues, la AFAG, Glutamato y TMANO, encontrándose estos dos últimos en orina, plasma y tejido.

4. **Estudio de las enzimas implicadas en el ciclo del Glutatión vía 5-Oxoprolina**.

Tras ver la clara alteración de los metabolitos 5-Oxoprolina y Glutamato en la ERC se estudiaron las enzimas implicadas en el catabolismo del Glutatión vía 5-Oxoprolina (145). En concreto se estudiaron 3 enzimas que catalizan la relación directa de éstos dos metabolitos: 5-Oxoprolinasa (OPLA), γ-Glutamilciclotransferasa (GGCT) y Glutamato-cisteina ligasa (GSH). El paso directo de 5-Oxoprolina a Glutamato está catalizado por la 5-Oxoprolinasa (OPLA); ésta ha sido encontrada en este trabajo con niveles elevados en la orina de individuos con ERC, sin embargo, γ- Glutamilciclotransferasa (GGCT), que cataliza dos pasos para llegar a 5-Oxoprolina, desciende sus niveles en la orina de estos individuos. La última enzima, Glutamato-cisteina ligasa (GSH), encargada de la

retroalimentación desde el Glutatión, aumenta sus niveles en orina en los pacientes con ERC. Las variaciones observadas se encuentran en consonancia con los resultados encontrados en el estudio de metabolitos en individuos con ERC. Si nos fijamos en la figura 2, el hecho de que descienda en orina la 5-Oxoprolina es perfectamente justificable debido a que el equilibrio de la reacción 5-Oxoprolina->Glutamato se encuentra desplazado hacía la producción de Glutamato. Así se encuentra éste aumentado en orina mientras que la 5-Oxoprolina se va consumiendo. Además al hecho de que se consuma la 5Oxoprolina, podemos sumarle su baja producción, como indican los bajos niveles de GGCT en las dos reacciones que cataliza y que dan lugar a 5-Oxoprolina. Destacamos también, que en este equilibrio desplazado hacía la síntesis de Glutamato, la enzima que cataliza dicha reacción, 5-Oxoprolinasa, encuentra sus niveles aumentados en orina en individuos con ERC seguramente para fomentar ese aumento de niveles de Glutamato. Precisamente para conseguir ese aumento de la concentración de Glutamato, se produce una retroalimentación desde el Glutatión hacía el Glutamato, confirmado por el aumento de los niveles de GSH en orina en individuos con ERC.

Estos resultados son coherentes con lo encontrado en estudios de transcriptómica en fracaso renal agudo, que revelan un 22% de incremento en la expresión de 5-Oxoprolinasa y una reducida expresión de γ- Glutamilciclotransferasa (resultados no publicados).

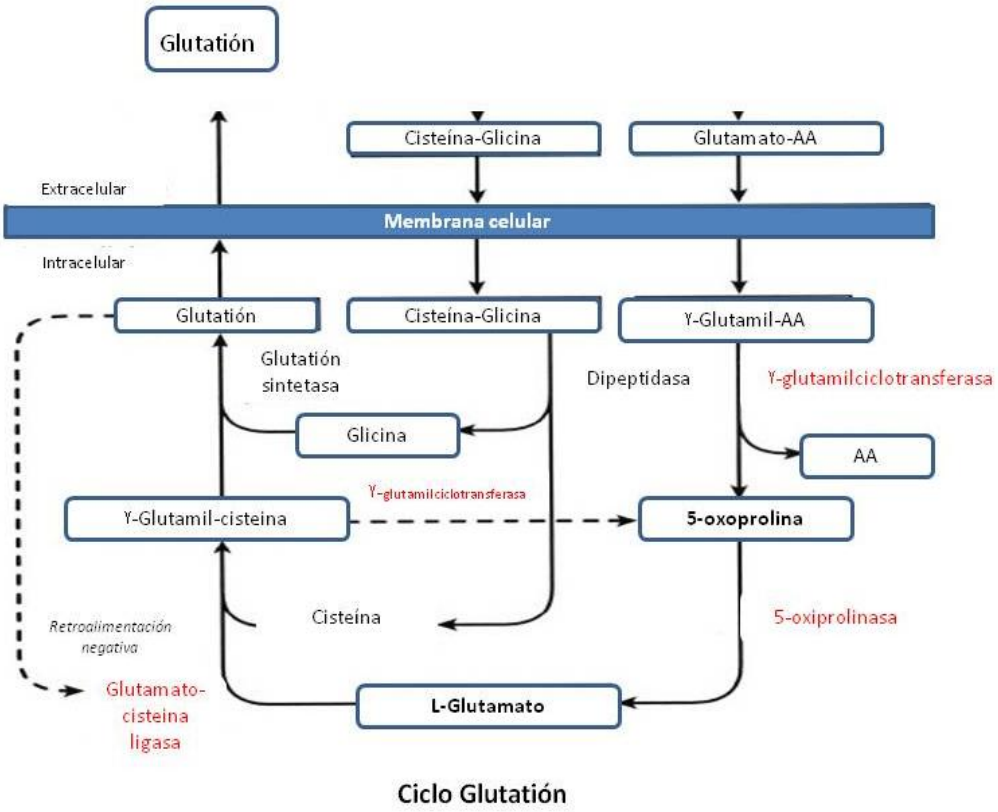

Figura 2. Ciclo del catabolismo de Glutatión vía 5-Oxoprolina.

Las observaciones vistas en plasma de estas enzimas son justo las contrarias a las encontradas en orina en individuos con ERC. Los niveles de 5-Oxoprolinasa descienden, cuando aumentaban en orina y los niveles de γ- Glutamilciclotransferasa aumentan cuando descendían en orina en individuos con ERC. Este comportamiento es coherente con lo encontrado en 5-Oxoprolina y el Glutamato en plasma, que también encuentran sus niveles variados al contrario respecto la orina. Estos resultados confirman esta variación del catabolismo del glutatión por la citada vía (146).

El Glutatión es un antioxidante endógeno que se encuentra en bajos niveles en las enfermedades que implican un aumento del estrés oxidativo (145;147-150). El estrés oxidativo y la inflamación conducen a la progresión en la ERC. Cabe destacar la participación de esta molécula en la eliminación de xenobióticos. El abuso de fármacos puede llevar a un gasto excesivo de Glutatión, desencadenando un mecanismo para su síntesis (151-153). Es conocida la alta ingestión de fármacos en los individuos con ERC por todas sus complicaciones clínicas. No es de extrañar entonces la asociación de este ciclo y sus alteraciones en estos individuos, sin embargo esto necesitaría ser estudiado en profundidad. Sorprende, sin embargo, que el Glutatión en sí no presente ninguna variación visible en este estudio, no dando ninguna variación cuando se comparan individuos con ERC en todos sus estadios e individuos sanos.

En plasma de rata también fueron encontrados aumentados los niveles de γ-Glutamilciclotransferasa y de Glutamato-cisteína ligasa en situación de éstres oxidativo (147;149;154). La enzima Glutamato-cisteína ligasa, encargada de la retroalimentación al Glutamato desde Glutatión, es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades, una subunidad reguladora y otra catalítica. En su subunidad reguladora se han visto sus niveles reducidos en tejido renal de rata diabética (155). Sin embargo, se observó alterada, aumentando su abundancia a nivel tisular, cuando se produce daño renal por una exposición a un metal pesado (156). En este estudio es más abundante en ERC en orina y en plasma. Resulta coherente si sabemos que el Glutatión actúa como inhibidor enzimático de esta enzima y controla la retroalimentación negativa en el caso de déficit de Glutamato; no resulta extraño encontrarla más abundante en ERC. Otro dato importante, sin embargo contradictorio es, que la vitamina D, la cual termina su metabolismo en el riñón y de la cual estos individuos tienen un déficit, regula positivamente a la subunidad catalítica de esta enzima (149).

5. Estudio de las proteínas asociadas a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina.

En un análisis complementario al de metabolitos asociados a ERC, se realizó un estudio de proteómica diferencial en orina para ver las proteínas que pudieran estar alteradas en esta patología. Se encontraron 7 proteínas cuyos niveles variaban significativamente respecto a controles: Kininogen1 (KNG1), Whey acidic proteins core disulfide domain protein 2 (WAP), complemento CD59 glicoproteína (CD59) y receptor polimérico de inmunoglobulina (PIGR) con niveles significativamente disminuidos en individuos con

ERC y tres: Retinol binding protein 4 (RBP4), β -2 –microglobulina (β2-MGB) y α-1-microglobulina/bikunina (AMPB) que encuentran incrementados sus niveles respecto a los individuos control. Estas tres últimas proteínas (RBP4, β2-MGB y AMBP) se encuentran altamente estudiadas y relacionadas con la disfunción renal en estudios previos.

Una de las proteínas que se encontraron con niveles disminuidos respecto a controles es la glicoproteína CD59, también llamada proteína inhibidora del complejo de ataque a membrana (MAC), se encuentra en nuestro estudio en niveles disminuidos en abundancia en los individuos con ERC. Esta proteína actúa inhibiendo el MAC previniendo la incorporación de múltiples copias de C9 y C5b-9 en el ensamblaje de MAC (157;158). La protectina CD59, ha sido identificada con niveles aumentados en daño renal agudo (159-161) y se ha asociado también el aumento de los niveles de esta proteína a la formación de piedras en el riñón (162), encontrándose así su papel en la protección del riñón como lo avalan diferentes estudios en modelos animales carentes en CD59 (163;164). De ellos se deduce que actúa como mediador en la enfermedad renal, jugando un papel importante en la protección del glomérulo, protegiéndolo también de agentes externos como toxinas. La carencia en esta proteína deja abierta la puerta al daño renal. Hechos que son coherentes con lo encontrado en el estudio diferencial realizado en este trabajo, donde encontramos a este complemento CD59 con niveles muy disminuidos en orina de individuos con ERC respecto a controles. Cook ,no sólo establece una relación con el daño glomerular si no también con el daño tubular, aunque no de forma tan significativa en su modelo de daño por Adriamycin en ratón (165). CD59 también se ha relacionado con el fracaso renal por Diabetes, encontrándose en niveles disminuidos en los eritrocitos de los pacientes con nefropatía diabética que en los eritrocitos de los pacientes con nefropatía no diabética (166).

