



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**TESIS DOCTORAL**

Título:

**APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE FACTORES  
PRONÓSTICOS DE LA NEFROPATIA IgA**

**AUTORA / CANDIDATA A DOCTORADO**

Fredzzia Amada Graterol Torres

**DIRECTORES**

Dra. Meritxell Ibernón Vilaró (Universitat de Barcelona)

Dr. Jordi Bonal Bastons (Universitat Autònoma de Barcelona)

**TUTOR**

Dr. Manel Monreal Bosch (Universitat Autònoma de Barcelona)

**Programa de Doctorado de Medicina**

**Departamento de Medicina**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Año 2019**

*“El premio nobel no me quita el sueño, la cura contra el cáncer sí”*

**Jacinto Convit (1913-2014)**

A José, Bonguito y mis gemelos. Las luces de mi vida

El Dr. Jorge Bonal Bastons, la Dra. Meritxell Ibernón Vilaró y el Dr. Manuel Monreal Bosch directores de la Tesis Doctoral presentada por Fredzzia Amada Graterol Torres, certifican:

Que la tesis titulada “Aplicación de la Proteómica en el Estudio de Factores Pronósticos de la Nefropatía IgA” para optar al grado de Doctor en Medicina ha estado realizada bajo nuestra dirección y consideramos adecuada su presentación como Tesis Doctoral en El Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dr. Jorge Bonal Bastons

Dra. Meritxell Ibernón Vilaró

Dr. Manuel Monreal Bosch

Badalona, 19 de septiembre 2019

# AGRADECIMIENTOS

---

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han acompañado en este largo camino y que han hecho posible esta tesis doctoral.

A mis pacientes. Protagonistas principales de esta historia y sin los cuáles no seríamos nada. Gracias a los que participaron en estos estudios, a los enfermos renales del Servicio de Nefrología del Hospital Germans Trias i Pujol y en especial a los pacientes de la Unidad de Hemodiálisis del centro. Este trabajo es para ustedes.

A mis directores. A la Dra. Ibernón. Gracias por enseñarme desde que era muy pequeña el arte de la nefrología, de entender la fisiopatología, de saber interpretar lo que el paciente nos dice y lo bonito del mundo de la glomerular. Tus conocimientos y aporte científico en la realización de estos estudios han sido primordiales para sacar este trabajo adelante. Gracias por todo tu apoyo pero sobre todo, gracias por creer en mí. Eso es algo que nunca olvidaré.

Al Dr. Bonal. Gracias por tu ayuda en la elaboración y corrección de esta tesis doctoral, por siempre animarme y enseñarme que de todo se aprende.

Al Dr. Romero y al Dr. Bonet por haberme permitido realizar este trabajo y por sus valiosos consejos.

A la Dra. Maribel Navarro, por haber dado el soporte técnico y luchado codo a codo para la publicación de estos estudios. Maribel lo hemos conseguido. A la Dra. Dolores López por aportar su conocimiento y excelencia científica en las valoraciones histológicas, con la mejor predisposición.

A mis adjuntos, que me han formado como nefróloga y que ahora tengo la satisfacción de decir que son mis compañeros. A la Dra. Maru Navarro, por su enseñanza en la nefrología clínica, sus buenos consejos y su mano amiga. Al Dr. Teixidó y a la Dra. Troya, por haberme enseñado lo que sé de diálisis peritoneal y todos los beneficios de una pirámide invertida. A los Dres. Lauzurica y Cañas por mostrarme el difícil mundo de la inmunosupresión y el trasplante renal. A la Dra. Serra por sus consejos de vida, y a la Dra. Marco, por impulsarme a culminar

esta tesis doctoral. A Marina y a Inés, mis petitas, por ayudarme tanto y animarme en todo momento.

A mis amigos. A la Dra. Bancu. Gracias por enseñarme a ser más fuerte, por quererme tal como soy y por compartir tus locuras conmigo. Allá donde vayas, te llevarás una parte de mí. Al Jordi Soler. Gracias por ser como eres y por quererme tanto como yo a ti. Que esta tesis sirva de motivación para la tuya. A Nuria Pardo y Neus Sala, por estar allí cuando las necesitaba. A Carlos y Gaby por estar siempre a mi lado y por su ayuda en el diseño final de esta tesis doctoral.

He dejado de último a las personas que más han influenciado esta tesis doctoral y mi vida. Al Dr. Inciarte. Podría haberte agradecido las infinitas horas que dedicaste a esta tesis doctoral, el encargarte de nuestra familia en mi ausencia, el atender mis problemas y el saber darme una copa de vino cuando era necesaria; y por el contrario lo he dado por hecho. El amor y seguridad que me haces sentir hace que me crea que puedo con todo, gracias por hacerme creer que te merezco. Lo siento, por favor, gracias.

A mis gemelos, Esteban y Mateo. Mi razón de seguir y sin ninguna duda, lo mejor que he hecho en toda mi vida.

A mi padres. Soy lo que soy por lo enseñado en casa. Mamá, gracias por tu apoyo, por enseñarme el valor del trabajo y de la honestidad. Papá, mi empuje y ganas de comerme el mundo creo que lo he heredado de ti. Gracias por haberme formado y demostrado que sí se puede.

A Faddy, Domingo y Freddy, mis hermanos y partes de mi. A Nico y a Lucía por darme la alegría de ser tita.

Y por último gracias a la Universidad Central de Venezuela y a la Vargas. Lo que he aprendido de la medicina, de la anamnesis, de lo austero y de cómo resolver cuando no se tiene, lo he aprendido de mi escuela. Espero que estos días oscuros sean solo la antesala de todo lo bueno que vendrá.

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Fig. 1.</b> Estructura molecular de la inmunoglobulina A.....	27
<b>Fig. 2.</b> Unión de los complejos Gd-IgA1 con el receptor CD89.....	29
<b>Fig. 3.</b> Estructura de la IgA degalactosilada.....	33
<b>Fig. 4.</b> Activación celular y depósito de inmunocomplejos a nivel mesangial... .....	37
<b>Fig.5.</b> Resumen de la patogénesis de la nefropatía por inmunoglobulina A.....	40
<b>Fig. 6.</b> Vías de activación del complemento.....	45
<b>Fig.7.</b> Heatmap de susceptibilidad genética de la nefropatía por inmunoglobulina IgA.....	48
<b>Fig. 8.</b> Lesiones histológicas según la clasificación de Oxford (MEST)....	55
<b>Fig. 9.</b> Representación esquemática de la progresión de la enfermedad renal crónica.....	65
<b>Fig. 10.</b> Principales componentes de un espectrómetro de masas tipo MALDI- TOF.....	80
<b>Fig. 11.</b> Proceso para llevar a cabo estudio de perfiles peptídicos.....	82
<b>Fig. 12.</b> Diferencias en la expresión de los péptidos bradicinina, uromodulina y alfa 1-antitripsina en la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular.....	98
<b>Fig. 13.</b> Diferencias en la expresión de los péptidos en orina y la lesión glomeruloesclerosis.....	100
<b>Fig. 14.</b> Diferencias en la expresión de los péptidos séricos y la lesión hipercelularidad endocapilar.....	103
<b>Fig. 15.</b> Diferencias en la expresión de los péptidos en plasma y la lesión hipercelularidad endocapilar.....	105
<b>Fig. 16.</b> Diferencias en los niveles de creatinina entre los grupos NlgA-C4d positivo y negativo.....	111
<b>Fig. 17.</b> Supervivencia renal entre grupos según presencia o ausencia de depósitos de C4d.....	112
<b>Fig. 18,19,20.</b> Diferencias de los péptidos plasmáticos correspondientes a C4A (fragmento del complemento C4a) y péptidos urinarios correspondientes a A1AT (fragmentos de $\alpha$ -1-antitripsina) entre los grupos NlgA-C4d positivo y C4d negativo.....	114
<b>Fig. 21.</b> Capacidad discriminatoria de los péptidos generados naturalmente en clasificar pacientes con NlgA-C4d positivo y NlgA-C4d negativo.....	117

# ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>TABLA 1.</b> <i>Resumen de los estudios más importantes que investigan paneles con múltiples marcadores de proteómica.....</i>	67
<b>TABLA 2.</b> <i>Perfil de péptidos urinarios identificados previamente en la NIgA a través de espectrometría de masa.....</i>	69
<b>TABLA 3.</b> <i>Características demográficas, clínica y bioquímicas de pacientes con Nefropatía IgA.....</i>	90
<b>TABLA 4.</b> <i>Diferencias en la expresión de picos peptídicos entre pacientes con nefropatía IgA y sujetos sanos.....</i>	92
<b>TABLA 5.</b> <i>Lesiones histológicas según la clasificación de Oxford en pacientes con nefropatía IgA.....</i>	94
<b>TABLA 6.</b> <i>Diferencias en la expresión de picos peptídicos entre los grupos T0, T1 y T2 de la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular (IFTA).....</i>	95
<b>TABLA 7.</b> <i>Correlación entre el doble de la creatinina sérica y el perfil peptídico.....</i>	106
<b>TABLA 8.</b> <i>Características demográficas, clínicas y bioquímicas de pacientes con Nefropatía IgA según depósitos C4d en biopsia renal.....</i>	108
<b>TABLA 9.</b> <i>Análisis descriptivo de la creatinina en el seguimiento de grupos NIgA-C4d positivo y NIgA-C4d negativo.....</i>	110

# ÍNDICE GENERAL

---

## AGRADECIMIENTOS

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	12
3. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	16
4. RESUMEN.....	19
5. ABSTRACT.....	21
6. INTRODUCCIÓN.....	23
6.1. Nefropatía IgA. Historia y conceptos generales.....	23
6.2. Epidemiología.....	24
6.3. Fisiología de la inmunoglobulina A.....	25
6.4. Patogénesis.....	32
6.4.1. Factores desencadenantes.....	32
6.4.1.1. IgA degalactosilada.....	32
6.4.1.2. Ac IgG contra IgA degalactosilada.....	36
6.4.1.3. Receptor de la IgA en la célula mesangial.....	39
6.4.1.4. Activación de la vía del complemento.....	41
6.4.1.4.1. Clásica.....	41
6.4.1.4.2. Alternativa.....	41
6.4.1.4.3. Vía de las lectinas.....	43
6.4.1.5. Activación y/o lesión de la célula mensangial....	46
6.4.1.6. Progresión a la insuficiencia renal crónica.....	46
6.4.1.7. Genéticos.....	47
6.5. Manifestaciones clínicas.....	49
6.6. Factores de mal pronóstico.....	51
6.6.1. Clásicos.....	51
6.6.1.1. Hipertensión arterial.....	52
6.6.1.2. Proteinuria.....	53
6.6.1.3. Insuficiencia renal.....	53
6.6.2. Histológicos.....	54
6.6.2.1. Clasificación de Oxford.....	54
6.6.2.2. Reacción extracapilar.....	56
6.7. Nuevos biomarcadores.....	58
6.7.1. Niveles de IgA1 degalactosilada.....	58
6.7.2. Inmunocomplejos circulantes.....	58

6.7.3. $\alpha$ -1-antitripsina.....	59
6.7.4. Complemento: C4d, MBL, FH.....	60
6.7.5. CD89+, CD46, CD55.....	61
6.8. Proteómica.....	63
6.8.1.1. Conceptos generales.....	63
6.8.1.2. Aplicaciones.....	66
6.8.1.2.1. Enfermedades Renales.....	66
6.8.1.2.2. Proteómica y Nefropatía IgA.....	66
7. HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....	72
8. OBJETIVOS.....	74
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
10. RESULTADOS.....	89
11. DISCUSIÓN.....	122
12. CONCLUSIONES GENERALES.....	133
13. LÍNEAS DE FUTURO.....	135
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
15. ANEXOS.....	155
15.1. Publicaciones relacionadas a esta Tesis Doctoral	155

# LISTADO DE ABREVIATURAS

---

<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>NIgA</b>	Nefropatía por Inmunoglobulina A
<b>NM</b>	Nefropatía Membranosa
<b>GN</b>	Glomerulonefritis
<b>GNM</b>	Glomerulonefritis Membranosa
<b>ERCT</b>	Enfermedad Renal Crónica Terminal
<b>ERC</b>	Enfermedad Renal Crónica
<b>TFGe</b>	Tasa de Filtrado Glomerular Estimada
<b>RCV</b>	Riesgo Cardiovascular
<b>PA</b>	Presión Arterial
<b>IECA</b>	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>ARA II</b>	Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II
<b>ISRAA</b>	Inhibidores del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
<b>SNCM</b>	Síndrome Nefrótico por Cambios Mínimos
<b>MBL</b>	Lectina Unida a Manosa
<b>GalNAc</b>	<i>N</i> -acetilgalactosamine
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>dIgA</b>	IgA dimérica
<b>pIgR</b>	Receptor polimérico de inmunoglobulina A
<b>SC</b>	Componente secretor
<b>CDR</b>	Regiones determinantes de complementariedad
<b>SIgA</b>	IgA secretora
<b>LRC</b>	Del inglés, Leucocyte Receptor Cluster
<b>ITAM</b>	De las siglas en inglés, immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>C1GalT1</b>	Core 1 beta 1-3 galactosiltransferasa
<b>COSMC</b>	Core 1 beta 1-3 galactosiltransferasa chaperona-uno molecular
<b>GWAS</b>	Estudio de la asociación del genoma completo
<b>sCD89</b>	Receptor para células mieloides CD89 en su forma soluble
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>TAP1 y TAP2</b>	Transportadores asociados con el procesamiento de antígenos
<b>PDGF</b>	Factores de crecimiento como los derivados de plaquetas
<b>CFH</b>	Factores del complemento como factor H
<b>APRIL</b>	Ligando de proliferación inducido

<b>TLR4</b>	Del inglés, Toll-like receptor
<b>MAT</b>	Microangiopatía trombótica
<b>SHU</b>	Síndrome urémico hemolítico atípico
<b>HTA</b>	Hipertensión Arterial
<b>GN</b>	Glomerulonefritis
<b>GEFyS</b>	Glomeruesclerosis focal y segmentaria
<b>MAC</b>	Complejo de ataque de membrana del complemento C5b-9
<b>MCP</b>	Proteína cofactor de membrana
<b>DAF; CD55</b>	Del inglés, Decay-aceleration factor

# RESUMEN

---

La nefropatía IgA (NIgA) es la glomerulonefritis más común en nuestro medio, caracterizada por una amplia variabilidad clínica, que va desde un curso benigno hasta la insuficiencia renal rápidamente progresiva. Su diagnóstico se realiza a través de biopsia renal, siendo un procedimiento invasivo y no exento de complicaciones. Además, se sabe que el 40% de los pacientes diagnosticados de NIgA evolucionarán a enfermedad renal crónica terminal en un período de 20 años. Se han descrito factores clásicos de mal pronóstico, inespecíficos y que comparten con otras enfermedades renales. Por este motivo, es necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores que sirvan de ayuda al nefrólogo en la identificación de esta enfermedad y de los grupos de mayor riesgo de evolución, en los que un tratamiento temprano y dirigido sería de gran utilidad. La proteómica representa una herramienta accesible y reproducible que permite la identificación en sangre y orina, de péptidos relacionados a procesos biológicos. En los estudios que conforman esta tesis doctoral, se han aplicado técnicas proteómicas mediante la espectrometría de masas para identificar un perfil de péptidos en sangre, plasma y orina, asociado a parámetros clínicos, bioquímicos e histológicos en una cohorte de pacientes con NIgA primaria y con depósitos de C4d. Como resultados, identificamos los péptidos C4a, bradisinina,  $\alpha$ -1-antitripsina (A1AT), B2 microglobulina y uromodulina (UMOD) que diferenciaban correctamente a los pacientes con NIgA de su grupo control y que se asociaban con los parámetros de peor evolución renal como proteinuria, niveles de creatinina, doble de la creatinina, glomeruloesclerosis y afectación tubulointersticial. Además, en la NIgA con depósitos de C4d, los péptidos A1AT y C4a, se asociaban con este grupo y lo diferenciaban de su grupo control, C4d negativo. A través de curvas ROC se establecieron puntos de corte de estos péptidos que discriminaban correctamente entre grupos. También los pacientes con NIgA y depósitos de C4d mostraban niveles más elevados de proteinuria y lesiones de glomeruloesclerosis e hiper celularidad endocapilar más graves que los pacientes C4d negativos, confirmando su peor pronóstico renal. Nosotros proponemos el uso de técnicas proteómicas como herramienta en la búsqueda de marcadores de mal pronóstico renal en la NIgA, para establecer un diagnóstico precoz e identificar pacientes de mayor riesgo de evolución renal, tributarios de terapias más agresivas.

# ABSTRACT

---

IgA nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis worldwide, characterized by wide clinical variability, ranging from a benign to rapidly progressive renal failure. The diagnosis of IgAN is made by renal biopsy, being an invasive procedure with potential complications. Moreover, the majority of patients with IgAN have a progressive disease, with 40% of cases reaching end stage renal disease within 20 years after diagnosis. It has been described poor risk factors similar to others renal diseases, for this reason its necessary to search specific new biomarkers to help the nephrologist in the treatment decision. These molecules would have to be able to identify a group of patients with a poor prognosis, with a higher risk of progression to end stage kidney disease (ESKD) in which the benefit of early and aggressive treatment is clear. Proteomics approaches represents an accessible and reproducible tool that allows us identify in blood and urine peptides related to biological processes. In the present study, proteomic techniques have been applied through mass spectrometry to identify a profile of peptides in blood, plasma and urine, associated with clinical, biochemical and histological parameters in a cohort of patients with primary IgAN and IgAN with C4d deposits. As a result, we found C4a, bradykinin, A1AT and B2 microglobulin serum peptides, and A1AT and UMOD urinary peptides differentiated patients with IgAN from control subjects; and were associated with worse renal outcomes: double of creatinine, glomerulosclerosis and tubulointerstitial damage/tubular atrophy. In addition, in the IgAN with C4d deposits study, we found higher urinary and plasma levels of eptides A1AT and C4a in IgAN C4d positive patients than C4d negative. In addition, histological lesions glomerulosclerosis and endocapillary hypercellularity lesions were significantly associated with IgAN C4d positive group, a worse renal prognosis group. A potential cut-off was defined that discriminated correctly between groups. We propose the use of proteomic techniques in the search for markers of poor renal prognosis in IgAN can help to establish an early diagnosis and identify a group of patients with a poor renal evolution and tributary of more aggressive therapies.

# INTRODUCCIÓN

---

### **6.1. Nefropatía IgA. Historia y conceptos generales.**

La nefropatía IgA (NIgA) también conocida como enfermedad de Berger, fue descrita por primera vez en 1968 por Jean Berger, nefrólogo parisino y Nicole Hinglais patóloga, como una glomerulopatía con depósitos de IgA-IgG principalmente mesangiales, siendo hasta la actualidad, el principal hallazgo diagnóstico en biopsias renales. Berger, en colaboración con Pierre Galle, especialista en microscopía electrónica, describió los "depósitos intercapilares de fibrinoides" en pacientes con glomerulonefritis crónica, un primer paso hacia su futura descripción de la nefropatía por IgA(1).

En 1967, en una sesión de "Actualités Néphro-logiques de l'Hôpital Necker", Berger presentó un panorama de las lesiones renales en función de su patrón de inmunofluorescencia. Entre estos hallazgos, había identificado depósitos de IgA glomerular en algunos pacientes con glomerulonefritis crónica o púrpura de Schönleini-Henoch. Un informe oral a la Société de Néphrologie en París en el invierno de 1968 fue seguido por la publicación en francés de un resumen de menos de una página(2) citándose repetidamente en todo el mundo, y titulado "Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG". Se trataba de 25 pacientes que se presentaban con hematuria recurrente y con lesiones focales y segmentarias por microscopía óptica, en quienes el reactivo de IgA marcaba fuertemente junto al reactivo de IgG. Berger extendió sus observaciones el siguiente año, describiendo una nefropatía caracterizada por la presencia de depósitos mesangiales de IgA-IgG, refiriendo que todos los pacientes tenían proteinuria moderada y hematuria microscópica persistente, y algunos de ellos "tenían uno o varios episodios de hematuria macroscópica que generalmente ocurrían durante un dolor de garganta"(2). Al principio hubo cierta reticencia a dar crédito a las observaciones de Berger al reconocer que la nefropatía por IgA era una entidad clínico-patológica distinta. Actualmente no sólo es aceptada, sino que representa la nefropatía más común como causa de glomerulonefritis primaria en el mundo, siendo una de las principales causas de enfermedad renal crónica (ERC) y fallo renal a nivel mundial.

Desde hace más de 40 años ha sido el patrón de glomerulopatía primaria más frecuente identificada en regiones donde la biopsia renal es realizada de

rutina(3). Numerosos esfuerzos en forma de estudios multicéntricos, han sido diseñados con la intención de mejorar nuestros conocimientos acerca de esta patología, enfocados en entender los pasos claves del proceso inmunopatogénico.

Puede presentarse en todas las etapas de la vida, teniendo un pico de mayor incidencia en la segunda y tercera década. Afecta a hombres y mujeres en una proporción 2:1 con preferencia en sujetos caucásicos, siendo relativamente rara en raza negra(4–6) y predominantemente en América, Europa oriental y Asia, afectando en esta última zona a ambos sexos por igual(3).

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza a través de biopsia renal, sin embargo, se han descrito biomarcadores urinarios, séricos y plasmáticos que identifican procesos clave en su historia natural. Avances en las técnicas diagnósticas en la actualidad, han creado la necesidad de encontrar moléculas que nos permitan identificar signos de mal pronóstico precoces y nos obligan a pensar en cuáles son los procesos decisivos de intervención en esta patología. Son estas dudas planteadas las que han dado origen a esta tesis doctoral.

## **6.2. Epidemiología**

La prevalencia de la NlgA varía según el área geográfica y depende del registro que se evalúe (registros de biopsias renales o de trasplante renal). Existe una alta incidencia en las regiones del Este Asiático y Pacífico atribuibles a diferencias geoespaciales(7). Por ejemplo, en estudios multicéntricos y de revisiones sistemáticas basadas en registro de biopsias (realizados en Europa y América del Norte) se sugiere una incidencia poblacional de al menos 2.5/100000 habitantes(8). En niños también varía según la distribución geográfica: la incidencia según registros japoneses de biopsias renales, es ocho veces mayor que el registro americano (4.5 versus 0.57/100,000/año)(8,9). En un estudio realizado en China(5) que incluían 13.510 biopsias renales, la nefropatía IgA constituía el 45% de todos los casos de glomerulonefritis primaria. Sin embargo, debe considerarse que pueden evidenciarse depósitos de IgA en estudios anatomopatológicos de biopsias renales sin evidencia de enfermedad renal (en un rango de 3-16% en sujetos sanos)(10,11).

Se ha sugerido que la variabilidad genética juega un rol importante en la variación de la prevalencia interregional(12,13). Cohortes agrupadas del estudio de validación de la clasificación de Oxford para la nefropatía IgA (VALIGA) y cohortes de Norte América indican una tasa de desarrollo de enfermedad renal crónica terminal (ERCT) o disminución del filtrado glomerular en un 27% a los 10 años del diagnóstico(14–16). Según el registro de glomerulonefritis de la Sociedad Española de Nefrología (S.E.N.)(17), para el 2018, la NIgA suponía el 19,6% del total de biopsias renales en adultos entre 19 y 45 años, y del 14,2% del total de biopsias renales en adultos entre 46 y 65 años. En general, en población adulta, representa la glomerulonefritis (GN) primaria más frecuente sometida a biopsia en nuestro medio.

La variación de la prevalencia puede reflejar diferencias regionales en la indicación de biopsia renal. Muchos pacientes se detectan por cribado rutinario de orina debido a la presencia de hematuria/proteinuria como manifestación clínica única. Por este motivo la prevalencia puede resultar mayor en países con un programa activo de análisis urinarios y un umbral bajo de rendimiento de la biopsia renal en pacientes con hematuria asintomática aislada, como Japón y Corea, donde las pruebas se realizan rutinariamente en escuelas y en el lugar de trabajo(5,8). Por el contrario, los médicos en América del Norte rara vez biopsian a un paciente con hematuria aislada o proteinuria leve, lo que resulta en una aparentemente menor prevalencia de la enfermedad(18).

### **6.3. Fisiología de la inmunoglobulina A**

La inmunoglobulina A es la Ig más abundante en el ser humano(19) y está presente en todos los mamíferos y aves(20). En humanos, fisiológicamente las primeras células B con expresión de IgA aparecen en la semana 11 después del nacimiento, a diferencia de lo que ocurre con IgG e IgM, de aparición más temprana(21–23). De forma habitual el nivel sérico de IgA es indetectable en el momento del nacimiento y los niveles del adulto no se logran hasta la pubertad(19,24). Existen dos subclases de IgA: IgA1 (90%) e IgA2 (10%)(20) que difieren entre sí en la inserción en unión doble de 8 aminoácidos en la región bisagra en la IgA2. Esta diferencia estructural explica la resistencia de la IgA2 a

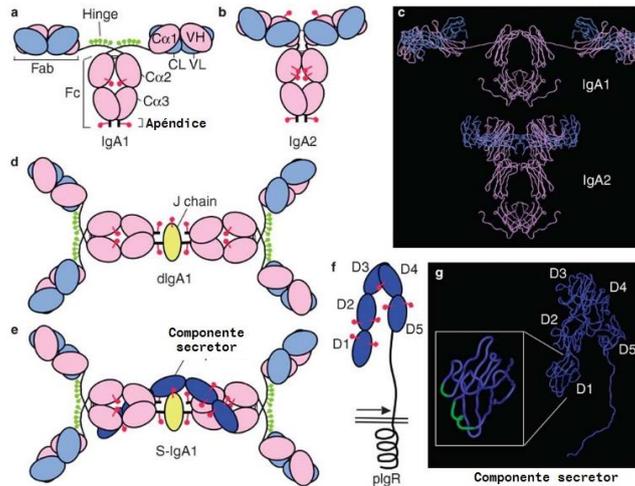
las proteasas bacterianas y a su mayor frecuencia en las mucosas. La IgA se halla distribuida en el organismo en dos compartimentos principales: La IgA que circula libremente en el plasma y la IgA que es secretada a las mucosas (IgA secretoria)(25).

En individuos sanos, la unión bisagra está constituida por 16 aminoácidos, enriquecida por residuos de serina y treonina, contando con más de 6 lugares de unión susceptibles de O-glicosilación. La estructura del core de los O-glicanos está compuesta por residuos de N-acetilgalactosamine (GalNAc) y galactosa (Gal), ambos potencialmente sializados(7,26,27).

La IgA más abundante, IgA1, es de tipo monomérica y producida por células plasmáticas de la médula ósea y liberada directamente a la circulación sanguínea. En contraposición, la IgA producida por las células plasmáticas asociadas al tejido linfoide de mucosas es secretada en forma de dímeros constituidos por dos moléculas de IgA unidas por una pieza de unión, denominada componente J(26). Dichos dímeros, para ser secretados a la superficie mucosa, deben unirse a un receptor específico, el receptor para IgA polimérica, presente en el polo basal de las células epiteliales

La IgA1 posee una región bisagra rica en residuos de serina, prolina y treonina (16 aminoácidos) donde se unen en posiciones 3-5, ocasionalmente 6, en forma de uniones O-oligosacáridos (Figura 1).

**Fig. 1.** Estructura molecular de la inmunoglobulina A.



Análisis de los oligosacáridos unidos a IgA1 sérica y IgA secretora revelan que consisten en una familia de estructuras basadas en un núcleo de manosil quitobiosa (acetilglucosamina), que muestran una marcada heterogeneidad en el tipo y número de residuos de carbohidratos terminales (galactosa y ácido siálico) y del nivel de fucosilación(28–30). La mayoría de los glicanos unidos a *N*-oligosacáridos son de tipo complejo biantenarico degalactosilados, aunque se han detectado algunas estructuras triatenarias y un pequeño porcentaje de estructuras tetratenarias(20).

Una vez formada la IgA dimérica (dIgA), es transportada dentro de las secreciones mucosales por el receptor polimérico de Ig (pIgR) expresado en la superficie basolateral de las células de la barrera epitelial de la mucosa (Figura 1f). El pIgR une y transporta específicamente inmunoglobulinas poliméricas(12). Como la IgA dimérica es la inmunoglobulina polimérica predominante en la superficie de la mucosa, forma el ligando principal y la carga del receptor. Tras la unión, el complejo pIgR-dIgA se internaliza y transfiere a través de la célula una serie de vesículas a la superficie apical. La porción extracelular de pIgR, ahora unida por un puente disulfuro a dIgA, se escinde para producir un fragmento conocido como componente secretor (SC) (Figura 1f y 1g). El complejo de dIgA y SC, denominado IgA secretora (S-IgA, Figura 1e), se libera en las secreciones que bañan la superficie de la mucosa(23,31).

La porción extracelular de pIgR que se une al ligando se pliega en cinco dominios similares a los dominios variables de anticuerpos de las inmunoglobulinas, denominados D1 a D5 desde el extremo N, y otra región menos globular que contiene el sitio de escisión que libera SC (Figura 1f y 1g). Se cree que SC adopta una estructura que se curva sobre sí misma cuando no se encuentra unido (Figura 1g). La interacción con dIgA requiere los primeros tres dominios (D1 – D3) de pIgR. D4 y D5 parecen contribuir indirectamente a la afinidad de interacción. D1 en particular tiene un papel crítico en la unión de dIgA, a través de bucles de superficie análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de dominios variables(20,28).

En la literatura se han descrito cinco receptores capaces de unirse a la molécula de IgA sérica y secretora(20,23,25,32), con diferentes señales intracelulares y funciones, no relacionados estructuralmente: Fc $\alpha$ RI (CD89), pIgR (receptor polimérico), TfR1 o receptor de la transferrina (CD71), el receptor Fc $\alpha$ / $\mu$ R (capaz de unir la IgM y la IgA), receptor de células M y el receptor de eosinófilos (específico del SC y de la SIgA). De todos estos, el CD89 es el principal receptor involucrado en el papel antiinflamatorio de la IgA.

### **Interacción con Fc $\alpha$ RI (CD89)**

Este receptor está codificado en la región LRC (Leucocyte Receptor Cluster) del cromosoma 19 y se expresa en la superficie de las células de linaje mieloide como monocitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos y células de Kupffer. Su unión con la IgA desencadena diversos mecanismos que incluyen fagocitosis, liberación de citocinas y oxígeno activado además de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos(32,33).

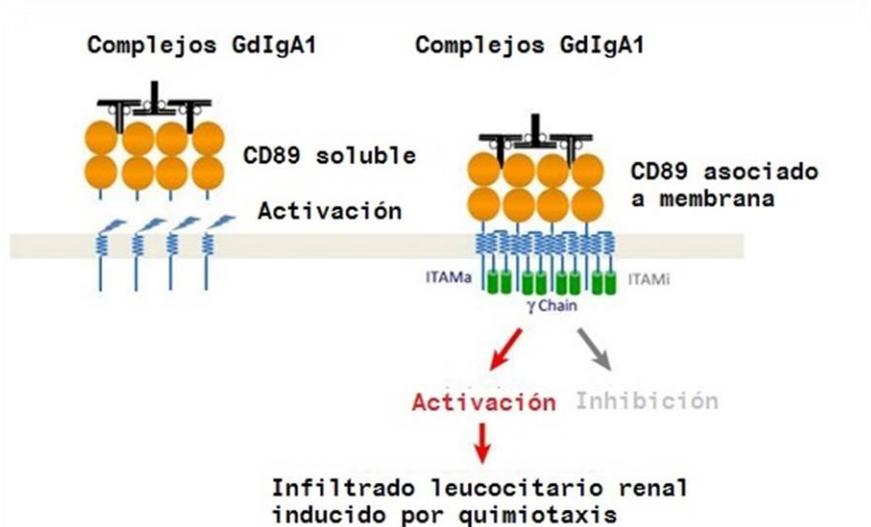
El CD89 está formado por dos dominios Ig-like (EC1 y EC2) orientados en ángulo recto, uniéndose a la IgA a través del dominio EC1 que reconoce la interfase de los dominios CH2 y CH3 de ésta, permitiendo que una sola molécula de IgA se pueda unir a dos receptores(23) (Figura 2). Además, el CD89 puede estar asociado a la subunidad intracitoplasmática del Fc $\gamma$  que contiene un dominio ITAM o bien libre ( $\gamma$ -less). Esta porción libre,  $\gamma$ -less, participa en la homeostasis de la IgA sérica, mientras que el CD89 asociado al Fc $\gamma$  puede inducir respuestas

activadoras o inhibitoras, dependiendo del ligando que se una(25) (Figura 2)

La unión de un **ligando monomérico** causa dimerización del receptor que induce la fosforilación parcial del dominio ITAM, induciendo el reclutamiento de la proteína SHP-1 fosfatasa la cual tiene un fuerte poder inhibitorio.

