

Universidad Autónoma de Barcelona

Departamento de Medicina

**Análisis del perfil de péptidos en sangre y orina en
pacientes con nefropatía IgA y su asociación con las lesiones
histológicas según la clasificación de Oxford**

Licenciada Fredzzia Amada Graterol Torres

Director de investigación: Profesor Ramón Vicente Antonio

Romero González.

Trabajo de investigación.

Convocatoria de Septiembre

Barcelona, 04 de Septiembre de 2012

Certificado del director	3
Resumen	4
Introducción	6
Material y métodos	9
Población de estudio	9
Criterios de inclusión	9
Parámetros clínicos y bioquímicos.....	10
Biopsia renal.....	10
Recogida muestra de sangre	11
Recogida muestra de orina	11
Extracción de péptidos e identificación por MALDI-TOF MS.....	12
Análisis estadístico	13
Resultados	14
Identificación de péptidos relacionados con la nefropatía IgA en sangre y orina	14
Asociación entre los péptidos relacionados con la nefropatía IgA y las lesiones histológicas según la clasificación de Oxford.....	15
Asociación entre péptidos y el doble de la creatinina sérica.....	18
Asociación entre péptidos y los parámetros clínicos	18
Discusión	20
Limitaciones del estudio	28
Conclusiones	30
Bibliografía	31
Leyendas figuras	36
Figura 1	47
Figura 2	48
Figura 3	49
Figura 4	52
Tablas	
Tabla 1	38
Tabla 2	41
Tabla 3	46
Tabla 4	50
Tabla 5	53

**CERTIFICAT DEL DIRECTOR O CO-DIRECTOR DEL
TREBALL DE RECERCA**

Ramón Vicente Antonio Romero González, Professor del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap de servei de Nefrologia del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,

Fa constar,

que el treball titulat **“Análisis del perfil de péptidos en sangre y orina en pacientes con nefropatía IgA y su asociación con las lesiones histológicas según la clasificación de Oxford”** ha estat realitzat sota la meua direcció pel llicenciat **Fredzzia Amada Graterol Torres**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna (curs 2011-2012), a la convocatòria de setembre.

Barcelona, 04 de setembre de dos mil dotze.

Resumen

Introducción: La nefropatía IgA (NIgA) es la glomerulonefritis primaria más común, con una progresión a la insuficiencia renal de 15-40%. Su diagnóstico se realiza a través de la biopsia renal siendo un método invasivo y no exento de complicaciones.

Objetivo: Encontrar una asociación entre un patrón de péptidos en sangre/orina de pacientes con NIgA y las lesiones histológicas descritas en la biopsia renal según la clasificación de Oxford.

Material y métodos: Estudio prospectivo, que incluye 19 pacientes con diagnóstico de NIgA y 14 sujetos sanos utilizados como controles en el período 2006-2009, excluyendo aquellos que presentaban reacción extracapilar. Se incluyeron datos clínicos y bioquímicos al momento del diagnóstico y a los 24 meses. Las lesiones histológicas fueron evaluadas según la Clasificación de Oxford. El análisis proteómico fue realizado mediante la tecnología de esferas magnéticas y espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Se consideró el doble de la creatinina como variable de mal pronóstico.

Resultados: Se encontraron 55 péptidos (13 en suero, 26 en plasma, 16 en orina) que permitieron diferenciar los pacientes de los controles. Existe una asociación significativa entre los péptidos

derivados de uromodulina y alfa-1-antitripsina en orina, y bradiquinina en plasma y la lesión tubulointersticial y la glomeruloesclerosis. Además, existe una asociación con una peor función renal, tanto del perfil de péptidos urinarios m/z (1769, 1898, 1913, 1945, 2378, 2491, 2977, 3004, 3389, 3406, 4752) como con el perfil de péptidos en suero/plasma m/z (5337,9289).

Conclusión: El análisis proteómico en sangre y orina permite identificar un perfil de péptidos asociado con las lesiones histológicas en pacientes con NIgA.

Introducción

La nefropatía IgA es la glomerulonefritis primaria más común en el mundo, siendo una causa importante de insuficiencia renal que conduce a enfermedad renal terminal (ERCT) en el 15-40% de los pacientes después de 20-25 años de seguimiento ¹.

Características clínicas tales como el sexo, proteinuria > 1gr/día, aumento de la creatinina sérica y la hipertensión se han asociado con un mal pronóstico ². Además, hallazgos anatomopatológicos en el momento del diagnóstico tales como la glomeruloesclerosis y la lesión tubulointersticial se han descrito también como predictores de mal pronóstico renal ³.

Actualmente el diagnóstico de la nefropatía por IgA se realiza por biopsia renal, basado en criterios patológicos que incluyen la presencia de depósitos de IgA mesangial difusa en el estudio de inmunofluorescencia. La clasificación de Oxford es un reciente método de clasificación histopatológica, que evalúa las variables histológicas utilizando un método cuantitativo relativamente sencillo. Esta nueva evaluación ha demostrado ser más precisa en el análisis de las biopsias de nefropatía IgA ³.

De esta forma el carácter invasivo de la biopsia renal y sus

complicaciones asociadas pueden contraindicar el procedimiento en algunos pacientes, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas diagnósticas no invasivas.

En la última década, la proteómica se ha aplicado ampliamente en diversos campos de la medicina incluyendo la nefrología, utilizándose para estudiar simultáneamente cientos de proteínas^{1,4-8}. La sangre y la orina son dos de los fluidos biológicos más utilizados en proteómica clínica, ya que pueden obtenerse de forma no invasiva, además que permite identificar marcadores relacionados con la enfermedad glomerular de forma directa⁹⁻¹⁹.

El análisis peptídico es un método de identificación de péptidos diferenciales en auge, que está ganando popularidad en la búsqueda de posibles nuevos biomarcadores²⁰⁻²⁸ en las enfermedades glomerulares. El fraccionamiento mediante esferas magnéticas acoplado a la espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF MS), se ha introducido recientemente como una técnica de identificación de péptidos urinarios, permitiendo un análisis rápido y de alto rendimiento²⁹⁻³¹.

Por lo tanto, hemos querido utilizar este método para comparar perfiles de péptidos en sangre y orina en pacientes diagnosticados de nefropatía IgA, a través de biopsia renal, con sujetos sanos con la

finalidad de encontrar un perfil de péptidos asociado a las lesiones histológicas encontradas en la biopsia renal según la clasificación de Oxford.

Población de estudio

Se ha realizado un estudio prospectivo, incluyendo pacientes diagnosticados de NIgA entre junio de 2006 y noviembre de 2009 en el Departamento de Nefrología del Hospital Germans Trias i Pujol (Barcelona, España). Todos los procedimientos se realizaron de conformidad con la Declaración de Helsinki de 1971, revisada en 2008. Los comités de ética local aprobaron el protocolo de estudio y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar.

Criterios de inclusión

Para su inclusión, los pacientes debían ser mayores de 18 años, mostrar signos clínicos de enfermedad renal, tales como presencia de proteinuria con función renal estable o diferentes grados de insuficiencia renal, presencia de hematuria, en los que se indicaba una biopsia renal. Sólo se incluyeron pacientes con nefropatía IgA primaria. Los pacientes con glomerulonefritis y reacción extracapilar (presencia de semilunas) fueron excluidos. Los sujetos sanos se utilizaron como controles para establecer un perfil de péptidos normal (Tabla 1).