Resulta extraño, sin embargo, que estudiando en este estudio diferencial la EAC asociada a ERC, no encontrar a CD59 significativamente variada en individuos con ERC sin EAC documentada, ya que hay estudios que la relacionan con enfermedades cardiovasculares y con ateroesclerosis. Li y colaboradores, creen que podría inhibir el desarrollo de la placa ateroesclerótica por reducir los niveles de lípidos en sangre según un modelo en ratón Apo E (-/-) (163).

Otra proteína cuyos niveles se encontraron disminuidos en individuos con ERC es WAP. WAP, es una proteína del suero de leche en los mamíferos y es conocida por su núcleo de 4-disulfuros. La función fisiológica con la que se ha relacionado es la inhibición de proteasas y con la formación de células epiteliales en mamíferos (167;168). Se relacionó con la fibrosis renal encontrándose expresada en cultivo de myofibroblastos por Lindquist y colaboradores. Demuestran tras su hallazgo, que la neutralización de esta proteína podría palia la fibrosis (169). Esta proteína, que nuestros datos la reflejan en niveles disminuidos en orina de individuos con ERC, podría estar formando parte de algún mecanismo compensatorio en protección de la fibrosis renal.

Respecto a PIGR no se relaciona mucho en la bibliografía con la ERC, pero se sabe que la Inmunoglobulina A (IgA) es dependiente de ella (170;171). La inmunoglobulina A (IgA) es el anticuerpo más abundante en las secreciones de las superficies de las mucosas del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario y en secreciones externas (172). PIGR también fue hallada por estudios de transcriptómica expresada en células de riñón canino, sin ninguna transcendencia (173).

De las cuatros proteínas que descendían sus niveles en ERC en muestras de orina respecto al grupo de individuos sanos (CD59, WAP, PIGR y KNG1), Kininogen1 (KNG1) se ha encontrado en numerosos estudios para detectar tanto daño renal como problemas cardiovasculares ya que reduce la resistencia vascular y estimula la excreción de agua y electrolitos en el riñón (174). La presencia de Kininogen 1 (KNG1) en orina fue detectada por primera vez en la primera mitad del siglo XX, y ha sido objeto de estudio de muchas investigaciones ya que se veía implicada en importantes procesos biológicos (175).

En nuestro caso encontramos la proteína KNG1 en niveles disminuidos en individuos con ERC, sobre todo en estadios avanzados de la enfermedad renal. Se encontraron también poco expresados en orina cuando midieron la disfunción renal por técnicas proteómicas, como label-free LCMS y LC- MS/MS (MRM) en estudios previos (176). Freue y otros, lo encuentran como opción para monitorizar el post-trasplante renal, encontrándolo en bajos niveles en el plasma de pacientes con enfermedad renal (177).Se identificó en la orina de cosmonautas rusos con prolongadas horas de vuelo, con técnicas proteómicas, para medir la preadaptación fisiológica a través del riñón (178). En su forma de alto peso molecular, KNG1, se ha relacionado con la formación de piedras de Ca en el riñón (179). En plasma se detectó junto β-2-microglobulina entre otras, post-trasplante renal para monitorizar y permitir en caso necesario una intervención terapéutica temprana (180). También incrementada en suero de ratas por exposición a amianto (181). Posiblemente en el caso de exposición a toxinas, crea efectos similares a los de las citokinas proinflamatorias, contando con vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y activación de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.

La proteína KNG1 pertenece al sistema Kalikrein-Kininogen (KKS), este sistema está implicado en procesos inflamatorios, procesos de coagulación sanguínea, homeostasis y vasodilatación, entre otros (175;182). También tiene funciones endocrinas, además de ser inhibidores de las tiol-proteasas y participar con el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), donde la proteína Kalikrein tiene un papel en la activación de la Renina (183;184). El KKS en el riñón está asociado con la membrana plasmática tubular cortical y las Kininas son formadas y secretadas al fluido tubular distal (183-186;186;187). No resulta extraño entonces haberla identificado en el riñón en los individuos con ERC en nuestro estudio. Al estar relacionados los dos sistemas KKS y RAAS, los dos se han estudiado asociado a la diabetes y a sus complicaciones cardiovasculares. El KKS, en su conjunto se encontró con niveles elevados en plasma

de pacientes diabéticos tipo I (188). Asociado también el KKS, concretamente a la apoptosis de podocitos bajo condiciones diabéticas (189). Estos hechos se contradicen con el modelo experimental en diabetes de Bodin donde sugiere el papel protector de KKS contra el desarrollo de la nefropatía diabética (188). El papel de KKS en la nefropatía diabética y sus complicaciones cardiovasculares no está claro y es un tema con discrepancia. En nuestro caso, para el estudio principal no incluimos como objeto de estudio la nefropatía diabética por sus complicaciones. Se consideró que constituye un grupo para estudiar aparte. Sin embargo, es importante la relación que establecen con la DM y con sus complicaciones vasculares en las diferentes investigaciones. Tanto es así que la activación de los receptores de las Kininas (B1R) y (B2R), pueden actuar como receptores agosnistas con efectos terapéuticos en EAC y DM (186;190). Respecto a su papel en el sistema vascular, aparece el KKS en plasma de pacientes tratados con estatinas después de un trasplante renal asociado a la inflamación vascular (191). Estudios sugieren una protección del KKS tanto en enfermedad cardiovascular como renal, como en infarto cerebral isquémico. KKS conduce al incremento de oxido nítrico, protege del daño por estrés oxidativo reduciendo los radicales libres y cuidando así daño vascular (186;192;193). Lo sugieren también como posible terapia para la insuficiencia coronaria e isquemia (194;195). En nuestro estudio los niveles de KNG1 están disminuidos en individuos con ERC, pero también encontramos esta proteína con niveles aumentados cuando está asociada la EAC a la ERC.

Una de las proteínas que se encontraron con niveles aumentados respecto a controles es RBP4, proteína transportadora de Retinol (Vitamina A). Como ya sabemos los riñones son esenciales para el metabolismo de esta vitamina (196). Se le atribuyen numerosas funciones biológicas. Forma un complejo con la Transtiretina (conocida también como prealbúmina transportadora de tiroxina) que previene su filtración por el riñón en situación no patológica. Estudios de estos últimos años, ya atribuyen su presencia en orina como marcador de daño renal (197). Huang y otros lo utilizan como marcador cuando la Creatinina sérica no está alterada, para controlar la función renal durante la intervención quirúrgica con laparoscopia en una nefrectomía parcial con predicondicionamiento isquémico remoto (198). Otros, no niegan un importante papel como marcador en normoalbuminúricos y microalbuminúricos en nefropatía diabética, sin embargo dicen que es independiente de la progresión en ERC cuando se trata de macroalbuminúricos en nefropatía diabética (199). Sin embargo, hay estudios en plasma que contradicen este hecho cuando hablan de ERC, encerrando diversas causas y atribuyen altos niveles plasmáticos de RBP4 en ERC es estadios de II a V y en coherencia con el filtrado glomerular (200). En nuestro caso separamos ERC inicial (estadios I-II) de ERC en estados avanzados (IV-V) resultando incoherente su alteración encontrada en orina con los resultados encontrados en la progresión de la ERC. Sin dar significación estadística en los estadios avanzados, RBP4 muestra una gran significación elevando sus niveles en los inicios de la ERC. Podría mostrarse como marcador temprano, cuando el riñón empieza a fallar por diferentes causas, que luego recuperase sus niveles con algún tipo de mecanismo compensatorio. Como marcador

temprano de la disfunción renal lo muestran en estudios por ejemplo, por intoxicación para detectar el daño renal por ácido Aristolochip en orina en países asiáticos (201); para medir la disfunción tubular, junto a β-2-microglobulina, por intoxicación con metales pesados como el Cd en un modelo animal en cerdo (202); para medir la nefropatía hipertensiva en niños en síndrome nefrítico cuando se da como situación transitoria (203). El incremento en orina de RBP4 es marcador de la alteración del transporte tubular. Algunos estudios muestran que el ratio RBP/Creatinina es útil como marcador específico de la disfunción tubular asociada a fármacos, como es el caso del antirretroviral Tenofovir (204;205).Todos ellos muestran altos niveles de orina de RBP4, como en nuestro caso en estudios en ERC al comienzo de la disfunción renal. Sus niveles en suero también han sido estudiados en relación con el fracaso renal, libre o unido a albúmina. Altos niveles en plasma fueron encontrados en ERC en ausencia de otros factores como diabetes y obesidad (206). Por otro lado Ahn confirmo su aumento en nefropatía diabética en plasma (207). Sin embargo, aunque juega un papel modulador en la función renal, su papel en la ND no está muy claro sobre todo en estados avanzados de la ERC (208). En vista de los estudios que la relacionaban con la función renal, se quiso relacionar con la mortalidad de estos individuos con ERC por enfermedad vascular asociada, no se ha encontrado ningún indicio de esto por el momento (209), tampoco evaluando las complicaciones cardiovasculares asociadas a la diabetes, no se observó variaciones en los niveles plasmáticos en individuos con diabetes tipo 2 (210).

La α-1-microglobulina/bikunina (AMBP) es una proteína de membrana, una glicoproteína secretada con actividad inhibidora de serin proteasas que se expresa constitutivamente en hígado y riñón. Compuesta por dos proteínas Bikunina, la cual se sintetiza en el hígado para después unirse a la α-1-microglobulina, la otra proteína que compone el dimero (211). Esta última sí ha sido relacionada con diferentes patologías renales, incluso como marcador de toxicidad renal (212;213). Esta proteína, AMBP junto con otras, ha sido patentada por Saemann y Weichhart como método de diagnóstico de la enfermedad renal, encontrándose aumentada en individuos con ERC (214). Estos resultados coinciden con lo encontrado en este estudio, donde se encontró con niveles más altos en individuos con ERC. Previamente en un estudio de exosomas de orina en nuestro laboratorio se encontró en niveles elevados en nefropatía diabética (105). En suero de pacientes fueron halladas proteínas enriquecidas en HDL, entre ellas AMBP, así su relación inflamación y riesgo cardiovascular (215). En nuestros resultados encontramos esta proteína en niveles disminuidos cuando la EAC está asociada a ERC en orina. Como predictor de riesgo cerebrovascular se relacionó en un estudio con pacientes con microalbuminuria (216). Substanciales diferencias y altos niveles en plasma fueron hallados en pacientes con ateroesclerosis en ERC (217). Por proteómica cuantitativa se halló en el plasma de individuos con Aneurisma abdominal aórtico (218). En los inicios de la enfermedad de Fabry, enfermedad caracterizada por el cúmulo de glicoesfingolípidos en diferentes órganos incluido el riñón aparece la Bikunina en orina en los inicios de la patología (219). En lesiones tubulares se halló

excretada en la orina la α-1-microglobulina (220). Todas estas observaciones nos llevan a pensar en su relación con el daño renal, tal y como se muestra en el presente trabajo.