La unión de un **ligando polimérico o de inmunocomplejos** produce la agregación del receptor induciendo la fosforilación total del dominio ITAM, que comporta el reclutamiento de quinasas activadoras como la quinasa SYK y una respuesta activadora.

**Fig. 2.** Unión de los complejos Gd-IgA1 con el receptor CD89.



### **Interacción con pIgR**

Esta interacción no covalente, se produce en el dominio 1 de pIgR con la porción Fc de la IgA. Se considera que el dominio de la IgA principalmente involucrado es el  $C\alpha_3$  (13,31). Un bucle expuesto formado por los residuos 402–410 que se encuentra en los tramos superiores del dominio  $C\alpha_3$ , con los residuos Phe411, Val413 y Thr414 son los que tienen roles claves, teniendo menor contribución el residuo cercano Lys377 y el bucle de interfaz Pro440 – Phe443 (Figura 1b). Curiosamente, el último bucle también está involucrado en la unión de  $Fc\alpha RI$ , lo que puede ofrecer una explicación de la incapacidad reportada de la SIgA para desencadenar la fagocitosis (34) Sin embargo, D1 de pIgR se une a solo una de

las dos regiones de Fc en la SIgA, dejando potencialmente el otro disponible para la participación de Fc $\alpha$ RI, si se adopta la orientación correcta.

### **Interacción con Fc $\alpha$ / $\mu$ R**

El receptor Fc $\alpha$ / $\mu$ R humano, es un receptor que se une a IgA e IgM (37) y que se encuentra en células dendríticas foliculares de amígdalas, en macrófagos, células plasmáticas y células de Paneth de la lámina propia, además de los centros germinales del intestino. Aunque la función del Fc $\alpha$ / $\mu$ R humano aún no está completamente clara, estas ubicaciones son consistentes con un papel en la coordinación de la respuesta inmune, al menos en ciertos tejidos mucosos. Fc $\alpha$ / $\mu$ R está localizado cerca del pIgR en el cromosoma humano 1. Además, su dominio *N*-terminal comparte homología con el dominio 1 de pIgR, y la presencia de ciertos residuos conservados sugiere que estos dominios comparten una estructura similar(20)). En particular, los bucles tipo CDR de ambos dominios comparten similitud, lo que implica que pueden compartir un modo similar de interacción con dIgA. Fc $\alpha$ / $\mu$ R interactúa solo con formas poliméricas de IgA e IgM, pero la presencia de la cadena J no parece ser esencial (34).

### **Otras funciones protectoras de la IgA**

**Actividad protectora mediada por glicanos:** Se ha demostrado que los glicanos de IgA interactúan con receptores o fimbrias dependientes de sacáridos en las superficies bacterianas(35) y, por lo tanto, inhiben la unión de varias especies de bacterias a las superficies mucosas. Potencialmente, la S-IgA puede servir como una molécula efectora tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, a través de su bloqueo constitutivo de receptores tipo lectina en microbios y el reconocimiento específico de antígenos por su CDR, respectivamente(29).

**Interacción con el complemento:** La IgA carece de los residuos identificados en las regiones Fc de IgG o IgM que se unen a C1q, en consecuencia, no activa la vía clásica del complemento. Recientemente se ha indentificado la activación de la vía alternativa del complemenyo por IgA agregada por calor, desnaturalizada o generada de forma recombinante. Esta activación parece estar inducida por anticuerpos IgG o IgM(20). Este efecto también es replicado

por los fragmentos Fab $\alpha$  generados por la escisión de los anticuerpos IgA1 con la proteasa de IgA. Estos agregados mixtos de IgG e IgA desnaturalizadas por calor activan la vía alternativa en proporción al contenido de IgG, y de la unión covalente de C3b a las cadenas pesadas de IgG, no a IgA(36–39). Otros reportes describen la lisis dependiente del complemento o la opsonización de bacterias encapsuladas probablemente por estímulo de los inmunocomplejos IgA, y que surgen de la activación de la vía alternativa por los polisacáridos bacterianos.

Además, se ha demostrado que la -IgA activa la vía de las lectinas, al unir la lectina de unión a manosa (MBL)(40). Sin embargo, esto depende de la disponibilidad de residuos terminales de manosa (o *N*-acetilglucosamina), los cuales han sido reportados como cadenas de glicanos expresadas por las moléculas de IgA. La importancia in vivo de la activación de esta vía por S-IgA (u otras formas moleculares de IgA) sigue siendo incierta.

**Otras funciones:** la molécula de IgA posee funciones clásicas que incluyen la inhibición de la adherencia de microbios a las superficies de mucosas, inhibe las enzimas bacterianas incluyendo las *strptococcus* glicosiltransferasa y bloquea las proteínas de unión a glicanos del *streptococo* oral, todas ellas contribuyentes a la formación de placa dental(20).

Una vez consideradas todas estas características, podemos entender cómo una alteración estructural en la molécula de IgA o de unión con recptores, son capaces de producir toda la cascada de eventos que sustentan el proceso fisiopatológico de esta enfermedad. Sin embargo, son múltiples y no un único proceso, los que explican los desencadenantes de esta cascada de eventos.

#### **6.4. Patogénesis**

El hallazgo central en el proceso fisiopatogénico en pacientes con NIgA es la presencia de IgA anómala circulante. Sin embargo, si hacemos una revisión de la literatura, podemos evidenciar que no existe un mecanismo patogénico único, sino que el desarrollo de la enfermedad es secundario a múltiples desencadenantes o “hits”(41). La confluencia de varios factores en un mismo

individuo es lo que se conoce como proceso de múltiples estímulos. La hipótesis central en la fisiopatogenia de la enfermedad se basa en la producción de una IgA anómala circulante (Hit 1), que genera un autoanticuerpo IgG (o IgA en menor proporción) dirigido contra la región bisagra O-glicanos (Hit 2) específico contra IgA, produciendo complejos inmunes formados por IgA1 polimérica (IgA1 deficiente en galactosa) (Hit 3) y C3. Todos estos hallazgos conllevan finalmente a 3 procesos patogénicos principales: el depósito mensajal de una IgA estructuralmente alterada (Hit 4), como consecuencia la activación del sistema de complemento e inflamación local y finalmente el daño renal establecido(16,42)

#### **5.4.1 Factores desencadenantes**

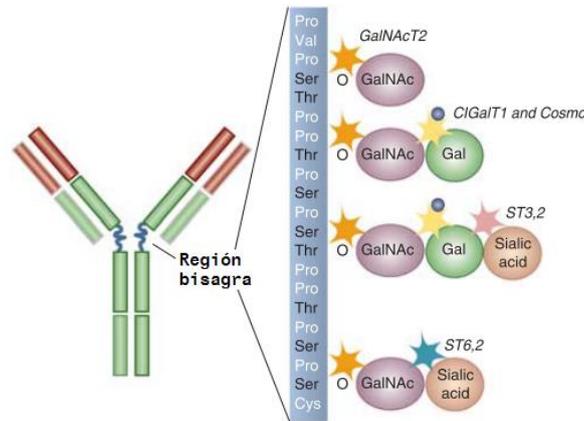
##### **6.4.1.1. IgA1 degalactosilada (Hit 1)**

Múltiples estudios han confirmado la presencia de alteraciones en la glicosilación en la molécula de IgA desde hace más de 20 años. La teoría del proceso fisiopatogénico que cuenta con mayor evidencia científica es la producción de una IgA con déficit en la glicosilación. Esta molécula denominada “anómala” se encuentra tanto en suero como en glomérulo, formando depósitos inmunes. A pesar de que aún se desconoce los desencadenantes y el lugar específico donde se produce esta molécula anómala, modelos experimentales sugieren que desencadenantes ambientales como bacterias (comensales o patógenas) son capaces y necesarias para estimular la producción a nivel de tejido linfoide asociado a mucosa. Algunos autores consideran que el origen de la IgA1 deficiente en galactosa son las células plasmáticas de la médula ósea, pero no es conocido hasta el momento si la producción es continua o si responde a estímulos ambientales o locales. De cualquier modo en sangre periférica se encuentra un exceso de IgA1 deficiente en galactosa como consecuencia a una producción anómala.

La molécula de IgA1 contiene 17 aminoácidos en la región bisagra (La región bisagra de IgA1 se extiende en 13 aminoácidos más que la región bisagra de IgA2)(41) , la cual sufre modificaciones co/post-traslacionales modificado por la adición de una monoscárido, sustituyendo un residuo de serina por treonina(19,20). Múltiples estudios experimentales demuestran que un defecto

en la región bisagra (entre los AA 223 y AA 240) que contienen serina y treonina, es el responsable de la formación de la molécula mal glicosilada.

**Fig. 3.** Estructura de la IgA degalactosilada. Región bisagra y unión con oligosacáridos.



En condiciones normales, estos aminoácidos incorporan una molécula de galactosa a través de la unión de N acetil-galactosamina (Gal NAc) por la acción de la enzima beta 1-3 galactosil-transferasa, formando el disacárido Gal-Gal NAc. Este complejo a su vez puede incorporar una o dos unidades de ácido siálico mediante la acción de la enzima alfa-2,3 sialil transferasa(43). Tanto el residuo de galactosa como la Gal NAc pueden incorporar un residuo de ácido siálico en las configuraciones alfa-2,3 o la alfa-2,6 respectivamente. Se ha propuesto que la incorporación de ácido siálico a la molécula de Gal NAc previene la adición futura de galactosa(27,44,45). Los pacientes con IgAN han aumentado los niveles circulantes de IgA1 con glucanos abreviados compuestos de N-acetilgalactosamina (GalNAc), con o sin ácido siálico, que carecen de una fracción de galactosa (Figura 3).

La causa del déficit de la glicosilación no se conoce con exactitud. No se han descrito mutaciones en el ADN ni deleciones en el RNAm que codifica la región bisagra, por lo que algunos autores consideran que el defecto podría ser post transcripcional. A pesar de las diferentes hipótesis hasta ahora planteadas, se sabe que el defecto de la degalactosilación de la IgA es hereditario(3,27) pero su expresión única no es suficiente para el desarrollo de enfermedad. En 20% de los enfermos con NIgA no se detectan niveles de IgA1 degalactosilada (y el

mecanismo de depósito renal es desconocido) y en familiares de pacientes con NlgA se detectan niveles elevados en sangre de NlgA sin desarrollar patología(27).

Otros autores plantean la hipótesis de que las células B de sujetos con nefropatía IgA tienen un déficit de la galactosilación, además de una actividad reducida de beta 1-3 galactosil transferasa y de su chaperona (COSMC)(45). La acción de esta chaperona permite el correcto plegado y estabilidad de la molécula de IgA. Existe evidencia que demuestra un aumento en la actividad de la alfa-2,3 sialil transferasa así como una disminución en la actividad de la C1GalT1 (core 1 beta 1-3 galactosiltransferasa) y/o de la COSMC (core 1 beta 1-3 galactosiltransferasa chaperona-uno molecular) capaz de bloquear el proceso de incorporación de la galactosa(46). Algunos grupos de investigación han estudiado la expresión de la glicosiltransferasa, y a pesar de tener resultados no concluyentes se cree que una disminución de la expresión del C1GalT1 y/o COSMC sin factores clave en la producción de la IgA1 degalactosilada(43,45). Por otro lado una excesiva sialización de la GalNAc por la alfa 2-6 dialiltransferasa, en combinación con el mecanismo anterior, pueden ser los responsables de los cambios en la región bisagra de la IgA1(46).

Además, se han detectado mutaciones de la enzima involucrada en la glicosilación así como de la expresión de su gen ST6 GALNA C2, en pacientes con expresión clínica, pero sin poder concluir su relación con el déficit de la glicosilación. Se han descrito mutaciones en dos haplotipos de genes que codifican ambas glicosiltransferasas (C1 GALT1/ST6 GALNA C2) y predisposición a nefropatía IgA(47).

Finalmente, también existe evidencia de la influencia de factores genéticos en la composición de glicofomas de IgA1 en cohortes americanas de IgAN familiares y formas de IgAN esporádicas en China(43). La heredabilidad de la IgA1 deficiente en galactosa se observa en diversos grupos raciales y no se explica por la variación en los niveles de IgA en suero, lo que sugiere que distintos mecanismos genéticos influyen en la producción y la glucosilación de IgA1(41). Estos datos también indican que la glucosilación de IgA1 aberrante precede a la enfermedad clínicamente manifiesta y constituye un factor de riesgo heredado

para el desarrollo de IgAN. Además, debido a que la mayoría de las personas con niveles elevados de IgA1 deficiente en galactosa no muestran signos clínicos de daño renal, este defecto hereditario es insuficiente para causar IgAN, lo que implica procesos patógenos adicionales.

Los datos del estudio de la asociación del genoma completo, GWAS(13), han identificado un locus en el cromosoma 22q12.2 que influye en la susceptibilidad a IgAN. Este locus también está asociado con la variación en los niveles de IgA en suero y se ha asociado previamente con el riesgo de enfermedad inflamatoria intestinal, lo que implica aún más el rol de regulación de la mucosa en la inflamación.

Una vez formada la molécula de IgA denominada anómala, inicia el proceso patogénico a través de tres mecanismos fundamentales: a través de la formación de agregados poliméricos con otras moléculas de IgA, unión a través del receptor Fc alfa de las superficies celulares de las células linfoides y mononucleadas, que se rompen y producen complejos IgA polimérica-RR alfa soluble, con afinidad al mesangio y por último la región hipoglicosilada de la región bisagra expone residuos inmunogénicos que generan la producción de autoanticuerpos IgG circulantes y en consecuencia la formación de inmunocomplejos IgA1 polimérica-IgG. El resultado final de estos procesos es la formación de agregados o e inmunocomplejos que persisten en circulación al no poder ser reconocidos por los receptores hepáticos, depositándose en el mesangio renal por su gran afinidad con proteínas de matriz extracelular o a través de la interacción con receptores mesangiales específicos (Ver receptores mesangiales). No es un único hallazgo, sino la combinación de múltiples procesos patogénicos lo que conllevan al desarrollo de la NIgA. Esta es la teoría descrita recientemente y conocida como la teoría de los multi-hit(41).

#### **5.4.1.2. Ac IgG contra IgA degalactosilada (Hit 2 y Hit 3)**

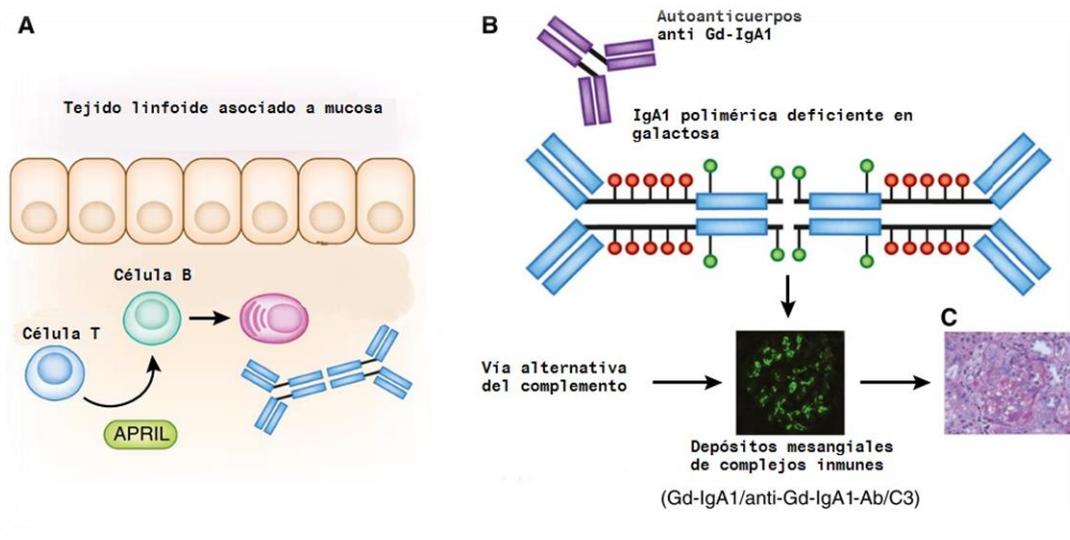
Los cambios estructurales de la molécula de IgA producto de los alteraciones conformacionales en la región bisagra, exponen epítopes que se consideran dianas antigénicas(43) y que desencadenan la formación de inmunocomplejos.

El principal anticuerpo circulante encontrado en suero de pacientes con NlgA es el IgG, siendo estos anticuerpos específicos contra la región bisagra de IgA1(45). A pesar de que no se conoce el desencadenante de la formación de los autoanticuerpos, se han descrito genomas que contienen alelos de susceptibilidad a formas esporádicas de IgA, en la región del antígeno leucocitario humano(12,13). Por otra parte, se ha demostrado que en la NlgA existen cambios en la expresión del inmunoproteosoma de células mononucleares en sangre periférica. Este cambio fenotípico a un proteosoma más catalítico sugiere una mayor eficiencia en el procesamiento y presentación de antígenos en la NlgA y pareciera presentarse como una respuesta del huésped a activaciones del sistema inmunes como en las infecciones virales (a través de la liberación del interferón gamma)(48). Otra hipótesis alternativa es que los anticuerpos que atacan la región bisagra de la inmunoglobulina A, son anticuerpos formados contra los carbohidratos presentes en las paredes de las células microbianas, que por reacción cruzada forman complejos inmunes contra la región bisagra de una IgA mal galactosilada. Por tanto, en períodos de infección de mucosas, incrementan los inmunocomplejos y secundariamente se asocia hematuria macroscópica intermitente. Es un caso desafortunado de lo que se denomina mimetismo molecular. Otro factor que contribuye a la formación de estos inmunocomplejos es el receptor para células mieloides CD89. Ya sea en su forma soluble (sCD89) o unida a membrana, tienen un papel crítico en la formación de IC. Se postula que ambas son capaces de unirse de forma estable a la molécula de IgA polimérica y de misma forma capaz de depositarse a nivel mesangial.

En cuanto a los inmunocomplejos, están constituidos por una molécula IgA1 deficiente en galactosa, un anticuerpo IgG o IgA unido a la región bisagra *O-glicano*, y una molécula del complemento (en la mayoría de los casos C3)(41). Por este motivo es fundamental que exista un exceso de IgA degalactosilada circulante (*IgA1 o-glicofomas*) para la formación de estos inmunocomplejos. Estos complejos contienen una alta afinidad por el mesangio, por lo que sus depósitos son responsables directos de la inflamación y la proliferación mesangial presentes en biopsias renales. Además, la activación local del complemento y la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona se

creo contribuyen a la producción de glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial, y finalmente a la pérdida de la función renal(49) (Figuras 4a y 4b).

**Fig. 4. Activación celular y depósito de inmunocomplejos a nivel mesangial. A.** Producción de IgA secretora por la activación de células B y T. **B.** Depósito de inmunocomplejos y activación de la vía alternativa del complemento.



Sin embargo, la presencia de *IgA1 O-glicofoma*, como único desencadenante, es insuficiente para producir la enfermedad, por lo que se requiere un segundo estímulo capaz de activar el proceso fisiopatológico. Se ha propuesto que este segundo estímulo lo constituye la formación de inmunocomplejos IgG e IgA glicano-específicos, los cuales son capaces de reconocer la región bisagra de la IgA1 degalactosilada. Actualmente se sabe que los niveles de IgA1 degalactosilada están influenciados, en mayor medida, por factores genéticos (al igual que en otras enfermedades autoinmunes) y de la misma manera influncian

la formación de inmunocomplejos en la NlgA.

Además, estos autoanticuerpos IgG exhiben características únicas (CDR3) en la región variable de sus cadenas pesadas(50) Específicamente, la tercera posición en CDR3 es típicamente serina en pacientes con IgAN, una característica necesaria para la unión eficiente de la IgG a IgA1 deficiente en galactosa. Es importante destacar que los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos para IgA1 deficiente en galactosa se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad(41,50). No se sabe si la sustitución de serina CDR3 se origina a partir de mutaciones somáticas que surgen durante la maduración de las células productoras de anticuerpos o de mutaciones hereditarias de la línea germinal(41).

Una hipótesis alternativa para la formación de inmunocomplejos ha sido propuesta por , describen el papel de la forma soluble del receptor Fc $\alpha$  (sCD89) en puede generar complejos con Gd-IgA1. En particular, se ha encontrado una asociación entre los niveles de complejos séricos de sCD89-IgA y la gravedad de enfermedad en pacientes con nefropatía IgA(31). Se sugiere que los pacientes que presentan progresión de enfermedad tienen niveles más elevados de sCD89 que su grupo control (no progresadores), por lo que los complejos sCD89-pIgA podrían ser protectores. En contraste, en un modelo animal se sugiere que la interacción entre Gd-IgA1, sCD89, receptor de transferrina y transglutaminasa 2 en las células mesangiales son necesarias para el desarrollo de la enfermedad(51).

Las señales más fuertes en el reciente GWAS para IgAN se localizaron dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), responsable de la codificación de polipéptidos en las células T presentadoras de antígeno, una región altamente asociada con el riesgo de muchos trastornos autoinmunes. Análisis genéticos identificaron tres loci de susceptibilidad independientes dentro del MHC(3). El efecto genético más fuerte se observó para el locus MHC-II que contiene los genes HLA-DQB1, DQA1 y DRB1. Este efecto parecía ser transmitido por un haplotipo altamente protector DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602. Específicamente, el alelo DQB1\*0602 redujo las probabilidades de enfermedad

en más del 50% por copia. Este es un alelo HLA clásico relativamente común, presente en 10 a 20% de europeos y 2 a 10% de asiáticos. El segundo efecto genético independiente es de una región que abarca dos genes que codifican transportadores asociados con el procesamiento de antígenos (TAP1 y TAP2) y dos genes que codifican componentes del inmunoproteasoma (PSMB8 y PSMB9). Estas moléculas procesan los antígenos en el citosol y los transportan al retículo endoplásmico para transportarlos a la superficie celular en asociación con las moléculas de MHC-I. Todavía no está claro cuál de estos cuatro genes está involucrado en la susceptibilidad a NlgA. Finalmente, el tercer locus de asociación está en el cromosoma 6p21 y codifica las moléculas MHC-II DPA1, DPB1 y DPB2, y por lo tanto también se relaciona con el proceso de presentación del antígeno.

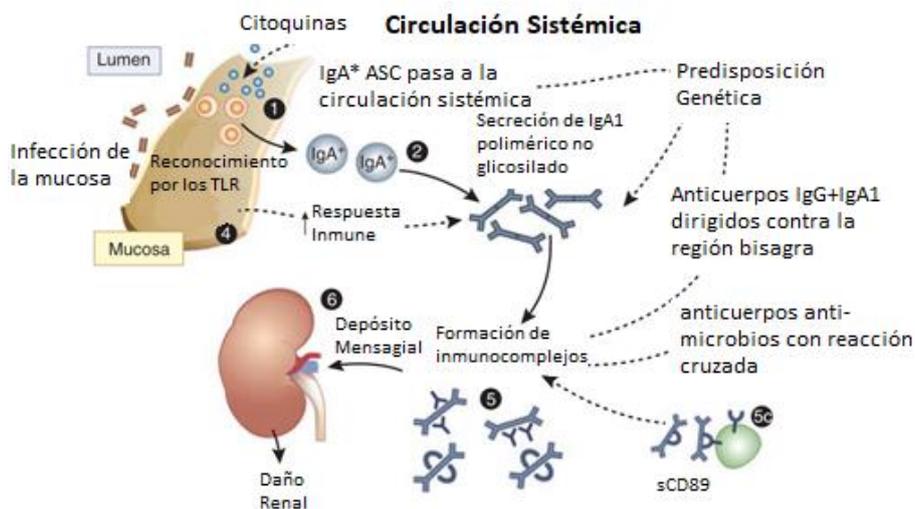
#### **5.4.1.3. Receptor de la IgA en la célula mesangial (Hit 4)**

A pesar que el hallazgo diagnóstico principal es el depósito de IgA a nivel mesangial, existe una asociación entre la intensidad del depósito de IgA y el grado de afectación glomerular y túbulo intersticial(52). La interacción de los depósitos de IgA1 con las células mesangiales produce una proliferación de estas, síntesis de matriz mesangial y/o lesión celular. Esta interacción está mediada por dos mecanismos principales: La interacción de IgA1 polimérica con receptores mesangiales específicos y por la activación del sistema del complemento a través de la vía alternativa o la vía de las lectinas (Figura 5), que será explicado en el apartado “activación del complemento/vía de las lectinas”.

De los receptores descritos, el receptor denominado TfR1 o CD71 (receptor de transferrina) se encuentra localizado en las células mesangiales(25,31). En situaciones normales es un receptor muy poco expresado en el mesangio, y es capaz de unir los inmunocomplejos formados por IgG-IgA e internalizarlos, produciendo la expresión de transglutaminasa 2, que posteriormente induce mayor expresión de TfR1, induciendo así un circuito de amplificación patogénico(31), lo que produce una hiperexpresión en enfermos con NlgA. Se ha establecido una relación entre la expresión de CD71 y la gravedad de la afectación renal lo que le confiere la importancia a este receptor. CD71 es capaz de unir IgA polimérica, pero no IgA1 monomérica, y diversos datos

experimentales han demostrado que la unión IgA1 polimérica-CD71 causa una activación de la célula mesangial que, como resultado, prolifera y produce IL-6, TGF beta y otras citoquinas(23,25). Gd-IgA1 por sí sola no es capaz de activar a las células mesangiales. Para esto deben formar complejos inmunes patógenos que se unan al mesangio e inicien la cascada de activación(53). Finalmente los factores de crecimiento como los derivados de plaquetas (PDGF) se consideran moléculas inductoras de proliferación mesangial a través de sus propiedades quimioatrayentes de células mesenquimales por lo que juegan un papel importante en el proceso mesangioproliferativo(15,54).vRecientemente se ha identificado a la  $\beta$ -1,4 galactosiltransferasa como un receptor potencial para la porción Fc de IgA(55).

**Fig. 5. Resumen de la patogénesis de la nefropatía por Inmunoglobulina A**



#### 5.4.1.4. Activación del complemento

La activación del complemento es considerado como el principal mecanismo patogénico en la nefropatía IgA. Estudios clínicos y genéticos describen defectos en la regulación de la vía alternativa del complemento como principal hallazgo en la inmunopatogénesis de la NIgA. La activación de la vía de las lectinas también está implicada en el proceso fisiopatogénico, procesos que culminan en la producción de inflamación.

Existen tres vías de activación del complemento(56) (Figura 6): la vía clásica, de menor influencia dentro del proceso fisiopatológico de la enfermedad e involucra

a la activación del C1q, la vía de las lectinas que a diferencia de la vía clásica contiene opsonina y lectina de unión a manosa y ficolinas en lugar de C1q; y finalmente la vía alternativa en la que intervienen la C3 convertasa. En las tres vías, la convertasa C3 activa y se escinde formando C3a y C3b y también el de C5 a C5a y C5b. El C5b forma el complejo de ataque de membrana con otros Componentes reclutados del complemento (C6, C7, C7, C8 y C9). El complejo de ataque de membrana es el producto final citolítico de la cascada del complemento, que forma un canal transmembrana que causa lisis osmótica de la célula diana.

#### **5.4.1.4.1 Clásica**

Se sabe que su participación en el proceso fisiopatológico es reducida, sin embargo está involucrada en la NlgA a través de la activación del complejo C1 (compuesto de una molécula de C1q, dos moléculas de C1r y dos moléculas de C1s, por lo tanto formando C1qr2s2)(56). Esta activación ocurre cuando C1q se une a los complejos antígeno-anticuerpo formados por IgM o IgG, o cuando C1q se une directamente a la superficie de un patógeno. Esta mínima intervención no justifica el desarrollo del proceso inflamatorio encontrado en los pacientes con NlgA.

#### **5.4.1.4.2 Alternativa**

La IgA polimérica es capaz de activar la vía alternativa del complemento, aunque en algunas biopsias de enfermos con NlgA, se encuentra MBL colocalizando depósitos de IgA-MBL y sugiriendo una activación de la vía de las lectinas (36,38,39). La vía alternativa es el principal activador de la cascada del complemento en la NlgA y el principal responsable del depósito de C3. También, factores del complemento como factor H (CFH) y properdina que se encuentran en biopsias renales de pacientes con NlgA(37,39,57) evidencian la activación de esta vía.

El codepósito mesangial de C3 e IgA es característico de la NlgA, estando presente en al menos el 90% de las biopsias(58) y se correlaciona con la gravedad y la progresión de la NlgA, lo que sugiere que la activación del complemento, particularmente a través de la vía alternativa, contribuya con la

lesión glomerular(57). El C4 mesangial, y particularmente el fragmento de activación C4d, se identifica con frecuencia en las biopsias de NIgA. Esto, junto con la ausencia casi universal de C1q en depósitos, indica que la vía de lectina también activa el complemento en la NIgA, y que es poco probable que la vía clásica contribuya a la patogénesis. La presencia glomerular de C3 solo implica actividad de la vía alternativa; la presencia de C4 y C3 en ausencia de C1q implica actividad de la vía de las lectinas, posiblemente con amplificación dependiente de la vía alternativa; y la actividad de la vía clásica se evidenciaría por depósitos glomerulares de C3, C4, C1q e IgG.

De forma típica en biopsias renales de pacientes con IgAN se encuentran componentes de la vía alternativa que incluyen C3, en más del 90%, properdina en el 75% –100% y factor H (FH) en el 30% –90% de los casos(57). También se han identificado otros reguladores de esta vía, como las proteínas FHR(59). Recientes publicaciones sustentan(39,57) la participación de la proteína relacionada con el factor H (FHR) 1 y de (FHR) 5 con la activación de la vía alternativa del complemento(60). De la participación del Factor H en la patogénesis de la enfermedad, ver apartado biomarcadores/Factor H.

Por otro lado, la evidencia de la activación del complemento no se limita a los riñones. Se observaron niveles disminuidos de C3 en plasma con elevación de derivados de C3 (iC3b y C3d) en algunos pacientes con NIgA indicando que la activación del complemento sistémico y la regulación posterior a través del AP también pueden ocurrir en la fase fluida(61). Para respaldar esto, los ensayos in vitro que usan IgA unida a la placa o agregados mostraron que IgA1 pudo desencadenar la cascada del complemento y la escisión de C3 a través de la vía alternativa; y los análisis proteómicos séricos de gd-IgA1-IC revelaron la presencia de productos de degradación de C3 como iC3b, C3c y C3dg(59,62).

Los codepósitos mesangiales de C3, el consumo de C3 y el aumento de los fragmentos de degradación de C3 en plasma, se correlacionan con las características clínicas y lesiones histopatológicas de peor pronóstico en la NIgA(61,63), lo que respalda la contribución de la vía alternativa en la patogénesis de la lesión glomerular.

#### **5.4.1.4.3 Vía de las lectinas**

Esta vía se activa mediante la unión de moléculas de reconocimiento de patrones (PRM) que incluyen lectina de unión a manosa (MBL), ficolinas y lectinas, a patrones moleculares asociados a patógenos. Los complejos resultantes pueden activar de forma variable las serina proteasas (MASP) asociadas a MBL que consisten en MASP-1, MASP-2 y MASP-3(40,64,65).