Parámetros clínicos y bioquímicos

Los siguientes datos clínicos se recogieron en el momento del diagnóstico: edad, género, historia de hipertensión, diabetes mellitus o dislipidemia. Datos bioquímicos como: niveles séricos de ácido úrico, albúmina y colesterol, proteinuria, hematuria, presión arterial sistólica y diastólica, fueron recogidos en el momento de la realización de la biopsia renal y a los dos años de seguimiento. De igual forma se registraron durante el estudio el uso de estatinas y de tratamiento antihipertensivo basado en el bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

Biopsia renal

Se obtuvo una muestra de biopsia renal percutánea de cada paciente al inicio del estudio, antes del inicio de tratamiento con bloqueadores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (BSRAA), corticoesteroides o cualquier otro tratamiento inmunosupresor.

Las biopsias renales fueron procesadas y analizadas de forma rutinaria a través del microscopio óptico, inmunofluorescencia y microscopía electrónica de acuerdo con el procedimiento estándar. En el estudio de microscopía óptica, las muestras fueron procesadas y teñidas con hematoxilina/eosina, ácido periódico de Schiff, plata metenamina, tricrómico de Masson, y rojo Congo.

En el momento de la biopsia, las muestras de biopsias renales eran

revisadas por un patólogo y evaluaba las variables histopatológicas de acuerdo con la clasificación de Oxford. Las cuatro variables incluidas dentro de la clasificación de Oxford se describen a continuación: Score mesangial: $\leq 0,5$ (M0) o $> 0,5$ (M1); Glomeruloesclerosis segmentaria: ausente (S0) o presente (S1); hiper celularidad endocapilar: ausente (E0) o presente (E1); atrofia tubular/fibrosis intersticial $\leq 25\%$ (T0), 26 a 50% (T1) o $> 50\%$ (T2)³.

Recogida muestras de sangre

Fueron tomadas muestras de sangre de los pacientes incluidos, en el mismo día en que se realizaba la biopsia renal ²⁹. Las muestras de plasma-EDTA y de suero se obtuvieron por centrifugación a 2200 g durante 10 min, para eliminar partículas y restos celulares. Se alicuotaron las muestras para evitar ciclos de congelación-descongelación, siendo posteriormente almacenadas a -80°C hasta su uso.

Recogida muestras de orina

Fueron tomadas muestras de orina frescas de la primera micción de la mañana el mismo día de la realización de la biopsia renal ²⁹. Posteriormente las muestras de orina fueron centrifugadas a 2100 g durante 30 min a 4°C para eliminar restos celulares. El sobrenadante fue ajustado a un pH de 6,5 con NH_4HCO_3 (1M) para minimizar la precipitación de proteínas durante el almacenamiento, y se alicuotó

para evitar ciclos de congelación-descongelación, siendo posteriormente almacenados a -80 °C hasta su uso ²⁹. No se añadió inhibidores de la proteasa a las muestras y no fue necesaria la normalización de concentración de proteínas en las muestras de orina para el análisis proteómico ³⁰.

Extracción de los péptidos e identificación por MALDI-TOF MS

Los péptidos en plasma y suero (80 mL), y en el sobrenadante de las muestras de orina (110 mL) se extrajeron usando esferas magnéticas. El kit de extracción de péptidos utilizado para las muestras de sangre fue el MB-IMAC Cu (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), que se basa en la afinidad de los péptidos para los iones de cobre inmovilizado en la superficie de las esferas magnéticas; mientras que en el caso de las muestras de orina las esferas utilizadas estaban recubiertas con cadenas alifáticas C18 (Dynabeads® RP-C18, Invitrogen, Países Bajos). En este caso los péptidos son capturados a través de interacciones hidrófobas.

Las muestras de plasma, suero y orina fueron procesadas por duplicado, y cada duplicado fue analizado dos veces en la placa MALDI (AnchorChip 600/384, Bruker Daltonics). Así, se obtuvieron cuatro espectros de MALDI para cada muestra, adquirida para valores m/z desde 1000 a 10.000.

Se utilizó el sistema ClinProTools (v2.0; Bruker Daltonics) para analizar los perfiles de péptidos. Los detalles sobre el análisis de MALDI-TOF MS y la selección de los péptidos de interés, están descritos en estudios anteriores de nuestro grupo^{30,32}.

Análisis estadístico

La normalidad de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar, mediana y rango y se compararon mediante el test U de Mann-Whitney. Las variables categóricas se analizaron mediante chi-cuadrado o la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Las asociaciones entre variables se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) considerando significación estadística un p-valor $<0,05$.

Resultados

Se incluyeron 19 pacientes con NIgA y 14 sujetos sanos incluidos como controles. Las características clínicas y bioquímicas basales y al seguimiento se describen en la Tabla 1.

Se observaron diferencias significativas entre los grupos con respecto a la edad y a la función renal, pero no en el género. Además, se compararon las variables clínicas y bioquímicas en el momento de la biopsia con aquellos al final del seguimiento (24 meses).

Durante el seguimiento, un total de n=5 pacientes (26,3%) alcanzaron el doble de la creatinina sérica observándose una diferencia significativa al final del seguimiento. Por otro lado la proteinuria disminuyó en el último control de seguimiento. Además, se observaron diferencias significativas entre los valores basales y de seguimiento en los niveles de colesterol y de albúmina plasmática.

Identificación de péptidos relacionados con la nefropatía IgA en sangre y orina

Como se muestra en la Tabla 2, el perfil de péptidos en suero/plasma y orina en pacientes con NIgA mostró una diferencia significativa respecto al de los sujetos sanos, y utilizando Clinprotools se obtuvieron 13 péptidos diferenciales en suero, 26 en plasma y 16 en

orina que permitieron diferenciar entre pacientes con NIgA de los sujetos sanos de forma estadísticamente significativa. De estos péptidos, dos péptidos en plasma y seis en orina han sido identificados por nuestro grupo en trabajos previos ^{30,32}.

Nuestros resultados anteriores demostraron que los péptidos detectados en el plasma con $m/z=1063$ y $m/z=1898$ correspondían a la bradiquinina (KNG1) y factor del complemento C4 (C4A), respectivamente ³². Así mismo, los péptidos detectados en la orina con $m/z=1898$ y 1913 correspondían a la uromodulina (UMOD), y los péptidos de $m/z=1945$, 2392, y 2505 correspondían a la alfa-1-antitripsina (A1AT), y el péptido $m/z=2714$ correspondía a la beta-2-microglobulina (B2M) ¹³.

Asociación entre los péptidos relacionados con la nefropatía IgA y las lesiones histológicas de acuerdo a la clasificación de Oxford

Las lesiones histológicas de los pacientes NIgA se resumen en la Tabla 3.

Como se muestra en la Tabla 4 los péptidos con m/z 1466, 1617, 3193, 3264, 5337, 5889, 5905, 5966 y 9289 en suero, los péptidos con m/z 1063, 1078, 2661 y 2790 en plasma, y los péptidos con m/z 1769, 1898, 1945, 2491, 2977, 3004, 3389, 3406, 4658 y 4752 en

orina de los pacientes con NIgA se asociaban con la lesión de fibrosis intersticial/atrofia tubular (IFTA).