6. Metabolitos indicadores de la Enfermedad Arterial Coronaria asociada a la Enfermedad Renal Crónica en muestras de orina y plasma.

Cuatro proteínas se han encontrado alteradas en ERC relacionadas con el riesgo cardiovascular. Dos dieron también significación cuando comparábamos individuos con ERC con individuos sanos, KNG1 y AMBP. Otras dos sólo se encontraron significativas comparado grupos con ERC con y sin enfermedad cardiovascular asociada: Nidogen 1 (NDG1) y Zinc-α-2-glicoproteína (ZA2GP); ambas se encontraron tanto en estadios iniciales como en avanzados en la ERC cuando tenían EAC documentada.

Una de las proteínas que resultaron estadísticamente significativas entre los grupos de ERC con y sin EAC documentada, Nidogen, es una glicoproteína sulfatada que forma parte de la membrana basal de los tejidos epiteliales, entre ellos el glomérulo. Por lo que su implicación en la filtración de proteínas como albúmina a través del glomérulo es un tema a debate (221). En el presente trabajo esta glicoproteína se encuentra disminuida cuando existen problemas vasculares asociados a ERC. Al jugar un papel crucial en el ensamblaje de las membranas basales tanto bioquímico como funcional, autores como Bader lo relacionan con el mantenimiento e integridad del tejido cardiaco (222). Tejido cardiaco de ratón también ha sido estudiado por "Label free" LCMS para examinar la cardiopatía en la enfermedad de Duchenne, revelando un drástico decrecimiento de Nidogen entre otras proteínas de la matriz extracelular (223). Se encontró aumentada también en los proteomas de las válvulas aortica y pulmonar demostrando su contribución a la función valvular (224). Hawkes y colaboradores encuentran una reducción de los niveles de esta proteína a nivel tisular en el cortex e hipocampo, que sugieren cambios en el drenaje vascular (225). A priori estos estudios no tienen relación alguna con lo encontrado pero sugieren la relación entre los problemas vasculares y esta proteína. Esta relación podría ser independiente de la enfermedad renal pero dado que se trata de una proteína de la matriz extracelular, ubicada en las membranas basales, incluidas las renales, se ha visto también implicada en el daño glomerular (226). Así, su carencia se ha visto asociada al incremento de la mesangioproliferación, a la alta expansión de la matriz mesangial y a la reducción de la capilaridad del glomérulo (227). Estos hechos sugieren un papel crítico de Nidogen. Altas concentraciones en plasma de esta proteína también han sido relacionadas con estrés oxidativo (228). Al formar parte de la membrana basal junto con la Laminina y el Colágeno IV, se ha intentado buscar la relación en varias patologías, sobre todo las relacionadas con el sistema vascular y renal. Estudio previos, sin mucho éxito en los posteriores años, demuestran que altera su distribución a nivel tisular tras una intervención quirúrgica de un aneurisma (229). Aunque casi todos los estudios descritos en la literatura estudian a esta proteína a nivel tisular, en nuestro caso la encontramos en orina en inferiores niveles en individuos con EAC dentro de la ERC. Esta situación se produce cuando ya existe EAC en estadios

tempranos de ERC como cuando existe EAC en los estadios avanzados, pudiendo ser independiente de la enfermedad renal. No es raro encontrar esta proteína asociada a problemas vasculares al formar parte del tejido epitelial, pero si es curioso encontrarla en orina como en nuestro caso.

Otra glicoproteína que resultó diferencial en el estudio cuando comparamos individuos con EAC asociada a ERC fue la Zinc-α-glicoproteína (ZAGP) (230). Anteriormente ya se había identificado en orina humana por 2D electroforesis, junto con RBP4 y β-2-MGB (231). La expresión de esta proteína es regulada por glucocorticoides. Así se la ha relacionado con muchas funciones y con su implicación en muchas enfermedades. Conocida porque estimula la degradación de lípidos en adipocitos, su relación con el riesgo cardiovascular puede deberse a ello, ya que altas concentraciones pueden modular la degradación de los ácidos grasos (232;232;233). La hiperlipidemia acelera la ERC porque el mesangio atrapa los lípidos y estimula su proliferación, siendo la lesión proporcional a la concentración de LDL. Tanto VLDL como LDL tienen la capacidad de fijarse a los polianiones en el mesangio y en la membrana basal glomerular, alterando su permeabilidad y produciendo un flujo de macromoléculas y una sobrecarga del mesangio que produce a termino final esclerosis. De hecho, Roos y colaboradores la identificaron en suero en niveles bajos cuando en la dieta se ingieren n-3LCPUFA (ácido grasos poliinsaturados) (234). Aunque a menor nivel, se observaron altos niveles de ZAGP relacionados con retinopatía diabética como complicación microvascular a la diabetes (235). Correlaciona con lo encontrado en orina cuando se compara individuos con ERC con EAC asociada con individuos con ERC sin EAC asociada, donde se elevan sus niveles en el primer caso de tener la EAC asociada. Esta situación se produce, como en el caso de NID1, tanto en los estadios iniciales como avanzados de la ERC.

7. Análisis global del estudio en la Enfermedad Renal Crónica.

Los datos encontrados en este trabajo revelan alteraciones en un conjunto de moléculas que en algunos casos se encuentran formando parte de diversos procesos biológicos correlacionados entre sí. A continuación se ofrece una posible explicación de su interacción.

Como ya se comentó hay evidencias de que el KKS y RAAS se complementan en diferentes funciones biológicas sobre todo en las relacionadas con el sistema vascular y renal. La activación de KKS se produce por el inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina I (185;192). Este sistema (KKS) interaccionan con las prolicarboxilasas en la inactivación de la Angiotensina II, en activación de Bradikinina y en la formación de heterodímeros del receptor B2R con la Angiotensina I (175). Otras evidencias de la relación de KKS y Aldosterona son, que altos niveles de K+ ayudan a la síntesis y excreción de KKS en el tejido y a un aumento en la síntesis de Aldosterona, esto va acompañado de una reducción de la presión sanguínea y una reducción de la fibrosis renal (183;236). No es de extrañar entonces los resultados de este trabajo en relación a

lo descrito en literatura. Nosotros encontramos claras evidencias de un aumento de los niveles de Aldosterona en tejido renal patológico y en orina una disminución de los niveles de KNG1.

No sólo interaccionan en procesos implicados con el equilibrio electrolítico del riñón, sino también en procesos relacionados con el sistema cardiovascular. El RAAS es conocido en este campo y en los estudios del KKS cada vez hay más avances en el conocimiento de sus implicaciones en el ser humano. El proceso de formación de KKS, pasa por Kallikrein plasmático (PK) que se une a KNG de alto peso molecular conduciendo a múltiples reacciones proteolíticas envueltas en el sistema cardiovascular (183). Los sistemas KKS y RAAS (Renina-Angiotensina-Aldosterona) se complementan en este sentido. Como RAAS contribuye al tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, a la hora de regular la presión arterial, se espera que con estos datos el KKS también pueda estudiarse en profundidad como diana terapéutica (190;237). Al estudiarse la respuesta de Aldosterona a dos fármacos antihipertensivos (una tiazida-diurético y un bloqueante del receptor de Angiotensina) los resultados implicaron a una o más variantes del gen Kininogen (KNG) en la variación interindividual de la respuesta de Aldosterona (238). Viendo una vez más la interacción entre estos dos sistemas, no es de extrañar que en nuestro estudio por separado y por técnicas diferentes, estas dos moléculas de ambos sistemas (Aldosterona, encontrada aumentada en tejido renal con nefropatía diabética y KNG1, encontrada en muestras de orina con niveles disminuidos en el caso de la ERC y aumentados en el caso de estar asociada la EAC) hayan sido halladas.

Otro dato curioso e importante a la vez es que en este trabajo, realizado sin sesgo, se han encontrado proteínas inhibidoras de proteasas (KNG1, WAP y AMBP) diferenciales en ERC y todas con sus niveles disminuidos en orina de estos individuos. Teniendo en cuenta la fibrosis renal en ERC puede ser, así postulan varios autores que estas proteínas sean un ligando alternativo para el receptor del activador de plasminógeno (uPA) cuya deficiencia ha sido muy relacionada con un papel protector de la fibrosis renal en modelos animales (239). También puede estar relacionado con el cúmulo de matriz extracelular que caracteriza a la fibrosis y que ocurre en cada causa de ERC (240). De este modo, las proteínas encontradas en tejidos endoteliales en este trabajo (NID1, WAP y PIGR), pueden tener un papel importante en el progreso de la fibrosis renal.

Aunque no se ha estudiado el daño renal que produce la DM en profundidad en este trabajo, se han encontrado en otros estudios como marcadores de la Diabetes tipo 2, AMBP, ZAGP y RPB4 todas ellas incrementados en orina. Todo nos hace sospechar que no sólo sean marcadores de DM, sino marcadores de daño renal al haberlas encontrado en nuestro estudio en el que han participado individuos no diabéticos con daño renal en su mayor parte.

Las dos microglobulinas (α y β) han sido relacionadas en el presente estudio y en los previos con la disfunción renal en diferentes patologías incluso en estudios de toxicidad. Incluso se ha discutido cual de las dos sería mejor marcador de la función renal. Nguyen y colaboradores estudiaron las dos en suero fetal viendo diferencias en la concentración de las dos, pero determinando que era mejor marcador de la función renal la proteína β-2-MGB (241). Petrica y colaboradores relacionan las dos microglobulinas para medir la disfunción tubular en la administración de Pioglitazone en Diabetes tipo 2 (242). En nuestro caso por la técnica utilizada, se observó mejor la α-1-microglobulina mediante la AMBP. Podemos asegurar esto porque el análisis mediante LC MS/MS de las proteínas se produce mediante la digestión previa por una proteasa (tripsina). Al romperse la secuencia de la proteína AMBP (compuesta por dos proteínas: α-1-microglobulina y Bikunina) nos deja a péptidos de α-1-microglobulina estadísticamente significativos en el estudio.