La activación de MASP da como resultado la formación de C4a y C4b a través del clivaje de C4; C2a y C2b a partir de C2. De forma similar, en la ruta clásica, C4b y C2a se unen posteriormente para formar C3 convertasa. La vía de las lectinas se desencadena directamente por la hidrólisis espontánea de C3 [C3 (H<sub>2</sub>O)], debido a la ruptura del enlace tioéster. Este cambio de forma permite la unión del factor de proteína plasmática B [C3 (H<sub>2</sub>O) Bb, convertasa C3]. Esta convertasa escinde las proteínas C3 en C3a y C3b, que luego son capaces de unirse covalentemente a una superficie de membrana patógena(7,57). La formación de una convertasa C3, C4bC2b y activación C3(66) dan paso a la fase final de la vía del complemento. La evidencia inmunohistológica de la activación de la vía de la lectinas es la identificación de C4d en ausencia de C1q en biopsias renales. Los componentes adicionales encontrados incluyen MBL, ficolinas y MASP(40).

Así pues, el depósito glomerular de las proteínas de la vía de las lectinas se asocia con la gravedad de la NlgA. Endo et al detectaron MBL y MASP-1 en biopsias renales del 24% de los pacientes con NlgA y el 3% de otras glomerulopatías(67). El MBL / MASP-1 depositado se asoció con el depósito glomerular de C3b / C3c y C5b9, pero no se correlacionó con los marcadores séricos de activación del complemento o con los marcadores clínicos de gravedad en la NlgA. Roos et al demostraron que el depósito de MBL glomerular, L-ficolin, MASP1/3 y C4d en un 25% de una cohorte de 60 pacientes con NlgA(40). El depósito glomerular se asociaba de forma significativa a los parámetros de gravedad de la enfermedad establecidos en el estudio específicamente la proteinuria, niveles elevados de creatinina e insuficiencia renal.

En un estudio de nuestro medio, se encontró que pacientes con NIgA con niveles urinarios de properdina, MBL, C4d y C5b-9 elevados tenía una correlación significativa con el filtrado glomerular, con la proteinuria y con la severidad y extensión de las lesiones de fibrosis(68) y que niveles urinarios de C4d y de MBL podían identificar a enfermos que presentaban depósitos mesangiales de ambas proteínas.

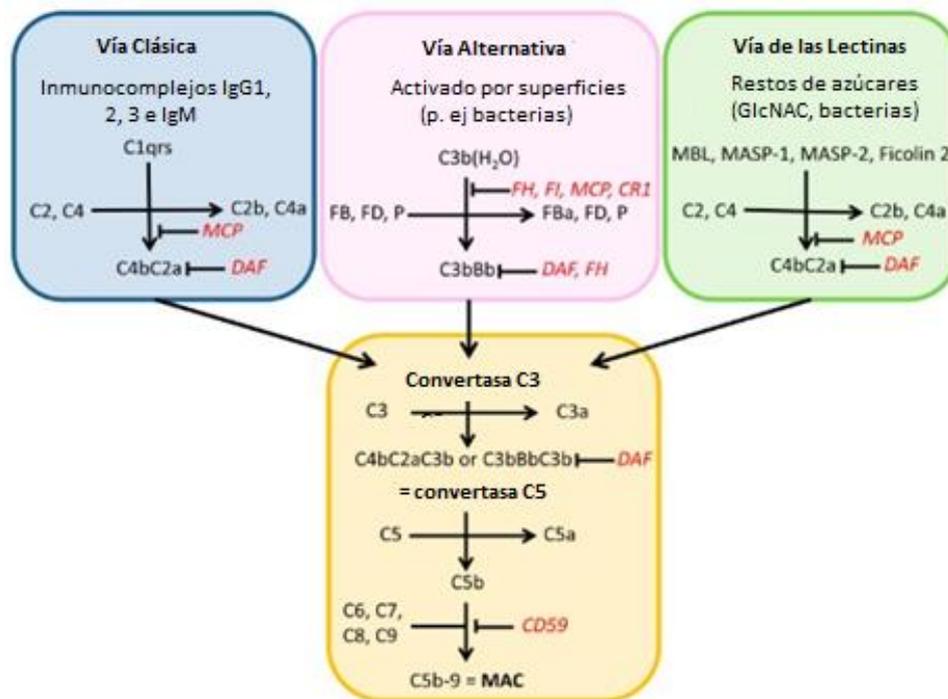
En un modelo animal, se demostró que el codepósito de MBL e IgA en glomérulos de ratones con NIgA ya la activación de la vía de las lectinas, fue similar en ratones que desarrollaban IgA de forma espontánea (gddY) y ratones con niveles de IgA elevados en sangre (HIGA). En estos modelos, se midieron niveles séricos de inmunocomplejo IgA-IgG2a, IgA-MBL-A e IgA-MBL-C mediante ELISA, evidenciándose que los niveles de IC de IgA-MBL en ratones gddY fueron más altos que los ratones HIGA, lo que sugiere que el IC sérico capaz de activar la vía de las lectinas en glomérulos consiste en una IgA aberrante unida a MBL(56).

En cuanto al C4d, en un estudio español diseñado por Espinosa et al, se demostró que existían depósitos de C4d glomerular y ausencia de C1q en biopsias renales de 283 pacientes con NIgA(69). El depósito de C3 se identificó en una proporción igual de casos positivos y negativos de C4d. Se argumentó que los pacientes podrían clasificarse en función de la evidencia glomerular de una o ambas activaciones de la vía de las lectinas o de la vía alternativa. Posteriormente al análisis multivariante, la tinción glomerular positiva de C4d fue un predictor significativo de enfermedad renal crónica terminal (ERCT)(69). El resto de consideraciones del C4d, se discuten en el apartado nuevos biomarcadores/C4d.

Por otro lado, existe un realción entre el depósito de gd-IgA1 y la inflamación globular en la patogénesis de NIgA. Los residuos de GalNac expuestos en la molécula de IgA aberrante, pueden desencadenar la activación de la vía de las lectinas debido a la interacción con ficolinas(40). Los datos in vitro demuestran que la IgA purificada del suero humano normal se une a los complejos MBL-

MASP. La presencia de MBL-MASP conduce a los depósitos de C3 y C4 sobre IgA en ausencia de actividad de la vía clásica, lo que indica que MBL puede unirse a la pIgA y activar el complemento a través de la vía de las lectinas(70). Por lo tanto las fracciones poliméricas de IgA de pacientes con NlGA pueden demostrar una fuerte unión de MBL(40), pero existe una variabilidad significativa en pacientes con IgAN y controles sanos.

**Fig. 6.** Vías de activación del complemento.



#### 5.4.1.5. Activación y/o lesión de la célula mesangial

A pesar de que los mecanismos de este depósito son desconocidos, se cree que una unión al receptor mesangial localizado a nivel tejido renal es el principal responsable de la activación local del complemento y por ende el inicio del proceso inflamatorio. Como se ha explicado anteriormente, el receptor CD71 o receptor de transferrina es el responsable de la señalización e internalización de la señal.

Por otro lado, datos recientes sugieren que la NlGA podría ser una podocitopatía, lo que puede obligar a modificar los modelos actuales de patogénesis(60). La expansión mesangial presente en la NlGA, puede ir acompañada de un prolapso capilar que podría causar desprendimiento podocitario(71). Esta reacción

cruzada de mesangio-podocitos puede explicar la aparición de proteinuria y lesión tubulointersticial en la NIgA(60); la liberación de citocinas como TNF, IL-6 y angiotensina II podría inducir inflamación y la glomeruloesclerosis.

La localización de depósitos de componente soluble en biopsias renales de rutina, asociados a depósitos de MBL, L-ficolin y C4d, confirma una activación de la vía de las lectinas, al menos de forma local, relacionado por algunos autores con un peor pronóstico renal(64).

#### **5.4.1.6. Progresión a la insuficiencia renal crónica**

Posterior a la fase inicial de proliferación y aumento de la matriz mesangial, la progresión a la insuficiencia renal crónica se caracteriza por la aparición de infiltrado linfomonocitario que precede a la fibrosis intersticial(60). Los mecanismos responsables del progreso a ERC, se basan en la activación linfocitaria (quimioatracción de linfocitos y monocitos al intersticio renal), que implica la expresión de selectinas en los capilares peritubulares seguido de una estimulación linfomonocitaria por quimiocinas específicas y de la migración transendotelial mediada por interacción de integrinas(42).

En la literatura, se ha descrito un posible mecanismo de progresión de daño renal, a través de la interacción de dos receptores diferentes: CD71 mesangial como inductor de activación y RR Fc  $\alpha$  linfomonocitario como mediador de la infiltración intersticial(23). Existe evidencia que el receptor RR Fc  $\alpha$ , puede estar implicado en el reclutamiento de monocitos hacia el mesangio renal, y de esta manera iniciar el proceso de lesión renal. La capacidad de la IgA polimérica para activar los leucocitos mononucleares a través del receptor Fc  $\alpha$ -FC y induce activación celular. Se cree que esta activación constituye uno de los mecanismos patogénicos responsables de la infiltración del intersticio renal y progresión de la lesión. Por otro lado la activación de la IgA dimérica unida al receptor Fc  $\alpha$  parece intervenir en la estimulación de los neutrófilos a nivel del mesangio renal(72).

#### **5.4.1.7. Genéticos**

Estudios experimentales han descrito una asociación del genoma con la fisiopatogenia de la nefropatía IgA. Se han encontrado niveles elevados de IgA1 con déficit de galactosa en 25% de familiares de pacientes con NIgA, lo que

supone un vínculo de consanguinidad o un trasfondo poligénico. Por otra parte, algunos alelos de riesgo han sido descritos en pacientes con NIgA y polimorfismo en los genes de la citoquina APRIL(73). Además, se han identificados alelos del gen del factor H del complemento, que confieren una protección contra el desarrollo de la nefropatía IgA. La delección del gen 1 y 3 relacionado al factor H (CFHR1 y CFHR3) produce un desequilibrio en la actividad y niveles de CFH. La ausencia de estas dos proteínas producen un aumento en su actividad(12).

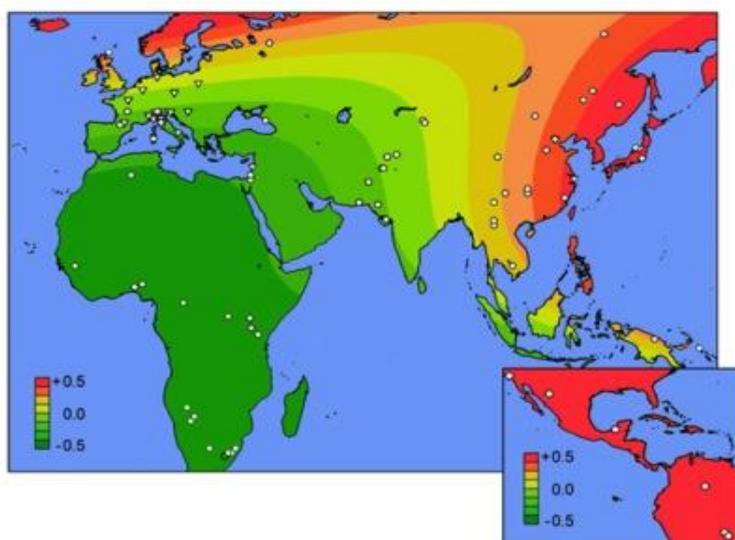
Por otro lado, se han identificado numerosos mecanismos celulares que intervienen en la glicosilación de la molécula de IgA. Una activación del factor asociado a células B (familia del factor de necrosis tumoral) denominado BAFF, se observa sobreexpresado en ratones de modelos experimentales, desarrollando un fenotipo similar a la NIgA(74). Por otro lado, la citoquina APRIL (ligando de proliferación inducido) . Tanto la sobre expresión del BAFF y las citoquinas APRIL son necesarias para la producción de IgA anómala. Además se ha descrito, una activación de células B a través de APRIL, permitiendo la transformación a células plasmáticas productores de IgA. La activación del receptor TACI parece involucrado en el cambio a este tipo de células(75).

Avances en modelos animales modificados genéticamente, añaden un nuevo grado de complejidad in modelos de estudio en la nefropatía IgA. Modelos transgénicos, knockout y knock-in han permitido indentifiar genes capaces de modular la enfermedad. Las primeras observaciones en este sentido fueron hechas en uteroglobina, en ratones knockdown, que desarrollaron depósitos glomerulares de IgA, fibronectina y colágeno además de microhematuria(76).

Dada la aparición ocasional familiar, se plantea la sospecha de que exista un componente genético en el desarrollo de la nefropatía IgA. Las variaciones étnicas en la prevalencia genera que se produzca un primer análisis del genomas en 30 familiares afectos con nefropatía IgA, demostrando una transmisión autosómica dominante con penetrancia incompleta y vinculada al gen 6q22-23(77). Del mismo modo en estudios de asociación del genoma completo (GWAS), se ha descrito la variación geográfica de la nefropatía IgA asociándose a la presencia de alelos genéticos particulares que protegen de la enfermedad,

siendo graficados en un mapa mundial de susceptibilidad para el desarrollo de nefropatía IgA(3). Esta predisposición racial se mantiene en otras regiones y, por ejemplo en América del Norte, la nefropatía IgA es menos común en los afroamericanos que en sujetos caucásicos de origen europeo (Figura 7). Así, a través de análisis del GWAS, se detectó una fuerte asociación del HLA clase II y del loci en la región del factor H del complemento, y una mayor susceptibilidad para la IgA.

**Fig. 7.** *Heatmap de susceptibilidad genética de la NIgA*



Estudios observacionales han descrito el papel de la galactosil-transferasa (C1GALT1) y polimorfismos del Toll-like receptor (TLR4) influyen en el riesgo de desarrollar IgAN y proteinúria(78). La regulación por parte de las células del sistema inmune (como las TLRs), que modulan la aparición de hematuria en pacientes con procesos infecciosos respiratorios. Además, estudios observacionales han demostrado que factores involucrados en la glicosilación anómala de la IgA, tienen componentes heredables en muchas de las familias con NIgA.

### **5.5. Manifestaciones clínicas**

La NIgA tiene un curso clínico heterogéneo. La diversidad clínica de esta patología es tan amplia que puede ir desde un curso completamente benigno presentado como una hematuria microscópica asintomática hasta la insuficiencia renal rápidamente progresiva.

En la mayoría de los casos (70%) sigue un curso benigno y limitado al riñón(4,16,42,61) a pesar de que puede estar asociada a la cirrosis, la celiaquía y la infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH)(79,80). En norte américa alrededor de un 75% de niños y adultos jóvenes con NIgA presentan hematuria macroscópica durante procesos respiratorios y/o gastrointestinales; y en adultos más del 50% de adultos mayores de 30 años al momento del diagnóstico presentan insuficiencia renal de estadíos 3 al 5(61).

Algunos de los pacientes mantienen una función renal normal durante muchos años e incluso alrededor del 8% llegan a normalizar el sedimento urinario. Sin embargo, otros enfermos evolucionan hacia la insuficiencia renal, requiriendo de tratamiento renal sustitutivo hasta en un 10% de los casos, incrementándose al 15%, 20% y 30% a los 10,15 y 20 años respectivamente(81).

En cuánto a las formas de presentación de la enfermedad, se pueden encontrar las siguientes formas clínicas:

1. Presencia de hematuria recurrente macroscópica (50% de los casos) frecuentemente presentada en contexto de infecciones respiratorias (denominada hematuria macroscópica sinfaringítica)(7,82), aún en pacientes con amigdalectomía. Puede acompañarse de dolor lumbar que puede reflejar el estiramiento de la cápsula renal. También puede asociarse fiebre. Estos episodios de hematuria no producen anemización y generalmente se presentan antes de los 40 años.

2. Insuficiencia renal progresiva, con una supervivencia renal que varía según el tiempo evolutivo, como ya se ha comentado previamente. Proteinuria leve, generalmente no nefrótica y detectada de forma casual en análisis del sedimento urinario, asociada a la insuficiencia renal. Hipertensión arterial en pacientes jóvenes, siendo rara la hipertensión arterial maligna. Habitualmente de crónica y de fácil control.

3. Síndrome nefrótico, menos común (10% de los casos) y habitualmente presentada como proteinuria nefrótica aislada(83).

4. Glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) caracterizada por edema, hipertensión arterial e insuficiencia renal. En estos casos puede asociarse oligoanuria y frecuentemente se encuentra una afectación más severa (reacción extracapilar en más de 50%) en la biopsia renal(84).

5. Como hallazgo casual en biopsias de protocolo, en regiones donde se realizan de forma rutinaria y en casos de nefropatía familiar en los que se incluyen hasta el 15% de los casos y en las que existe un antecedente familiar claro. En cuánto a su forma de transmisión, tiene penetrancia incompleta y con un rasgo autosómico dominante(85).

Por otro lado, las formas de presentación pueden variar según la edad de debut de la enfermedad. En un reciente estudio en una cohorte española(86) con un seguimiento de 25 años, se estudiaron pacientes mayores de 65 años con diagnóstico de nefropatía IgA, con la intención de describir las formas de presentación y la evolución en pacientes de más edad. El estudio demostró que la presentación clínica más común fue la hematuria y/o proteinuria (55%) y el fallo renal agudo al momento del diagnóstico (40%). De estos últimos 87% presentaban hematuria asociada a fracaso renal (NTA) y 13% semilunas en el estudio de la biopsia renal. Cuando se valoraba la ERCT o la muerte hasta un 74% de los pacientes presentaban o enfermedad renal crónica terminal o fallecían a los 5 años de seguimiento.

#### **5.6. Factores de mal pronóstico**

En un estudio realizado en 2019, se analizó una gran cohorte de pacientes con NIgA, multiétnico y provenientes de Europa, Norte América, China y Japón(87), diseñado para establecer una herramienta útil para predecir el riesgo de ERCT o una disminución de la TFGe en más de un 50% en pacientes con NIgA. El estudio incluyó 3927 pacientes, que fueron valorados según modelos predictivos. Estos modelos incluían un modelo clínico, donde se valoraba la TFGe, proteinuria y presión arterial al momento de la biopsia renal; y dos modelos que incluían la valoración histológica de Oxford (MEST), la edad, tratamiento y presencia características raciales/étnicas (caucásicos, japoneses o chinos) o ausencia de características raciales/étnicas, para permitir la aplicación a otros

grupos étnicos. Estos modelos parecían predecir el riesgo de alcanzar el objetivo del estudio (<50% de la TFGe o ERCT) mejor que el modelo clínico clásico. Sin embargo, estos modelos requieren aún de validación.

Por tanto, los factores de mal pronósticos demostrados hasta ahora, incluyen factores de mal pronóstico clásicos, histológicos y séricos en los cuales se incluyen los marcadores del proceso fisiopatológico discutidos en apartados previos de esta tesis doctoral.

### **5.6.1. Clásicos**

En los últimos años, el avance en el conocimiento de la nefropatía IgA ha tenido una evolución muy variable. En muchos casos este tipo de nefropatía ha tenido un curso benigno donde en algunos pacientes se ha mantenido una función renal normal durante muchos años, mientras en casos opuestos, ha habido pacientes que, en cuestión de poco tiempo, alcanzaron insuficiencia renal terminal.

El pronóstico de la Nefropatía IgA depende tanto de factores histopatológicos como la glomeruloesclerosis avanzada, la hiper celularidad mesangial, lesiones necrotizantes, atrofia tisual, arteriosclerosis entre otros. Sin embargo, factores clínicos como la edad, la hipertensión arterial, la ausencia de hematuria, la obesidad, el género y el hábito tabáquico, se asocian a una peor evolución renal(88). De hecho el hábito tabáquico incrementa el riesgo de progresión a enfermedad renal crónica terminal en hombres con enfermedad renal (89).

En un estudio prospectivo realizado en una cohorte de 322 pacientes con nefropatía IgA, se estudió la capacidad predictora de fallo renal o muerte, a través de un score de riesgo renal(88). Los autores concluían que el score diseñado era capaz de predecir precozmente el riesgo de llegar a diálisis/muerte. Además, demostraban que el control de la tensión arterial constituía la intervención terapéutica más importante para mejorar la supervivencia.

#### **5.6.1.1 Hipertensión arterial**

Alrededor del 7% al 15% de los pacientes con IgAN presentan hipertensión maligna(90,91). La NIgA con hipertensión maligna se caracteriza por insuficiencia renal grave desde el diagnóstico y comúnmente progresa a ERCT.

El efecto protector de los IECA o ARA II se correlacionó positivamente con la proteinuria basal.

La terapia para el tratamiento de la hipertensión arterial de la nefropatía progresiva por IgA (STOP IgAN) demostró beneficios del control prolongado y rigurosos de la presión arterial en esta cohorte de pacientes y proteinuria > 0,75 < 3,5 g / día además de deterioro de la función renal moderado(81). Estos beneficios a los 3 años de seguimiento no fueron significativamente diferentes de los efectos obtenidos al asociar corticosteroides/inmunosupresores(92). A pesar del beneficio del bloqueo doble con ISRAA sobre la proteinuria, actualmente se desaconseja por el riesgo de presentar efectos secundarios (Guías KDIGO).

La biopsia renal muestra esclerosis glomerular leve a moderada y fibrosis intersticial en más del 80% de los casos. Curiosamente, la biopsia renal también demuestra microangiopatía trombótica (MAT) en 30% a 100% de los pacientes, aunque la evidencia de laboratorio de MAT, como trombocitopenia o esquistocitos en la muestra de sangre, es mucho menos común(90,91).

La MAT es característica de los síndromes microangiopáticos en los que la desregulación del complemento parece desempeñar un papel patogénico importante, incluido el síndrome urémico hemolítico atípico (SHU)(93). La patogenia de la NIgA-HTA maligna es completamente desconocida. A pesar de esto, los pacientes con IgAN con hipertensión maligna y MAT demuestran el potencial del complemento para conducir la lesión glomerular en la nefropatía glomerular.

#### **5.6.1.2 Proteinuria**

La proteinuria sigue siendo uno de los parámetros que mejor se correlaciona con el desarrollo de insuficiencia renal en cualquier patología glomerular. Existe un amplio acuerdo en el mundo nefrológico en que el tratamiento con bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) es el tratamiento de elección en pacientes con NIgA, proteinuria mayor de 0.5-1 g/día e hipertensión arterial(94).

En la nefropatía IgA, los mejores factores predictores de la progresión renal son el aumento del nivel de creatinina, la hipertensión arterial y la proteinuria de rango nefrótico(15). Un estudio multivariante mostró la relevancia de la proteinuria durante el seguimiento (porcentaje de duración de proteinuria masiva o proteinuria al año) más la valoración de la proteinuria inicial. El valor medio de la presión arterial y la proteinuria durante el seguimiento fueron predictores independientes de ERC terminal(15). A pesar de que la proteinuria suele presentarse en rango <1gr en pacientes con NIgA, el fallo renal agudo, la insuficiencia renal y la proteinuria de rango nefrótico son más comunes en pacientes mayores de 65 años(95).

### **5.6.1.3. Insuficiencia renal**

Un diagnóstico de IgAN se asocia con una reducción promedio en la esperanza de vida de 6 a 10 años. Aproximadamente el 40% de los pacientes con IgAN mayores de 30 años en el momento del diagnóstico desarrollan ERCT a los 20 años de diagnóstico(15).

La nefropatía por IgA puede manifestarse de manera diversa, desde hematuria microscópica aislada hasta glomerulonefritis rápidamente progresiva. La historia natural y los resultados clínicos de la IgAN también son diversos e incluyen remisiones espontáneas (5–15%, menos frecuentes en adultos) y glomerulonefritis rápidamente progresiva (<10%), aunque con ERC progresiva lenta (30–40 %) y la evolución "benigna" (40–50%) son las más comunes(96,97). La variación inherente en la tasa de progresión de IgAN hace que los ensayos controlados aleatorios sean difíciles de diseñar e interpretar. Por lo tanto, se necesitan scores de riesgo que predigan y estratifiquen a los pacientes en pacientes con cursos clínicos rápidos o indolentes(81).

## **5.6.2. Histológicos:**

### **5.6.2.1 Clasificación de Oxford**

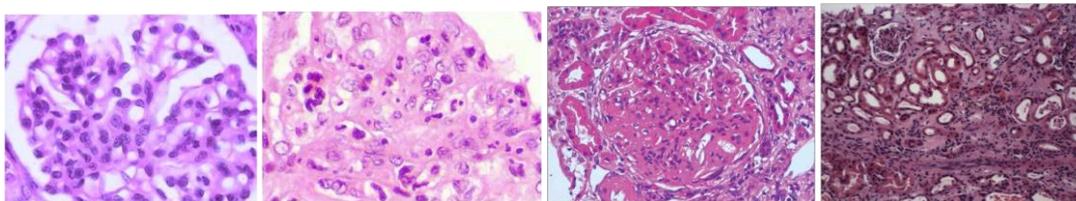
Desde que se comprobó su potencial progresión a enfermedad renal terminal, se han intentado numerosas clasificaciones histopatológicas, ninguna de las cuales habían tenido aceptación universal. La clasificación de Oxford(98) es el

resultado de un extenso trabajo llevado a cabo desde 2005 por un grupo numeroso nefrólogos y patólogos, cuyo objetivo fue determinar los hallazgos de la biopsia renal en 265 pacientes (adultos y niños) con NIgA, realizado entre 15 centros de 11 países alrededor del mundo, con seguimiento promedio de 5 años. El objetivo de esta clasificación fue el de describir las lesiones histológicas más relevantes según su correlación con el pronóstico renal, y que tuvieran además una buena reproducibilidad interobservador y suficientemente fácil de identificar rutinariamente.

Los pacientes incluidos dentro del estudio presentaban 0,5 g/d de proteinuria, eGFR 30 ml/min por 1.73 m<sup>2</sup> en la biopsia renal y un seguimiento de al menos un año. Las variables histológicas seleccionadas para su inclusión demostraron un alto grado de reproducibilidad interobservador y se correlacionaron con criterios de valoración clínicos predeterminados, incluyendo un resultado compuesto de ERCT o una reducción del 50% en la tasa de filtrado glomerular estimado (TFGe) y la tasa de disminución de la función renal.

Para esto se incluyeron cuatro características patológicas y se estudió su asociación con las variables de pronóstico renal. Estas variables histológicas fueron: hiper celularidad mesangial (M), hiper celularidad endocapilar (E), glomeruloesclerosis segmentaria (S) y atrofia tubular/fibrosis intersticial (T), ahora conocidas como MEST o puntuación de Oxford (Figura 8). La ausencia/presencia de >50% de glomérulos que muestran hiper celularidad mesangial se denota M0/M1, respectivamente; E1 indica cualquier hiper celularidad endocapilar; S1 denota cualquier glomeruloesclerosis segmentaria; y T0, T1 y T2 reflejan fibrosis que involucra 1%-25%, 26%-50%, ó > 50% del área cortical respectivamente.

**Fig. 8.** Lesiones histológicas según la clasificación de Oxford (MEST). Se muestran en orden: hiperplasia mesangial, hiperplasia endocapilar, glomerulosclerosis y afectación túbulo-intersticial.



A partir de este diseño histológico (estructurado, estandarizado y reproducible), la evaluación patológica ahora agrega información pronóstica importante más allá de lo que se obtiene solo de variables clínicas.

La relevancia clínica y la aplicabilidad de este puntaje ahora se ha validado en múltiples poblaciones, incluida, más recientemente, la cohorte europea (VALIGA)(14). Este estudio, constituye el mayor estudio de validación realizado, que incluyó 1147 pacientes de todo el mundo. A diferencia del estudio original de Oxford, los criterios de ingreso fueron menos restrictivos; se incluyeron pacientes en ambos extremos del espectro de gravedad de la enfermedad. La cohorte era predominantemente blanca (97.5%) y el objetivo final de estudio combinado de ERCT o disminución de la TFGe en un 50% ocurrió en el 26% de los pacientes a los 10 años.

La reproducibilidad de la clasificación fue satisfactoria, a través de la confirmación de las asociaciones de las variables histológicas a las variables clínicas estudiadas. Curiosamente, en el grupo de bajo riesgo que presentaba proteinuria de 0,5g/d, sólo la proliferación endocapilar se asoció con una tasa rápida de disminución de la función renal. Así mismo, la proliferación mesangial y endocapilar se asoció con un mayor riesgo de desarrollar proteinuria; y en pacientes con una TFGe de 30 ml/min, las lesiones M1 y T1/2 se asociaron con una peor supervivencia renal.

Por otro lado, definir la relación entre la lesión histológica y la respuesta al tratamiento fue un importante objetivo a cumplir. Los estudios MEST sugieren que la respuesta a los corticosteroides puede diferir según la histología. En la

cohorte de estudio original, el uso de corticosteroides en pacientes con E1 parecía reducir el riesgo de alcanzar la ERCT. En la cohorte VALIGA, la mitad de los sujetos recibieron inmunosupresión, principalmente corticosteroides. En un subestudio de VALIGA, Tesar et al.(99) se evaluaron los beneficios aditivos de los corticoesteroides a la terapia con ISRAA. El uso de corticosteroides mejoró la supervivencia renal, y se reportó una reducción en la tasa de filtrado glomerular en sujetos con proliferación mesangial, glomeruloesclerosis segmentaria y fibrosis tubulointersticial. Aunque es difícil llegar a conclusiones firmes basadas en datos de observación, existe un acuerdo en que los ensayos terapéuticos futuros en NlgA deben incluir la estratificación basada en la puntuación MEST para determinar si la histología se puede utilizar para adaptar las decisiones de tratamiento(54).

#### **5.6.2.2. Reacción extracapilar**

El efecto aditivo de la presencia de semilunas en la predicción del pronóstico renal sigue siendo una pregunta difícil de responder en la NlgA. Aunque las semilunas son un hallazgo común en las biopsias de NlgA, la presencia de >30% no lo es tanto. Los primeros estudios inicialmente sugirieron que los pacientes con semilunas que afectan >50% de los glomérulos tienen un alto riesgo de progresión, alcanzando la ERCT hasta en un 75% de los casos a los 10 años de seguimiento(54,100). Por este motivo, se considera a la presencia de reacción extracapilar como una variable de progresión y pérdida de la función renal a corto plazo. Es importante destacar que los pacientes con cursos rápidamente progresivos que presentaban reacción extracapilar no fueron incluidos en el estudio Oxford, por lo tanto, el estudio tenía poco poder para determinar el efecto de la presencia de semilunas sobre la supervivencia renal.

Como resultado de un grupo de trabajo formado en 2014, donde se evaluaban los resultados de cuatro estudios combinados, en una cohorte total de 3096 pacientes, y utilizando la cohorte original de Oxford, la cohorte del estudio VALIGA y dos grandes cohortes asiáticas, una de China y el otro de Japón(54). Las biopsias de 1118 (36%) de los pacientes contenían semilunas celular o fibrocelular; 440 (14%), 221 (7%) y 96 (3%) presentaban reacción extracapilar en >1/10, >1/6 y >1/4 de glomérulos, respectivamente. En general, la presencia de estos hallazgos fue un predictor significativo e independiente de la

probabilidad de desarrollar un evento combinado de ERCT o una reducción de >50% del TFGe. Otros predictores independientes del evento combinado fueron la TFGe al momento de la biopsia, la proteinuria, presión arterial media, y las puntuaciones de Oxford M1, S1 y T1/T2(101). El valor predictivo de todos los parámetros histológicos (incluidas las semilunas), excepto T1/T2, se perdió en pacientes que recibieron inmunosupresión. Sin embargo, la presencia de semilunas celulares o fibrocelulares en > 1/4 de glomérulos fue significativamente predictiva de la disfunción de la TFGe o de ERCT incluso en pacientes que reciben inmunosupresión.

Sobre la base de estos hallazgos, los autores propusieron agregar a la reacción extracapilar a la valoración rutinaria de la clasificación de Oxford (MEST) de la siguiente manera: C0: sin semilunas celulares o fibrocelulares; C1: semilunas celulares/fibrocelulares en el 25% de los glomérulos, que identifican a los pacientes con mayor riesgo de progresión (en comparación con C0) entre los que no reciben terapia inmunosupresora; y C2: crecientes en > 25% de glomérulos, identificando pacientes con mayor riesgo de progresión a pesar de recibir inmunosupresión(101).