Al evaluar la afectación tubulointersticial T2 (> 50%) en los pacientes con NIgA, observamos que los péptidos en suero con m/z 1466, 1617, 5905, 5966, 9289 estaban aumentados en pacientes con lesión tubulointersticial T2 en comparación con los otros dos grupos (T0, T1). Pero, no se encontraron diferencias significativas en los péptidos en suero m/z 3264, 5337, 5889 entre los diferentes grados de afectación tubulointersticial.

En el plasma, los péptidos con m/z 2661 y 2790 estaban aumentados y los péptidos con m/z 1063, 1078 estaban disminuidos en los pacientes con lesión tubulointersticial T2 en comparación con los otros dos grupos (T0, T1).

En la orina, los péptidos urinarios con m/z 1945 y 2491 estaban aumentados en comparación con el grupo de pacientes con afectación tubulointersticial T0 y T1.

De forma contraria, los péptidos urinarios con m/z 1769, 1898, 2977, 3004, 3389, 3406, 4658, y 4752 estaban disminuidos en los pacientes con afectación tubulointersticial T2, en comparación con el grupo de pacientes con afectación T0 y T1.

Como se muestra en la Figura 1a-d, los péptidos urinarios con m/z 1945, 2392 y 4013 de pacientes con lesión S1 aumentaron, pero el péptido con m/z 3389 disminuyó en comparación con los pacientes con NIgA clasificados como glomeruloesclerosis segmentaria S0. Sin embargo, no se hallaron asociaciones entre la glomeruloesclerosis y los péptidos en suero y plasma.

En cuanto a la hiper celularidad endocapilar, la lesión descrita como E0, se asoció con una disminución de los péptidos con m/z 1546 y 3264, mientras que el péptido con m/z 3242 estaba aumentado en el suero de pacientes con nefropatía IgA (Figura 2a-c). Además, los péptidos con m/z 3242 y m/z 8602 estaban aumentados en el plasma de los pacientes que presentaban hiper celularidad endocapilar (E1) (Figura 3a-b). No se hallaron asociaciones entre los péptidos urinarios.

No se observaron asociaciones entre los péptidos de suero/plasma u orina y la proliferación mesangial en los pacientes con NIgA.

Como se muestra en la Tabla 4, los péptidos con m/z 1466, 1617, 3193, 3264, 5337, 5889, 5905, 5966 y 9289 en suero, los péptidos con m/z 1063, 1078, 2661 y 2790 en el plasma, y los péptidos con m/z 1769, 1898, 1945, 2491, 2977, 3004, 3389, 3406, 4658 y 4752 en orina de los pacientes con NIgA estaban asociados con la lesión

fibrosis intersticial / atrofia tubular (IFTA).

Asociación entre péptidos y doble de la creatinina sérica

Como se describió anteriormente, se observó una asociación entre los péptidos con m/z 2953, 5337, 9289 en el suero y m/z 9287 en el plasma con una peor evolución de la función renal en los pacientes con NIGa. Además, se observó una asociación entre los péptidos de orina con m/z 1769, 1898, 1913, 1945, 2491, 2756, 2977, 3004, 3389, 4752 y el doble de la creatinina sérica en el mismo grupo.

Asociación entre los péptidos y los parámetros clínicos.

No se encontraron asociaciones entre los parámetros clínicos y el perfil de péptidos de suero/plasma y orina de los pacientes con NIGa.

Se halló una correlación inversa entre los péptidos urinarios derivados de la UMOD (m/z 1898, 1913) y los niveles basales de creatinina sérica y proteinuria. Del mismo modo, se encontró una correlación positiva entre los péptidos derivados de A1AT (m/z 1945, 2392, 2505) y la proteinuria.

La mayoría de nuestros pacientes presentaban diferentes grados de hematuria en el momento del diagnóstico, por lo que no fue posible determinar la influencia de la hematuria en los cambios del perfil de

péptidos.

Discusión

La importancia de la nefropatía IgA se basa en su incidencia y pronóstico: de un 15 a 40% de los casos presentan insuficiencia renal crónica terminal después de 20-25 años de seguimiento ³³, lo que requiere la búsqueda de técnicas de temprano y fácil diagnóstico.

En este estudio prospectivo, nos propusimos realizar un análisis preliminar el cual tiene como principal objetivo identificar a través del análisis proteómico en sangre y orina potenciales biomarcadores peptídicos asociados a las lesiones histológicas que marcan un peor pronóstico de la enfermedad utilizando la clasificación de Oxford.

Nosotros observamos un perfil de péptidos en suero/plasma y en orina, en pacientes con NIgA que permitió diferenciarlos de los sujetos sanos. De los péptidos obtenidos a través del análisis de muestras de orina, hemos identificado en el grupo de pacientes dos péptidos correspondientes a uromodulina (UMOD) (m/z 1898, 1913), tres péptidos correspondientes a la alfa-1-antitripsina (A1AT) (m/z 1945, 2392, 2505) y un péptido derivado de la B2microglobulina (m/z 2714). También fueron identificados en el plasma de pacientes con NIgA un péptido con m/z 1063 que correspondía a la Bradiquinina y un segundo péptido con m/z 1898 que correspondía a fragmentos del complemento C4a.

La nefropatía IgA puede presentarse con un curso muy variable, que puede ir desde una histología prácticamente normal hasta formas agresivas de daño glomerular o tubular como afectación glomerular necrotizante severa, glomeruloesclerosis, atrofia tubular avanzada o fibrosis intersticial. La atrofia tubular/ fibrosis intersticial y la glomeruloesclerosis han sido identificados como potentes predictores de mal pronóstico en esta glomerulopatía ³⁴

También factores de riesgo como el sexo masculino, la hipertensión, la proteinuria, ausencia de hematuria y la insuficiencia renal se han descrito como marcadores de peor evolución de la enfermedad renal ².

En este sentido, numerosos esfuerzos han sido dirigidos a encontrar una asociación entre una amplia gama de lesiones histológicas y las manifestaciones clínicas de esta patología. La clasificación de Oxford es una reciente clasificación histopatológica que incluye cuatro lesiones bien definidas, desarrollada como un sistema de evaluación cuantitativo útil y reproducible de la nefropatía IgA, en el que se analizan cada una de las lesiones histológicas como potentes predictores de la evolución de la enfermedad renal. Así, a través de esta clasificación, es posible encontrar de forma más precisa un diagnóstico histológico para posteriormente ofrecer un pronóstico de la enfermedad, beneficiando el inicio de tratamiento terapéutico temprano.

Recientemente, nuevos métodos han sido descritos para identificar biomarcadores biológicos en diferentes tipos de fluidos, entre ellos el análisis proteómico. En un estudio previo de nuestro grupo ³⁰, hemos demostrado que el perfil de péptidos obtenido a través de la tecnología de esferas magnéticas unido a MALDI-TOF permite evaluar diferencias entre péptidos urinarios de pacientes con enfermedad glomerular crónica y población sana, sugiriendo un patrón de péptidos diferencial como paso previo hacia la clasificación de los pacientes con enfermedad glomerular. En este estudio, fue descrita una combinación de péptidos urinarios derivados de la UMOD y de la A1AT capaces de clasificar correctamente a los pacientes con enfermedad glomerular.