Otro metabolito en relación con las proteínas estudiadas en el estudio diferencial es PDC. PDC se encuentra identificado en estudios de proteómica con la enzima PDC-esterol aciltransferasa que aparece junto a KNG1 y β-2 MGB aumentada en el plasma de individuos tras un trasplante renal (180), también nos cerciora de la observación obtenida de PDC en el tejido renal.

Datos obtenidos en este trabajo es la relación de la proteína ZAGP con Aldosterona, ya que su respuesta está regulada por corticoides. Además ZAGP, interacciona con los receptores β-adrenérgicos como B2R (230;243). Esta glicoproteína no es la única que está relacionada con el RAAS y KKS. La glicoproteína, CD59 está implicada en el proceso de coagulación donde se une como C5 y C5b a la Trombina. Si describimos brevemente el proceso de coagulación comenzamos con la activación de alto peso molecular Kininogen, preKallikrein y el factor XII (cada vez más datos experimentales relacionan a KKS a este proceso) y termina con el paso final catalizado por la Trombina que se une a C5 y C5b, entre otros complementos (244).

Se quiere destacar que estos datos englobados en todas la nefropatías a la vez no dan respuesta a ninguna patología concreta, que desgraciadamente es lo que piden los nefrólogos para poder asegurar y diagnóstico y un tratamiento adecuados y personalizados. Estos metabolitos responden únicamente al fracaso renal. Es decir, que aunque se trate de un proceso agudo y no crónico los ciclos se alteran al alterase todo el equilibrio y el metabolismo propio de riñón. Si patología produce una disfunción renal de forma crónica entonces los ciclos alterados tenderán a alterarse cada vez más afectando a la vez a otros sistemas. El cuerpo humano con sus mecanismos de compensación intentará solucionar con otras vías esta situación. Esto lo podrá realizar durante un tiempo determinado, hasta el fracaso total. No es así en un proceso agudo donde por lógica, esa situación de desequilibrio revertirá cuando revierta la causa del fracaso. En este trabajo se han referenciado por la bibliografía científica existente algunas de estas moléculas, ya sean metabolitos o proteínas con procesos agudos,

cuando lo que se está estudiando es fracaso crónico, es decir, irreversible. Aún así es correcto ya que podrían corresponder a las primeras alteraciones de las moléculas, que además no tuviesen mecanismos de compensación o no estén reflejados.

Respecto a la comparación con estudios en animales, habría que pensar en un escalado y cuantos estudios se han realizado con éxito en animales menores y han fracasado en el hombre. Muchos ensayos en preclínica sugieren precaución a la hora de transferir los resultados observados en modelos animales al hombre. Lo que si observamos es que puede ser un reflejo de lo que podría ocurrir, pero esperando a ese escalado que nos indique que efectivamente es cierto.

Tenemos así un cuadro de proteínas relacionadas con ERC donde encontramos elevadas en orina de estos individuos proteínas ya relacionadas en la literatura con la medida de la función renal como son β-2-MG y RBP4. Sin embargo, encontramos otras 5 que no han sido descritas y que encuentran sus niveles de abundancia en ERC en estadios avanzados disminuidos frente a controles sanos, así tenemos a KNIG1, CD59, PIGR, WAP y AMBP. Tal y como se hizo en el estudio de metabolitos se estudio la EAC dentro de la ERC, tenemos dos proteínas relacionadas de manera independiente con EAC: NID1 y ZA2GP. Estas no están dieron significación en ERC frente a controles sanos, sin embargo si resultaron significativas cuando la EAC estaba asociada a la enfermedad renal tanto en los estadios iniciales como en avanzados de esta.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha establecido una metodología de análisis del metaboloma de un fluido biológico de diagnóstico clínico como es la orina, de individuos sanos y con enfermedad renal crónica (ERC), incluyendo elevados niveles de proteinuria, mediante RMN y nLC-MS/MS (metodología MRM).

2. Se ha identificado una huella metabolómica en orina asociada a la enfermedad renal crónica (ERC), tanto en estadios iniciales como en avanzados, compuesta por: Trimetilamina-N-Oxido (TMANO), α-Fenilacetilglutamina, Taurina, Guanidoacetato, Citrato y dos componentes del ciclo del catabolismo de Glutatión: 5-Oxoprolina y Glutamato. La variación de estos metabolitos corresponde con la evolución de la ERC.

3. Adicionalmente se ha identificado una huella metabolómica en orina con potencial para identificar enfermedad arterial coronaria (EAC) asociada a la ERC tanto en estadios iniciales como en avanzados compuesta por: Homocisteína, Treonina, Leucina y Citrato.

4. El estudio del tejido renal en un modelo temprano de nefropatía diabética reveló 18 metabolitos con niveles alterados en animales patológicos frente a controles. De estos 18, 5 metabolitos presentan significación estadística en su alteración: Aldosterona, *Myo*inositol, Fosfatidilcolina (PDC), Trimetilamina-N-oxido (TMANO) y Glutamato.

5. La variación encontrada para dos componentes del ciclo del catabolismo del Glutatión, 5-Oxoprolina y Glutamato, se ve corroborada por la variación observada para las enzimas que catalizan su trasformación: 5-Oxoprolinasa (OPLA), gamma-Glutamilciclotransferasa (GGCT) y Glutamato-cisteínaligasa (GSH). Estas alteraciones metabólicas se reflejan tanto a nivel de orina como de plasma, en estadios avanzados y en estadios iniciales de la ERC.

6. Se ha establecido una metodología de análisis diferencial del proteoma de la orina, tanto control como patológica con altos niveles de proteinuria, mediante iTRAQ.

7. Hemos descubierto potenciales marcadores de ERC: Kininogeno 1 (KNG1), Complemento 59 (CD59), Receptor parainmunoglobulina (PIRG), Whey acidic

proteins WAP y Alfa-1-microglobulina/bikunina (AMBP) y confirmando otros encontrados ya en uso clínico como marcador de la disfunción renal como es el caso de la Proteína transportadora de retinol 4 (RBP4) y beta-2-microglobulina (β-2-MG). Hemos descubierto un panel de proteínas en orina compuesto por Zinc-alfa-2-glicoproteína (ZA2G) y Nidogeno 1 (NID1), que se encuentra alterado en respuesta a la presencia de enfermedad arterial coronaria (EAC) asociada a ERC, y que sólo responde a esa condición clínica y no a la propia ERC. . KNG1 y AMBP sin embargo responden significativamente a las dos patologías (ECR por sí misma, y EAC en ERC).

8. Hemos puesto a punto y establecido las condiciones óptimas de análisis proteómico y metabolómico de fluidos biológicos como orina y plasma en una plataforma pionera compuesta por nano-cromatografía en formato chip acoplada en línea a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS) mediante la tecnología ChipCUBE.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

(1) Dan L.Longo, Lim1Anthony S.Fauci, Dennis L Kasper, Stephen L.Hauser, J.Larry Jameson, Joseph Loscalzo. Harrison's Principles of Internal Medicine. Part.10 Chapter 234-239. Part. 13 Chapter 241-249. 18e McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC.

Ref Type: Generic

(2) Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, Cushman M, McClellan W, Zakai NA et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. JAMA 2011 April 20;305(15):1545-52.

(3) American Society of Nephrology Renal Research Report. J Am Soc Nephrol 2005 July;16(7):1886-903.

(4) Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. JAMA 2007 November 7;298(17):2038-47.

(5) Stevens PE, Farmer CK. Association of kidney disease measures with poor outcomes. Lancet 2012 November 10;380(9854):1628-30.

(6) Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int 2006 January;69(2):213-7.

(7) Matsushita K, Selvin E, Bash LD, Astor BC, Coresh J. Risk implications of the new CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation compared with the MDRD Study equation for estimated GFR: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Am J Kidney Dis 2010 April;55(4):648-59.

(8) Estrella MM, Jaar BG, Cavanaugh KL, Fox CH, Perazella MA, Soman SS et al. Perceptions and use of the national kidney foundation KDOQI guidelines: a survey of U.S. renal healthcare providers. BMC Nephrol 2013 October 24;14(1):230.

(9) Waldum B, Os I. The Cardiorenal Syndrome: What the Cardiologist Needs to Know. Cardiology 2013 September 10;126(3):175-86.

(10) Krzych L, Wybraniec M, Chudek J, Bochenek A. Perioperative management of cardiac surgery patients who are at the risk of acute kidney injury. Anaesthesiol Intensive Ther 2013 July;45(3):155-63.

(11) Anand IS. Cardiorenal Syndrome: A Cardiologist's Perspective of Pathophysiology. Clin J Am Soc Nephrol 2013 October;8(10):1800-7.

(12) Spasovski G, Ortiz A, Vanholder R, El NM. Proteomics in chronic kidney disease: The issues clinical nephrologists need an answer for. Proteomics Clin Appl 2011 June;5(5-6):233-40.

(13) American Society of Nephrology Renal Research Report. J Am Soc Nephrol 2005 July;16(7):1886-903.

(14) Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, Coombes JS, Cooper MA, Hoy WE. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. Kidney Int 2011 October;80(8):806-21.

(15) Astor BC, Shaikh S, Chaudhry M. Associations of endogenous markers of kidney function with outcomes: more and less than glomerular filtration rate. Curr Opin Nephrol Hypertens 2013 March 15.

(16) Bomback AS, Klemmer PJ. Interaction of aldosterone and extracellular volume in the pathogenesis of obesity-associated kidney disease: a narrative review. Am J Nephrol 2009;30(2):140-6.

(17) D'Agati VD, Mengel M. The rise of renal pathology in nephrology: structure illuminates function. Am J Kidney Dis 2013 June;61(6):1016-25.