Es importante resaltar que a pesar de que el análisis de las variables MEST no reemplaza la información detallada de un informe de anatomía patológica, se debe tener en cuenta para la valoración de progresión a pesar de que no incluya la mayoría de factores no medidos y atribuibles a la lesión renal (como los depósitos de factores del complemento) que pudieran orientar a una intervención terapéutica individualizada.

## **5.8. Nuevos biomarcadores:**

**5.8.1. Niveles de IgA1 degalactosilada:** Como se ha descrito previamente, la molécula de IgA1 aberrante, es capaz de estimular la producción de anticuerpos específicos contra los O-glicanos de la zona bisagra, pero no siendo específica de enfermedad. En pacientes con NlgA existe una elevación de los niveles séricos circulantes, por un lado por un aumento en su producción y por otro por una disminución en su degradación hepática(61). Recientemente se ha demostrado que niveles séricos elevados de IgA1 deficiente en galactosa están

asociados con mal pronóstico en pacientes con NlgA(102). A pesar de esto, son necesarios estudios de validación que confirmen estos datos.

**5.8.2. Inmunocomplejos circulantes:** No sólo la presencia de IgA1 aberrante es importante como factor pronóstico de la enfermedad renal por IgA, sino que también la formación de inmunocomplejos y su depósito a nivel mesangial juegan un papel crucial en la cascada de eventos que liderizan el daño renal. Ya hemos visto como los inmunocomplejos son reconocidos por las células mesangiales a través del receptor específico. La cantidad de IC encontrados en sangre periférica se relaciona con el pronóstico renal y pareciera ser tan importante como la IgA1 degalactosilada. En un reciente estudio de Rizk y col(103) demostraron la presencia de IgG específica unida a inmunocomplejos, a través de la utilización de anticuerpos monoclonales, en biopsias renales de pacientes con NlgA que habían sido reportadas como IgG negativas. Los depósitos mesangiales de IgG a través de esta determinación fueron mayores en el grupo con NlgA que sus grupos controles (nefropatía lúpica y nefropatía membranosa). Los niveles séricos de IC IgA1-dg-IgG específica y niveles de C3 están elevados en aproximadamente 1/3 de pacientes con NlgA, y su actividad parece aumentar durante los episodios de hematuria macroscópica. Sin embargo, no se conoce si este aumento en la actividad se debe a una mayor producción de IgA1-dg, a una mayor producción de anticuerpos anti-glicanos o a otros factores no definidos(41).

**5.8.3.  $\alpha$ -1-antitripsina:** La A1AT es un importante inhibidor de la serina proteinasa (serpina) encontrado en plasma humano. Es una glicoproteína con una amplia gama de actividades, incluida la regulación de neutrófilos elastasa durante los procesos inflamatorios(104). Kwak et al(105), han evaluado recientemente la expresión de la A1AT en biopsias renales de pacientes con NlgA. Nuestro grupo de investigación ha reportado previamente un aumento en la excreción urinaria de A1AT en pacientes con glomerulonefritis (GN) primaria, más específicamente de glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFyS), NlgA y síndrome nefrótico por cambios mínimos (SNCM)(106,107). Otros autores, han demostrado la expresión de A1AT citoplasma podocitario en glomérulos escleróticos. Este hallazgo pareciera relacionar la disfunción epitelial y

consecuente degradación de la matriz extracelular en la nefropatía IgA (108,109). En 2010, Good y col.(110) investigó el peptidoma urinario de 230 pacientes con enfermedad renal y los comparó con 379 controles sanos. Los autores detectaron 273 péptidos urinario significativamente diferente entre casos y controles. Esos potenciales biomarcadores se integraron en un solo perfil predictor llamado CKD 273, que permitía clasificar pacientes de forma diagnóstica, y servía de marcador pronóstico en la ERC. Para tres de los diferenciales detectados. Diversos fragmentos de la A1AT se encontraban en este perfil clasificador (todos ellos elevados en suero de pacientes con ERC). Por todo esto, la A1AT parece ser un buen marcador de progresión renal y es utilizado en varias enfermedades glomerulares, incluyendo la NlgA, como un marcador pronóstico.

#### **5.8.4. Complemento: C4d, MBL, FH**

**C4d:** La presencia de C4d en biopsias renales refleja la activación de la vía de las lectinas, y refleja una evolución más agresiva de la enfermedad renal en pacientes con NlgA. La tinción glomerular de C4d se ha asociado a mayor proteinuria, una menor TFGe, niveles más elevados de presión arterial y con una hiperplasia endocapilar y atrofia tubular más severa(111). Por otro lado, la proteína de unión a C4 se comporta como un puente entre el complemento y la coagulación, pudiendo desempeñar un papel en la formación de microangiopatía trombótica(69) como desarrollan algunos pacientes con NlgA. Por todo esto, el C4d se considera un factor de riesgo independiente de progresión de la enfermedad renal en la NlgA(68,69,112).

**MBL:** El MBL es una molécula de origen hepático, que activa el complemento a través de la vía de las lectinas(113). La influencia de las variantes genéticas y serológicas de MBL se investigó en una cohorte de China de 749 pacientes con NlgA y 489 controles(64). Los niveles circulantes de MBL están predominantemente influenciados por variantes en el exón 1, la región promotora y la región 5 del gen MBL2(113). El estudio encontró que los genotipos MBL2 LYPB/LYPB y LXPA/LYPB eran determinantes en los niveles deficientes de MBL(64). Sin embargo, quizás debido a la gran cantidad de haplotipos estudiados, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de

haplotipos entre NIgA y el grupo control. La deficiencia de MBL, definida como niveles plasmáticos inferiores a 100 ng/ml, se asoció con una peor evolución renal. Alrededor del 25% de pacientes con deficiencia de MBL y 12% de pacientes con niveles de MBL normales alcanzaron la ERCT o disminuyeron en más de 50% la TFGe en 4 años.

Las asociaciones entre la gravedad de NIgA y los niveles de circulantes de MBL parecen contradictorias, pero probablemente se explican por los múltiples mecanismos de la molécula en la patogénesis de la NIgA. Por ejemplo, niveles circulantes de MBL elevados pueden predisponer a la activación del complemento desencadenada por vía de las lectinas, por lo que se produciría más lesión renal e inflamación. Bajos niveles circulantes de MBL pueden predisponer a infecciones y exacerbaciones en la NIgA(60).

Estas asociaciones en cohortes chinas con NIgA. La secuenciación genética de MBL2 y FCN2, el gen que influye en la actividad funcional de L-ficolina, en 50 pacientes chinos con IgAN reveló siete variantes que se cree que influyen en la expresión de proteínas. El rs1800450, una variante de MBL2 se asoció a una peor evolución renal valorada por ERCT. El alelo rs1800450-A, está asociado con niveles reducidos de MBL; no presentan depósitos glomerulares pero sí daño renal tubulointerstitial más severo y mayor riesgo de ERCT(114). Por otro lado, el análisis de polimorfismo de MBL en otras regiones no asiáticas no reportan los mismo resultados que la población China. En un estudio italiano, 160 pacientes con NIgA y 74 controles demostraron diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas del MBL, sin asociaciones con el pronóstico renal(115). Aunque en cohortes pequeñas, los niveles circulantes de MBL no se asociaron con pacientes con NIgA en comparación con controles sanos, se ha demostrado que el MBL se excreta en grandes cantidades en orina de pacientes con NIgA(38). Las explicaciones para estas asociaciones inconsistentes de MBL podrían incluir diferencias en los tamaños de cohorte, etnias, efectos de la disminución de la TFGe en los niveles circulantes de MBL y las definiciones de progresión de enfermedad(60,87).

**Factor H:** El factor H, es un regulador del complemento que interfiere con la

actividad de la vía alternativa en la etapa C3b evitando la formación del complejo de ataque de membrana del complemento C5b-9 (MAC), por lo que funciona como un inhibidor de la vía(116).

Análisis recientes de los niveles circulantes de FH y FHR1 resaltan la importancia de la desregulación de la vía alternativa del complemento en la NIgA. Dos estudios mostraron que los niveles plasmáticos de FHR1 fueron significativamente más altos en pacientes con NIgA que en los controles sanos, independientemente de la expresión del gen CFHR3-R1(117,118), responsable de la formación de la molécula de FH y FHR1. También se observó una correlación negativa entre los niveles de FHR1 y la TFGe, asociándolo con la progresión de la enfermedad a ERCT. En este estudio, se identificaron cuatro variantes de FH que producían niveles bajos de la molécula en plasma(118). La relevancia de estas variantes se basa en la correlación directa descrita entre niveles de FHR1/FH y las características clínicas de enfermedad.

#### **5.8.5. CD89+, CD46, CD55**

**CD89+:** El CD89 es el principal receptor involucrado en las funciones de la IgA y como se ha mencionado previamente está expresado en células de linaje mieloide, principalmente en monocitos. La correlación de los inmunocomplejos formados por sCD89 y la Gd-IgA1, y el pronóstico de la patología es limitada pero se plantea la posibilidad de que el aumento de la expresión del CD89 en la membrana monocitaria pueda correlacionarse con la severidad de la enfermedad (Esteve y col, datos no publicados).

En un estudio reciente Jhee y col, en el que se estudiaron niveles circulantes de complejo CD89-IgA en pacientes con NIgA, no encontraron asociaciones entre niveles del complejo sCD89-IgA y la progresión de la enfermedad en esa población, por lo que no parece ser un buen predictor de evolución renal. A pesar de que la utilidad clínica parece limitada, son necesarios nuevos estudios de validación.

**CD46 y CD55:** Se conocen cuatro proteínas reguladoras unidas a la membrana. El receptor del complemento 1 (C1R o CD35), expresado principalmente en

eritrocitos y proteína cofactor de membrana (MCP; CD46) que está unida a la membrana a través de cofactores reguladores del complemento y que produce la inactivación de C3b y C4b. El decay-aceleration factor (DAF; CD55) que acelera la descomposición de las convertasas C3 y C5 ensambladas en la superficie celular y previene la formación de MAC en la bicapa lipídica(119).

La expresión génica de CD46 y CD55, dos moléculas clave en la regulación a nivel celular de la actividad convertasa C3 en las vías alternativa y lectina del complemento, transcritas en gran parte de casi todas células y tejidos de sangre periférica incluyendo células mesangiales.

Coppo y col(119), reportaron en un reciente estudio, en el que se estudiaba la expresión génica defectuosa de factores del complemento en pacientes con NIgA, que la expresión del gen CD46 no se correlacionó con la TFGe, sin embargo los pacientes presentaban una pérdida de función renal anual más rápida a lo largo del período de seguimiento. Bajos niveles de ARNm de CD46 se correlacionaron con una expresión génica baja de CD55. Estos hallazgos sugieren que los defectos de la activación del complemento en la NIgA pueden tener un origen en una baja expresión estas dos moléculas regulatorias.

CD46 es un regulador expresado en la superficie celular, que actúa como cofactor, para la molécula factor de proteasa I en suero, que escinde C3b a iC3b, evitando así irreversiblemente el reensamblaje de la actividad amplificadora de la vía alternativa. CD55 es también un factor regulador unido a membrana que acelera el clivaje de las convertasas C3 y C5 ensambladas en la superficie celular, favoreciendo la disociación de C3bBb y C2b y C4b e inhibiendo su reagrupación. Esto evita la formación del MAC final.

Ambos factores reguladores, cuya expresión se detectó en glóbulos blancos, monocitos y macrófagos infiltrantes y en células mesangiales (CD46), además de células endoteliales y podocitos (CD55) se encontraban disminuidos, correlacionándose con la pérdida progresiva de función renal. Estos resultados son presentados por primera vez por el grupo investigador, por lo requieren de confirmación.

## **5.8. Proteómica**

### **5.9.1. Conceptos generales**

En la actualidad, se han desarrollado una serie de disciplinas que tienen el sufijo “ómica”, como la genómica, la transcriptómica, la proteómica entre otras, que constituyen herramientas de ayuda al diagnóstico y seguimiento de las enfermedades renales.

La proteómica se define como la ciencia que estudia el proteoma, término introducido por primera vez por Wilkins en 1994 para referirse al conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma, en un momento determinado y bajo unas condiciones concretas de tiempo y ambiente(120). A diferencia del genoma, que es siempre el mismo en cada célula durante toda la vida, el proteoma es un elemento dinámico, que sufre variaciones dentro de un mismo organismo, tejido, célula o compartimiento celular, y en respuesta a factores ambientales y fisiológicos como la edad, situaciones de estrés, agentes tóxicos, fármacos u hormonas(121).

El estudio del proteoma es una labor dificultosa debido al elevado número de proteínas existentes. Dado que un sólo gen puede codificar múltiples proteínas, se estima que el proteoma tiene un orden de magnitud más complejo que el genoma.

Esta complejidad es debida principalmente al proceso de splicing o corte y empalme alternativo de los ARNm que codifican proteínas, que hace que de los 25.000 genes codificantes en un ser humano puedan generarse hasta un millón de proteínas distintas. Además, una vez sintetizadas, las proteínas pueden sufrir modificaciones en su estructura o en su secuencia básica por procesos proteolíticos, así como modificaciones post-traduccionales, las cuales sirven para modificar o modular la actividad, función o localización de una proteína en diferentes contextos fisiológicos o metabólicos. Se han documentado hasta 200 diferentes modificaciones post-traduccionales, que incluyen metilaciones, fosforilaciones y acetilaciones, lo cual explica la enorme complejidad del entorno proteico dentro de la célula(122,123)

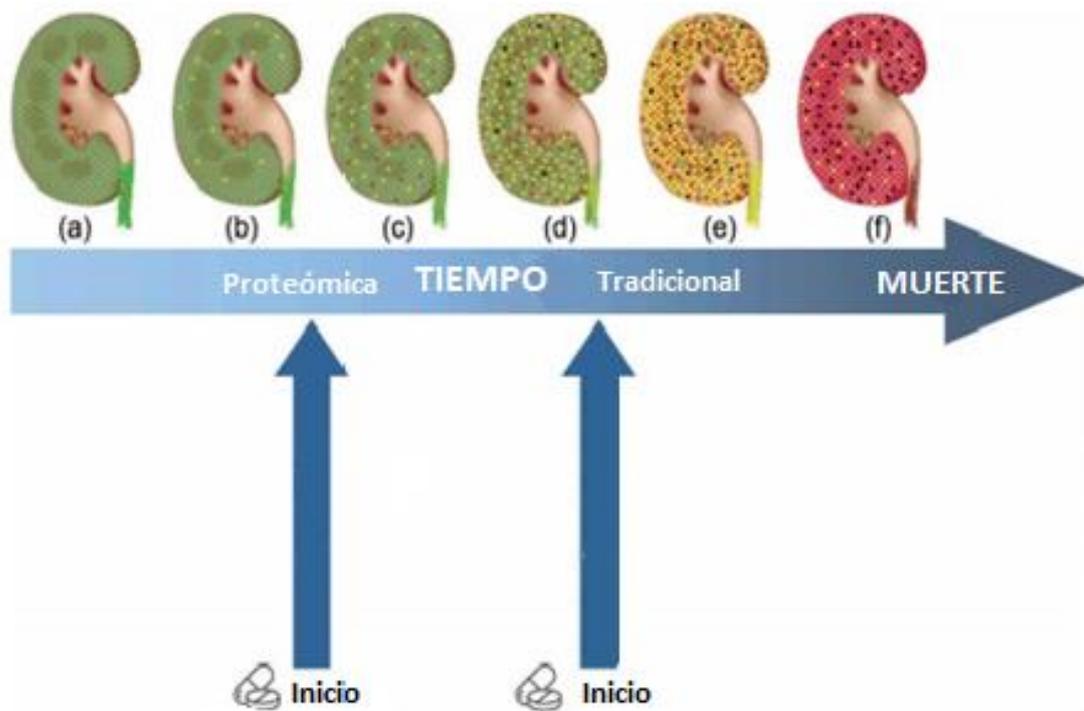
La aplicación de técnicas proteómicas en el área de la medicina se denomina proteómica clínica, y su principal objetivo es el descubrimiento de nuevos biomarcadores, es decir, moléculas que se miden y evalúan objetivamente como indicadores de procesos biológicos normales, procesos farmacológicos o generados secundariamente a una intervención terapéutica(123). Estos biomarcadores pueden servir para establecer el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades, en particular las renales, así como para determinar la eficacia de un tratamiento farmacológico; todo esto en etapas tempranas de la enfermedad renal (Figura 10).

Actualmente, las técnicas de electroforesis en gel y de ionización en espectrometría de masas incluyen el 2DE, LC-MS, CE-MS, MALDI-TOF MS, SELDI-TOF MS, ESI y protein-binding arrays (Navarro-Muñoz). A pesar de que la biopsia renal no puede ser sustituida como técnica diagnóstica y representa el “gold standar” en el diagnóstico en las enfermedades glomerulares, las técnicas proteómicas sirven de ayuda para definir biomarcadores diagnósticos y pronósticos, que complementen los hallazgos de la biopsia renal.

En dicho contexto, el análisis de fluidos biológicos, en especial de la orina, es fundamental para permitir cuantificar e identificar adecuadamente estos potenciales marcadores biológicos. Múltiples estudios han utilizado la proteómica en la búsqueda de marcadores urinarios para determinar biomarcadores en las enfermedades renales.

**Fig. 9.** *Representación esquemática de la progresión de la enfermedad renal crónica.* El riñon está compuesto por unidades de filtración (glomérulos). **(a)** un riñón sano al inicio (glomérulos en verde), **(b)** algunos glomérulos experimentan cambios patológicos moleculares, **(c)** el daño glomerular avanza (rojo), **(d)** los primeros glomérulos se pierden, **(e)** enfermedad renal crónica establecida, **(f)** La prevención de evolución a enfermedad renal crónica terminal (ERCT) hubiese sido posible con una intervención en el estadio **(b)** o **(c)**, donde los cambios moleculares pueden ser detectados por la proteómica, pero los parámetros de función no están afectados. Por el contrario, los parámetros de función renal

(filtrado glomerular), los cuales son precozmente detectables en **(d)** ya ha pasado el estadio en donde el tratamiento puede ser efectivo.



## 5.9.2. Aplicaciones

### 5.9.2.1. Enfermedades Renales

Estudios proteómicos urinarios han sido realizados en pacientes con ERC proponiéndose gran cantidad de péptidos como predictores de progresión renal. Sin embargo, la mayoría de ellos, están diseñados en cohortes pequeñas y con validaciones independientes.

Muchos de ellos, demostraron que la búsqueda y análisis de un panel de biomarcadores es más eficiente que un biomarcador único y que pueden complementar los parámetros utilizados actualmente en la clínica. Algunos de ellos, han mostrado una gran potencia diagnóstica al discernir entre pacientes con enfermedad renal crónica y sujetos sanos, como es el caso de la lipocaína asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), molécula urinaria de lesión renal (KIM-1), proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático (L-FABP), o factor de crecimiento  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ). Sin embargo, la mayoría de estos biomarcadores

ya son biomarcadores potenciales para fracaso renal agudo, por lo tanto, solo predicen la progresión de la ERC en etapas tardías de ERC(124).

Recientemente se ha descrito el panel de enfermedad renal crónica denominado CKD273. Este panel de biomarcadores es el mejor validado, es utilizado en múltiples ensayos, tiene el apoyo de la FDA y por lo tanto ya en la fase de implementación(125). Este panel fue el primero aplicado en enfermedad renal crónica por diabetes mellitus en pacientes con normoalbuminemia. Hasta la fecha, es el único panel validado predictor y de detección temprana de ERC.

#### **5.9.2.2. Proteómica y Nefropatía IgA**

Para el diagnóstico de diferentes enfermedades glomerulares, la proteómica ha aportado información de importancia para la determinación de marcadores de procesos biológicos. Estudios basados en técnicas proteómicas buscan la identificación de marcadores de procesos biológicos precoces, ya que se trata de enfermedades de las que depende el tratamiento precoz e individualizado, la evolución renal. En la Tabla 1, se enumeran los estudios relevantes que muestran los potenciales biomarcadores encontrados a través de estas técnicas.

En un primer estudio, el análisis del proteoma urinario se utilizó para diferenciar entre pacientes con NIgA y otros tipos de enfermedades renales(126). Fueron identificados 25 biomarcadores peptídicos urinarios característicos de NIgA, que se combinaron en un panel específico para IgA. Este panel pudo discriminar pacientes con NIgA o púrpura de Henöch-Schöenlein con nefritis (HSPN) de pacientes con glomerulonefritis asociada al VIH.

**TABLA 1.** Resumen de los estudios más importantes que investigan paneles con múltiples marcadores de proteómica.

	Estudio	Muestra	Etiología de la ERCT	Duración del seguimiento, años	Tratamiento (nombre del estudio)
<b>Progresión de la ERCT en estapas tempranas</b>	Zürbig et al. 2012	35	ND	9.1	-
	Roscioni et al. 2012	88	ND	3	(PREVEND)
	Argiles et al. 2013	53	ND, NAE, NTI, NM, otros	3.6	-
	Gu et al. 2014	797	ND, NAE, otros	4.8	(FLEMENGHO)
	Schanstra et al. 2015	522	ND, GN, VAS, LES, NI, otros	4.5	-
	Pontillo et al. 2016	2672	ND, NAE, NM, NlgA	3.3	-
	Lindhardt et al. 2016	737	ND	4.1	(DIRECT)
	Pontillo et al. 2017	2087	ND, NAE, otros	4.6	-
	Markiska et al. 2017	553	ND, NAE, otros	3	-
	Pejchinovski et al. 2017	221	PQAD	9.9	(CRISP)
<b>Diagnóstico diferencial</b>	Currie et al. 2018	155	ND	6.1	-
	Zürbig et al. 2018	1014	ND	6	-
	Julian et al. 2007	609	NlgA, PSH, GN-VHC	-	-
	Haubitz et al. 2009	77	VAS	-	-
<b>Respuesta tratamiento</b>	Siwy et al. 2017	1180	GEFyS, NlgA, SNCM, ND, LES, VAS	0.5	-
	Haubitz et al. 2009	10	VAS	0.5	PRED/CF
	Andersen et al. 2010	44	ND	2	IBER (IRMA2)
	Lindhardt et al. 2017	111	ND	16 semanas	ESP (SPIRIL)
	Cherney et al. 2017	40	ND	8 semanas	EMPA (ATIRMA)
	Wallbach et al. 2018	32	Hipertensión resistente	0.5	BAR
	Siwy et al. 2019	360	ND	24 semanas	LINA (MARLINA-T2D)

ial; PQAD=poliquistosis renal autosómica dominante; VAS=vasculitis asociada a anticuerpos; SNCM=síndrome nefrótico por cambios mínimos; NlgA=nefropatía IgA; PSH=Púrpura de Henoch-Schonlein; GN-VHC=glomerulonefritis asociada a virus de la hepatitis C; GEFyS=Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; NAE=nefroangioesclerosis; PRED=prednisona; CF=ciclofosfamida; IBER=irbesartan; ESP=espironolactona; EMPA=empaglifozina; BAR= terapia de activación con Barorrelejo; LINA=linagliptina

En una cohorte multicéntrica de un total de 1180 muestras, fueron definidos paneles específicos de biomarcadores para siete etiologías diferentes de ERC (GEFyS, NlgA, CM, NM, nefroangioesclerosis y nefritis lúpica)(125). Para los siete tipos diferentes de ERC, numerosos biomarcadores urinarios potenciales (que van desde 116 hasta 619 péptidos) fueron identificados y combinados en paneles específicos para cada tipo de ERC. Todos estos paneles fueron validados en una cohorte independiente y mostró precisiones buenas a

excelentes para la discriminación de una etiología específica de ERC.

En la nefropatía IgA se requieren perfiles de péptidos urinarios que permitan diferenciarla de otras enfermedades renales y sobre todo de otras glomerulonefritis. En la tabla 2, se resumen todos los biomarcadores encontrados y los principales estudios que se han diseñado para el estudio del peptidoma en NIgA(127).

**TABLA 2.** Perfil de péptidos urinarios identificados previamente en la NIgA a través de espectrometría de masa.

Validación independiente														
Autores	Perfíl	Utilidad clínica	Tamaño de la muestra de estudio			Tamaño de la muestra de validación			Capacidad discriminadora del biomarcador					
			NIgA	Sujetos sanos	Otras enfermedades como controles	NIgA	Sujetos sanos	Otras enfermedades como controles	Sensibilidad	Especificidad	AUC (IC 95%)	Primera vs. segunda orina de la mañana	Fracción urinaria	Técnica
<b>Haubitz et al.</b>	22P P	Dx/Prog	45	57	13 (MN)	-	-	-	NIgA vs. CS (100%) NIgA vs. COE (77%)	NIgA vs. CS (90%) NIgA vs. COE (100%)	-	Segunda	Orina total	CE-MS
<b>Julian et al.</b>	22P P	Dx	45	207	253 (GEFyS, ND, LES, VAS, NAEH, SNCM, GN)	10	12	22 (NMO-nNIgA, PSH), 5 PSH sin nefritis	-	NIgA vs. CS (82.3%) NIgA vs. COE (82.3%)	-	Segunda	Orina total	CE-MS
<b>Graterol et al.</b>	16P P 10P P	Dx/Corr	19	14	No	-	-	-	-	-	-	Primera	Sobrenadante	MALDI-TOF MS
<b>Wu et al.</b>	11P P	Dx	25	24	23 (GN,SNCM, LES)	7	6	13 (GN, SNCM, LES)	NIgA vs. CS (100%) NIgA vs. COE (85.7%)	NIgA vs. CS (100%) NIgA vs. COE (76.9%)	-	Primera	Sobrenadante	MALDI-TOF MS

ERCT=enfermedad renal crónica terminal; CS= controles snaos; COE= controles de otras enfermedades; PP=proteínas/péptidos; ND=nefropatía diabética; GN=gomerulonefritis; NTL= nefropatía túbulo-intersticial; PQAD=poliquistosis renal autosómica dominante; VAS=vasculitis asociada a anticuerpos; SNCM=síndrome nefrótico por cambios mínimos; NIgA=nefropatía IgA; PSH=Púrpura de Henoch-Schonlein; GN-VHC=glomerulonefritis asociada a virus de la hepatitis C; GEFyS=Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; NAE=nefroangioesclerosis; NAEH=nefroangioesclerosis hipertensiva; NMP-nNIgA=nefropatía mesangioproliferativa no relacionada con NIgA; NM=nefropatía membranosa. Dx=diagnóstica; Prog=Pronóstico; Corr=correlación con mal pronóstico renal; Dif=diagnóstico diferencia de NIgA con otras causas de ERCT.

**TABLA 2. Continuación (...)**

Autores	Perfil	Utilidad clínica	Validación independiente											
			Tamaño de la muestra de estudio			Tamaño de la muestra de validación			Capacidad discriminadora del biomarcador					
			NlgA	Sujetos sanos	Controles otras enfermedades	NlgA	Sujetos sanos	Controles otras enfermedades	Sensibilidad	Especificidad	AUC (IC 95%)	Primera vs. segunda orina de la mañana	Fracción urinaria	Técnica
<b>Kwak et al.</b>	A1AT (isoformas) Elevado vs. control	Dx	8	5	-	-	-	-	-	-	-	Primera	Sobrenadante	2DE MALDI-TOF MS
<b>Rocchetti et al.</b>	13PP (PL, GLP, CLκ)	Dx	49	40	42 (GN, ND)	14	-	14 (GN; ND, NM) y 10 (GNMP)	-	-	-	Primera	Sobrenadante	SELDI-TOF MS
<b>Siwy et al.</b>	116PP	Dif	179	No	1001 (GEFyS, SNCM, GM, NTI,LES)	57	-	417 (GEFyS, ND, GM, SNCM, NTI, VAS)	-	-	0.82 (0.76-0.87)	Segunda	Orina total	CE-MS

ERCT=enfermedad renal crónica terminal; CS= controles sanos; COE= controles de otras enfermedades; PP=proteínas/péptidos; ND=nefropatía diabética; GN=glomerulonefritis; NTI= nefropatía túbulo-intersticial; PQAD=poliquistosis renal autosómica dominante; VAS=vasculitis asociada a anticuerpos; SNCM=síndrome nefrótico por cambios mínimos; NlgA=nefropatía IgA; PSH=Púrpura de Henoch-Schonlein; GN-VHC=glomerulonefritis asociada a virus de la hepatitis C; GEFyS=Glomerulosclerosis focal y segmentaria; NAE=nefroangiosclerosis; NAEH=nefroangiosclerosis hipertensiva; NMP-nNlgA=nefropatía mesangioproliferativa no relacionada con NlgA; NM=nefropatía membranosa; GNMP=glomerulonefritis membrano-proliferativa; Dx=diagnóstica; Prog=Pronóstico; Corr=correlación con mal pronóstico renal; Dif=diagnóstico diferencia de NlgA con otras causas de ERCT; A1AT=alfa-1 anti-tripsina; PL=perlecan laminin; GLP=G-like 3 peptide; CLκ=cadenas ligeras κ.

# HIPÓTESIS DE TRABAJO

---

La nefropatía IgA es la glomerulonefritis más común en nuestro medio, caracterizada por una amplia variabilidad tanto en las manifestaciones clínicas como en la progresión a la insuficiencia renal crónica.

Se han descrito factores de mal pronóstico clínicos (hipertensión arterial y sexo masculino), bioquímicos (creatinina sérica y proteinuria) e histológicos (glomeruloesclerosis, afectación túbulo-intersticial y depósitos de C4d) que pueden ser utilizados en el momento del diagnóstico pero que son inespecíficos y que comparten con otras enfermedades renales.

Hasta el momento, el diagnóstico de la nefropatía IgA se realiza por biopsia renal, siendo un procedimiento invasivo y no exento de complicaciones. Son necesarias nuevas técnicas no invasivas que permitan un diagnóstico precoz e identificar perfiles de pacientes con peor pronóstico.

La proteómica, es una técnica no invasiva en la que se analizan péptidos y proteínas en fluidos biológicos (ej: sangre y orina) con el objetivo de identificar biomarcadores asociados a procesos biológicos. Además constituye una herramienta diagnóstica, aplicada en varios campos de la medicina incluida la nefrología, donde el análisis de péptidos en orina ha permitido diferenciar pacientes con enfermedades glomerulares de pacientes sanos.

La sangre y especialmente la orina, son fluidos obtenidos de forma no invasiva que contienen gran número de péptidos y proteínas que pueden ser potenciales biomarcadores de enfermedades renales.

La hipótesis planteada en este trabajo fue identificar un perfil de péptidos en sangre, plasma y orina, asociado a parámetros clínicos, bioquímicos e histológicos en una cohorte de pacientes con nefropatía IgA primaria, con la finalidad de identificar potenciales biomarcadores de mal pronóstico renal.

# OBJETIVOS

---

1. Objetivo principal:

- a. Identificar a través del análisis de espectrometría de masas, un perfil peptídico en sangre y orina que permita diferenciar los pacientes con nefropatía IgA primaria de sujetos sanos.

2. Objetivos secundarios:

- a. Identificar un perfil peptídico en sangre y orina asociado a las lesiones histológicas, variables bioquímicas y de evolución renal en pacientes con nefropatía IgA.
- b. Identificar un perfil peptídico en sangre y orina asociado a pacientes con nefropatía IgA primaria con depósitos de C4d.
- c. Identificar un perfil peptídico en sangre y orina asociado a las variables clínicas, bioquímicas, lesiones histológicas, y de evolución renal en pacientes con nefropatía IgA con depósitos de C4d.
- d. Establecer potenciales puntos de corte de los péptidos identificados para discriminar pacientes con nefropatía IgA con depósitos de C4d.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **Diseño**

Los trabajos que constituyen esta tesis doctoral tienen por objetivo el estudio de un perfil de péptidos asociados con la nefropatía IgA y a las variables clínicas, bioquímicas e histológicas. Para ello se han diseñado dos estudios prospectivos entre los años 2006-2009 y 2006-2016 de una población de pacientes con nefropatía IgA en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Barcelona). Todos los procedimientos fueron realizados según la declaración de Helsinki de 1971 y revisada en 2008. Los estudios fueron aprobados por el comité ético del Hospital Germans Trias i Pujol y todos los pacientes han firmado el consentimiento informado escrito para participar en cada uno de ellos. Los datos obtenidos fueron registrados apropiadamente manteniendo la confidencialidad durante todo el desarrollo del estudio.