En el presente estudio, buscamos una asociación entre los péptidos presentes en suero/plasma y orina, y las lesiones histológicas de acuerdo a la clasificación de Oxford.

Hemos observado que de las cuatro lesiones histológicas valoradas, la lesión tubulointersticial era la que se asociaba de forma significativa a un mayor número de péptidos. En concreto, se observó una correlación positiva entre el daño tubulointersticial y los niveles del péptido derivado de la A1AT (m/z 1945), y una asociación inversa entre los niveles del péptido derivado de la UMOD (m/z 1898) y la bradiquinina (m/z 1063) con la lesión tubulointersticial.

Es bien conocido, que la A1AT actúa protegiendo la matriz extracelular del ataque de los neutrófilos, de allí sus efectos anti-inflamatorios y anti-apoptóticos, por lo que las células epiteliales tubulares renales podrían producir A1AT en respuesta al daño tubulointersticial ³⁵. Además la A1AT se ha considerado como una proteína fibrinolítica (proteasa sérica inhibidora de trombina) inducida en respuesta a la hematuria. Sin embargo también se ha descrito en la literatura un desequilibrio entre proteasas y sus inhibidores tisulares en el área inflamatoria, lo que podría justificar el papel de esta proteína en los procesos inflamatorios involucrados en la fisiopatología de las enfermedades glomerulares. Todos estos hallazgos podrían justificar los altos niveles de A1AT encontrados en orina ya que es prácticamente ausente en la orina normal. A pesar de esto no está completamente claro el papel que juega la presencia de A1AT a nivel urinario.

Estos mismos resultados han sido descritos en otros estudios en los que se detectaron niveles aumentados de A1AT tanto en tejido de renal y en orina de pacientes con NIgA en comparación con sujetos sanos ³⁵.

Pero no sólo la A1AT tiene un papel relacionado con la lesión tubulointersticial. Nosotros encontramos una asociación inversa entre

la UMOD y la lesión tubulointersticial. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores que encontraban bajas concentraciones de UMOD en la orina de pacientes con NIgA asociada a la lesión atrofia tubular/fibrosis intersticial en biopsias renales ³⁶

En cuanto a la uromodulina, es una glicoproteína expresada en las células tubulares renales epiteliales, que representa la proteína urinaria más abundante. Estudios recientes sugieren un papel de la UMOD en la enfermedad renal crónica. Alteraciones en la excreción urinaria de UMOD se han asociado con la reducción de la tasa de filtrado glomerular (TFG) en diversas nefropatías ³⁷.

En un estudio anterior, nuestro grupo de trabajo ha observado una correlación inversa entre la UMOD, la creatinina sérica y la proteinuria en pacientes con enfermedad glomerular. En la NIgA, Wu y col.³¹ observaron un perfil de péptidos en orina relacionado con esta enfermedad glomerular. Los autores encontraron una disminución en la excreción urinaria de la UMOD, sugiriendo que era capaz de discriminar entre los pacientes con NIgA y el grupo de sujetos sanos. En nuestro estudio, el patrón de péptidos encontrado podría ser marcador de la lesión histológica y del daño tubulointersticial, no pudiendo asegurarse que sea específico de la nefropatía IgA.

Por otra parte, en el plasma se ha identificado también un péptido

con m/z 1063 que corresponde a un péptido derivado del quininógeno, la bradiquinina. Nosotros observamos una disminución significativa de los niveles de bradiquinina en el grupo de pacientes que presentaban mayor afectación tubulointersticial (T2) en comparación con los otros grupos (T0, T1).

La bradiquinina es un nonapéptido derivado del quininógeno. El quininógeno es un componente del sistema calicreína-quinina. Todas las quininas son fuertes agonistas del receptor de la bradiquinina 2. La activación de esta vía de señalización conduce a la producción de óxido nítrico y prostaglandinas ³⁸. Por lo tanto, las quininas son potentes vasodilatadores renales y presentan actividades antitrombóticas y antifibróticas.

En pacientes con NIgA, Rocchetti y col.¹⁶ describen también una disminución significativa en la excreción urinaria de quininógeno en pacientes con NIgA, y especialmente en pacientes no respondedores a la terapia con IECAs. Los autores especulan acerca de que la diferencia en la excreción de orina del quininógeno, podría ser reflejo de la gravedad del daño renal en pacientes con NIgA.

En nuestro grupo de estudio, los pacientes no recibían tratamiento con inhibidores del sistema renina angiotensina aldosterona o antagonistas de receptores de angiotensina II al momento del

diagnóstico por lo que no podíamos comparar el efecto de estos fármacos en los perfiles de péptidos. Se requieren más estudios con una mayor inclusión de los pacientes para demostrar este efecto.

De la misma forma, se encontró una asociación entre cuatro péptidos urinarios y la glomeruloesclerosis. De estos péptidos, tres de ellos (m/z 1945, 2392 y 4013) estaban aumentados en pacientes con S1. Por otro lado, el péptido con m/z 3389 estaba aumentado en pacientes con S0.

En estudios anteriores, Kang y col.³ observaron que la glomeruloesclerosis segmentaria y la lesión atrofia tubular/fibrosis intersticial reflejaban daño crónico, pudiendo utilizarse como predictor de evolución a largo plazo en pacientes con NIgA. Nuestros hallazgos podrían reflejar que los péptidos encontrados constituyan marcadores de lesión glomerular crónica en la población estudiada.

De manera similar se identificaron cinco péptidos, en suero m/z 1546, 3264, 3242, y en plasma m/z 3242, 8602. De todos ellos los péptidos de plasma y suero con m/z 3242 y el péptido de plasma con m/z 8602 aumentaban en presencia de hiper celularidad endocapilar (E1). Mientras que los péptidos de suero m/z 1546 y 3264 estaban aumentados en la lesión E0.

Muchos de los pacientes con NIGa muestran proliferación mesangial, por lo tanto, esta puntuación se define como el número de células mesangiales por área mesangial. Estudios anteriores han demostrado una relación entre la hipercelularidad mesangial y el grado de actividad de la enfermedad. En nuestro grupo todos los pacientes estaban categorizados como M1 al momento del diagnóstico por lo que no se pudo comparar patrones de péptidos entre M1 y M0.

Por último, se observó una asociación entre algunos péptidos en suero, plasma y orina y el doble de la creatinina tomado como predictor de peor pronóstico renal. De los péptidos identificados se encontró una asociación inversa entre la uromodulina y el doble de la creatinina, y una asociación positiva entre el péptido alfa-1-antitripsina y el doble de la creatinina. Con base en estos hallazgos podríamos utilizar estos péptidos identificados como potenciales biomarcadores predictores de la evolución renal.

Limitaciones del estudio

Nosotros hemos encontrado una asociación de un perfil de péptidos con las lesiones histológicas descritas en la clasificación de Oxford. No podemos asegurar que la disminución de concentraciones urinarias de UMOD o incrementos en la excreción de A1AT estén relacionadas únicamente con la enfermedad glomerular, ya que al momento del diagnóstico nuestro grupo de estudio presentaba diferentes estadios de insuficiencia renal además de diferentes grados de lesión tubulointersticial, pudiéndose corresponder estos péptidos a un biomarcador de disfunción renal o de daño tubulointersticial.