(18) Varghese SA, Powell TB, Janech MG, Budisavljevic MN, Stanislaus RC, Almeida JS et al. Identification of diagnostic urinary biomarkers for acute kidney injury. J Investig Med 2010 April;58(4):612-20.

(19) Vilayur E, Gopinath B, Harris DC, Burlutsky G, McMahon CM, Mitchell P. The association between reduced GFR and hearing loss: a cross-sectional population-based study. Am J Kidney Dis 2010 October;56(4):661-9.

(20) Wettersten HI, Weiss RH. Applications of metabolomics for kidney disease research: from biomarkers to therapeutic targets. Organogenesis 2013 January;9(1):11-8.

(21) Barratt J, Topham P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. CMAJ 2007 August 14;177(4):361-8.

(22) Shastri S, Katz R, Shlipak MG, Kestenbaum B, Peralta CA, Kramer H et al. Cystatin C and albuminuria as risk factors for development of CKD stage 3: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). Am J Kidney Dis 2011 June;57(6):832-40.

(23) Lassus J, Harjola VP. Cystatin C: a step forward in assessing kidney function and cardiovascular risk. Heart Fail Rev 2012 March;17(2):251-61.

(24) Lassus JP, Harjola VP, Peuhkurinen K, Sund R, Mebazaa A, Siirila-Waris K et al. Cystatin C, NT-proBNP, and inflammatory markers in acute heart failure: insights into the cardiorenal syndrome. Biomarkers 2011 June;16(4):302-10.

(25) Lassus JP, Nieminen MS, Peuhkurinen K, Pulkki K, Siirila-Waris K, Sund R et al. Markers of renal function and acute kidney injury in acute heart failure: definitions and impact on outcomes of the cardiorenal syndrome. Eur Heart J 2010 November;31(22):2791-8.

(26) Ilva T, Lassus J, Siirila-Waris K, Melin J, Peuhkurinen K, Pulkki K et al. Clinical significance of cardiac troponins I and T in acute heart failure. Eur J Heart Fail 2008 August;10(8):772-9.

(27) Lassus J, Harjola VP, Sund R, Siirila-Waris K, Melin J, Peuhkurinen K et al. Prognostic value of cystatin C in acute heart failure in relation to other markers of renal function and NT-proBNP. Eur Heart J 2007 August;28(15):1841-7.

(28) Noto A, Cibecchini F, Fanos V, Mussap M. NGAL and metabolomics: the single biomarker to reveal the metabolome alterations in kidney injury. Biomed Res Int 2013;2013:612032.

(29) Taub PR, Borden KC, Fard A, Maisel A. Role of biomarkers in the diagnosis and prognosis of acute kidney injury in patients with cardiorenal syndrome. Expert Rev Cardiovasc Ther 2012 May;10(5):657-67.

(30) Parikh CR, Butrymowicz I, Yu A, Chinchilli VM, Park M, Hsu CY et al. Urine Stability Studies for Novel Biomarkers of Acute Kidney Injury. Am J Kidney Dis 2013 November 4.

(31) Doi K, Urata M, Katagiri D, Inamori M, Murata S, Hisagi M et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury superimposed on chronic kidney disease after cardiac surgery: a multicenter prospective study. Crit Care 2013 November 12;17(6):R270.

(32) Sesti G, Mannino GC, De LC, Greco A, Sciacqua A, Marini MA et al. A functional variant of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 gene is associated with chronic kidney disease. Atherosclerosis 2013 November;231(1):141-4.

(33) Ueda S, Yamagishi SI, Yokoro M, Okuda S. Role of asymmetric dimethylarginine in cardiorenal syndrome. Curr Pharm Des 2013 June 20.

(34) Zhao YY. Metabolomics in chronic kidney disease. Clin Chim Acta 2013 June 25;422:59-69.

(35) Al-Ismaili Z, Palijan A, Zappitelli M. Biomarkers of acute kidney injury in children: discovery, evaluation, and clinical application. Pediatr Nephrol 2011 January;26(1):29-40.

(36) Rosner MH. Urinary biomarkers for the detection of renal injury. Adv Clin Chem 2009;49:73-97.

(37) Suhre K, Shin SY, Petersen AK, Mohney RP, Meredith D, Wagele B et al. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. Nature 2011 September 1;477(7362):54-60.

(38) Toyohara T, Akiyama Y, Suzuki T, Takeuchi Y, Mishima E, Tanemoto M et al. Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. Hypertens Res 2010 September;33(9):944-52.

(39) Sato E, Kohno M, Yamamoto M, Fujisawa T, Fujiwara K, Tanaka N. Metabolomic analysis of human plasma from haemodialysis patients. Eur J Clin Invest 2011 March;41(3):241-55.

(40) Goek ON, Doring A, Gieger C, Heier M, Koenig W, Prehn C et al. Serum metabolite concentrations and decreased GFR in the general population. Am J Kidney Dis 2012 August;60(2):197-206.

(41) Sato E, Kohno M, Yamamoto M, Fujisawa T, Fujiwara K, Tanaka N. Metabolomic analysis of human plasma from haemodialysis patients. Eur J Clin Invest 2011 March;41(3):241-55.

(42) Wishart DS. Metabolomics: a complementary tool in renal transplantation. Contrib Nephrol 2008;160:76-87.

(43) Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. Nat Rev Nephrol 2012 January;8(1):22-33.

(44) Bonomini M, Sirolli V, Magni F, Urbani A. Proteomics and nephrology. J Nephrol 2012 November;25(6):865-71.

(45) Zhao YY. Metabolomics in chronic kidney disease. Clin Chim Acta 2013 June 25;422:59-69.

(46) Duncan MW. Omics and its 15 minutes. Exp Biol Med (Maywood) 2007 April;232(4):471-2.

(47) Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands JL, Schanstra JP, Coon JJ et al. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. J Proteome Res 2007 December;6(12):4549-55.

(48) Bennet RV, Gamage CM, Fernandez FM. Imaging of biological tissues by desorption electrospray ionization mass spectrometry. J Vis Exp 2013;(77):e50575.

(49) Fields S. Proteomics. Proteomics in genomeland. Science 2001 February 16;291(5507):1221-4.

(50) Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev 1996;13:19-50.

(51) Rodriguez-Suarez E, Siwy J, Zurbig P, Mischak H. Urine as a source for clinical proteome analysis: From discovery to clinical application. Biochim Biophys Acta 2013 July 2.

(52) Surinova S, Schiess R, Huttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. J Proteome Res 2011 January 7;10(1):5-16.

(53) Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods 1982 September;6(4):317-39.

(54) Callesen AK, Madsen JS, Vach W, Kruse TA, Mogensen O, Jensen ON. Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: a future diagnostics tool? Proteomics 2009 March;9(6):1428-41.

(55) Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem 1988 October 15;60(20):2299-301.

(56) Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 1989 October 6;246(4926):64-71.

(57) Yin H, Killeen K. The fundamental aspects and applications of Agilent HPLC-Chip. J Sep Sci 2007 July;30(10):1427-34.

(58) Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 2003 March 13;422(6928):198-207.

(59) Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 1989 October 6;246(4926):64-71.

(60) Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K et al. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. Anal Chem 2006 April 1;78(7):2113-20.

(61) Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. Anal Chem 2000 March 15;72(6):1156-62.

(62) Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham CR. The Orbitrap: a new mass spectrometer. J Mass Spectrom 2005 April;40(4):430-43.

(63) Ludwig C, Claassen M, Schmidt A, Aebersold R. Estimation of absolute protein quantities of unlabeled samples by selected reaction monitoring mass spectrometry. Mol Cell Proteomics 2012 March;11(3):M111.

(64) Rost H, Malmstrom L, Aebersold R. A computational tool to detect and avoid redundancy in selected reaction monitoring. Mol Cell Proteomics 2012 August;11(8):540-9.

(65) Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Mol Syst Biol 2008;4:222.

(66) Omenn GS, Baker MS, Aebersold R. Recent Workshops of the HUPO Human Plasma Proteome Project (HPPP): a bridge with the HUPO CardioVascular Initiative and the emergence of SRM targeted proteomics. Proteomics 2011 September;11(17):3439-43.

(67) Selevsek N, Matondo M, Sanchez CM, Aebersold R, Domon B. Systematic quantification of peptides/proteins in urine using selected reaction monitoring. Proteomics 2011 March;11(6):1135-47.

(68) Shadforth IP, Dunkley TP, Lilley KS, Bessant C. i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ. BMC Genomics 2005;6:145.

(69) Oberg AL, Mahoney DW. Statistical methods for quantitative mass spectrometry proteomic experiments with labeling. BMC Bioinformatics 2012;13 Suppl 16:S7.

(70) Luo R, Zhao H. Protein quantitation using iTRAQ: Review on the sources of variations and analysis of nonrandom missingness. Stat Interface 2012 January 1;5(1):99-107.

(71) Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. Nature 2008 October 23;455(7216):1054-6.

(72) Singh R, Sinclair KD. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. Theriogenology 2007 September 1;68 Suppl 1:S56-S62.

(73) Whitfield PD, German AJ, Noble PJ. Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition. Br J Nutr 2004 October;92(4):549-55.

(74) Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. J Proteome Res 2007 February;6(2):443-58.

(75) Barderas MG, Laborde CM, Posada M, de la Cuesta F, Zubiri I, Vivanco F et al. Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases. J Biomed Biotechnol 2011;2011:790132.

(76) Maher AD, Zirah SF, Holmes E, Nicholson JK. Experimental and analytical variation in human urine in 1H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. Anal Chem 2007 July 15;79(14):5204-11.

(77) Marion D. An introduction to biological NMR spectroscopy. Mol Cell Proteomics 2013 November;12(11):3006-25.

(78) Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C. Human urine as test material in 1H NMR-based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. Anal Chem 2007 February 1;79(3):1181-6.

(79) Bothwell JH, Griffin JL. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biol Rev Camb Philos Soc 2011 May;86(2):493-510.

(80) Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Chem Soc Rev 2011 January;40(1):387-426.

(81) Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. Pharmacogenomics 2007 September;8(9):1243-66.

(82) Rai RK, Tripathi P, Sinha N. Quantification of metabolites from two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy: application to human urine samples. Anal Chem 2009 December 15;81(24):10232-8.