### **Primer estudio: Asociación entre las lesiones histológicas de mal pronóstico y el perfil peptídico en sangre y orina de pacientes con Nefropatía IgA.**

#### **Población de estudio**

##### **Criterios de inclusión**

Para ser incluidos los pacientes debían cumplir las siguientes condiciones:

- Diagnóstico de nefropatía IgA primaria por biopsia renal
- Edad mayor a 18 años
- Signos clínicos de enfermedad renal como proteinuria y enfermedad renal crónica con función renal estable o diferentes grados de insuficiencia renal y hematuria, con indicación clínica de biopsia renal.
- Consentimiento informado

Los criterios de exclusión fueron: no cumplir con los criterios de inclusión, nefropatía IgA de causa secundaria.

Como **grupo control** se incluyen pacientes sanos, con función renal normal, sin proteinuria ni hematuria en el sedimento urinario y sin tratamiento farmacológico crónico, con la intención de establecer un perfil peptídico normal.

## **Variables del estudio**

Las variables clínicas fueron recogidas y analizadas al momento del diagnóstico y en el período de seguimiento. Para la realización del estudio se recogieron las siguientes variables:

**Clínicas:** Edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipemia.

**Bioquímicas:** Creatinina sérica, ácido úrico, albúmina, colesterol, proteína C reactiva (PCR), hematuria y proteinuria de 24 horas. La determinación de las variables bioquímicas fue realizada de la siguiente manera:

- a. La creatinina sérica fue determinada utilizando el analizador Cobas® 711 de Roche Diagnostics.
- b. La presencia de proteínas en orina de 24 horas se determinó utilizando un método espectrofotométrico con rojo de pirogalol (pyrogallol red). Se definió como proteinuria la presencia de más de 300 mg de proteínas en orina de 24h.

**Evolución renal:** Doble de la creatinina (definido como doble de la creatinina basal cuando el valor fuese superior al límite normal establecido por el laboratorio).

**Histológicas:** Proliferación mesangial (M), glomeruloesclerosis segmentaria (S), afectación túbulo-intersticial y fibrosis tubular (IFTA), proliferación endocapilar (E) según la clasificación de Oxford.

**Tratamiento:** estatinas, antihipertensivo con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y antagonistas del receptor de angiotensina II (ARAI).

**Análisis del perfil proteómico. Análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF. Enriquecimiento de péptidos.**

## **Obtención de muestras en plasma, suero y orina.**

El día de la biopsia renal se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes. Para extraer el suero y plasma-EDTA se centrifugaron las muestras a 2200 g durante 10 minutos, y se obtuvieron las alícuotas y se almacenaron a - 80 ° C hasta su uso.

En fresco, se recogieron muestras de orina de primera orina de la mañana, del día del biopsia renal. Se centrifugaron las muestras de orina a 2100 g durante 30 minutos a 4°C para eliminar las partículas y restos celulares. El sobrenadante fue ajustado a 6.5 pH con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1 M) para minimizar la precipitación durante el almacenamiento. Posteriormente se alicuotaron y se almacenaron a -80 ° C hasta su uso. No fueron añadidos inhibidores de proteasas.

Para el análisis del perfil peptídico no fué necesaria la normalización de las muestras por concentración de proteínas. Las muestras plasmáticas (80µL) fueron enriquecidas con resinas IMAC-Cu de esferas magnéticas (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Las muestras de orina (110 µL) fueron enriquecidas utilizando resinas C18 de fase inversa de esferas magnéticas. (Dynabeads®, Invitrogen, Países Bajos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.).

Estas microesferas están recubiertas por cadenas alifáticas de C18, mediante las cuales se crean interacciones hidrofóbicas y los polipéptidos quedan atrapados (capturados). El C18 es ampliamente utilizado para purificar y enriquecer la abundancia de péptidos en el rango de masas (1-10 kDa), que serán los rangos de *m/z* de adquisición de los espectros de MALDI-TOF MS que analizamos en nuestro estudio. Los detalles adicionales del enriquecimiento de péptidos se describen en estudios previos de nuestro grupo(106,107,128–130).

### **Análisis MALDI-TOF MS**

Para el análisis de MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) de espectrometría de masas (MS), como su nombre lo indica necesita una matriz, un soporte sólido en este caso en forma de cristal, que facilite la ionización del análisis presentado a la muestra.

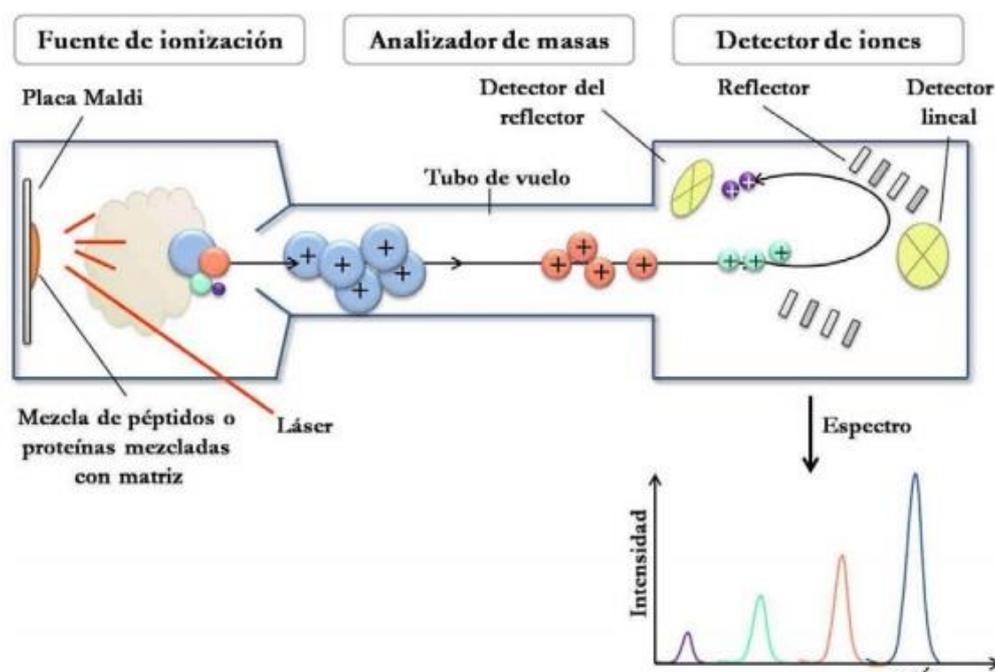
Entonces en un primer procesamiento, las muestras enriquecidas fueron diluidas primero en una dilución 1:5 con agua de grado LC (Lab-Scan, Gliwicz, Poland) y luego mezcladas 1:2 con solución de matriz (1.84 mg/ml de 2,6-dihidroxiacetofenona, 20% de acetonitrilo, 40 mmol/L de amonio citrato dibásico). De la mezcla resultante (eluido/matriz), se recoge 1 µL que es colocado en spots

por duplicado en una placa de AnchorChip 600/384 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y dejadas a secar al aire a temperatura ambiente para permitir que la matriz cristalizara. Cuatro spots de cada muestra fueron analizados por MALDI-TOF MS. Para la calibración externa fué utilizado ClinProt Peptide Calibration Standard I (Bruker Daltonics), una mezcla de calibradores de proteínas/peptidos disponible comercialmente. El calibrador se mezcló 1:1 con la solución de matriz y 0.4  $\mu$ L fueron depositados en los lugares de la placa AnchorChip para la calibración.

Una vez se encuentran las muestras en la placa MALDI, ésta se introduce en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics), el cual dispone de una bomba de vacío para poder extraer el aire de la cámara. Las muestras son irradiadas dentro de la cámara con un haz de luz láser, con pulsaciones de nanosegundos (Figura 10). La ionización fue conseguida manualmente con 300 pulsaciones de láser liberada sobre la superficie de los spots a un poder fijo de láser de 70%. Las condiciones operacionales fueron las siguientes: voltajes de la fuente de iones: 25 y 22,40 kV, reflector 1: 26.45 kV; reflector 2: 13.40kV, tiempo de extracción de los pulsos de iones: 300 ns. Los espectros fueron calibrados externamente obteniendo una precisión de masa menor a 10 ppm. Los picos con una señal-ruido  $>3$  en un rango  $m/z$  de 1 a 10 kDa fueron grabados con el FlexControl software v3.4 (Bruker Daktonics).

**Fig. 10.** *Principales componentes de un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF.* Un haz de láser irradia la muestra mezclada con matriz sobre la placa de MALDI, ionizado y vaporizando los péptidos. Éstos son acelerados por un campo eléctrico que los dirige al analizador de masas a través de un tubo de vuelo. Las

diferencias iniciales de energía son corregidas mediante el reflector y los iones llegan finalmente al detector.



### Análisis bioinformático

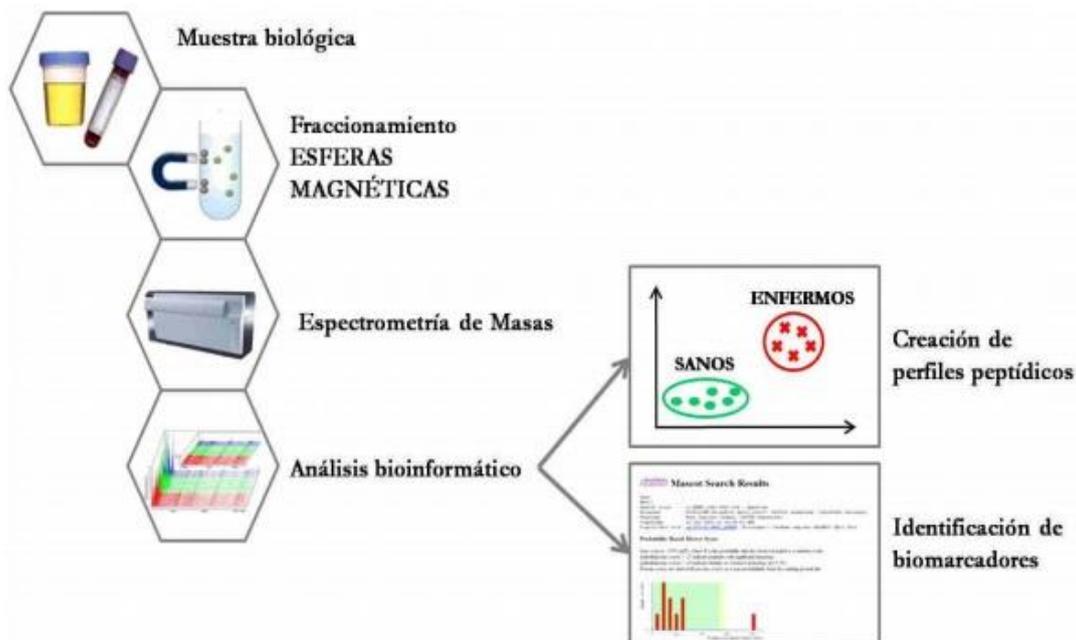
Se realizó un análisis detallado con el software DataAnalysis v3.4 (Bruker Daltonics) y se seleccionó 1 espectro de 4 para cada muestra con el mayor número de picos y la mayor intensidad. Se utilizó el software ClinProTools (v2,2; Bruker Daltonics) para procesar los espectros obtenidos por MALDI-TOF MS, obtener los valores de referencia y normalización de los espectros así como para generar un modelo de predicción de clase capaz de diferenciar entre pacientes con nefropatía IgA y controles sanos. Todos los espectros se normalizaron a sus propios recuentos de iones totales. La relación señal/ruido fue  $\geq 5$ .

El programa analiza los espectros obtenidos del grupo de entrenamiento mediante un algoritmo Support Vector Machine. Este algoritmo selecciona una combinación de picos que permite separar grupos de espectros a través del uso de un vector. Se basa en el principio de "minimización del

riesgo estructural”, que tiene como finalidad identificar la mejor combinación de picos con el menor riesgo de fracaso. Este algoritmo también selecciona el número máximo de picos utilizados para la generación del modelo. El programa ofrece unos valores de validación cruzada y de capacidad de reconocimiento. La validación cruzada mide la exactitud del modelo y puede utilizarse para predecir cómo se comportará en el futuro. La capacidad de reconocimiento describe el rendimiento de un algoritmo, es decir, la correcta clasificación de un determinado grupo de datos. Una vez generado el modelo de predicción de clase, éste fue validado con los espectros del grupo.

Además, se utilizaron los perfiles peptídicos de todos los pacientes, sin ser divididos en grupos de entrenamiento o validación, con el fin de identificar qué señales  $m/z$  mostraban diferencias significativas al comparar entre NIgA y controles sanos. Para realizar esta comparación, los datos de área del pico obtenidos por el programa ClinProTools, fueron convertidos en ficheros ASCII y exportados a hojas de cálculo EXCEL, para poder finalmente trabajar con el programa estadístico SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., EE.UU.). Una representación gráfica de todo el proceso se muestra en la figura 11.

**Fig. 11.** *Proceso para llevar a cabo estudio de perfiles peptídicos.* Se utilizan las esferas magnéticas para el fraccionamiento de las muestras previo al análisis por espectrometría de masas. El análisis bioinformático permite la creación de los modelos de clasificación, así como a la identificación de posibles biomarcadores.



### Identificación de péptidos

La identificación de los péptidos de interés se llevó a cabo mediante HPLC-MS/MS, en un instrumento Agilent 1200, funcionando a 300 nl/min, combinado con un espectrómetro de masas. Los péptidos eluidos de la columna cromatográfica fueron escaneados y fragmentados con un espectrómetro LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). Los iones precursores, en el rango de 400 a 2000  $m/z$ , se detectaron en un analizador Orbitrap a alta resolución. Las secuencias de los péptidos se identificaron mediante búsquedas en bases de datos en el International Protein Index v3.87, restringidas a Homo sapiens y usando Sequest integrado en Proteome Discoverer v1.3.

El criterio para dar como positiva una identificación fue que el ratio de falsos positivos fuera  $\leq 5\%$  y  $Xcorr \geq 1,5, 2,0, 2,25, \text{ y } 3,0$ , correspondientes a las cargas +1, +2, +3, y +4, respectivamente. El análisis de los péptidos proteotípicos se basó en la base de datos Global Proteome Machine.

### **Análisis de la biopsia renal**

Las muestras de biopsias renales fueron obtenidas de forma percutánea y analizadas por el servicio de anatomía patológica del Hospital Germans Trias i Pujol. Las muestras fueron procesadas de forma rutinaria a través de microscopía óptica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Los cortes para el análisis de microscopía óptica fueron teñidos con hematoxilina/eosina, ácido periódico de Schiff, metenamina de plata, tricrómico de Masson y rojo congo. Todas las biopsias fueron analizadas por un único patólogo, y fueron clasificadas en un primer momento según la clasificación de Oxford: Afectación túbulo intersticial (IFTA) <25% (T0), 26-50% (T1) ó >50% (T2); Glomeruloesclerosis (S) ausencia (S0) o presencia (S1); Hiper celularidad endocapilar (E) ausencia (E0) y presencia (E1); Hiper celularidad mensangial  $\leq 0.5$  (M0) ó  $\geq 0.5$  (M1). Todas las biopsias con presencia de reacción extracapilar fueron excluidas.

### **Análisis estadístico**

La normalidad de las variables se evaluó mediante el test de normalidad de Shapiro Wilk. Las variables normales fueron expresadas como mediana  $\pm$  desviación estándar (DE), y comparadas utilizando t test. Las variables no normales fueron expresadas como medias y rangos y fueron comparadas usando el test U de Mann-Whitney o el test Kruskal-Wallis, según el caso. Las variables categóricas fueron analizadas utilizando la prueba de chi-cuadrado o test de probabilidad exacto de Fisher. Para las variables estadísticamente significativas se utilizó un test apareado de comparación múltiple Tukey. El análisis estadístico fue realizado utilizando SAS v9.4, SAS institute Inc, Cary, NC, USA. Un p valor <0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

## **Segundo estudio: Análisis de péptidos asociados a la Nefropatía IgA con depósitos de C4d.**

### **Población de estudio**

#### **Criterios de inclusión**

Para ser incluidos los pacientes debían cumplir las siguientes condiciones:

- Diagnóstico de nefropatía IgA primaria por biopsia renal
- Edad mayor a 18 años
- Signos clínicos de enfermedad renal como proteinuria y enfermedad renal crónica con función renal estable o diferentes grados de insuficiencia renal y hematuria, con indicación clínica de biopsia renal.
- Consentimiento informado

Los criterios de exclusión fueron: no cumplir con los criterios de inclusión, nefropatía IgA de causa secundaria.

Como **grupo control** se incluyen pacientes sanos, con función renal normal, sin proteinuria ni hematuria en el sedimento urinario y sin tratamiento farmacológico crónico, con la intención de establecer un perfil peptídico normal.

#### **VARIABLES DEL ESTUDIO**

Las variables clínicas fueron recogidas y analizadas al momento del diagnóstico. Fue considerado un seguimiento global de 6 años para estimar la evolución renal. Para la realización del estudio se recogieron las siguientes variables:

**Clínicas:** Edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipemia.

**Bioquímicas:** Creatinina sérica, ácido úrico, albúmina, colesterol, proteína C reactiva (PCR), hematuria y proteinuria de 24 horas. Las determinaciones de las variables bioquímicas fueron realizadas bajo el mismo procedimiento que el primer estudio.

**Evolución renal:** Doble de la creatinina (definido como doble de la creatinina basal cuando el valor fuese superior al límite normal establecido por el laboratorio), análisis descriptivo de la creatinina (lineal mixed model), supervivencia renal (definido como enfermedad renal crónica terminal que requiere inicio de tratamiento renal sustitutivo - diálisis o trasplante renal).

**Histológicas:** Proliferación mesangial (M), glomeruloesclerosis segmentaria (S), afectación túbulointersticial (IFTA), proliferación endocapilar (E), depósitos de C4d y proliferación extracapilar.

**Tratamiento:** estatinas, tratamiento antihipertensivo con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y antagonistas del receptor de angiotensina II (ARAI).

### **Análisis del perfil proteómico. Análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF. Enriquecimiento de péptidos.**

Todos los procedimientos correspondientes a la obtención de muestras, el enriquecimiento y purificación de péptidos, el análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF, el análisis bioinformático y la identificación de péptidos, fueron realizados según el mismo procedimiento descrito en el primer estudio (apartado análisis del perfil proteómico, análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF, enriquecimiento de péptidos)

### **Análisis de la biopsia renal**

Las muestras de biopsias renales fueron obtenidas de forma percutánea y analizadas por el servicio de anatomía patológica del Hospital Germans Trias i Pujol. Las muestras fueron procesadas de forma rutinaria a través de microscopía óptica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Los cortes para el análisis de microscopía óptica fueron teñidos con hematoxilina/eosina, ácido periódico de Schiff, metenamina de plata, tricómico de Masson y rojo congo. Todas las biopsias fueron analizadas por un único patólogo, y fueron clasificadas en un primer momento según la clasificación de Oxford: Afectación túbulo intersticial (IFTA) <25% (T0), 26-50% (T1) ó >50% (T2); Glomeruloesclerosis (S) ausencia (S0) o presencia (S1); Hiper celularidad endocapilar (E) ausencia (E0) y presencia (E1); Hiper celularidad mensangial  $\leq 0.5$  (M0) ó  $\geq 0.5$  (M1).

En una segunda fase, las muestras fueron analizadas para la tinción C4d, a través de tinción de inmunohistoquímica, cortes de material renal fijado en formaldehído, de 3-micrómetros de diámetro, desparafinados y rehidratados. Para el análisis inmunohistoquímico se utilizó un anticuerpo de conejo policlonal

anti C4d, Cell Marque 404A-18/CMC40411021. Posteriormente se somete la muestra a un tratamiento por cocción a presión (5 minutos a + 125C en Tris / EDTA buffer, pH 8.5) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Como controles positivos, se utilizaron muestras de biopsias de trasplantes renales con diagnóstico de rechazo humoral que tenían un resultado C4d positivo (todas las muestras tuvieron un control positivo). La tinción inmunohistoquímica C4d se calificó como negativa o positiva, con puntajes de 0 ó 1, respectivamente. Los pacientes fueron clasificados como positivos cuando presentaban positividad global en al menos un glomérulo. La tinción glomerular positiva era predominantemente mesangial.

### **Análisis estadístico**

La normalidad de las variables se evaluó mediante el test de normalidad de Shapiro Wilk. Las variables normales fueron expresadas como mediana  $\pm$  desviación estándar (DE), y comparadas utilizando t test. Las variables no normales fueron expresadas como medias y rangos y fueron comparadas usando el test U de Mann-Whitney o el test Kruskal-Wallis, según el caso. Las variables categóricas fueron analizadas utilizando la prueba de chi-cuadrado o test de probabilidad exacto de Fisher. Para evaluar la progresión renal se analizó el delta de la creatinina y la modelización de la creatinina y para evaluar la supervivencia renal fueron utilizadas las curvas de Kaplan-Meier. Para las variables estadísticamente significativas se utilizó un test apareado de comparación múltiple Tukey. Para analizar la capacidad discriminatoria de los péptidos para clasificar grupos, fueron utilizadas las curvas ROC, identificando el cutt-of que maximizara la sensibilidad y especificidad. Los resultados son mostrados como un área bajo la curva (AUC) y sus correspondientes intervalos de confianza. El análisis estadístico fue realizado utilizando SAS v9.4, SAS institute Inc, Cary, NC, USA. Un p valor  $<0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo. En el análisis peptídico, un resultado fue expresado con un nivel de significación del 10%.

# RESULTADOS

---

El estudio está planteado en dos fases. Una primera fase en la que se describe el perfil peptídico en sangre y orina en una cohorte de pacientes con nefropatía IgA y una segunda fase, en la que se analiza el perfil peptídico en una cohorte de pacientes con nefropatía IgA y depósitos de C4d, considerada como de mal pronóstico renal.

**Primer estudio: Asociación entre las lesiones histológicas de mal pronóstico y el perfil peptídico en sangre y orina de pacientes con Nefropatía IgA.**

Para el estudio del perfil peptídico se analizaron muestras urinarias, séricas y plasmáticas de pacientes con nefropatía IgA (n=19) y controles sanos y se analizaron a través del software ClinProTools (v2,2; Bruker Daltonics) los espectros obtenidos por MALDI-TOF MS.

**Pacientes**

Se incluyeron 19 pacientes que cumplían criterios de inclusión, y que fueron comparados con 14 sujetos sanos incluidos como controles. Las características clínicas y bioquímicas de los pacientes incluidos se muestran en la tabla 3.

**TABLA 3.** Características demográficas, clínica y bioquímicas de pacientes con Nefropatía IgA.

	Pacientes con NIgA	
	Al momento de la biopsia renal	En el seguimiento (2 años)
Número de pacientes	19	
Edad, años	42 (33–52)	44 (35–54)
Sexo (Hombres), n (%)	15 (79)	
Hipertensión (Si), n (%)	12 (63)	
Diabetes mellitus (Si), n (%)	1 (5)	
Dislipemia (Si), n (%)	9 (47)	
Creatinina sérica, mg/dL	2.00 (1.40-2.57)	3.16 <sup>a</sup> (1.26-6.18)
Ácido úrico, mg/dL	7.40 (5.45-8.30)	7.40 (6.55-9.20)
Albúmina sérica, g/L	34.00 (31.00–39.00)	40.00 <sup>a</sup> (36.75–42.40)
Colesterol, mg/dL	194.00 (157.00–221.75)	147.00 <sup>a</sup> (131.50-213.00)
Proteinuria, g/24 horas	2.28 (1.20-4.26)	1.30 (0.52-3.27)
ISRAA (Si), n (%)	7 (37)	17 (89)
IECA	5 (26)	11(58)
ARA II	1 (5)	3(16)
IECA+ARAI	1 (5)	3(16)
Estatinas (Si), n (%)	4 (21)	9 (47)

Los resultados están expresados en mediana y rangos intercuartílicos; n= número; %=porcentaje; mg/dl=milígramo por decilitro; g=gramo; ISRAA= inhibidores del sistema angiotensina-aldosterona; IECA=inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII=antagonista del receptor II de la angiotensina; <sup>a</sup> Diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Kruskal–Wallis ( $P < 0.05$ ) en los pacientes con NIgA desde la realización de la biopsia renal hasta el fin del seguimiento.

### **Identificación de péptidos en sangre y orina relacionados a nefropatía IgA.**

A través del software Clinprotools, hemos identificado un perfil de péptidos en sangre y orina que difiere de forma significativa en pacientes con nefropatía IgA de los controles sanos. En total se han encontrado 13 picos séricos, 26 picos plasmáticos y 16 picos urinarios. Los péptidos encontrados en esta fase se muestran en la tabla 4. Dos picos urinarios y seis picos plasmáticos fueron identificados en estudios previos de nuestro grupo de investigación(107,129)

**TABLA 4.** Diferencias en la expresión de péptidos entre NlgA y sujetos sanos.

Biofluido	Peptido MH+ (MALDI-TOF)	Swiss-Prot accession	Abreviación de la proteína	Fold-change*	p valor**	
Suero	1063	n.a.	n.a.	+3.23	0.008	
	1079	n.a.	n.a.	+2.77	0.046	
	1532	n.a.	n.a.	-0.63	0.040	
	1618	n.a.	n.a.	-0.53	0.052	
	1898	n.a.	n.a.	-0.62	0.002	
	2023	n.a.	n.a.	+2.03	0.010	
	2864	n.a.	n.a.	-0.45	0.014	
	2934	n.a.	n.a.	-0.57	0.003	
	3159	n.a.	n.a.	-0.50	0.003	
	3193	n.a.	n.a.	-0.54	0.007	
	4283	n.a.	n.a.	-0.60	0.026	
	5337	n.a.	n.a.	-0.80	0.010	
	5967	n.a.	n.a.	-0.51	0.008	
	Plasma	1049	n.a.	n.a.	-0.24	0.001
		1063a	P01042	KNG1	-0.25	0.003
1079		n.a.	n.a.	-0.16	0.010	
1084		n.a.	n.a.	-0.08	<0.001	
1100		n.a.	n.a.	-0.15	0.001	
1360		n.a.	n.a.	-0.35	0.002	
1532		n.a.	n.a.	-0.33	0.001	
1607		n.a.	n.a.	+4.62	0.001	
1779		n.a.	n.a.	+2.48	<0.001	
1848		n.a.	n.a.	+1.55	0.003	
1866		n.a.	n.a.	+4.05	0.001	
1883		n.a.	n.a.	+3.03	0.001	
1898a		P0COL4	C4A	+2.52	0.001	
1936		n.a.	n.a.	+6.71	<0.001	
1960		n.a.	n.a.	+1.75	0.014	
2008		n.a.	n.a.	+6.38	<0.001	
2023		n.a.	n.a.	+8.22	<0.001	
2312		n.a.	n.a.	-0.11	0.001	
2358		n.a.	n.a.	-0.20	0.001	
2375		n.a.	n.a.	-0.31	0.001	
2486		n.a.	n.a.	-0.24	0.007	
2863		n.a.	n.a.	-0.14	<0.001	
3242		n.a.	n.a.	-0.39	0.033	
4576		n.a.	n.a.	-0.21	0.009	
4965		n.a.	n.a.	+20.34	0.002	
4981		n.a.	n.a.	+22.73	0.002	
4294		n.a.	n.a.	-0.59	0.049	
4658		n.a.	n.a.	-0.43	<0.001	
4752	n.a.	n.a.	-0.30	<0.001		

Péptidos correspondientes a <sup>a</sup>Bradicinina (KNG1) y factor del complemento C4a (C4A) identificados por análisis de MALDI-TOF/TOF MS, en orden ascendente por peso MH+ (Dalton), como ha sido reportado en estudios previos (Navarro-Muñoz). Péptidos correspondientes a <sup>b</sup>Uromodulina (UMOD),  $\alpha$ -1-antitripsina (A1AT), y  $\beta$ -2-microglobulina (B2M) identificados por análisis de HPLC-MS/MS, en orden ascendente por peso MH+ (Dalton), como ha sido reportado en estudios previos (Pérez). \*Ratio entre el área pico de pacientes con NlgA comparado con sujetos sanos. Los valores (+) y (-) están incrementados o disminuidos en sus valores de área pico, respectivamente. \*\* U-test Mann-Whitney significativo (P<0.05). UMOD: uromodulina; A1AT:  $\alpha$ -1-antitripsina; B2M:  $\beta$ -2-microglobulina; KNG1: bradicinina; C4A: factor del complemento C4a; n.a.: no aplicable.

**TABLA 4. Continuación (...)**

Biofluido	Peptido MH+ (MALDI-TOF)	Swiss-Prot accession	Abreviación de la proteína	Fold-change*	P valor**
Orina	1898b	P07911	UMOD	-0.21	<0.001
	1913b	P07911	UMOD	-0.09	<0.001
	1945b	P01009	A1AT	+9.66	<0.001
	2378	n.a.	n.a.	+2.14	0.006
	2392b	P01009	A1AT	+3.62	0.001
	2491	n.a.	n.a.	+3.10	<0.001
	2505b	P01009	A1AT	+10.57	<0.001
	2714b	P61769	B2M	-0.28	0.001
	2977	n.a.	n.a.	-0.36	<0.001
	3004	n.a.	n.a.	-0.31	0.001
	3389	n.a.	n.a.	-0.31	<0.001
	3406	n.a.	n.a.	-0.27	<0.001
	4013	n.a.	n.a.	+1.26	0.049
	4294	n.a.	n.a.	-0.59	0.049
	4658	n.a.	n.a.	-0.43	<0.001
	4752	n.a.	n.a.	-0.30	<0.001

Péptidos correspondientes a <sup>a</sup>Bradicinina (KNG1) y factor del complemento C4a (C4A) identificados por análisis de MALDI-TOF/TOF MS, en orden ascendente por peso MH+ (Dalton), como ha sido reportado en estudios previos (Navarro-Muñoz). Péptidos correspondientes a <sup>b</sup>Uromodulina (UMOD),  $\alpha$ -1-antitripsina (A1AT), y  $\beta$ -2-microglobulina (B2M) identificados por análisis de HPLC-MS/MS, en orden ascendente por peso MH+ (Dalton), como ha sido reportado en estudios previos (Pérez). \*Ratio entre el área pico de pacientes con NlgA comparado con sujetos sanos. Los valores (+) y (-) están incrementados o disminuidos en sus valores de área pico, respectivamente. \*\* U-test Mann-Whitney significativo (P<0.05). UMOD: uromodulina; A1AT:  $\alpha$ -1-antitripsina; B2M:  $\beta$ -2-microglobulina; KNG1: bradicinina; C4A: factor del complemento C4a; n.a.: no aplicable.

De los péptidos detectados en plasma por MALDI-TOF, el de  $m/z= 1063$  y  $m/z= 1898$  correspondían a bradicinina (KNG1) y factor del complemento C4a (C4A), respectivamente(129). De igual forma, los péptidos urinarios identificados por MALDI-TOF con masas  $m/z= 1898$  y  $1913$  correspondían a péptidos derivados de la uromodulina (UMOD), los péptidos con  $m/z 1945, 2392$  y  $2505$  correspondían a  $\alpha$ -1-antitripsina (A1AT) y por último, los péptidos con masa  $m/z= 2714$  correspondían a  $\beta$ -2-microglobulina (B2M)(107)

#### **Asociación entre los péptidos relacionados a la nefropatía IgA y las lesiones histológicas según la clasificación de Oxford.**

Como se ha descrito previamente, todas las biopsias renales fueron valoradas según la clasificación de Oxford. En la tabla 5, se muestran las lesiones histológicas que presentaban los pacientes con nefropatía IgA al momento de la valoración.