Por otro lado, es necesario ampliar el número de pacientes incluidos en el estudio con la finalidad de disminuir las limitaciones en cuanto reproducibilidad, y de esta forma obtener un patrón de péptidos específico y más amplio.

Del mismo modo, la mayoría de nuestros pacientes presentaban algún grado de afectación mesangial siendo catalogados dentro del score M1. Esta característica de nuestra población de estudio no nos permitió evaluar la influencia de esta lesión en el perfil de péptidos.

Finalmente, se conoce la complejidad en la identificación de los péptidos en fluidos biológicos, representando un punto crucial para

conocer cuál es la función que podrían desempeñar en el proceso de esta enfermedad.

Conclusiones

La nefropatía IgA es una enfermedad glomerular con un mecanismo patogénico incierto. El análisis proteómico nos permite obtener un patrón de péptidos que podría acercarnos al diagnóstico no invasivo de la NIgA y su relación con las lesiones histológicas. Futuros estudios con una inclusión más amplia de pacientes son necesarios para clarificar el rol de la UMOD/A1AT urinaria y la Bradiquinina plasmática en el proceso fisiopatológico de la nefropatía IgA.

Bibliografía

1. Barratt J, Topham P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *CMAJ* 2007; 177:361-8.
2. Frimat L, Briancon S, Hestin D, et al. IgA nephropathy: prognostic classification of end-stage renal failure. *L'Association des Nephrologues de l'Est. Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:2569-75.
3. Kang SH, Choi SR, Park HS, et al. The Oxford classification as a predictor of prognosis in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*; 27:252-8.
4. Casado-Vela J, del Pulgar TG, Cebrian A, et al. Human urine proteomics: building a list of human urine cancer biomarkers. *Expert Rev Proteomics*; 8:347-60.
5. Niwa T. Biomarker discovery for kidney diseases by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 870:148-53.
6. Thongboonkerd V. Biomarker discovery in glomerular diseases using urinary proteomics. *Proteomics clin appl* 2008; 2:1413.
7. Thongboonkerd V. Renal and Urinary Proteomics. *PROTEOMICS – Clinical Applications* 2008; 2:947-9.
8. Thongboonkerd V, Klein JB, Jevans AW, et al. Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. *Contrib Nephrol* 2004; 141:292-307.

9. Park MR, Wang EH, Jin DC, et al. Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA nephropathy. *Proteomics* 2006; 6:1066-76.
10. Janech MG, Raymond JR, Arthur JM. Proteomics in renal research. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292:F501-12.
11. Pang JX, Ginanni N, Dongre AR, et al. Biomarker discovery in urine by proteomics. *J Proteome Res* 2002; 1:161-9.
12. Candiano G, Musante L, Bruschi M, et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:3139-48.
13. Hellin JL, Bech-Serra JJ, Moctezuma EL, et al. Very low-molecular-mass fragments of albumin in the plasma of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2009; 54:871-80.
14. Magistroni R, Ligabue G, Lupo V, et al. Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1672-81.
15. Ngai HH, Sit WH, Jiang PP, et al. Serial changes in urinary proteome profile of membranous nephropathy: implications for pathophysiology and biomarker discovery. *J Proteome Res* 2006; 5:3038-47.
16. Rocchetti MT, Centra M, Papale M, et al. Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor

therapy. *Proteomics* 2008; 8:206-16.

17. Shui HA, Huang TH, Ka SM, et al. Urinary proteome and potential biomarkers associated with serial pathogenesis steps of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:176-85.

18. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:913-22.

19. Yokota H, Hiramoto M, Okada H, et al. Absence of increased alpha1-microglobulin in IgA nephropathy proteinuria. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6:738-44.

20. Vanhoutte KJ, Laarakkers C, Marchiori E, et al. Biomarker discovery with SELDI-TOF MS in human urine associated with early renal injury: evaluation with computational analytical tools. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:2932-43.

21. Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, et al. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67:2313-20.

22. Julian BA, Wittke S, Haubitz M, et al. Urinary biomarkers of IgA nephropathy and other IgA-associated renal diseases. *World J Urol* 2007; 25:467-76.

23. Weissinger EM, Wittke S, Kaiser T, et al. Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes. *Kidney Int* 2004; 65:2426-34.

24. Xu BJ, Shyr Y, Liang X, et al. Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2967-75.
25. Rossing K, Mischak H, Dakna M, et al. Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:1283-90.
26. Papale M, Di Paolo S, Magistroni R, et al. Urine proteome analysis may allow noninvasive differential diagnosis of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*; 33:2409-15.
27. Lapolla A, Molin L, Seraglia R, et al. Urinary peptides as a diagnostic tool for renal failure detected by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry: an evaluation of their clinical significance. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*; 17:245-53.
28. Lapolla A, Seraglia R, Molin L, et al. Low molecular weight proteins in urines from healthy subjects as well as diabetic, nephropathic and diabetic-nephropathic patients: a MALDI study. *J Mass Spectrom* 2009; 44:419-25.
29. Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, et al. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 2007; 53:421-8.
30. Navarro-Munoz M, Ibernón M, Bonet J, et al. Uromodulin and alpha(1)-Antitrypsin Urinary Peptide Analysis to Differentiate Glomerular Kidney Diseases. *Kidney Blood Press Res*; 35:314-25.

31. Wu J, Wang N, Wang J, et al. Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom*; 24:1971-8.
32. Perez V, Navarro-Munoz M, Mas S, et al. Proteomic approach to the study of statin pleiotropy in kidney transplant patients. *Pharmacology*; 87:161-8.
33. Lai KN. Pathogenesis of IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol*; 8:275-83.
34. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int* 2009; 76:546-56.
35. Kwak NJ, Wang EH, Heo IY, et al. Proteomic analysis of alpha-1-antitrypsin in immunoglobulin A nephropathy. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1:420-8.
36. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, et al. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant*; 25:1896-903.
37. Lhotta K. Uromodulin and chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*; 33:393-8.
38. Tomita H, Sanford RB, Smithies O, et al. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. *Kidney Int*; 81:733-44.

Figura 1 - Péptidos en orina que se diferencian según la lesión glomeruloesclerosis segmentaria.

Diagrama de cajas de las diferencias en los péptidos urinarios de m/z 1945 (a), m/z 2392 (b), m/z 4013 (c) y m/z 3389 (d) en pacientes con NIgA entre ausencia (S0) o presencia (S1) de la lesión glomeruloesclerosis segmentaria. Los valores atípicos se representan como círculos.

Figura 2 – Péptidos en suero que se diferencian según la lesión hiper celularidad endocapilar.

Diagrama de cajas de las diferencias en suero de m/z 1546 (a), 3264 (b), m/z 3242 (c) en pacientes con NIgA entre ausente (E0) y presente (E1) de la lesión hiper celularidad endocapilar. Los valores atípicos se representan como círculos.

Figura 3 - Péptidos en plasma que se diferencian según la lesión hiper celularidad endocapilar.