(83) Nagayama K, Wuthrich K, Ernst RR. Two-dimensional spin echo correlated spectroscopy (SECSY) for 1H NMR studies of biological macromolecules. Biochem Biophys Res Commun 1979 September 12;90(1):305-11.

(84) Lippens G, Warrass R, Wieruszeski JM, Rousselot-Pailley P, Chessari G. High resolution magic angle spinning NMR in combinatorial chemistry. Comb Chem High Throughput Screen 2001 June;4(4):333-51.

(85) Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E et al. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. Nat Protoc 2010 June;5(6):1019-32.

(86) Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. J Proteome Res 2007 February;6(2):469-79.

(87) Rantalainen M, Cloarec O, Ebbels TM, Lundstedt T, Nicholson JK, Holmes E et al. Piecewise multivariate modelling of sequential metabolic profiling data. BMC Bioinformatics 2008;9:105.

(88) Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. Ther Drug Monit 2005 December;27(6):747-51.

(89) Cui Q, Lewis IA, Hegeman AD, Anderson ME, Li J, Schulte CF et al. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. Nat Biotechnol 2008 February;26(2):162-4.

(90) Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. Nucleic Acids Res 2013 January;41(Database issue):D801-D807.

(91) Benson D, Boguski M, Lipman D, Ostell J. The National Center for Biotechnology Information. Genomics 1990 February;6(2):389-91.

(92) Chen C, Li Z, Huang H, Suzek BE, Wu CH. A fast Peptide Match service for UniProt Knowledgebase. Bioinformatics 2013 November 1;29(21):2808-9.

(93) Waikar SS, Sabbisetti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. Kidney Int 2010 September;78(5):486-94.

(94) Warrack BM, Hnatyshyn S, Ott KH, Reily MD, Sanders M, Zhang H et al. Normalization strategies for metabonomic analysis of urine samples. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009 February 15;877(5-6):547-52.

(95) Zubiri I, Maria Posada-Ayala, Alberto Benito-Martin, Beatriz Fernandez-Fernandez, Alberto Ortiz, Fernando Vivanco et al. A rat early model of diabetic nephropathy shows significant changes in renal tissue proteome with reflection in human urine and urinary exosomes. Mol Cell Proteomics . 2013.
Ref Type: Journal (Full)

(96) Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. Nat Protoc 2013 January;8(1):17-32.

(97) Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. Kidney Int 2006 February;69(3):440-9.

(98) Zubiri I, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Proteomic analysis of urinary exosomes in cardiovascular and associated kidney diseases by two-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS. Methods Mol Biol 2013;1000:209-20.

(99) Afkarian M, Bhasin M, Dillon ST, Guerrero MC, Nelson RG, Knowler WC et al. Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. Mol Cell Proteomics 2010 October;9(10):2195-204.

(100) Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C. Human urine as test material in 1H NMR-based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. Anal Chem 2007 February 1;79(3):1181-6.

(101) Xu J, Zhang J, Cai S, Dong J, Yang JY, Chen Z. Metabonomics studies of intact hepatic and renal cortical tissues from diabetic db/db mice using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy. Anal Bioanal Chem 2009 March;393(6-7):1657-68.

(102) Huhn SD, Szabo CM, Gass JH, Manzi AE. Metabolic profiling of normal and hypertensive rat kidney tissues by hrMAS-NMR spectroscopy. Anal Bioanal Chem 2004 March;378(6):1511-9.

(103) Wang Y, Bollard ME, Nicholson JK, Holmes E. Exploration of the direct metabolic effects of mercury II chloride on the kidney of Sprague-Dawley rats using high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact tissue and pattern recognition. J Pharm Biomed Anal 2006 February 13;40(2):375-81.

(104) Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. J Amino Acids 2012;2012:736837.

(105) Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, Calvo E, Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. J Proteomics 2013 November 6.

(106) Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. Mol Aspects Med 2009 February;30(1-2):42-59.

(107) Lim S. Metabolic acidosis. Acta Med Indones 2007 July;39(3):145-50.

(108) Brusilow SW. Phenylacetylglutamine may replace urea as a vehicle for waste nitrogen excretion. Pediatr Res 1991 February;29(2):147-50.

(109) Zimmerman L, Egestad B, Jornvall H, Bergstrom J. Identification and determination of phenylacetylglutamine, a major nitrogenous metabolite in plasma of uremic patients. Clin Nephrol 1989 September;32(3):124-8.

(110) Bain MA, Faull R, Fornasini G, Milne RW, Evans AM. Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 2006 May;21(5):1300-4.

(111) Brosnan JT, Brosnan ME. Creatine metabolism and the urea cycle. Mol Genet Metab 2010;100 Suppl 1:S49-S52.

(112) da Silva RP, Nissim I, Brosnan ME, Brosnan JT. Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009 February;296(2):E256-E261.

(113) Bain MA, Faull R, Fornasini G, Milne RW, Evans AM. Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 2006 May;21(5):1300-4.

(114) Pandya KG, Budhram R, Clark G, Lau-Cam CA. Comparative evaluation of taurine and thiotaurine as protectants against diabetes-induced nephropathy in a rat model. Adv Exp Med Biol 2013;775:371-94.

(115) Qi S, Ouyang X, Wang L, Peng W, Wen J, Dai Y. A pilot metabolic profiling study in serum of patients with chronic kidney disease based on (1) H-NMR-spectroscopy. Clin Transl Sci 2012 October;5(5):379-85.

(116) Chua HR, Baldwin I, Fealy N, Naka T, Bellomo R. Amino acid balance with extended daily diafiltration in acute kidney injury. Blood Purif 2012;33(4):292-9.

(117) Han X, Chesney RW. The role of taurine in renal disorders. Amino Acids 2012 December;43(6):2249-63.

(118) Ye HB, Shi HB, Yin SK. Mechanisms underlying taurine protection against glutamate-induced neurotoxicity. Can J Neurol Sci 2013 September;40(5):628-34.

(119) Liu P, Ge X, Ding H, Jiang H, Christensen BM, Li J. Role of glutamate decarboxylase-like protein 1 (GADL1) in taurine biosynthesis. J Biol Chem 2012 November 30;287(49):40898-906.

(120) Phisitkul S, Khanna A, Simoni J, Broglio K, Sheather S, Rajab MH et al. Amelioration of metabolic acidosis in patients with low GFR reduced kidney endothelin production and kidney injury, and better preserved GFR. Kidney Int 2010 April;77(7):617-23.

(121) Rhee EP, Gerszten RE. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. Clin Chem 2012 January;58(1):139-47.

(122) Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. Nat Rev Nephrol 2012 January;8(1):22-33.

(123) Teul J, Ruperez FJ, Garcia A, Vaysse J, Balayssac S, Gilard V et al. Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and 1H NMR fingerprints. J Proteome Res 2009 December;8(12):5580-9.

(124) Vallejo M, Garcia A, Tunon J, Garcia-Martinez D, Angulo S, Martin-Ventura JL et al. Plasma fingerprinting with GC-MS in acute coronary syndrome. Anal Bioanal Chem 2009 July;394(6):1517-24.

(125) Raj DS, Ouwendyk M, Francoeur R, Pierratos A. Plasma amino acid profile on nocturnal hemodialysis. Blood Purif 2000;18(2):97-102.

(126) Zhang F, Jia Z, Gao P, Kong H, Li X, Chen J et al. Metabonomics study of atherosclerosis rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry. Talanta 2009 August 15;79(3):836-44.

(127) Marcus J, Sarnak MJ, Menon V. Homocysteine lowering and cardiovascular disease risk: lost in translation. Can J Cardiol 2007 July;23(9):707-10.

(128) Beard RS, Jr., Bearden SE. Vascular complications of cystathionine beta-synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011 January;300(1):H13-H26.

(129) Kazory A, Klein A, Chalopin JM, Ducloux D, Courivaud C. Obesity and atherosclerotic events in chronic hemodialysis patients: a prospective study. Nephrol Dial Transplant 2013 November;28 Suppl 4:iv188-iv194.

(130) Zoccali C, Jager KJ. Hyperhomocysteinemia: a renal and cardiovascular risk factor? Nat Rev Nephrol 2010 December;6(12):695-6.

(131) Bostom AG, Carpenter MA, Kusek JW, Levey AS, Hunsicker L, Pfeffer MA et al. Homocysteine-lowering and cardiovascular disease outcomes in kidney transplant recipients: primary results from the Folic Acid for Vascular Outcome Reduction in Transplantation trial. Circulation 2011 April 26;123(16):1763-70.

(132) Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. Am J Clin Nutr 2001 December;74(6):723-9.

(133) Sen U, Basu P, Abe OA, Givvimani S, Tyagi N, Metreveli N et al. Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. Am J Physiol Renal Physiol 2009 August;297(2):F410-F419.

(134) Sarov M, Not A, de Baulny HO, Masnou P, Vahedi K, Bousser MG et al. A case of homocystinuria due to CBS gene mutations revealed by cerebral venous thrombosis. J Neurol Sci 2013 October 11.

(135) Ruhoy IS, Merritt JL, Amlie-Lefond C. Cystathionine Beta-synthase Deficiency Heralded by Cerebral Sinus Venous Thrombosis and Stroke. Pediatr Neurol 2013 October 15.

(136) Bomback AS, Klemmer PJ. Interaction of aldosterone and extracellular volume in the pathogenesis of obesity-associated kidney disease: a narrative review. Am J Nephrol 2009;30(2):140-6.

(137) Luther JM, Luo P, Wang Z, Cohen SE, Kim HS, Fogo AB et al. Aldosterone deficiency and mineralocorticoid receptor antagonism prevent angiotensin II-induced cardiac, renal, and vascular injury. Kidney Int 2012 September;82(6):643-51.

(138) Whaley-Connell A, Johnson MS, Sowers JR. Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. Prog Cardiovasc Dis 2010 March;52(5):401-9.

(139) Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kato Y et al. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. J Am Soc Nephrol 2012 July;23(7):1198-209.

(140) Shibata S, Fujita T. The kidneys and aldosterone/mineralocorticoid receptor system in salt-sensitive hypertension. Curr Hypertens Rep 2011 April;13(2):109-15.

(141) Whaley-Connell A, Johnson MS, Sowers JR. Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. Prog Cardiovasc Dis 2010 March;52(5):401-9.