**TABLA 5.** Lesiones histológicas según la clasificación de Oxford en pacientes con nefropatía IgA.

Lesiones histológicas	IgA pacientes
<b>IFTA, n (%)</b>	
<b>T0</b>	6 (32)
<b>T1</b>	8 (42)
<b>T2</b>	5 (26)
<b>Glomeruloesclerosis, n (%)</b>	
<b>S0</b>	3 (16)
<b>S1</b>	16 (84)
<b>Hiper celularidad Endocapilar, n (%)</b>	
<b>E0</b>	12 (63)
<b>E1</b>	7 (37)
<b>Hiper celularidad Mesangial, n (%)</b>	
<b>M0</b>	0 (0)
<b>M1</b>	19 (100)

n= número; %=porcentaje; Afectación túbulo intestinal/Fibrosis tubular (IFTA) <25% (T0), 26-50% (T1) ó >50% (T2); Glomeruloesclerosis (S) ausencia (S0) o presencia (S1); Hiper celularidad endocapilar (E) ausencia (E0) y presencia (E1); Hiper celularidad mesangial  $\leq 0.5$  (M0) ó  $\geq 0.5$  (M1).

Al analizar las muestras, encontramos péptidos en sangre y orina que se asociaban de forma estadísticamente significativa a diferentes lesiones histológicas presentadas en las biopsias renales. Se han encontrado péptidos urinarios, séricos y plasmáticos que se asocian de forma estadísticamente significativa con la lesión histológica IFTA (Tabla 6)

**TABLA 6.** Diferencias en la expresión de picos peptídicos entre los grupos T0, T1 y T2 de la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular (IFTA).

Biofluido	Péptidos (m/z, AU)	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

\*Diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Kruskal–Wallis ( $p < 0.05$ ): afectación túbulo intersticial/Fibrosis tubular (IFTA) <25% (T0), 26-50% (T1) ó >50% (T2); Glomeruloesclerosis (S) ausencia (S0) o presencia (S1); Hiper celularidad endocapilar (E) ausencia (E0) y presencia (E1); Hiper celularidad mensangial  $\leq 0.5$  (M0) ó  $\geq 0.5$  (M1); m/z= masa. Los valores de área pico de los diferentes péptidos se presentan en unidades arbitrarias (AU).

**TABLA 6. Continuación (...)**

Biofluido	Péptidos ( <i>m/z</i> , AU)	T0	T1	T2	<i>p</i> *
Plasma	1063	257.50 (106.62-973.82)	273.48 (124.69-630.09)	20.02 (12.91-28.53)	0.049
	1078	135.27 (20.43-537.92)	142.85 (62.26-283.79)	8.96 (7.28-12.96)	0.049
	2661	25.25 (14.13-37.51)	17.48 (6.85-25.13)	60.39 (58.48-63.10)	0.041
	2790	22.05 (8.20-50.53)	23.32 (4.29-66.61)	119.78 (88.07-243.65)	0.049
Orina	1769	101.49 (34.53-135.78)	21.67 (7.15-66.39)	7.79 (2.09-11.12)	0.009
	1898	45.84 (21.98-54.32)	17.58 (12.82-24.01)	5.48 (2.52-11.94)	0.010
	1945	33.04 (8.93-49.00)	101.14 (50.88-263.48)	453.78 (198.45-948.64)	0.004
	2491	24.68 (10.31-38.16)	41.36 (22.17-92.58)	172.68 (75.44-247.01)	0.041
	2977	50.50 (31.17-70.23)	20.98 (13.71-36.43)	6.31 (2.89-20.34)	0.007

\*Diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Kruskal–Wallis ( $p < 0.05$ ): afectación túbulo intersticial/Fibrosis tubular (IFTA) <25% (T0), 26-50% (T1) ó >50% (T2); Glomerulosclerosis (S) ausencia (S0) o presencia (S1); Hiper celularidad endocapilar (E) ausencia (E0) y presencia (E1); Hiper celularidad mensangial  $\leq 0.5$  (M0) ó  $\geq 0.5$  (M1); *m/z*= masa. Los valores de área pico de los diferentes péptidos se presentan en unidades arbitrarias (AU).

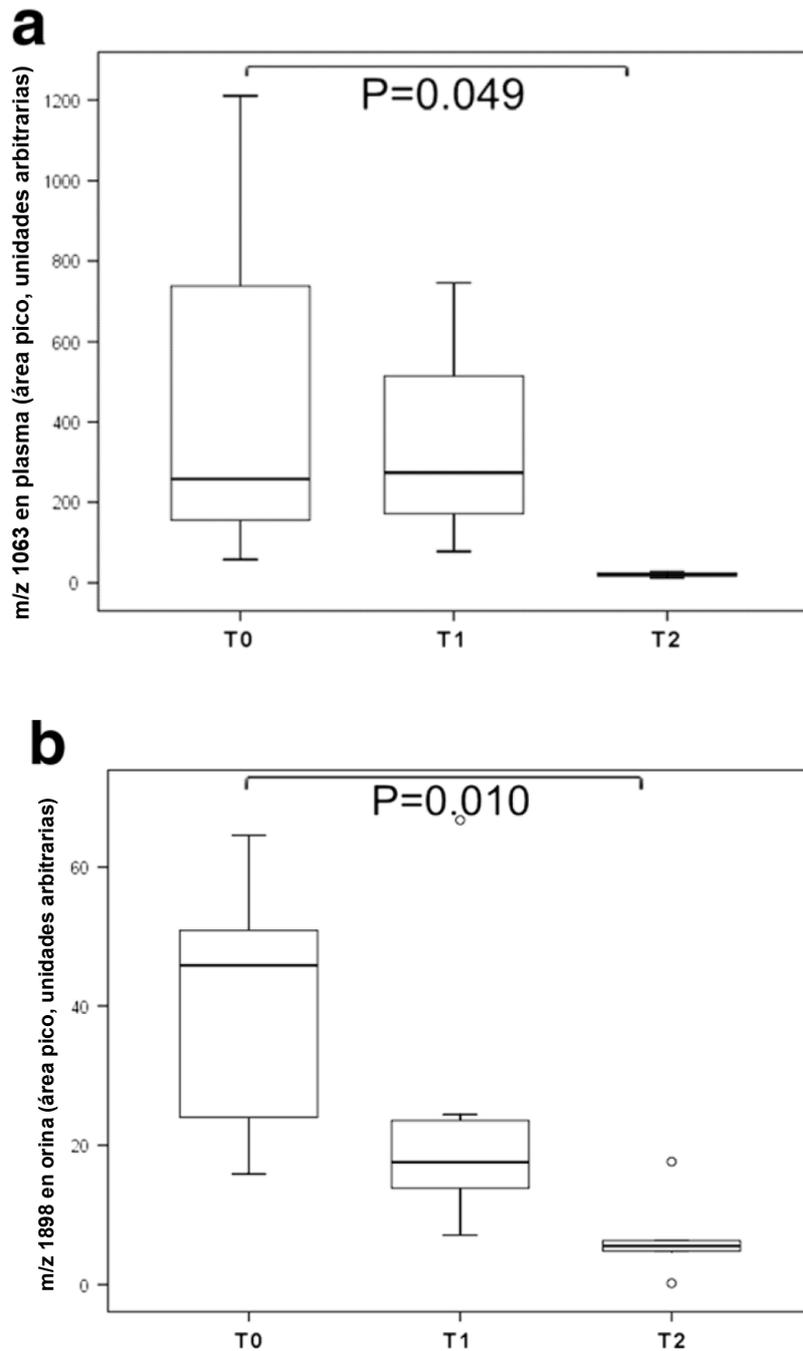
Específicamente al valorar la lesión túbulo-intersticial en función de su grado de afectación encontramos que: En la lesión T2 (>50%) se observa un incremento en el área pico de los péptidos séricos con *m/z* 5966 y 9289 respecto al grupo T0 y T1. Así mismo los péptidos séricos con *m/z* 1466, 1617, 3193, 3264, 5337, 5889 y 5905 estaban incrementados respecto al grupo T1. De forma similar, los péptidos plasmáticos con *m/z* 2661 y 2790 incrementaron su área pico respecto a los grupos T0 y T1. Por otro lado los péptidos con *m/z* 1063 y 1078 disminuyeron su área pico en pacientes con NIgA y T2 comparados con los sujetos con T0 y T1.

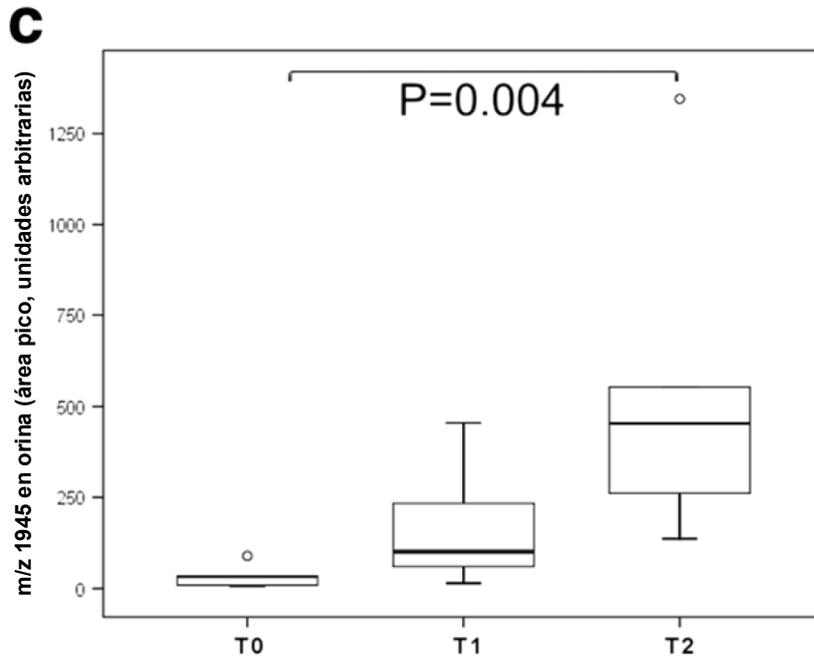
Finalmente en orina, los péptidos con *m/z* 1945 y 2491 incrementaron su área pico en pacientes con NIgA y afectación túbulo-intersticial >50% (T2) en comparación con T0 y T1. También encontramos una disminución del área pico

de los péptidos  $m/z$  1769, 1898, 2977, 3004, 3389, 3406, 4658 y 4752 cuando comparamos los grupos T2 con T0-T1.

Como se muestra en la figura 12a-c, el péptido plasmático correspondiente a la bradisinina ( $m/z$  1063) y el péptido urinario correspondiente a UMOD ( $m/z$  1898) disminuyeron su área pico en paralelo con la progresión de la afectación túbulointersticial. De forma contraria el péptido urinario correspondiente a A1AT ( $m/z$  1945) aumentaba de forma proporcional ante la presencia de mayor daño túbulointersticial.

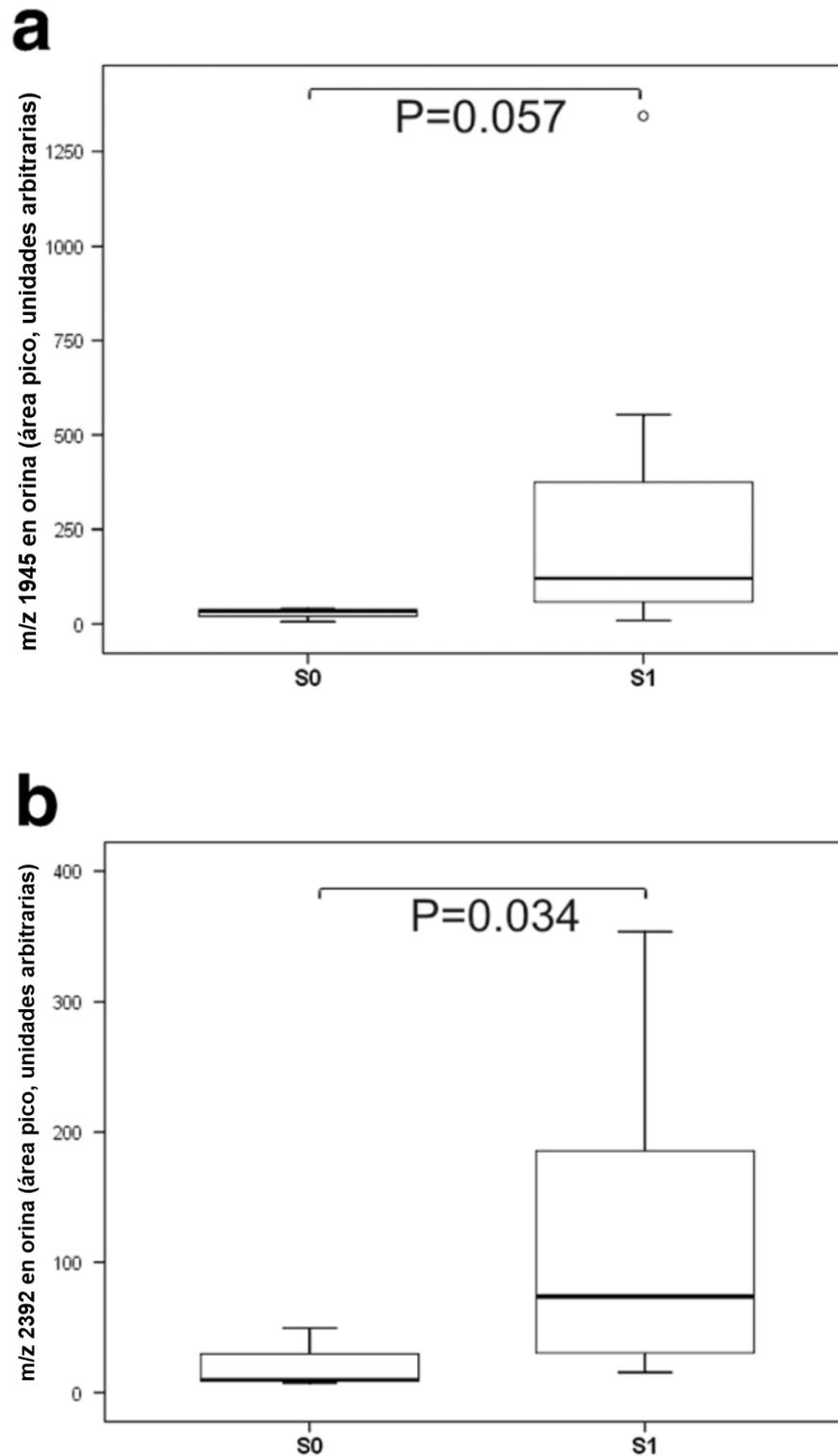
**Fig. 12.** Diferencias en la expresión de los péptidos bradicinina, uromodulina y alfa 1-antitripsina en la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular. (a) Box plot de la expresión en plasma de  $m/z$  1063; (b) expresión urinaria de  $m/z$  1898; (c) expresión urinaria de  $m/z$  1945 en NigA.

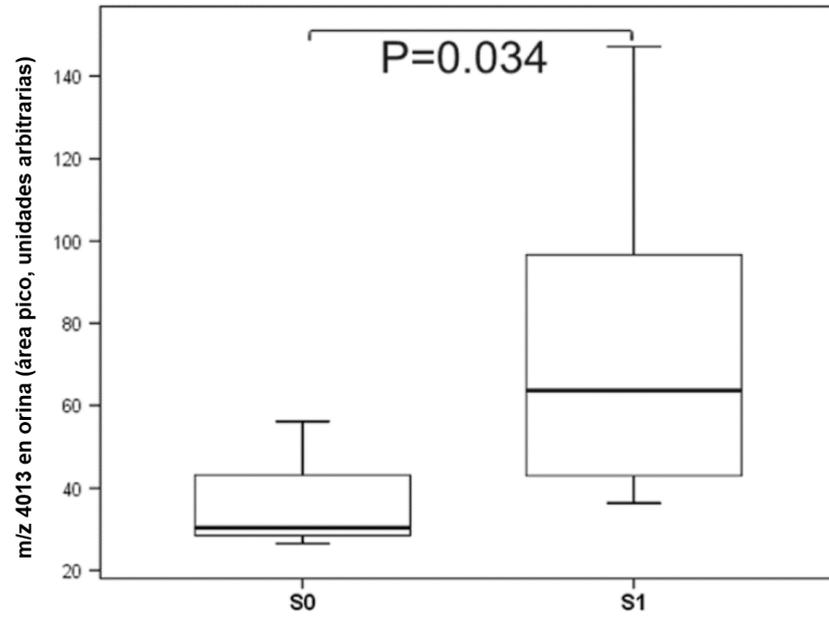
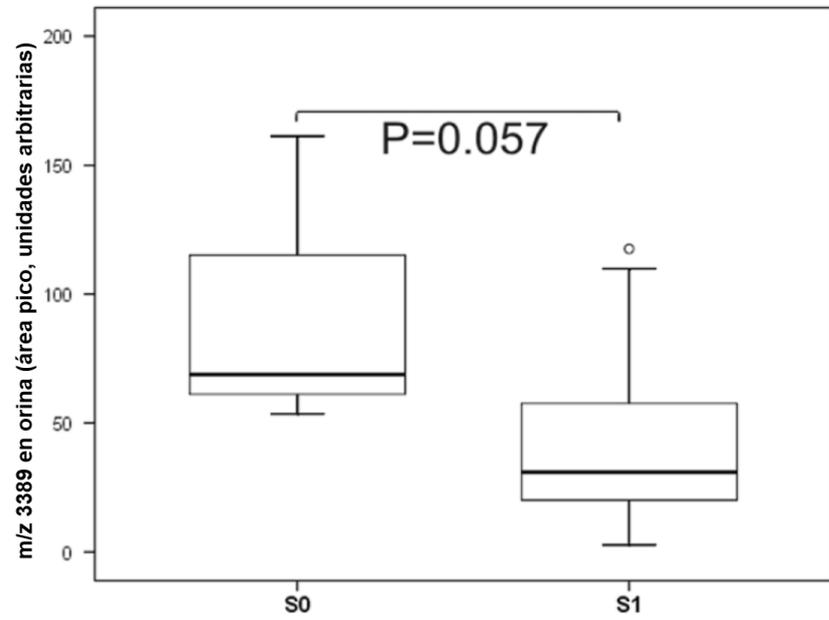




Como se muestra en la figura 13 a-d, los péptidos urinarios con masa  $m/z$  1945, 2392 y 4013 mostraron un incremento en su área pico en paciente con NIgA y afectación S1. De forma contraria el péptido con masa  $m/z$  3389, mostró una disminución en su área pico en el grupo S1 comparado con el grupo S0. No se encontraron asociaciones entre los péptidos séricos/plasmáticos y la lesión glomeruloesclerosis.

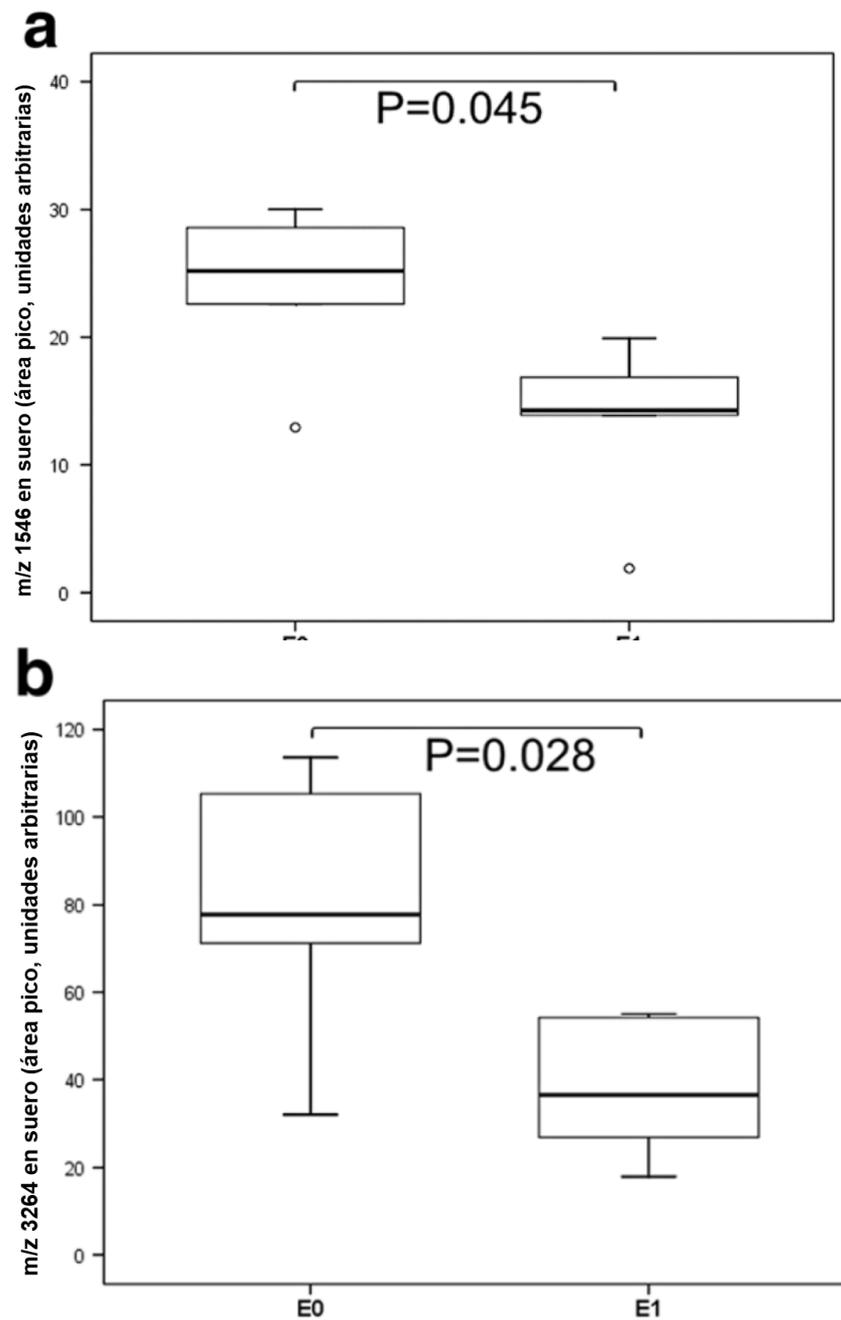
**Fig. 13.** *Diferencias en la expresión de los péptidos en orina y la lesión gloméruloesclerosis. (a)* Box plot de la expresión urinaria de *m/z* 1945; *(b)* expresión urinaria de *m/z* 2392; *(c)* expresión urinaria de *m/z* 4013; *(d)* expresión urinaria de *m/z* 3389 en NigA.



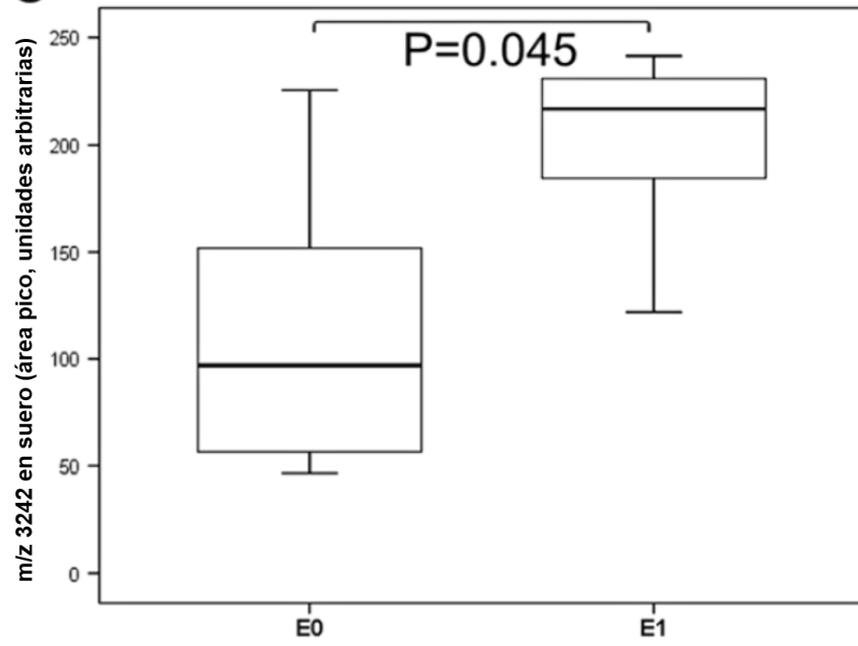
**c****d**

En cuanto a la lesión hiper celularidad endocapilar, encontramos que los péptidos séricos con masa  $m/z$  1546 y 3264 se incrementaban en el grupo E0 (ausencia de lesión) mientras que el péptido sérico  $m/z$  3242 disminuía en su área pico en el mismo grupo (Figura 14a-c). Así mismo, encontramos una disminución del área pico de los péptidos plasmáticos  $m/z$  3242 y  $m/z$  8602 cuando se compararon con el grupo E1 (Figura 15a-b). No encontramos asociaciones entre la lesión hiper celularidad endocapilar y los péptidos urinarios.

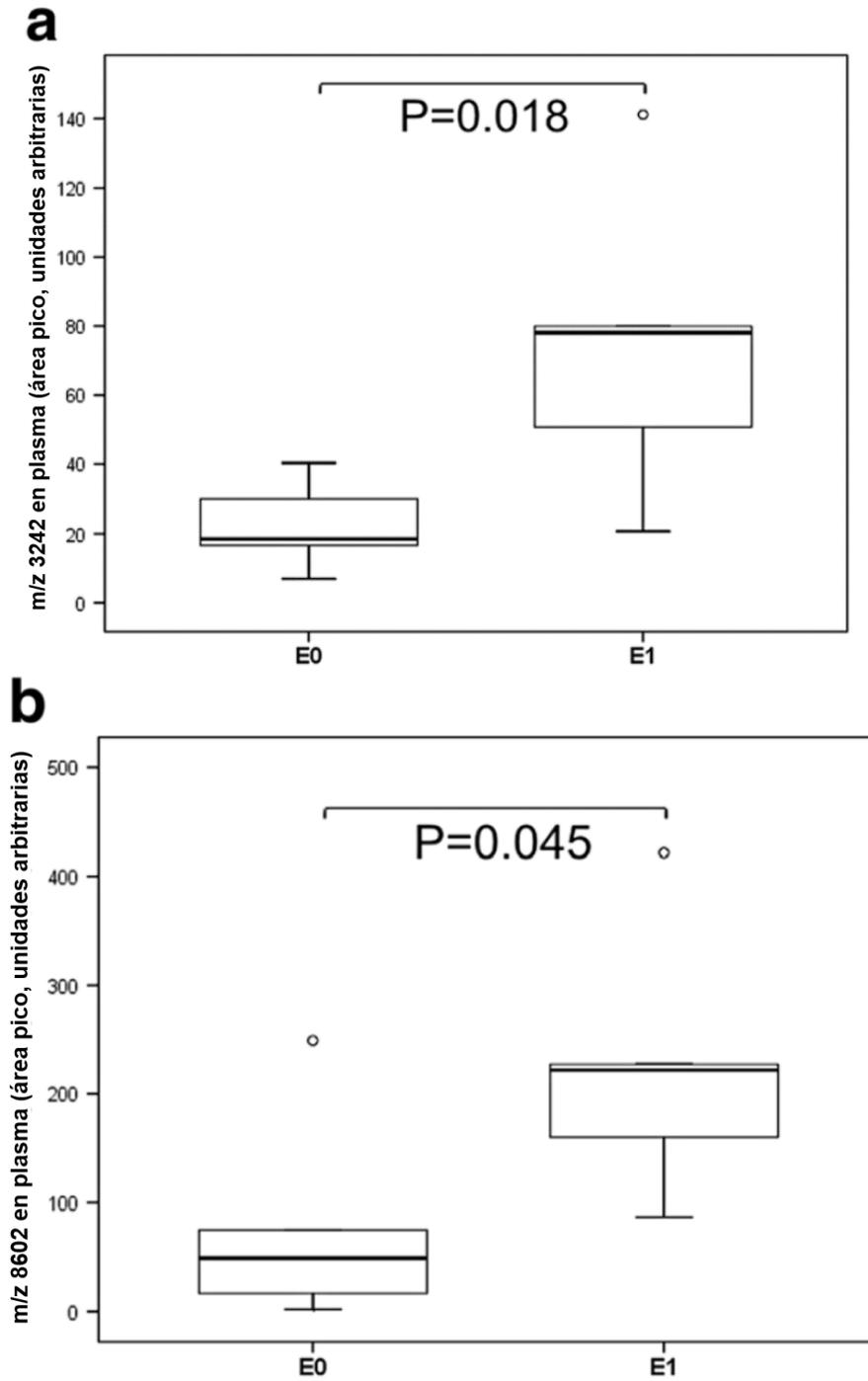
**Fig. 14.** Diferencias en la expresión de los péptidos séricos y la lesión hiper celularidad endocapilar. (a) Box plot de la expresión sérica de  $m/z$  1546; (b) expresión sérica de  $m/z$  3264; (c) expresión sérica de  $m/z$  3242 en NigA.



**C**



**Fig. 15.** Diferencias en la expresión de los péptidos en plasma y la lesión hiper celularidad endocapilar. (a) Box plot de la expresión plasmática de *m/z* 3242; (b) expresión plasmática de *m/z* 8602 en NigA.



Por último, todos los pacientes incluidos dentro del estudio, presentaban hiper celularidad mesangial (M1) por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas del perfil peptídico entre M1 y M0.

### **Asociación entre el perfil peptídico y el doble de la creatinina en pacientes con nefropatía IgA.**

Encontramos una asociación entre los péptidos séricos m/z 2953, 5337 y 9289; los péptidos plasmáticos m/z 9287 y los péptidos urinarios m/z 1769, 1898, 1913, 1945, 2491, 2756, 2977, 3004, 3389 y 4752 y el doble de la creatinina sérica. Todos estos péptidos presentaron una correlación con una peor función renal en pacientes con nefropatía IgA (Tabla 7)

**TABLA 7.** Correlación entre el doble de la creatinina sérica y el perfil peptídico

Biofluido	Péptidos ( m/z)	R	p*
Suero	2953	0.624	0.040
	5337	-0.615	0.044
Plasma	9289	0.711	0.014
	9287	0.615	0.044
	1769	-0.718	0.001
Orina	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	-0.631	0.004
	3389	-0.529	0.020
	4752	-0.530	0.020

\*Diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ); m/z= masa; R=correlación. Los valores de área pico de los diferentes péptidos se presentan en unidades arbitrarias (AU).

### **Asociación entre el perfil peptídico y los parámetros clínicos en la nefropatía IgA.**

Los péptidos urinarios derivados de UMOD (m/z 1898, 1913) presentaban una correlación inversa entre los niveles de creatinina sérica basales y la proteinuria basal. Del mismo modo, encontramos que los péptidos urinarios derivados de la

A1AT ( $m/z$  1945, 2392 y 2505) mostraron una asociación positiva con la variable proteinuria al momento basal.

La mayoría de los pacientes tenían diferentes grados de hematuria al momento del diagnóstico, por lo que no fue posible comparar la influencia de la hematuria en el perfil peptídico.

### **Segundo estudio: Análisis de péptidos asociados a la Nefropatía IgA con depósitos de C4d.**

#### **Pacientes**

Para el estudio del perfil peptídico en sangre y orina de pacientes con nefropatía IgA de mal pronóstico (depósitos de C4d), se identifica a través del análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF, un perfil de péptidos capaz de discriminar entre el grupo de pacientes con nefropatía IgA y el grupo control (sujetos sanos). Posteriormente, los pacientes con nefropatía IgA son clasificados en dos subgrupos: un subgrupo que presentaban depósitos de C4d en la biopsia renal (NIgA-C4d positivo), y un segundo subgrupo sin depósitos de C4d en la biopsia renal (NIgA-C4d negativo). A continuación, se analizó la relación entre los péptidos obtenidos en sangre y orina con el grupo NIgA-C4d positivo, y se compararon con el grupo NIgA-C4d negativo.