Diagrama de cajas de las diferencias en plasma de m/z 3242 (a) y m/z 8602 (b) en pacientes con NIgA entre ausente (E0) y presente (E1) de la lesión hiper celularidad endocapilar. Los valores atípicos se representan como círculos.

Figura 4 – Diferencias en los péptidos uromodulina, alfa-1-antitripsina y bradiquinina según la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular

Diagrama de cajas de las diferencias en orina de m/z 1898 (a) y m/z 1945 (b), en plasma de m/z 1063 (c) en pacientes con NIGa entre ausente (T0) y presente (T1, T2) de la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular. Los valores atípicos se representan como círculos.

Tablas

Tabla 1 – Características demográficas, clínicas y datos bioquímicos de los pacientes con NIgA y sujetos sanos

	Pacientes con NIgA		Sujetos sanos
	Al momento de la biopsia renal	Al final del seguimiento (24 meses)	
Número de personas	19		14
Edad, años	42		29,5
Rango	(33-52)		(25,75-41)*
Sexo, n(%)			
Hombres	15 (79)		6 (43)
Hipertensión, n(%)			No
Si	12 (63)		
Diabetes, n(%)			No
Si	1 (5)		
Dislipidemia, n(%)			No
Si	9 (47)		
Creatinina sérica, mg/dL	2.00	3.16 ^a	0.84*
Rango	1.40-2.57	1.26-6.18	0.71-0.97

Proteinuria, g/24 horas	2.28	1.30	Negativa
Rango	1.20-4.26	0.52-3.27	
Colesterol, mg/dL	194	147 ^a	Nd
Rango	157-221.75	131.5-213	
Ácido úrico, mg/dL	7.4	7.4	Nd
Rango	5.45-8.30	6.55-9.20	
Albúmina sérica, g/L	34	40 ^a	Nd
Rango	31-39	36.75-42.40	
Bloqueo RAAS, n(%)			
Si	7 (36.8)	17 (89,4)	
IECAs	5 (26.3)	11(57,8)	
ARA II	1 (5.3)	3(15,7)	No
IECAs más ARAII	1 (5.3)	3(15,7)	
Estatinas, n(%)			
Si	4 (21.1)	9 (47,3)	

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) o medianas y rangos según convenga. *Test U de Mann-Whitney con significación estadística ($P < 0.05$) entre pacientes con NIgA y sujetos sanos. **Test chi-cuadrado o Test exacto de Fisher ($P < 0.05$) entre

pacientes con NIgA y sujetos sanos. ^aTest de Wilcoxon con significación estadística. ($P < 0.05$) en pacientes con NIgA entre el tiempo inicial de la biopsia renal y el final del seguimiento. SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona; IECAs: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII: Antagonistas de los receptores de la angiotensina II; n.d.: no disponible.

Tabla 2 – Diferencias en el perfil de péptidos entre pacientes con NIgA y sujetos sanos

Fluido biológico	Péptido MH⁺ MALDI-TOF	Swiss- Prot accession	Proteína abreviada	Fold- change*	P valor**
Suero	1063	n.d.	n.d.	+3.23	<i>0.008</i>
	1079	n.d.	n.d.	+2.77	<i>0.046</i>
	1532	n.d.	n.d.	-0.63	<i>0.040</i>
	1618	n.d.	n.d.	-0.53	<i>0.052</i>
	1898	n.d.	n.d.	-0.62	<i>0.002</i>
	2023	n.d.	n.d.	+2.03	<i>0.010</i>
	2864	n.d.	n.d.	-0.45	<i>0.014</i>
	2934	n.d.	n.d.	-0.57	<i>0.003</i>
	3159	n.d.	n.d.	-0.50	<i>0.003</i>

	3193	n.d.	n.d.	-0.54	<i>0.007</i>
	4283	n.d.	n.d.	-0.60	<i>0.026</i>
	5337	n.d.	n.d.	-0.80	<i>0.010</i>
	5967	n.d.	n.d.	-0.51	<i>0.008</i>
	1049	n.d.	n.d.	-0.24	<i>0.001</i>
	1063 ^a	P01042	KNG1	-0.25	<i>0.003</i>
	1079	n.d.	n.d.	-0.16	<i>0.010</i>
	1084	n.d.	n.d.	-0.08	<i><0.001</i>
Plasma	1100	n.d.	n.d.	-0.15	<i>0.001</i>
	1360	n.d.	n.d.	-0.35	<i>0.002</i>
	1532	n.d.	n.d.	-0.33	<i>0.001</i>
	1607	n.d.	n.d.	+4.62	<i>0.001</i>
	1779	n.d.	n.d.	+2.48	<i><0.001</i>
	1848	n.d.	n.d.	+1.55	<i>0.003</i>

1866	n.d.	n.d.	+4.05	<i>0.001</i>
1883	n.d.	n.d.	+3.03	<i>0.001</i>
1898 ^a	POCOL4	Cd4A	+2.52	<i>0.001</i>
1936	n.d.	n.d.	+6.71	<i><0.001</i>
1960	n.d.	n.d.	+1.75	<i>0.014</i>
2008	n.d.	n.d.	+6.38	<i><0.001</i>
2023	n.d.	n.d.	+8.22	<i><0.001</i>
2312	n.d.	n.d.	-0.11	<i>0.001</i>
2358	n.d.	n.d.	-0.20	<i>0.001</i>
2375	n.d.	n.d.	-0.31	<i>0.001</i>
2486	n.d.	n.d.	-0.24	<i>0.007</i>
2863	n.d.	n.d.	-0.14	<i><0.001</i>
3242	n.d.	n.d.	-0.39	<i>0.033</i>
4576	n.d.	n.d.	-0.21	<i>0.009</i>

	4965	n.d.	n.d.	+20.34	<i>0.002</i>
	4981	n.d.	n.d.	+22.73	<i>0.002</i>
	1898 ^b	P07911	UMOD	-0.21	<i><0.001</i>
	1913 ^b	P07911	UMOD	-0.09	<i><0.001</i>
	1945 ^b	P01009	A1AT	+9.66	<i><0.001</i>
	2378	n.d.	n.d.	+2.14	<i>0.006</i>
	2392 ^b	P01009	A1AT	+3.62	<i>0.001</i>
Orina	2491	n.d.	n.d.	+3.10	<i><0.001</i>
	2505 ^b	P01009	A1AT	+10.57	<i><0.001</i>
	2714 ^b	P61769	B2M	-0.28	<i>0.001</i>
	2977	n.d.	n.d.	-0.36	<i><0.001</i>
	3004	n.d.	n.d.	-0.31	<i>0.001</i>
	3389	n.d.	n.d.	-0.31	<i><0.001</i>
	3406	n.d.	n.d.	-0.27	<i><0.001</i>

4013	n.d.	n.d.	+1.26	<i>0.049</i>
4294	n.d.	n.d.	-0.59	<i>0.049</i>
4658	n.d.	n.d.	-0.43	<i><0.001</i>
4752	n.d.	n.d.	-0.30	<i><0.001</i>

^aPéptidos de Bradiquinina (KNG1) y factor del complemento C4 (C4A) identificados por el análisis de MALDI-TOF/TOF MS, en orden ascendente por masa/carga en MH+ (Dalton) descrito previamente ³². ^bPéptidos de uromodulina (UMOD), alfa-1-antitripsina (A1AT) y beta-2-microglobulina (B2M) identificados por HPLC-MS/MS analysis, en orden ascendente de masa/carga MH+ (Dalton) descrito previamente ³⁰. *Ratio entre el valor de la mediana del área del péptido en los pacientes con NIgA comparado con sujetos sanos. El valor (+) y (-) hace referencia al incremento o decremento del valor del área péptido respectivamente. **Test de significación estadística U de Mann-Whitney (P<0.05). UMOD: uromodulina; A1AT: alfa-1-antitripsina; B2M: beta-2-microglobulina; KNG1: Bradiquinina; C4A factor de complemento C4; n.d.: no disponible.