(142) Szachowicz-Petelska B, Dobrzynska I, Skrodzka M, Darewicz B, Figaszewski ZA, Kudelski J. Phospholipid composition and electric charge in healthy and cancerous parts of human kidneys. J Membr Biol 2013 May;246(5):421-5.

(143) Yang WL, Bai Q, Li DD, TL A, Wang S, Zhao RS et al. Changes of urinary phospholipids in the chronic kidney disease patients. Biomarkers 2013 September 13.

(144) Pahl MV, Ni Z, Sepassi L, Moradi H, Vaziri ND. Plasma phospholipid transfer protein, cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyltransferase in end-stage renal disease (ESRD). Nephrol Dial Transplant 2009 August;24(8):2541-6.

(145) Njalsson R, Norgren S. Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. Acta Paediatr 2005 February;94(2):132-7.

(146) Ruijter GJ, Mourad-Baars PE, Ristoff E, Onkenhout W, Poorthuis BJ. Persistent 5-oxoprolinuria with normal glutathione synthase and 5-oxoprolinase activities. J Inherit Metab Dis 2006 August;29(4):587.

(147) Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Sayed-Ahmed MM, Al-Shabanah OA, Abuohashish HM, Ahmed MM et al. Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholestrolemic male Westar rat. BMC Complement Altern Med 2013;13:136.

(148) Aminzadeh MA, Nicholas SB, Norris KC, Vaziri ND. Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2013 August;28(8):2038-45.

(149) Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. Biochem Biophys Res Commun 2013 July 19;437(1):7-11.

(150) Wesseling S, Joles JA, van GH, Bluyssen HA, Kemmeren P, Holstege FC et al. Transcriptome-based identification of pro- and antioxidative gene expression in kidney cortex of nitric oxide-depleted rats. Physiol Genomics 2007 January 17;28(2):158-67.

(151) Tutelyan VA, Kravchenko LV, Aksenov IV, Trusov NV, Guseva GV, Kodentsova VM et al. Activity of xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver of rats with multi-vitamin deficiency. Int J Vitam Nutr Res 2013 February;83(1):5-13.

(152) Grober U. [Mitochondrial toxicity of drugs]. Med Monatsschr Pharm 2012 December;35(12):445-56.

(153) Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. Biochim Biophys Acta 2013 May;1830(5):3267-88.

(154) Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. Food Chem Toxicol 2013 October;60:38-44.

(155) Wu HZ, Guo L, Mak YF, Liu N, Poon WT, Chan YW et al. Proteomics investigation on aristolochic acid nephropathy: a case study on rat kidney tissues. Anal Bioanal Chem 2011 April;399(10):3431-9.

(156) Chen J, Mercer G, Roth SR, Abraham L, Lutz P, Ercal N et al. Sub-chronic lead exposure alters kidney proteome profiles. Hum Exp Toxicol 2011 October;30(10):1616-25.

(157) Ramo K, Cashman SM, Kumar-Singh R. Evaluation of adenovirus-delivered human CD59 as a potential therapy for AMD in a model of human membrane attack complex formation on murine RPE. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008 September;49(9):4126-36.

(158) Huang Y, Fedarovich A, Tomlinson S, Davies C. Crystal structure of CD59: implications for molecular recognition of the complement proteins C8 and C9 in the membrane-attack complex. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2007 June;63(Pt 6):714-21.

(159) Aregger F, Uehlinger DE, Witowski J, Brunisholz RA, Hunziker P, Frey FJ et al. Identification of IGFBP-7 by urinary proteomics as a novel prognostic marker in early acute kidney injury. Kidney Int 2013 September 25.

(160) Bonventre JV. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. Contrib Nephrol 2007;156:39-46.

(161) Borgeson E, Godson C. Molecular circuits of resolution in renal disease. ScientificWorldJournal 2010;10:1370-85.

(162) Bergsland KJ, Kelly JK, Coe BJ, Coe FL. Urine protein markers distinguish stone-forming from non-stone-forming relatives of calcium stone formers. Am J Physiol Renal Physiol 2006 September;291(3):F530-F536.

(163) Li B, Xu YJ, Chu XM, Gao MH, Wang XH, Nie SM et al. Molecular mechanism of inhibitory effects of CD59 gene on atherosclerosis in ApoE (-/-) mice. Immunol Lett 2013 September 29;156(1-2):68-81.

(164) Qin X, Goldfine A, Krumrei N, Grubissich L, Acosta J, Chorev M et al. Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59: a possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes. Diabetes 2004 October;53(10):2653-61.

(165) Turnberg D, Lewis M, Moss J, Xu Y, Botto M, Cook HT. Complement activation contributes to both glomerular and tubulointerstitial damage in adriamycin nephropathy in mice. J Immunol 2006 September 15;177(6):4094-102.

(166) Wakabayashi M, Ohi H, Tamano M, Onda K, Fujita T, Tomino Y. Acquired loss of erythrocyte complement receptor type 1 in patients with diabetic nephropathy undergoing hemodialysis. Nephron Exp Nephrol 2006;104(3):e89-e95.

(167) Topcic D, Auguste A, De Leo AA, Lefevre C, Digby MR, Nicholas KR. Characterization of the tammar wallaby (Macropus eugenii) whey acidic protein gene: new insights into the function of the protein. Evol Dev 2009 July;11(4):363-75.

(168) Simpson KJ, Nicholas KR. The comparative biology of whey proteins. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2002 July;7(3):313-26.

(169) Lindquist JA, Mertens PR. Myofibroblasts, regeneration or renal fibrosis--is there a decisive hint? Nephrol Dial Transplant 2013 November;28(11):2678-81.

(170) Johansen FE, Kaetzel CS. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. Mucosal Immunol 2011 November;4(6):598-602.

(171) Asano M, Komiyama K. Polymeric immunoglobulin receptor. J Oral Sci 2011 June;53(2):147-56.

(172) Snoeck V, Peters IR, Cox E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. Vet Res 2006 May;37(3):455-67.

(173) Oztan A, Rondanino C, Apodaca G. Transcytosis of polymeric immunoglobulin a in polarized Madin-Darby canine kidney cells. Methods Mol Biol 2008;440:157-70.

(174) Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. Compr Physiol 2011 April;1(2):971-93.

(175) Hillmeister P, Persson PB. The Kallikrein-Kinin system. Acta Physiol (Oxf) 2012 December;206(4):215-9.

(176) Quintana LF, Campistol JM, Alcolea MP, Banon-Maneus E, Sol-Gonzalez A, Cutillas PR. Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. Mol Cell Proteomics 2009 July;8(7):1658-73.

(177) Perez V, Navarro-Munoz M, Mas S, Bayes B, Pastor MC, Martinez-Caceres E et al. Proteomic approach to the study of statin pleiotropy in kidney transplant patients. Pharmacology 2011;87(3-4):161-8.

(178) Pastushkova LK, Kireev KS, Kononikhin AS, Tiys ES, Popov IA, Starodubtseva NL et al. Detection of renal tissue and urinary tract proteins in the human urine after space flight. PLoS One 2013;8(8):e71652.

(179) Thurgood LA, Wang T, Chataway TK, Ryall RL. Comparison of the specific incorporation of intracrystalline proteins into urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. J Proteome Res 2010 September 3;9(9):4745-57.

(180) Freue GV, Sasaki M, Meredith A, Gunther OP, Bergman A, Takhar M et al. Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. Mol Cell Proteomics 2010 September;9(9):1954-67.

(181) Shannahan JH, Alzate O, Winnik WM, Andrews D, Schladweiler MC, Ghio AJ et al. Acute phase response, inflammation and metabolic syndrome biomarkers of Libby asbestos exposure. Toxicol Appl Pharmacol 2012 April 15;260(2):105-14.

(182) Bryant JW, Shariat-Madar Z. Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 2009 July;7(3):234-50.

(183) Bjorkqvist J, Jamsa A, Renne T. Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. Thromb Haemost 2013 September;110(3):399-407.

(184) Kugaevskaia EV. [Angiotensin converting enzyme and Alzheimer's disease]. Biomed Khim 2013 January;59(1):5-24.

(185) Su JB. Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2013 February 5.

(186) Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. Exp Physiol 2005 May;90(3):291-8.

(187) Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. Compr Physiol 2011 April;1(2):971-93.

(188) Bodin S, Chollet C, Goncalves-Mendes N, Gardes J, Pean F, Heudes D et al. Kallikrein protects against microalbuminuria in experimental type I diabetes. Kidney Int 2009 August;76(4):395-403.

(189) Kwak SJ, Paeng J, Kim dH, Lee SH, Nam BY, Kang HY et al. Local kallikrein-kinin system is involved in podocyte apoptosis under diabetic conditions. Apoptosis 2011 May;16(5):478-90.

(190) Potier L, Waeckel L, Vincent MP, Chollet C, Gobeil F, Jr., Marre M et al. Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes. J Pharmacol Exp Ther 2013 July;346(1):23-30.

(191) Perez V, Navarro-Munoz M, Mas S, Bayes B, Pastor MC, Martinez-Caceres E et al. Proteomic approach to the study of statin pleiotropy in kidney transplant patients. Pharmacology 2011;87(3-4):161-8.

(192) Kayashima Y, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system and oxidative stress. Curr Opin Nephrol Hypertens 2012 January;21(1):92-6.

(193) Tomita H, Sanford RB, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. Kidney Int 2012 April;81(8):733-44.

(194) Albert-Weissenberger C, Siren AL, Kleinschnitz C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: the role of the kallikrein-kinin system. Prog Neurobiol 2013 February;101-102:65-82.

(195) Regoli D, Plante GE, Gobeil F, Jr. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. Pharmacol Ther 2012 July;135(1):94-111.

(196) Henze A, Raila J, Kempf C, Reinke P, Sefrin A, Querfeld U et al. Vitamin A metabolism is changed in donors after living-kidney transplantation: an observational study. Lipids Health Dis 2011;10:231.

(197) Koch A, Weiskirchen R, Sanson E, Zimmermann HW, Voigt S, Duckers H et al. Circulating retinol binding protein 4 in critically ill patients before specific treatment: prognostic impact and correlation with organ function, metabolism and inflammation. Crit Care 2010;14(5):R179.

(198) Huang J, Chen Y, Dong B, Kong W, Zhang J, Xue W et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on renal protection in patients undergoing laparoscopic partial nephrectomy: a 'blinded' randomised controlled trial. BJU Int 2013 July;112(1):74-80.