Para este análisis, fueron incluidos un total de 37 pacientes con diagnóstico de nefropatía IgA primaria, con una media de dieciocho glomérulos incluidos para el análisis histológico ( $18 \pm 8.3$ ). Como controles fueron incluidos 14 sujetos sanos con función renal normal, sin hematuria, proteinuria o tratamiento con inhibidores del SRAA. Las características clínicas, bioquímicas e histológicas fueron analizadas de acuerdo a la presencia o ausencia de los depósitos de C4d y se muestran en la tabla 8.

**TABLA 8.** Características demográficas, clínicas y bioquímicas de pacientes con Nefropatía IgA según depósitos C4d en biopsia renal.

	Total (n=37)	C4d positivo (n=12)	C4d negativo (n=25)	p	Controles sanos (n=14)
Género (Hombre), n(%)	27(72.9%)	9 (75%)	18 (72%)	NS	6(43%)
Edad, años	42.33	45 (31- 64)	42 (20 -58)	NS	34±12
IMC	27.36±4.2	26.49 ± 3.5	28.06±4.42	NS	
Diabetes Mellitus (Si), n(%)	2 (5.4%)	1 (8.3%)	1 (4%)	NS	
Dislipemia (Si), n(%)	16 (43.2%)	6 (50%)	10 (40%)	NS	
Hipertensión arterial (Si), n(%)	23 (62%)	8 (67%)	15 (63%)	NS	
Tensión arterial sistólica	139±20.7	139.5±14.65	140.2±24.1	NS	
Tensión arterial diastólica	83 ±12.91	81.08±11.5	85.1 ±13.06	NS	
Creatinina sérica, mg/dL	2.56	2.5 (1.1-6.7)	2.0 (0.5-10.9)	NS	0.86±0.12
Albumina sérica, g/L	33.8 ±6.3	31.79±6.1	35.03±6.3	NS	
Colesterol, mg/dL	190	229 (132-383)	184 (124-275)	<b>0.04</b>	
Acido úrico, mg/dL	6.9	6.7 ±1.16	6.95± 2.69	NS	
PCR	11.15	9.8 (0-54.9)	12.57 (0-158)	NS	
Hematuria	29(76.3%)	7 (58.3%)	20 (83.3%)	NS	
Proteinuria g/24horas	3.56	4.6 (1-10)	1.9 (0.4-13)	<b>0.01</b>	<b>N.A.</b>
Estatinas (Si), n(%)	22 (59.4%)	9 (75%)	13 (52%)	NS	
ISRAA (Si), n(%)	31 (83.7%)	12 (100%)	19 (76%)	<b>0.038</b>	
Oxford					
M1	35 (94.6%)	12 (100%)	23 (92%)	NS	
S1	31(83.8%)	12 (100%)	19 (76%)	<b>0.034</b>	
E1	14 (38.9%)	8 (66.6%)	6 (24%)	<b>0.015</b>	
T 1-2	25 (67.6%)	10 (83.3%)	15 (62.5%)	NS	
C3	21 (56.8%)	6 (50%)	15 (60%)	NS	
C4	0	0	0	NS	
ERCT	22 (59.4%)	7 (58.3%)	15 (60%)	NS	
Doble de la creatinina sérica	21 (56.7%)	7 (58.3%)	14 (56%)	NS	

Los resultados están expresados en mediana y rangos intercuartílicos; n= número; %=porcentaje; mg/dl=miligramo por decilitro; g=gramo; ISRAA= inhibidores del sistema angiotensina-aldosterona; IECA=inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; g/L=gramos por litro; mg/dl= miligramos por decilitro; PCR=proteína C reactiva; ERCT=enfermedad renal crónica terminal; N.A= no aplica; NS= no significativa; afectación túbulo intestinal/Fibrosis tubular (IFTA) <25% (T0), 26-50% (T1) ó >50% (T2); Glomerulosclerosis (S) ausencia (S0) o presencia (S1); Hiper celularidad endocapilar (E) ausencia (E0) y presencia (E1); Hiper celularidad mensangial ≤ 0.5 (M0) ó ≥ 0.5 (M1)

La mayoría de los pacientes incluidos presentaban diferentes grados de insuficiencia renal al momento del diagnóstico por biopsia renal. Los pacientes con NIgA-C4d positivo presentaban un mayor grado de proteinuria y mayores niveles séricos de colesterol respecto al grupo NIgA-C4d negativo. En cuanto al tratamiento con ISRAA, una mayor proporción de pacientes del grupo NIgA-C4d positivo recibían tratamiento con IECA y/o ARAII al momento del diagnóstico. No se encontraron diferencias significativas entre presión arterial (sistólica o diastólica), hematuria (incluyendo micro o macrohematuria), diabetes mellitus, tratamiento con estatinas, ácido úrico ni IMC entre ambos grupos.

### **Evolución renal**

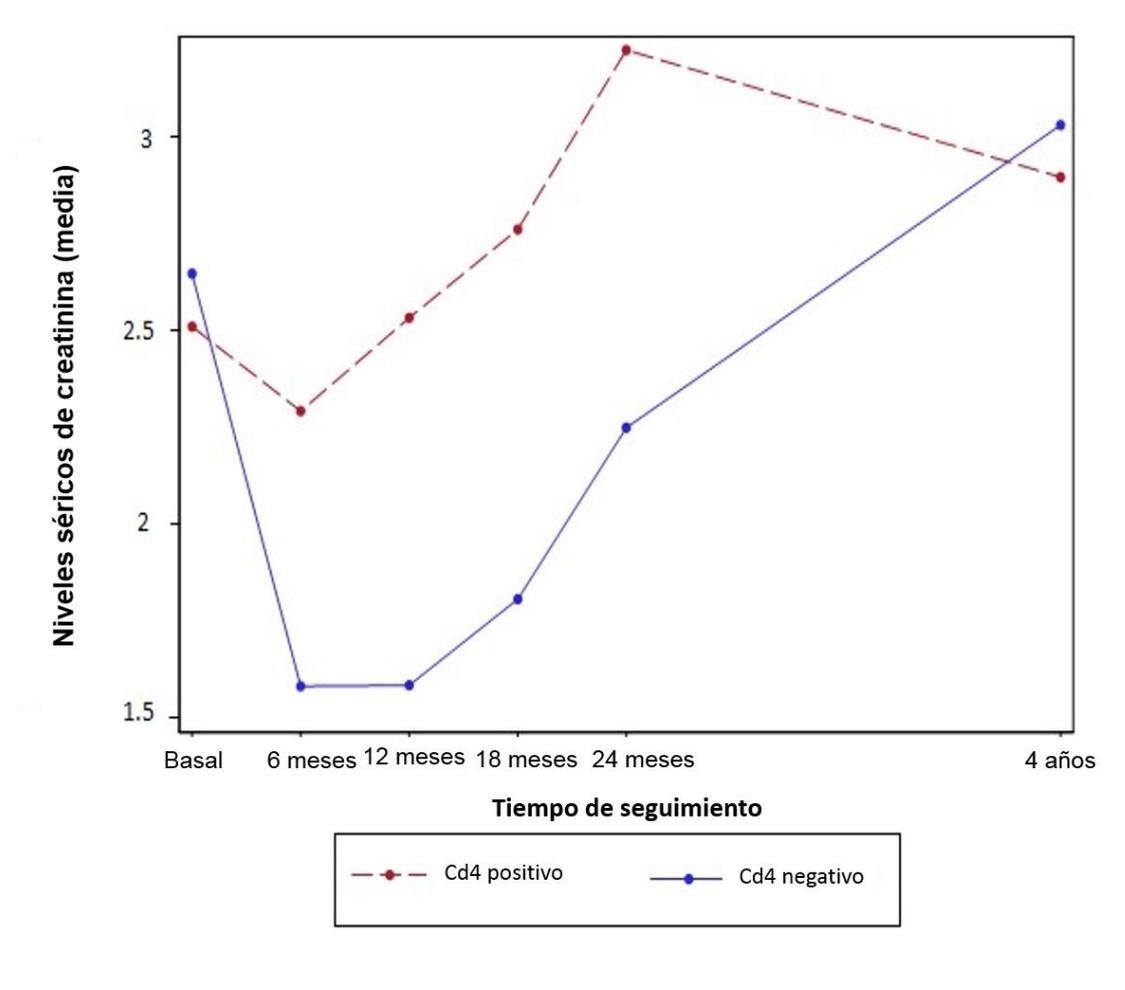
El análisis descriptivo de la creatinina (lineal mixed model) muestra una peor evolución renal (Tabla 9 y figura 17). El análisis de medidas repetidas de creatinina a lo largo del tiempo no mostró diferencias significativas entre los grupos durante el seguimiento ( $p=0.77$ ).

**TABLA 9.** *Análisis descriptivo de la creatinina en el seguimiento de grupos NIgA-C4d positivo y NIgA-C4d negativo.*

C4d	Tiempo	Media	Desviación estándar
<b>Negativo</b>	Basal	2.646	2.1 [0.5-10.9]
	6 meses	1.58	0.9 [0-3.7]
	12 meses	1.58	0.9 [0-3.2]
	18 meses	1.80	1.11 [0-3.5]
	24 meses	2.24	1.5 [0.6-6.8]
	4 años	3.02	2.4 [0.6-10.8]
<b>Positivo</b>	Basal	2.50	1.5 [1.1-6.7]
	6 meses	2.29	1.5 [0-5.8]
	12 meses	2.53	2.0 [0-6.5]
	18 meses	2.76	3.0 [0-.9.5]
	24 meses	3.22	2.0 [1.2-6.9]
	4 años	2.89	1.6 [1.3-4.8]

[ ]=intervalos de confianza del 95%

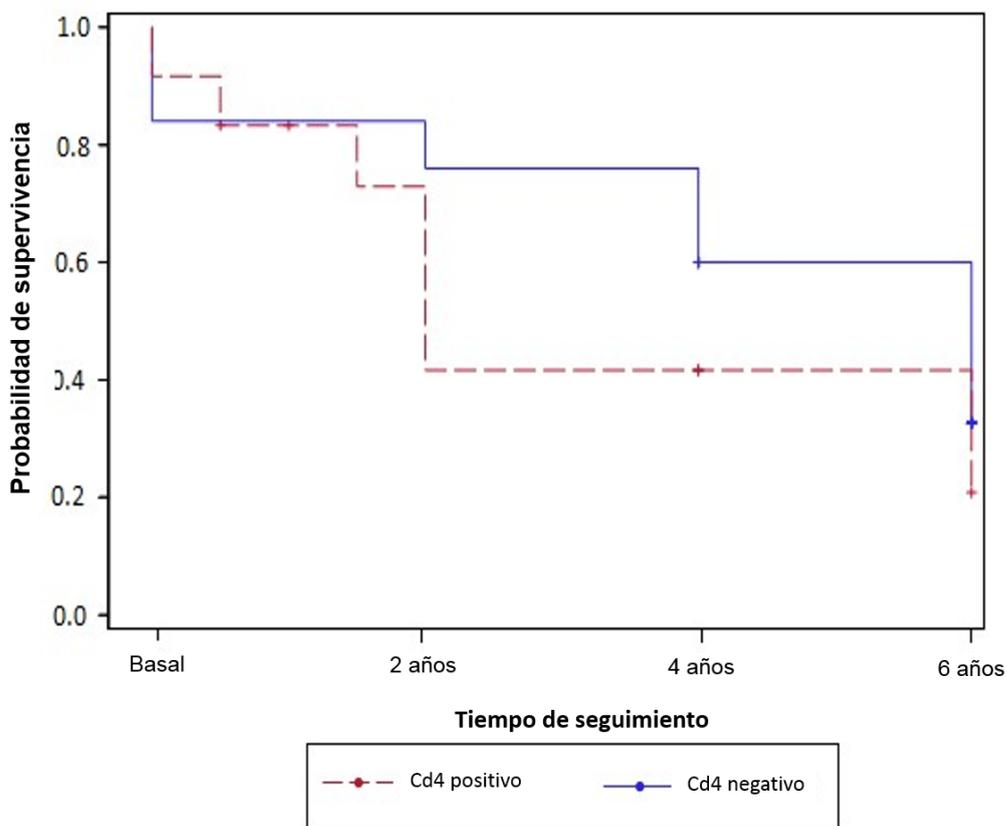
**Fig. 16.** Diferencias en los niveles de creatinina entre los grupos NlgA-C4d positivo y negativo.



**Análisis descriptivo de las medias de creatinina entre los dos grupos (NlgA-C4d positivo y NlgA-C4d negativo) a través del tiempo.**

En total, 22 pacientes (59.4%) cumplieron criterio de fallo renal. La media de tiempo para alcanzar el fallo renal fue de 24 meses en el grupo NlgA-C4d positivo y de 72 meses en el grupo NlgA-C4d negativo. La curva de supervivencia diseñada a través del test Kaplan-Meier no mostró diferencias significativas entre grupos en cuanto a supervivencia renal antes de alcanzar el fallor renal ( $p=0.31$ ) (figure 17).

**Fig. 17.** Supervivencia renal entre grupos según presencia o ausencia de depósitos de C4d.



En general, un total de 21 pacientes (56.7%) alcanzaron el doble de la creatinina durante el seguimiento, pero no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Ningún paciente falleció durante el período del estudio.

### Identificación de péptidos en orina y plasma relacionados con nefropatía IgA y depósitos de C4d.

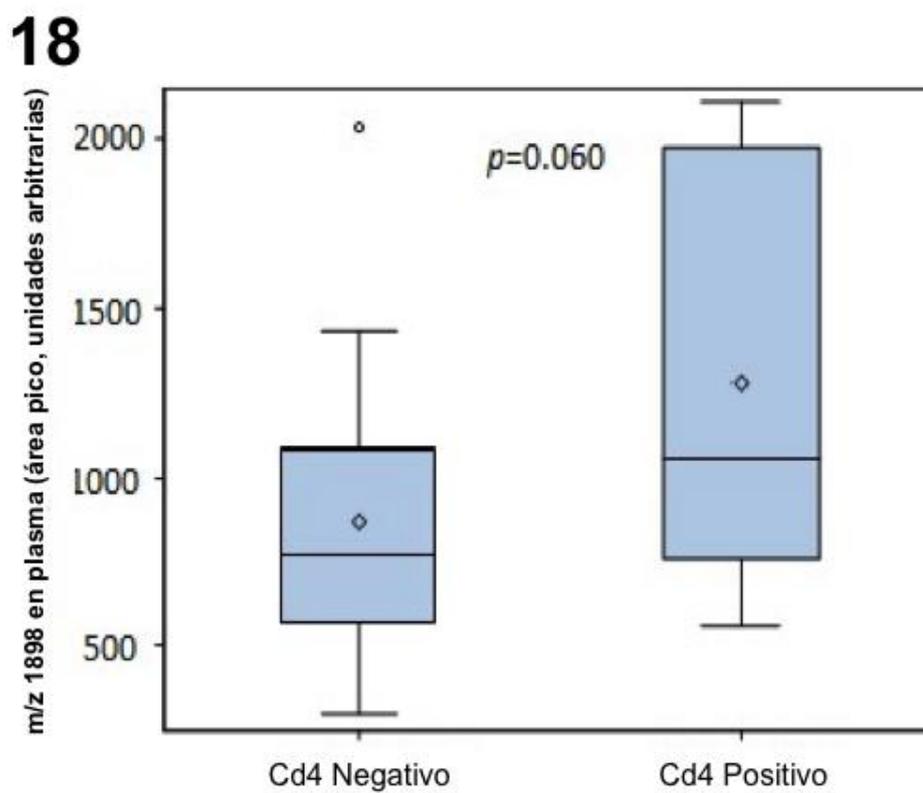
En el estudio previo, fueron encontrados péptidos que diferenciaban pacientes con nefropatía IgA de sujetos sanos (**Graterol et al**). De forma similar, se han encontrado diferencias significativas en péptidos urinarios y plasmáticos en

pacientes con nefropatía IgA y depósitos de C4d (NIgA-C4d positivo) comparados con el grupo NIgA-C4d negativo.

A través del análisis MALDI-TOF, fueron identificados un total de 105 péptidos que difieren en plasma, suero y orina entre los grupos, pero sólo los 8 péptidos descritos previamente en el primer estudio, fueron incluidos para los análisis. Se incluyen los péptidos plasmáticos con masa  $m/z$  1063 y 1898 correspondientes a bradisinina (KNG1) y factor del complemento C4a (C4A), respectivamente. Péptidos urinarios con masa  $m/z$  1898 y 1913 correspondientes a fragmentos de uromodulina (UMOD); péptidos con masa  $m/z$  1945, 2392 y 2505 correspondientes a fragmentos de  $\alpha$ -1-antitripsina (A1AT) y péptidos con masa  $m/z$  2714 correspondientes a  $\beta$ -2-microglobulina (B2M)(107,129).

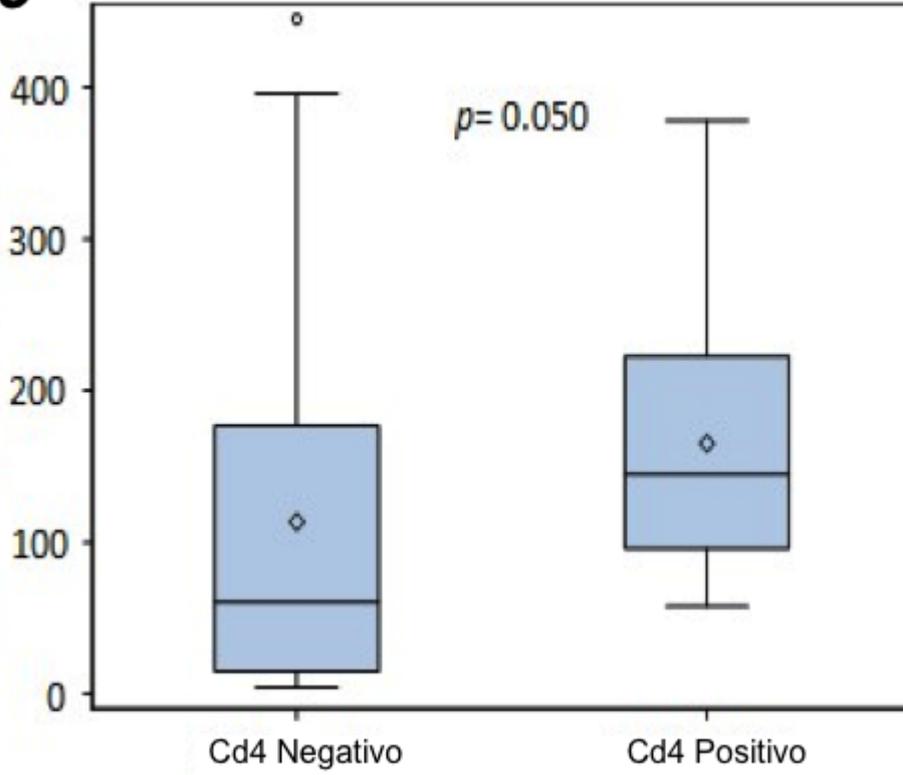
Los péptidos plasmáticos con  $m/z$  1898 identificados como C4A (C4A; P0C0L4) y los péptidos urinarios con  $m/z$  2392 y 2505 identificados como A1AT (A1AT; P01009) mostraron un área pico incrementada en el grupo NIgA-C4d positivo respecto al grupo NIgA-C4d negativo (figura 18,19, 20)

**Fig. 18, 19, 20.** Diferencias de los péptidos plasmáticos correspondientes a C4A (fragmento del complemento C4a) y péptidos urinarios correspondientes a A1AT (fragmentos de  $\alpha$ -1-antitripsina) entre los grupos NIgA-C4d positivo y C4d negativo.

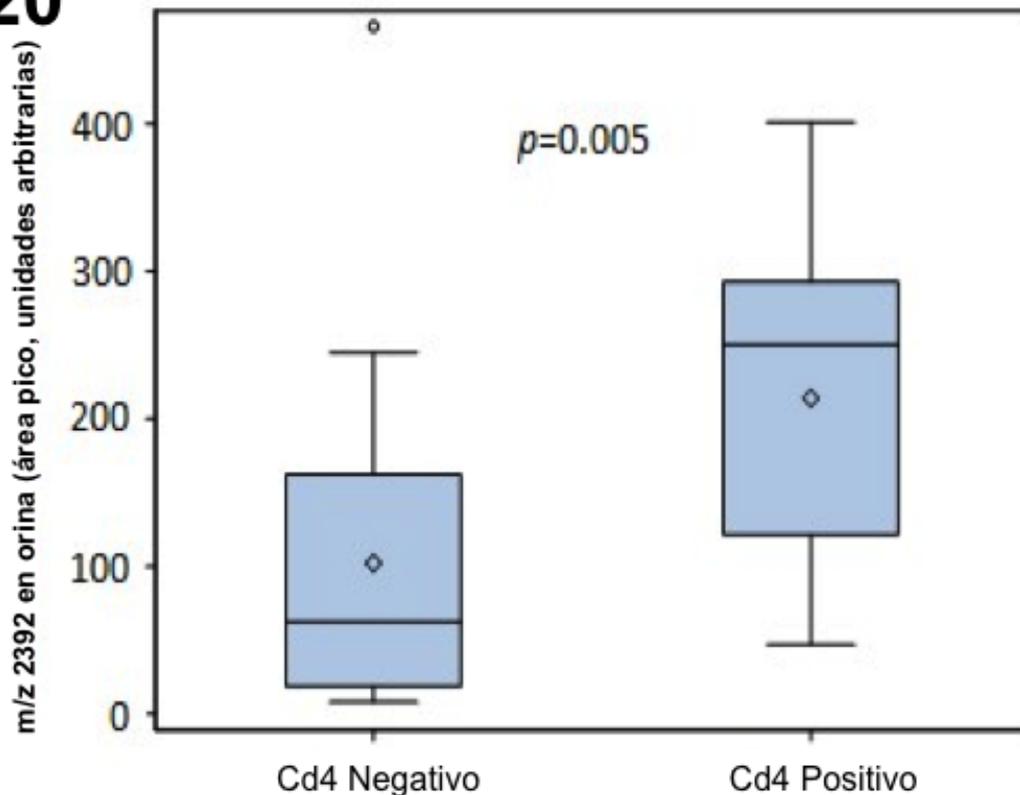


19

m/z 2505 en orina (área pico, unidades arbitrarias)



20



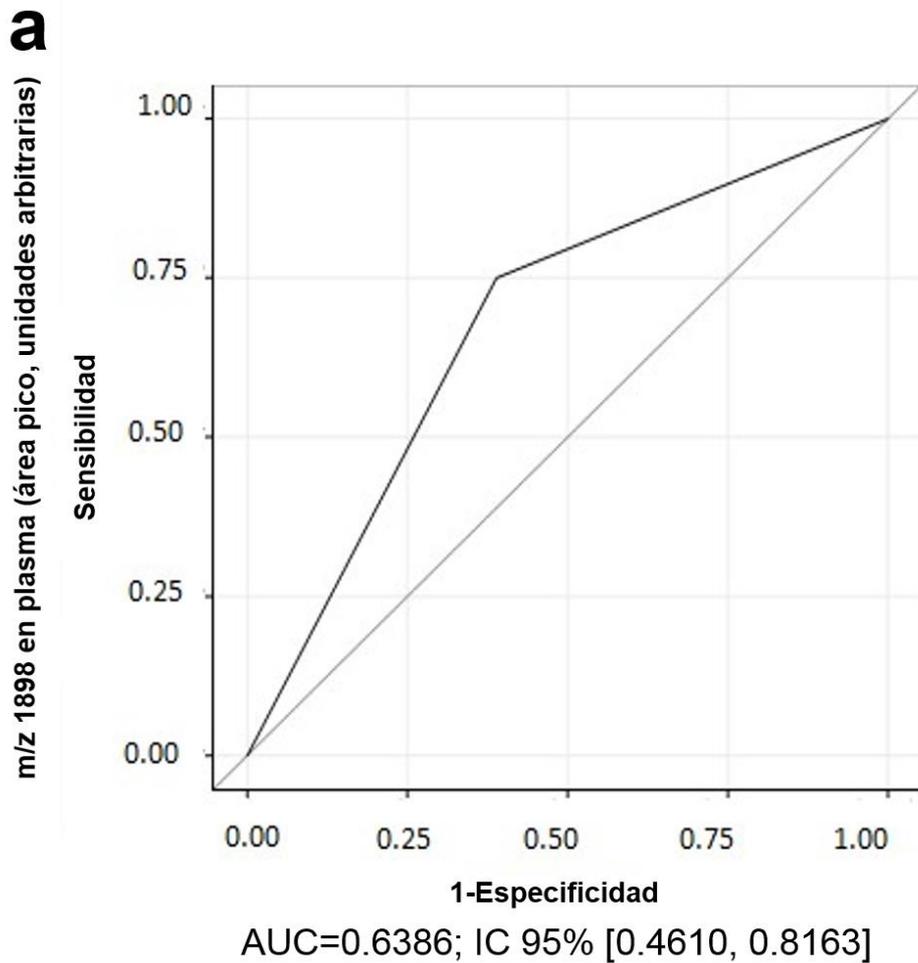
### Capacidad discriminatoria de los péptidos relacionados con pacientes NIgA-C4d positivo.

Con la finalidad de establecer el poder discriminatorio de los péptidos, se elaboraron las curvas ROC entre ambos grupos, definiendo un potencial punto de corte capaz de discriminar entre pacientes con NIgA-C4d positivo y NIgA-C4d negativo. Para este fin, se considero el punto de máxima sensibilidad y especificidad de cada péptido. Los valores por encima del punto de corte identificaban pacientes con NIgA-C4d positivo y los valores por debajo de este punto identificaban pacientes con NIgA-C4d negativo.

Los pacientes del grupo C4d positivo, fueron correctamente clasificados, mostrando un AUC de 0.6386 (95% IC 0.4610-0.8163) y un punto de corte de 890.91 (sensibilidad 78.57%, especificidad 52.9%) para el péptido plasmático

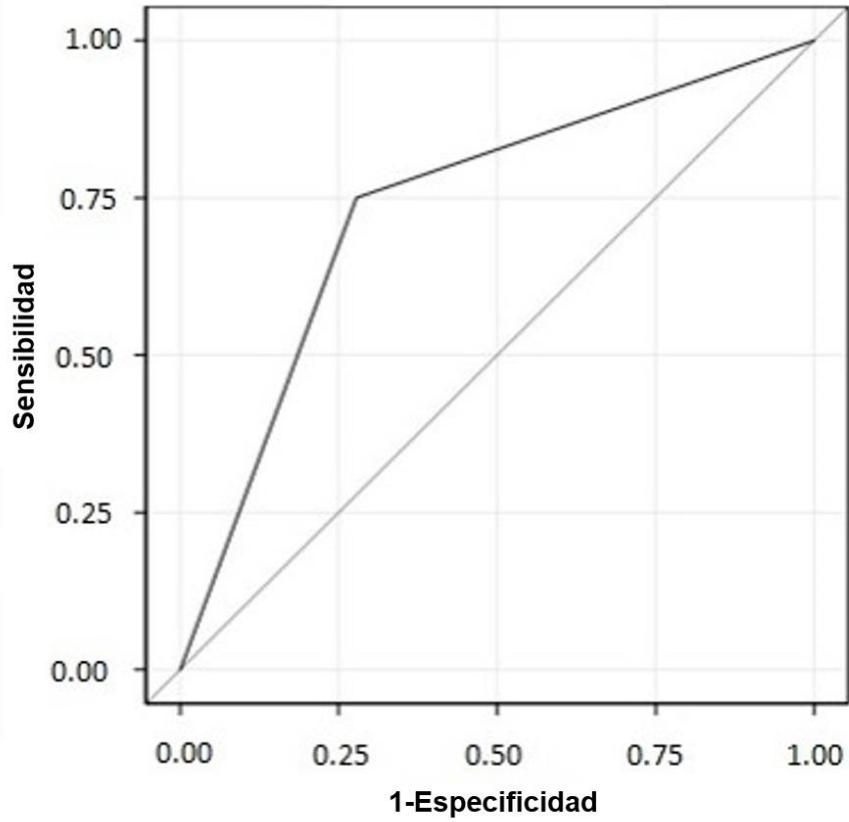
C4A con  $m/z$  1898. Los péptidos urinarios correspondientes a A1AT con  $m/z$  2392 mostraron un AUC de 0.736 (95% IC 0.569-0.902) y un punto de corte de 152.42, y para la  $m/z$  2505 un AUC de 0.680 (95% IC 0.507-0.853) y un punto de corte de 109.44 (sensibilidad 56,25% y especificidad 78,57%) (figuras 21a,b,c).

**Fig. 21.** Capacidad discriminadora de los péptidos generados naturalmente en clasificar pacientes con NlgA-C4d positivo y NlgA-C4d negativo.



**b**

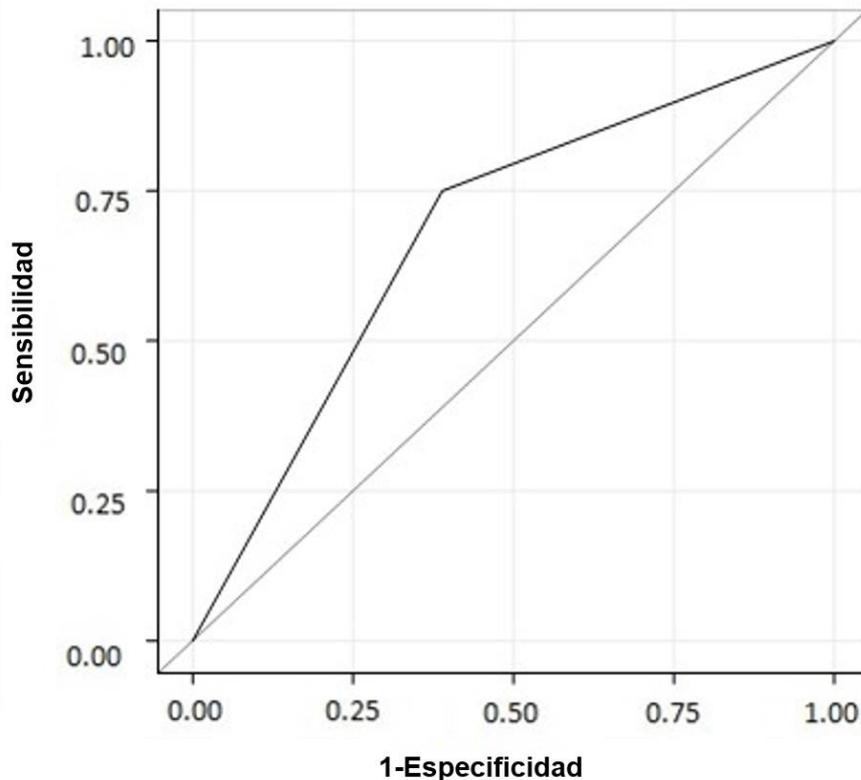
m/z 2392 en orina (área pico, unidades arbitrarias)



AUC=0.7361; IC 95% [0.5697, 0.9026]

**C**

m/z 2505 en orina (área pico, unidades arbitrarias)



AUC=0.6806; IC 95% [0.5079, 0.8532]

**Asociación entre pacientes con NIgA-C4d positivo y lesiones histológicas**

Las lesiones histológicas que presentaban los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla 8. Un total de treinta y siete biopsias de pacientes con nefropatía IgA y tinción de C4d fueron analizadas.

Se encontró una asociación significativa entre las lesiones hiper celularidad endocapilar y glomeruloesclerosis y el grupo NIgA-C4d positivo. No se encontraron diferencias significativas entre la lesión fibrosis intersticial/atrofia tubular con el grupo C4d positivo. Sin embargo, el 83,3% de los pacientes fueron clasificados como T1-T2 al momento del diagnóstico. Todos los pacientes incluidos mostraron presencia de hiper celularidad mesangial (M1). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos, cuando se analizó la reacción extracapilar (25% en NIgA-C4d positivo y 12% en pacientes con NIgA-C4d negativo).