Table 3 – Breve descripción de las lesiones histológicas según la clasificación de Oxford en pacientes con nefropatía IgA

Lesiones histológicas	Pacientes con NIgA (n=19)
IFTA, n(%)	
T0	6 (32)
T1	8 (42)
T2	5 (26)
Glomeruloesclerosis segmentaria y focal, n(%)	
S0	3 (16)
S1	16 (84)
Hiper celularidad endocapilar, n(%)	
E0	12 (63)
E1	7 (37)
Proliferación mesangial, n(%)	
M0	0 (0)
M1	19 (100)

Figura 1

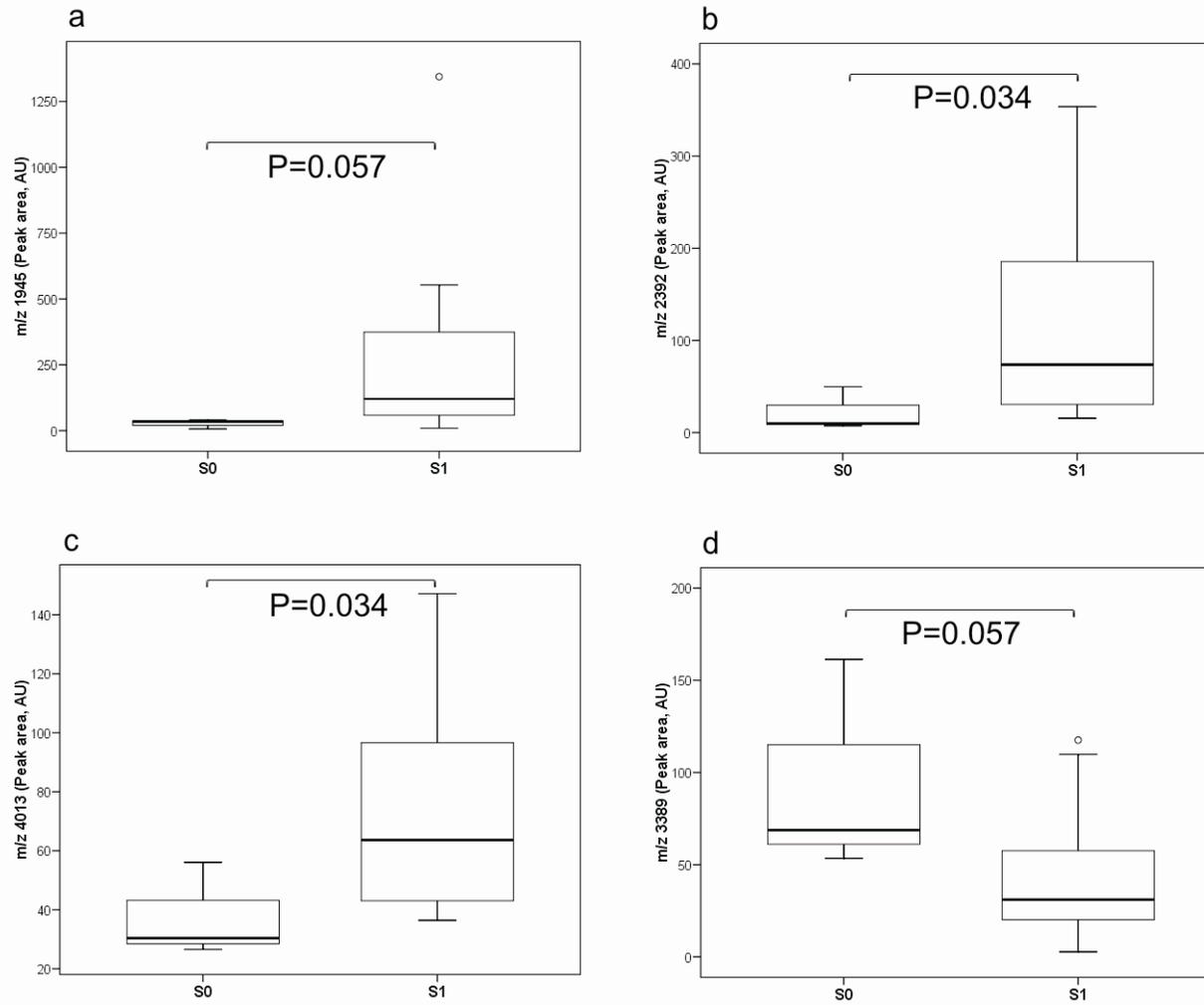


Figura 2

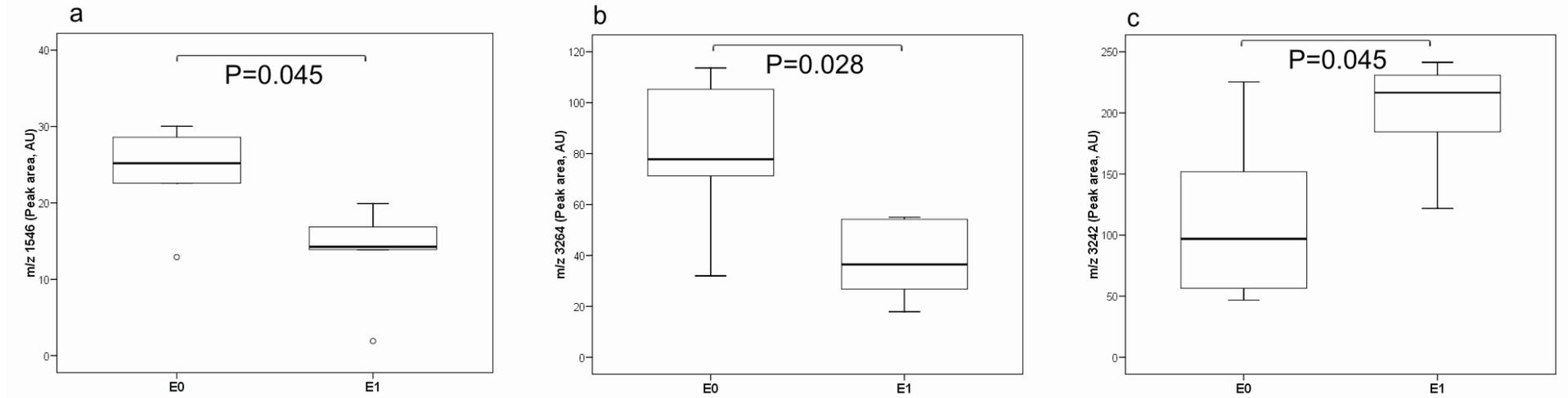


Figura 3

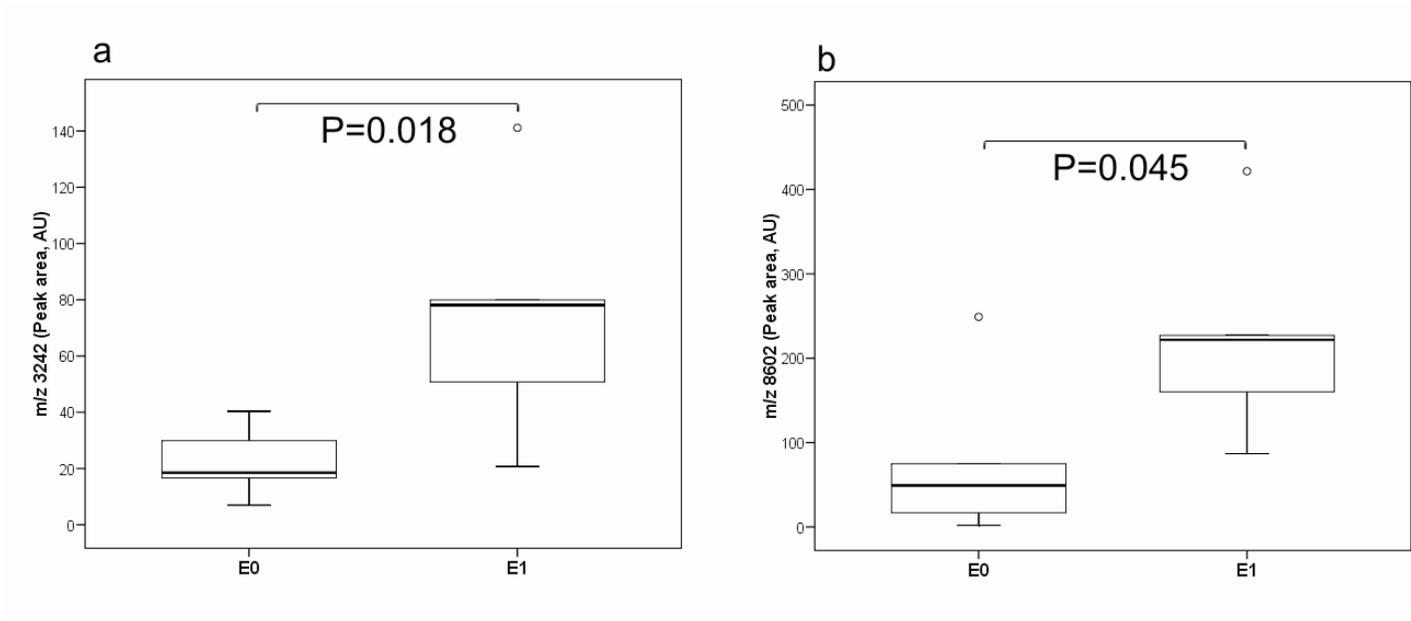


Tabla 4 – Diferencias en el perfil de péptidos según la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular (IFTA)

Fluido	Péptido (m/z)	T0	T1	T2	p*
Suero	1466	14.59 (11.14-77.66)	6.80 (2.17-9.65)	61.44 (22.84-99.24)	0.020
	1617	28.47 (22.80-60.53)	13.46 (8.93-15.51)	44.50 (22.75-62.99)	0.029
	3193	58.13 (41.11-70.71)	23.42 (14.69-32.80)	38.35 (37.84-81.76)	0.030
	3264	76.38 (58.46-99.35)	29.37 (20.14-35.33)	74.01 (55.00-113.65)	0.029