(199) Titan SM, Vieira JM, Jr., Dominguez WV, Moreira SR, Pereira AB, Barros RT et al. Urinary MCP-1 and RBP: independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy. J Diabetes Complications 2012 November;26(6):546-53.

(200) Henze A, Frey SK, Raila J, Scholze A, Spranger J, Weickert MO et al. Alterations of retinol-binding protein 4 species in patients with different stages of chronic kidney disease and their relation to lipid parameters. Biochem Biophys Res Commun 2010 February 26;393(1):79-83.

(201) Chen D, Tang Z, Luo C, Chen H, Liu Z. Clinical and pathological spectrums of aristolochic acid nephropathy. Clin Nephrol 2012 July;78(1):54-60.

(202) Wu X, Wei S, Wei Y, Guo B, Yang M, Zhao D et al. The reference dose for subchronic exposure of pigs to cadmium leading to early renal damage by benchmark dose method. Toxicol Sci 2012 August;128(2):524-31.

(203) Blumczynski A, Soltysiak J, Lipkowska K, Silska M, Poprawska A, Musielak A et al. Hypertensive nephropathy in children - do we diagnose early enough? Blood Press 2012 August;21(4):233-9.

(204) Del PM, Romero S, Casado JL. Proximal tubular renal dysfunction or damage in HIV-infected patients. AIDS Rev 2012 July;14(3):179-87.

(205) Del PM, Romero S, Casado JL. The use of biomarkers for assessing HAART-associated renal toxicity in HIV-infected patients. Curr HIV Res 2012 September;10(6):521-31.

(206) Barazzoni R, Zanetti M, Semolic A, Pirulli A, Cattin MR, Biolo G et al. high plasma rbp4 is associated with systemic inflammation independently of low rbp4 adipose expression and is normalized by transplantation in non-obese, non-diabetic patients with chronic kidney disease. Clin Endocrinol (Oxf) 2011 January 21.

(207) Ahn JM, Kim BG, Yu MH, Lee IK, Cho JY. Identification of diabetic nephropathy-selective proteins in human plasma by multi-lectin affinity chromatography and LC-MS/MS. Proteomics Clin Appl 2010 July;4(6-7):644-53.

(208) Ng DP, Salim A, Lim XL, Nurbaya S. Estimated glomerular filtration rate and its association with the retinol-binding protein 4 (RBP4) locus on human chromosome 10q23. Nephrol Dial Transplant 2012 April;27(4):1511-5.

(209) Kalousova M, Kubena AA, Kostirova M, Vinglerova M, Ing OM, Dusilova-Sulkova S et al. Lower retinol levels as an independent predictor of mortality in long-term hemodialysis patients: a prospective observational cohort study. Am J Kidney Dis 2010 September;56(3):513-21.

(210) Akbay E, Muslu N, Nayir E, Ozhan O, Kiykim A. Serum retinol binding protein 4 level is related with renal functions in Type 2 diabetes. J Endocrinol Invest 2010 November;33(10):725-9.

(211) Sjoberg EM, Fries E. Biosynthesis of bikunin (urinary trypsin inhibitor) in rat hepatocytes. Arch Biochem Biophys 1992 June;295(2):217-22.

(212) Grewal JS, Tsai JY, Khan SR. Oxalate-inducible AMBP gene and its regulatory mechanism in renal tubular epithelial cells. Biochem J 2005 May 1;387(Pt 3):609-16.

(213) Tyagi S, Surjit M, Roy AK, Jameel S, Lal SK. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-

microglobulin/bikunin precursor (AMBP) and expedites their export from the hepatocyte. J Biol Chem 2004 July 9;279(28):29308-19.

(214) Marcus Säemann, Thomas Weichhart, inventors; Method for indicating a renal disease in a patient. patent WO 2012146778 A2. 2009.

(215) Weichhart T, Kopecky C, Kubicek M, Haidinger M, Doller D, Katholnig K et al. Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. J Am Soc Nephrol 2012 May;23(5):934-47.

(216) Schrader J, Luders S, Kulschewski A, Hammersen F, Zuchner C, Venneklaas U et al. Microalbuminuria and tubular proteinuria as risk predictors of cardiovascular morbidity and mortality in essential hypertension: final results of a prospective long-term study (MARPLE Study)*. J Hypertens 2006 March;24(3):541-8.

(217) Luczak M, Formanowicz D, Pawliczak E, Wanic-Kossowska M, Wykretowicz A, Figlerowicz M. Chronic kidney disease-related atherosclerosis - proteomic studies of blood plasma. Proteome Sci 2011;9:25.

(218) Acosta-Martin AE, Panchaud A, Chwastyniak M, Dupont A, Juthier F, Gautier C et al. Quantitative mass spectrometry analysis using PAcIFIC for the identification of plasma diagnostic biomarkers for abdominal aortic aneurysm. PLoS One 2011;6(12):e28698.

(219) Lepedda AJ, Fancellu L, Zinellu E, De MP, Nieddu G, Deiana GA et al. Urine bikunin as a marker of renal impairment in Fabry's disease. Biomed Res Int 2013;2013:205948.

(220) Shore N, Khurshid R, Saleem M. Alpha-1 microglobulin: a marker for early detection of tubular disorders in diabetic nephropathy. J Ayub Med Coll Abbottabad 2010 October;22(4):53-5.

(221) Chen YM, Miner JH. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. Transl Res 2012 October;160(4):291-7.

(222) Bader BL, Smyth N, Nedbal S, Miosge N, Baranowsky A, Mokkapati S et al. Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. Mol Cell Biol 2005 August;25(15):6846-56.

(223) Holland A, Dowling P, Zweyer M, Swandulla D, Henry M, Clynes M et al. Proteomic profiling of cardiomyopathic tissue from the aged mdx model of Duchenne muscular dystrophy reveals a drastic decrease in laminin, nidogen and annexin. Proteomics 2013 August;13(15):2312-23.

(224) Angel PM, Nusinow D, Brown CB, Violette K, Barnett JV, Zhang B et al. Networked-based characterization of extracellular matrix proteins from adult mouse pulmonary and aortic valves. J Proteome Res 2011 February 4;10(2):812-23.

(225) Hawkes CA, Gatherer M, Sharp MM, Dorr A, Yuen HM, Kalaria R et al. Regional differences in the morphological and functional effects of aging on cerebral basement membranes and perivascular drainage of amyloid-beta from the mouse brain. Aging Cell 2013 April;12(2):224-36.

(226) Gubler MC. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. Nat Clin Pract Nephrol 2008 January;4(1):24-37.

(227) Amann K, Haas CS, Zeiler GA, Benz K, Bader BL, Hartner A et al. Lack of nidogen-2 increases blood pressure, glomerular and tubulointerstitial damage in DOCA-salt hypertension. Eur J Clin Invest 2009 February;39(2):116-25.

(228) Ning M, Sarracino DA, Kho AT, Guo S, Lee SR, Krastins B et al. Proteomic temporal profile of human brain endothelium after oxidative stress. Stroke 2011 January;42(1):37-43.

(229) Kittelberger R, Davis PF, Stehbens WE. Distribution of type IV collagen, laminin, nidogen and fibronectin in the haemodynamically stressed vascular wall. Histol Histopathol 1990 April;5(2):161-7.

(230) Hassan MI, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F. Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. Mol Cancer Res 2008 June;6(6):892-906.

(231) Edwards JJ, Tollaksen SL, Anderson NG. Proteins of human urine. III. Identification and two-dimensional electrophoretic map positions of some major urinary proteins. Clin Chem 1982 April;28(4 Pt 2):941-8.

(232) Tedeschi S, Pilotti E, Parenti E, Vicini V, Coghi P, Montanari A et al. Serum adipokine zinc alpha2-glycoprotein and lipolysis in cachectic and noncachectic heart failure patients: relationship with neurohormonal and inflammatory biomarkers. Metabolism 2012 January;61(1):37-42.

(233) Lim SC, Liying DQ, Toy WC, Wong M, Yeoh LY, Tan C et al. Adipocytokine zinc alpha2 glycoprotein (ZAG) as a novel urinary biomarker for normo-albuminuric diabetic nephropathy. Diabet Med 2012 July;29(7):945-9.

(234) de RB, Geelen A, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G et al. Identification of potential serum biomarkers of inflammation and lipid modulation that are altered by fish oil supplementation in healthy volunteers. Proteomics 2008 May;8(10):1965-74.

(235) Garcia-Ramirez M, Canals F, Hernandez C, Colome N, Ferrer C, Carrasco E et al. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. Diabetologia 2007 June;50(6):1294-303.

(236) Rojkjaer R, Schmaier AH. Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cell membranes. Immunopharmacology 1999 September;43(2-3):109-14.

(237) Braun C, Kleemann T, Hilgenfeldt U, Riester U, Rohmeiss P, van der Woude FJ. Activity and functional significance of the renal kallikrein-kinin-system in polycystic kidney disease of the rat. Kidney Int 2002 June;61(6):2149-56.

(238) Barbalic M, Schwartz GL, Chapman AB, Turner ST, Boerwinkle E. Kininogen gene (KNG) variation has a consistent effect on aldosterone response to antihypertensive drug therapy: the GERA study. Physiol Genomics 2009 September 9;39(1):56-60.

(239) Eddy AA. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. Thromb Haemost 2009 April;101(4):656-64.

(240) Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int 2006 January;69(2):213-7.

(241) Nguyen C, Dreux S, Heidet L, Czerkiewicz I, Salomon LJ, Guimiot F et al. Fetal serum alpha-1 microglobulin for renal function assessment: comparison with beta2-microglobulin and cystatin C. Prenat Diagn 2013 August;33(8):775-81.

(242) Petrica L, Vlad A, Petrica M, Jianu CD, Gluhovschi G, Gadalean F et al. Pioglitazone delays proximal tubule dysfunction and improves cerebral vessel endothelial dysfunction in normoalbuminuric people with type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 2011 October;94(1):22-32.

(243) Russell ST, Tisdale MJ. Role of beta-adrenergic receptors in the oral activity of zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG). Endocrinology 2012 October;153(10):4696-704.

(244) Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? Trends Immunol 2007 April;28(4):184-92.