	5337	220.49 (214.37-235.50)	109.47 (54.45-164.65)	191.20 (119.59-212.96)	0.016
	5889	248.44 (221.10-293.41)	198.39 (52.45-246.57)	283.06 (270.31-453.76)	0.052
	5905	1090.49 (918.54-1283.53)	1042.24 (249.00-1205.96)	1731.53 (1358.88-1891.18)	0.041
	5966	95.33 (86.83-140.95)	117.38 (32.35-133.61)	232.90 (177.94-343.53)	0.049
	9289	204.63 (87.63-321.87)	371.75 (295.27-378.63)	417.34 (349.94-485.85)	0.036
	1063	257.50 (106.62-973.82)	273.48 (110.11-600.00)	20.02 (12.91-28.53)	0.049

Figura 4

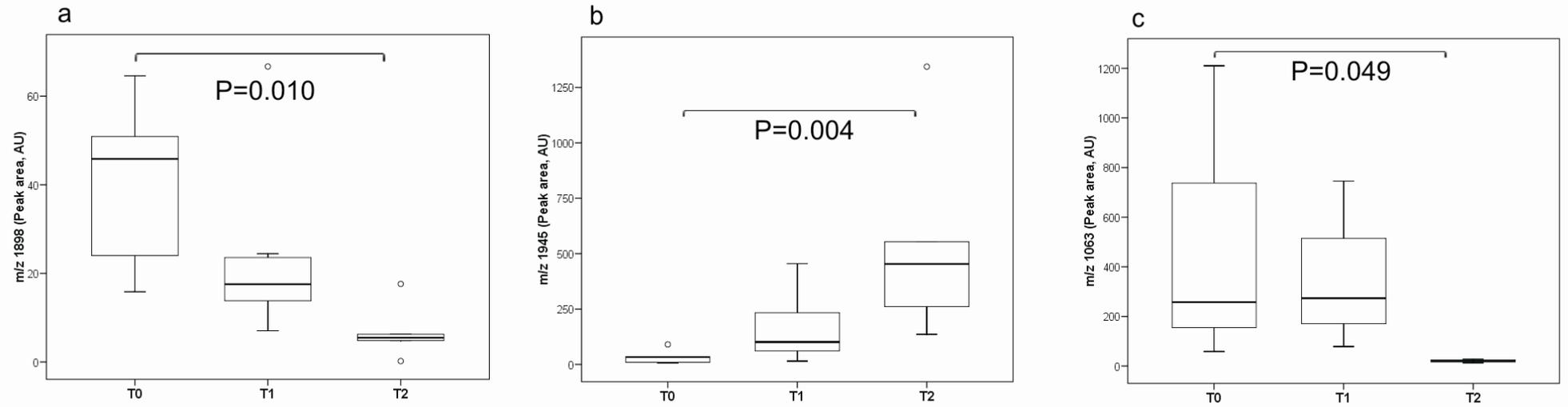


Tabla 5 – Relación entre el doble de la creatinina y los péptidos en diferentes fluidos biológicos

Fluido	Péptidos (<i>m/z</i>)	R	p*
Suero	2953	0.062	0.040
	5337	-0.615	0.040
	9289	0.711	0.014
Plasma	9287	0.615	0.040
Orina	1769	-0.718	0.001
	1898	-0.734	0.001
	1913	-0.598	0.007
	1945	0.603	0.006
	2491	0.465	0.045
	2756	-0.443	0.058
	2977	-0.564	0.012
	3004	-0.639	0.004
	3389	-0.529	0.020
	4752	-0.530	0.020