# DISCUSIÓN

---

La necesidad de encontrar nuevos biomarcadores no invasivos, que permitan complementar los hallazgos de la biopsia renal y establecer un mejor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad renal por IgA, ha conducido al desarrollo de nuevas tecnologías. En este sentido, las técnicas proteómicas se han convertido en una herramienta prometedora para el descubrimiento de biomarcadores de las enfermedades renales durante los últimos años.

La aplicabilidad de estas técnicas, especialmente en el estudio de péptidos urinarios, muestra una serie de ventajas respecto a la biopsia renal, "Gold Standard" en el diagnóstico de las enfermedades glomerulares. La principal, es que constituye una técnica no invasiva que puede ser utilizada para establecer diagnósticos en estadios iniciales de la enfermedad y que puede realizarse de forma consecutiva durante su evolución. Este hecho permite que se utilice como una herramienta en el seguimiento de estas patologías así como en la monitorización de la respuesta terapéutica. En las enfermedades glomerulares, la proteómica ha demostrado ser útil en su diferenciación con sujetos sanos(107) y entre sus diferentes etiologías, como el SNCM y la GEFyS (131).

En los estudios que conforman esta tesis doctoral, se han aplicado técnicas proteómicas mediante la espectrometría de masas para identificar un perfil de péptidos en sangre, plasma y orina, asociado a parámetros clínicos, bioquímicos e histológicos en una cohorte de pacientes con nefropatía IgA primaria y con depósitos de C4d.

Basados en nuestra hipótesis, en nuestro primer trabajo obtuvimos un perfil peptídico correspondientes a Bradicinina y C4a en plasma, así como péptidos correspondientes a A1AT, UMOD, y  $\beta$ 2-microglobulina en orina que diferenciaban correctamente el grupo de pacientes con NIgA de los controles sanos. De estos péptidos, la A1AT, UMOD y la Bradicinina, se asociaban con lesiones histológicas de mal pronóstico (IFTA y glomeruloesclerosis), y parámetros de función renal como la proteinuria, la creatinina sérica y el doble de la creatinina, definida como una variable de mal pronóstico renal.

Diversos estudios han utilizado la proteómica identificando biomarcadores en diferentes enfermedades glomerulares incluyendo la NIgA, que refuerzan nuestros resultados. Haubitz y colaboradores, encontraron un patrón peptídico (22 péptidos no identificados) que era capaz de discriminar entre pacientes con NIgA de otras enfermedades glomerulares(132). Del mismo modo, Julian y col. identificaron un perfil de péptidos que diferenciaba pacientes con IgA primaria de formas secundarias(126) y en un estudio piloto Neprasova (144), describió la expresión urinaria de 8 péptidos, capaces de diferenciar a pacientes con NIgA de pacientes con otras enfermedades glomerulares y de sujetos sanos, incluyendo dentro de este grupo de péptidos a la UMOD y a la A1AT.

La A1AT es una proteína sérica que protege la matriz extracelular del ataque de neutrófilos, lo que le confiere un efecto anti-inflamatorio y anti-apoptótico(133,134). Kwak y colaboradores describieron un incremento en los niveles de A1AT en tejido renal y orina de pacientes con nefropatía IgA. Los autores sugerían que las células epiteliales renales producían A1AT en respuesta al daño tubulo-intersticial; y que la presencia de A1AT en áreas de esclerosis glomerular, podocitos y túbulos, representaba un paso intermedio en el proceso fisiopatológico de la glomeruloesclerosis y la lesión túbulo intersticial(105).

Por otro lado, en la búsqueda de biomarcadores, un estudio que aplicaba técnicas proteómicas (MALDI-MSI) en biopsias renales y orina, mostró la presencia de A1AT en áreas escleróticas de pacientes con GEFyS y con NIgA. Además, existía una correlación positiva entre los niveles urinarios de A1AT y una mayor progresión a la insuficiencia renal. Los autores sugerían que la combinación de ambos hallazgos (A1AT en tejido y orina) podrían considerarse un potencial marcador de progresión en estas glomerulopatías (134).

De forma concordante, en nuestro estudio encontramos niveles elevados de A1AT asociados a las lesiones de glomeruloesclerosis e IFTA en la NIgA. Estos hallazgos sugieren que A1AT podría ser considerado un marcador de mal pronóstico renal en la enfermedad glomerular por IgA. Sin embargo, por su papel

en otras enfermedades glomerulares, no puede descartarse que la expresión de A1AT represente un marcador de daño renal crónico establecido.

Por otro lado, reportamos una asociación inversa entre péptidos correspondientes a UMOD y la afectación túbulointersticial.

La uromodulina o proteína de Tamm–Horsfall, es la glicoproteína urinaria más abundante y es expresada en las células del epitelio renal. Recientes estudios han implicado a la UMOD como un potencial marcador de enfermedad renal crónica de cualquier etiología (125,135–137) debido probablemente a su papel regulador en la inflamación (unión a neutrófilos-producción IL-8 y unión a monocitos-producción de IL-1, IL-6 y  $TNF\alpha$ ) (137,138). De hecho, la expresión urinaria de complejos IgA-UMOD en pacientes con NlgA, parece constituir un marcador de fases precoces de la enfermedad y se asocia a la presencia de inflamación, siendo capaz de diferenciarla de otras enfermedades glomerulares (GEFyS, nefropatía diabética, SNCM y nefropatía membranosa) (138).

Wu y colaboradores(139) describieron una disminución de niveles urinarios de UMOD en pacientes afectados con NlgA que les permitía diferenciarlos de sus controles sanos. Del mismo modo, Pracjzer y col., describen una asociación entre los niveles urinarios de UMOD y la atrofia/fibrosis en la enfermedad renal crónica(135).

De forma consistente, la expresión urinaria de UMOD encontrada en nuestra población IgA, es capaz de discriminar entre grupos y su asociación con la lesión histológica IFTA sugiere que la UMOD podría proponerse como un marcador de mal pronóstico renal. A pesar de esto, es necesaria una valoración conjunta dentro de un perfil de péptidos, ya que la presencia de UMOD de forma individual carece de validez y especificidad.

Por otro lado, nuestros hallazgos describen un aumento de los péptidos m/z 1945, 2392 y 4013 y un descenso del péptido m/z 3389 en pacientes con lesión S1. En reportes previos, Kang y colaboradores(140) observaron que tanto la glomeruloesclerosis segmentaria como la lesión IFTA, reflejaban daño renal

crónico, por lo cual estos péptidos podrían ser utilizados como predictores pronósticos a largo plazo en pacientes con NIgA.

En cuanto al tratamiento, Rocchetti y colaboradores(141) reportaron un descenso significativo en la excreción urinaria de kininógeno en pacientes con nefropatía IgA, particularmente en pacientes no respondedores a IECA. Se especulaba que las diferencias encontradas reflejaban la gravedad del daño renal en pacientes con NIgA. De forma similar, en nuestro estudio encontramos niveles plasmáticos disminuidos de bradicinina (m/z 1063), un derivado del kininógeno, en pacientes con nefropatía IgA que presentaban daño tubulointersticial severo (T2). A pesar de ello, no pudimos demostrar el efecto del tratamiento con inhibidores del SRAA sobre el perfil peptídico, debido a que la mayoría de nuestros pacientes no recibían IECA o ARAII al momento del diagnóstico.

La Bradicinina es un nonapéptido derivado del kininógeno, un potente agonista del receptor 2 de la Bradicinina, que mejora la producción de óxido nítrico y prostaglandinas. Además, las denominadas kininas son potentes vasodilatadores renales y poseen un efecto antitrombótico y antifibrótico, reportado en pacientes con nefropatía diabética(142,143). Así mismo, una disminución en la expresión del receptor de bradicininas ha sido descrita como mecanismo mediador de progresión en la glomerulosclerosis focal y segmentaria(144). Nuestros resultados sustentan que los niveles bajos de bradicinina encontrados reflejan un mayor daño túbulo intersticial, y que se evidencia en el alto porcentaje de insuficiencia renal basal de nuestra población.

En cuánto a la lesión endocapilar, en nuestro estudio no se encontraron asociaciones con la evolución renal, de forma concordante con el análisis realizado en la cohorte original de pacientes utilizados para la validación de la clasificación de Oxford. Sin embargo, nosotros encontramos una asociación de 5 péptidos –en suero: m/z 1546, 3264 y 3242 y en plasma: m/z 3242 y 8602; que incrementaban su área pico (m/z 3242 y 8602) o disminuían (m/z 1546 y 3264) en presencia de hiper celularidad endocapilar (E1).

De todas las lesiones, no encontramos asociaciones del perfil de péptidos y la lesión hiper celularidad mesangial, probablemente debido a que la mayoría de los pacientes incluidos en nuestra población de estudio estaban clasificados como M1. Estudios previos muestran una correlación de lesión M1 con lesiones sugestivas de actividad, y candidatas a tratamiento por su buena respuesta. Nosotros no hemos podido demostrar este efecto en nuestro grupo de estudio.

Finalmente, reportamos una correlación inversa entre niveles séricos de creatinina, proteinuria y el doble de la creatinina con los péptidos correspondientes a UMOD y una correlación directa entre A1AT y los mismos parámetros. En estudios previos (135) se ha demostrado que existe una correlación inversa entre los niveles séricos de UMOD y la tasa de filtración glomerular estimada en las enfermedades renales. Además, fragmentos de péptidos derivados de A1AT urinarios, han sido correlacionados con una peor progresión renal y con el filtrado glomerular basal en pacientes con enfermedad renal crónica(134,145). De forma similar, nuestros resultados sugieren que la UMOD y la A1AT podrían considerarse marcadores subrogados de evolución renal en nuestra población de estudio.

Por todo esto, proponemos que el perfil peptídico encontrado en la NIgA junto con los hallazgos histológicos y la función renal, aporta información adicional al diagnóstico y ayuda a establecer el pronóstico de la enfermedad a través de su correlación con parámetros de función renal.

En una segunda fase de investigación, una vez identificado un perfil peptídico asociado a la nefropatía IgA con las características poblacionales propias, consideramos estudiar un perfil peptídico que se asociara a aquellas nefropatías IgA con peor evolución renal. Considerando que la fracción del complemento C4d es un factor de mal pronóstico independiente demostrado, nos planteamos encontrar un perfil de péptidos relacionados a un grupo de pacientes diagnosticados de nefropatía IgA con depósitos de C4d en la biopsia renal.

Recientes evidencias sustentan el papel del complemento en el proceso fisiopatológico de la nefropatía IgA. La activación del complemento contribuye al

aumento de la respuesta inflamatoria local(40,69) liderizando la cascada de procesos que conllevan a la insuficiencia renal(68). La presencia de lectina de unión a manosa (MBL) y C4d en biopsias renales(40,69) se asocia a lesiones histológicas de mayor gravedad y a una reducción significativa de la supervivencia renal. Por esto, el C4d es considerado un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal (ERCT) en la nefropatía IgA primaria(68,69).

Hasta el momento, no existen biomarcadores peptídicos asociados a la nefropatía IgA con depósitos de C4d. Por este motivo y para responder a nuestra hipótesis diseñamos un segundo estudio, con la finalidad de describir un perfil de péptidos en suero, sangre y orina asociados a un grupo de pacientes con nefropatía IgA primaria y depósitos de C4d y compararlo con un grupo control, NIgA-C4d negativo.

Así pues, encontramos un perfil de péptidos que fueron capaces de diferenciar entre grupos, mostrando un aumento de niveles plasmáticos del péptido C4a ( $m/z$  1898) y niveles urinarios del péptido A1AT ( $m/z$  2392 y 2505) en pacientes con NIgA-C4d positivo. Del mismo modo, las lesiones histológicas glomeruloesclerosis segmentaria e hiper celularidad endocapilar se asociaban al grupo NIgA-C4d positivo.

Espinosa y colaboradores describieron una asociación entre pacientes con NIgA-C4d positivo y las lesiones histológicas glomeruloesclerosis segmentaria, fibrosis tubulointerstitial, la proteinuria y la hipertensión(68,69). De forma concordante en nuestro segundo estudio, encontramos una asociación entre pacientes con NIgA-C4d positivo y niveles más elevados de colesterol, proteinuria y una mayor proporción de tratamiento con ISRAA, sugiriendo la presencia de mayor daño renal y por tanto una mayor necesidad de tratamiento antiproteinúrico.

También encontramos un incremento en los niveles plasmáticos de C4a ( $m/z$  1898), un factor del complemento derivado del C4, el cuál actúa como un potente

agente inductor de inflamación(146) a través de la activación quimiotáctica monocitaria(36,147). Sogabe y colaboradores, reportaron un aumento significativo de los niveles séricos de C4a en pacientes con NIgA correlacionados con una mayor gravedad de las lesiones glomerulares. De forma consistente con el autor, encontramos un incremento significativo de los niveles plasmáticos de C4a en pacientes con NIgA-C4d positivo, evidenciando una asociación entre la activación del sistema del complemento y este grupo de pacientes.

Además, encontramos un incremento de los niveles urinarios de A1AT en pacientes con nefropatía IgA y depósitos de C4d. Como se ha descrito previamente, la A1AT se asocia a lesiones histológicas de mayor gravedad (IFTA y GE) consideradas como factores de mal pronóstico renal(148). En concordancia con los autores y con nuestro primer estudio, encontramos un incremento en los niveles urinarios de A1AT en pacientes con NIgA-C4d positivo sugiriendo la presencia de mayor daño renal.

Posteriormente, se diseñan las curvas ROC para ambos grupos, con la intención de establecer un potencial punto de corte que permitiera identificar pacientes con NIgA-C4d positivo, y que valorado en conjunto con la biopsia renal pudiera identificar un grupo de pacientes con peor pronóstico renal. Para esto se define el punto que maximizara la mejor sensibilidad y especificidad para cada uno de los péptidos estableciendo su capacidad discriminadora.

Nosotros proponemos que estos puntos de cortes pueden ser utilizados como método rutinario, considerando su positividad en pacientes con NIgA-C4d positivo y niveles superiores al punto definido, como herramienta confirmatoria diagnóstica, siendo esta determinación más rápida y de fácil obtención.

En cuánto a las lesiones histológicas, hemos encontrado una asociación entre la hiper celularidad endocapilar y la glomeruloesclerosis con el grupo de pacientes con NIgA-C4d positivo.

La proliferación endocapilar en pacientes con NIgA-C4d positivo, puede reflejar una respuesta a un proceso inflamatorio activo, que conlleva a la

fibrosis(14,148). En el estudio de validación de la clasificación de Oxford (VALIGA), se confirmó que la lesiones hiper celularidad mesangial, IFTA y la glomeruloesclerosis eran buenos predictores de la tasa de pérdida renal y de supervivencia. La hiper celularidad endocapilar cumplía esta condición al valorar pacientes con proteinuria <1 gr/24h o en pacientes que no habían recibido corticoterapia, lo que lo hacía un marcador pronóstico en el grupo de bajo riesgo (14). Sin embargo, en un estudio de marcadores pronósticos urinarios a través de técnicas proteómicas, se observó una asociación entre la lesión E1 y una peor evolución renal. (149).

Los estudios realizados en pacientes con NIgA C4d, encuentran una fuerte asociación entre la glomeruloesclerosis y el grupo con depósito de C4d en biopsias renales(69). En nuestro segundo estudio, observamos de forma consistente una correlación entre el grupo NIgA-C4d positivo y la glomeruloesclerosis segmentaria al momento del diagnóstico, reforzando la observación que este grupo de pacientes tienen peor pronóstico renal.

Finalmente, los resultados de los estudios aquí presentados, sugieren que las técnicas proteómicas pueden constituir una herramienta de ayuda en la práctica clínica, clasificando pacientes con peor evolución renal. La valoración de estos marcadores séricos, plasmáticos y urinarios en conjunto con la función renal, proteinuria y hallazgos histológicos, orientan hacia la identificación precoz de este perfil de pacientes, que se beneficiarían de terapias más específicas y de rápido inicio.

Nosotros planteamos continuar en la búsqueda de patrones proteómicos en la NIgA con la intención de definir un perfil específico de la enfermedad. Una vez validado, este perfil podría ser incluido en un futuro, como variable de estudio en ensayos clínicos dirigidos a encontrar nuevas dianas terapéuticas. Los beneficios de estos ensayos serían máximos en el grupo de pacientes de peor pronóstico y rápida evolución a la insuficiencia renal.

En conclusión, las técnicas proteómicas pueden aportar perfiles de péptidos en plasma, suero y orina de utilidad en la identificación de formas de nefropatía IgA

más agresivas. Proponemos que el análisis de los péptidos plasmáticos C4a, bradicinina, séricos A1AT y B2 microglobulina y urinarios A1AT y UMOD, de forma conjunta con la biopsia renal y con los parámetros clínicos como la proteinuria y los niveles de creatinina podrían dar soporte al diagnóstico y pronóstico en la nefropatía IgA. Del mismo modo, la determinación en orina y plasma de A1AT y C4a, así como la presencia de glomerulosclerosis, lesión tubulointersticial y la hiper celularidad endocapilar en la biopsia renal, pueden ayudar a establecer un diagnóstico precoz en pacientes con NlgA y depósitos de C4d, que requieren terapias más agresivas de inicio más temprano.

A pesar de ello nuestros estudios tienen algunas limitaciones. No pudimos confirmar que los péptidos urinarios de UMOD y A1AT estén relacionados específicamente con NlgA, y no así con la enfermedad renal crónica, principalmente por el grado de insuficiencia renal basal de nuestra población de estudio. Consideramos necesario diseñar nuevos ensayos incluyendo un mayor número de pacientes y afectos de diferentes enfermedades glomerulares con la intención de mitigar las limitaciones en su reproducibilidad y así obtener un perfil de péptido específico. Además, creemos que es necesario diseñar una fase de validación para confirmar que las asociaciones de los marcadores encontrados son reproducibles.

# CONCLUSIONES GENERALES

---

1. El uso de técnicas proteómicas demuestra ser una técnica eficaz para identificar un perfil de péptidos que diferencian pacientes con nefropatía IgA de controles sanos.
2. Los péptidos derivados de UMOD y A1AT se han asociado a las lesiones histológicas de mal pronóstico y presentan una correlación inversa y directa con el doble de la creatinina respectivamente, sugiriendo que UMOD y A1AT podrían ser indicadores de mal pronóstico renal.
3. Existe un aumento de la expresión plasmática de péptidos derivados de C4a en pacientes con NlgA-C4d positivo, demostrando la activación del complemento y su papel en la patogenia de formas de NlgA más agresivas.
4. Los pacientes con nefropatía IgA y depósitos de C4d presentan una asociación con los péptidos derivados de A1AT y C4a sugiriendo que dichos péptidos podrían ser potenciales marcadores de este grupo de pacientes.
5. Los péptidos urinarios derivados de A1AT y plasmáticos de C4a, presentan puntos de cortes que permiten discriminar entre pacientes con NlgA C4d positivo y C4d negativo.
6. La lesión hiper celularidad endocapilar se asocia de forma significativa al grupo de pacientes con NlgA-C4d positivo, pudiendo representar un factor de riesgo de progresión en la NlgA.

# LÍNEAS DE FUTURO

---

Posterior a nuestra investigación, nos hacemos algunas preguntas que podrían generar futuras investigaciones en la nefropatía IgA. Para esto proponemos utilizar técnicas proteómicas en fluidos incluyendo el obtenido a través del aislamiento de microvesículas, técnica disponible y de experiencia en nuestro equipo de investigación.

Es primordial diseñar estudios que permitan desarrollar una fase de validación de estos péptidos encontrados, incluyendo una cohorte mayor de pacientes y con otros tipos de glomerulopatías, de forma tal que pudieran clasificarse como propios de la NIgA.

Así mismo, creemos de importancia utilizar un perfil peptídico validado como variable de estudio de ensayos clínicos dirigidos a encontrar nuevas dianas terapéuticas y monitorizar la respuesta al tratamiento.

Un desafío actual es profundizar en el conocimiento del papel del complemento en la patogenia de la NIgA, ya que se ha demostrado que constituye un factor de mal pronóstico de la enfermedad.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Feehally J, Levy M, Monteiro RC. Jean Berger (1930–2011). *Kidney Int.* 2011;80(5):437–8.
2. Berger J, Hinglais N. [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. *J Urol Nephrol (Paris)* [Internet]. 1968 Sep [cited 2019 Aug 28];74(9):694–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4180586>
3. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet.* 2011;
4. Galla JH. IgA nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 1995 Feb [cited 2019 Aug 28];47(2):377–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815588145>
5. Li L-S, Liu Z-H. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China: analysis based on 13,519 renal biopsies. *Kidney Int* [Internet]. 2004 Sep [cited 2019 Aug 28];66(3):920–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815501385>
6. Crowley-Nowick PA, Julian BA, Wyatt RJ, Galla JH, Wall BM, Warnock DG, et al. IgA nephropathy in blacks: studies of IgA2 allotypes and clinical course. *Kidney Int* [Internet]. 1991 Jun [cited 2019 Aug 28];39(6):1218–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008525381557244X>
7. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(4):677–86.
8. McGrogan A, Franssen CFM, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2019 Aug 28];26(2):414–30. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfq665>
9. Utsunomiya Y, Koda T, Kado T, Okada S, Hayashi A, Kanzaki S, et al. Incidence of pediatric IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 Aug 28];18(6):511–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12720079>
10. Suzuki K, Honda K, Tanabe K, Toma H, Nihei H, Yamaguchi Y. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. *Kidney Int* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 Aug 28];63(6):2286–94.

Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815491501>

11. Waldherr R, Rambašek M, Duncker WD, Ritz E. Frequency of mesangial IgA deposits in a non-selected autopsy series. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 1989 [cited 2019 Aug 28];4(11):943–6. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/4.11.943>
12. Magistroni R, D'Agati VD, Appel GB, Kiryluk K. New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of IgA nephropathy. *Kidney International*. 2015.
13. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, et al. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. McCarthy MI, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 2012 Jun 21 [cited 2019 Aug 29];8(6):e1002765. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002765>
14. Coppo R, Troyanov S, Bellur S, Cattran D, Cook HT, Feehally J, et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. *Kidney Int*. 2014;86(4):828–36.
15. Coppo R DG. Factors predicting progression of IgA nephropathies. *J Nephrol* [Internet]. 2005;18(5):503–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299675>
16. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2000;36(2):227–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922300>
17. Nefrología SE de. Registro de Glomerulonefritis de la Sociedad Española de Nefrología. Evolución en 25 años. Available from: <https://www.senefro.org/contents/webstructure/REGN2018.pdf>
18. Wyatt RJ, Julian BA, Baehler RW, Stafford CC, McMorrow RG, Ferguson T, et al. Epidemiology of IgA nephropathy in central and eastern Kentucky for the period 1975 through 1994. Central Kentucky Region of the Southeastern United States IgA Nephropathy DATABANK Project. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1998 May [cited 2019 Aug 29];9(5):853–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596083>
19. Kerr MA. The structure and function of human IgA. Vol. 271, *Biochem. J*.

- 1990.
20. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2011;4(6):590–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2011.39>
  21. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T, Klinman D. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. 2014; Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  22. Cooper MD, Kincade PW, Bockman DE, Lawton AR. Origin, distribution and differentiation of IgA-producing cells. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 1974 [cited 2019 Aug 31];45(0):13–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4137873>
  23. Monteiro RC, van de Winkel JGJ. I G A F C R ECEPTORS . *Annu Rev Immunol*. 2003 Apr;21(1):177–204.
  24. Svenson M, Geborek P, Saxne T, Bendtzen K. Monitoring patients treated with anti-TNF-?? biopharmaceuticals: Assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies. *Rheumatology*. 2007;46(12):1828–34.
  25. Segarra A. Avances en el conocimiento de la patogenia de la nefropatía IgA: ¿nuevas perspectivas para un futuro inmediato? *Nefrologia*. 2010;30(5):501–7.
  26. Barratt J, Feehally J. Primary IgA Nephropathy: New Insights Into Pathogenesis. *Semin Nephrol*. 2011;
  27. Barker C V., Wyatt RJ, Novak J, Moldoveanu Z, Lifton RP, Gharavi AG, et al. Aberrant IgA1 Glycosylation Is Inherited in Familial and Sporadic IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008;
  28. Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, Lellouch AC, et al. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc $\alpha$  receptor interactions. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):2260–72.
  29. Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, Van Gijlswijk-Janssen D, Redwan ERM, et al. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):20140–53.
  30. Field MC, Amatayakul-Chantler S, Rademacher TW, Rudd PM, Dwek RA. Structural analysis of the N-glycans from human immunoglobulin A1:

- Comparison of normal human serum immunoglobulin A1 with that isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem J.* 1994;299(1):261–75.
31. Berthelot L, Papista C, Maciel TT, Biarnes-Pelicot M, Tissandie E, Wang PHM, et al. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med.* 2012;209(4):793–806.
  32. Morton HC, Brandtzaeg P. CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2001 [cited 2019 Aug 31];49(3):217–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478396>
  33. Hamre R, Farstad IN, Brandtzaeg P, Morton HC. Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR gamma chain on myeloid cells in blood and tissue. *Scand J Immunol* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 Aug 31];57(6):506–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791088>
  34. Yoo EM, Trinh KR, Lim H, Wims LA, Morrison SL. Characterization of IgA and IgM binding and internalization by surface-expressed human Fc $\alpha$ / $\mu$  receptor. *Mol Immunol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2019 Aug 31];48(15–16):1818–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632111>
  35. Wold AE, Mestecky J, Tomana M, Kobata A, Ohbayashi H, Endo T, et al. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun* [Internet]. 1990 Sep [cited 2019 Aug 31];58(9):3073–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2201644>
  36. Gaya da Costa M, Poppelaars F, Berger SP, Daha MR, Seelen MA. The lectin pathway in renal disease: old concept and new insights. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2018;(April):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29701808>
  37. Floege J, Moura IC, Daha MR. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Immunopathol.* 2014;36(4):431–42.
  38. Roos A. Glomerular Activation of the Lectin Pathway of Complement in IgA Nephropathy Is Associated with More Severe Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;

39. Daha MR, van Kooten C. Role of complement in IgA nephropathy. *J Nephrol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 Aug 31];29(1):1–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567162>
40. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006;17(6):1724–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687629>
41. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, et al. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 Aug 31];22(10):1795–803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949093>
42. Barratt J, Feehally J. IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:2088–97.
43. Boyd JK, Cheung CK, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney International*. 2012.
44. Roos A, van Gijlswijk-Janssen DJ, Eijgenraam J-W, van Kooten C, Royle L, Rudd PM, et al. Differential Glycosylation of Polymeric and Monomeric IgA: A Possible Role in Glomerular Inflammation in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2006;
45. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Vu HL, Novak L, et al. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest*. 2008;118(2):629–39.
46. Buck KS, Smith AC, Molyneux K, El-Barbary H, Feehally J, Barratt J. B-cell O-galactosyltransferase activity, and expression of O-glycosylation genes in bone marrow in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2008;73(10):1128–36.
47. Zhu L, Tang W, Li G, Lv J, Ding J, Yu L, et al. Interaction between variants of two glycosyltransferase genes in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2009 Jul;76(2):190–8.
48. Tang SCW, Lai KN. The ubiquitin-proteasome pathway and IgA nephropathy: A novel link? Vol. 75, *Kidney International*. Nature Publishing Group; 2009. p. 457–9.

49. Suzuki H. Biomarkers for IgA nephropathy on the basis of multi-hit pathogenesis. *Clin Exp Nephrol* [Internet]. 2019;23(1):26–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10157-018-1582-2>
50. Julian BA, Mariat C, Berthoux F, Novak J, Maillard N, Suzuki H, et al. Autoantibodies Targeting Galactose-Deficient IgA1 Associate with Progression of IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;
51. Cragg MS, Berthelot L, Van Egmond M, Breedveld A. IgA and Fc $\alpha$ RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Immunol* | [wwwfrontiersinorg](http://www.frontiersin.org) [Internet]. 2019;1:553. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
52. Barratt J, Feehally J. Primary IgA Nephropathy: New Insights Into Pathogenesis. *Semin Nephrol* [Internet]. 2011;31(4):349–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2011.06.006>
53. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Mariat C, et al. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2019 Sep 4];23(9):1579–87. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2012010053>
54. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;
55. Molyneux K, Wimbury D, Pawluczyk I, Muto M, Bhachu J, Mertens PR, et al.  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells. *Kidney Int* [Internet]. 2017 [cited 2019 Sep 5];92(6):1458–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28750925>
56. Hashimoto A, Suzuki Y, Suzuki H, Ohsawa I, Brown R, Hall S, et al. Determination of severity of murine IgA nephropathy by glomerular complement activation by aberrantly glycosylated IgA and immune complexes. *Am J Pathol* [Internet]. 2012;181(4):1338–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.038>
57. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, Kiryluk K, Gharavi A, Fremeaux-Bacchi V, et al. Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015 Jul [cited 2019 Sep 5];26(7):1503–12. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25694468>
58. Floege J, Daha MR. IgA nephropathy: new insights into the role of complement. *Kidney Int* [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 5];94(1):16–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29933843>
  59. Paunas TIF, Finne K, Leh S, Marti H-P, Mollnes TE, Berven F, et al. Glomerular abundance of complement proteins characterized by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli associates with progressive disease in IgA nephropathy. *Clin Proteomics*. 2017 Dec;14(1).
  60. Tortajada A, Gutierrez E, Pickering MC, Praga Terente M, Medjeral-Thomas N. The role of complement in IgA nephropathy. *Mol Immunol* [Internet]. 2019 Jul 24 [cited 2019 Sep 5];114:123–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31351413>
  61. Wyatt RJ, Julian BA. *Medical progress: IgA nephropathy*. Vol. 368, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2013. p. 2402–14.
  62. Knoppova B, Reily C, Maillard N, Rizk D V, Moldoveanu Z, Mestecky J, et al. The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Sep 5];7:117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148252>
  63. Wyatt RJ, Kanayama Y, Julian BA, Negoro N, Sugimoto S, Hudson EC, et al. Complement activation in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 1987;31(4):1019–23.
  64. Guo W-Y, Zhu L, Meng S-J, Shi S-F, Liu L-J, Lv J-C, et al. Mannose-Binding Lectin Levels Could Predict Prognosis in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017 Nov [cited 2019 Sep 5];28(11):3175–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28698271>
  65. Liu LL, Liu N, Chen Y, Wang LN, Jiang Y, Wang J, et al. Glomerular mannose-binding lectin deposition is a useful prognostic predictor in immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Immunol*. 2013;174(1):152–60.
  66. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev* [Internet]. 2016 Nov [cited 2019 Sep 5];274(1):74–97. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12468>

67. Kawashiri SY, Kawakami A, Iwamoto N, Fujikawa K, Satoh K, Tamai M, et al. The power Doppler ultrasonography score from 24 synovial sites or 6 simplified synovial sites, including the metacarpophalangeal joints, reflects the clinical disease activity and level of serum biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2011;50(5):962–5.
68. Segarra-medrano A, Carnicer-caceres C, Valtierra-carmeno N. Estudio de las variables asociadas a la activación local del complemento en la nefropatía IgA idiopática. *Nefrología [Internet]*. 2017;7(x x):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2016.11.019>
69. Espinosa M, Ortega R, Sanchez M, Segarra A, Salcedo MT, Gonzalez F, et al. Association of C4d deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(5):897–904.
70. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J Immunol [Internet]*. 2001 Sep 1 [cited 2019 Sep 5];167(5):2861–8. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.167.5.2861>
71. Kriz W. Maintenance and Breakdown of Glomerular Tuft Architecture. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 2018 [cited 2019 Sep 5];29(4):1075–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29535166>
72. Daniel L, Saingra Y, Giorgi R, Bouvier C, Pellissier JF, Berland Y. Tubular lesions determine prognosis of IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2000;35(1):13–20.
73. Yu X-Q, Li M, Zhang H, Low H-Q, Wei X, Wang J-Q, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies multiple susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet [Internet]*. 2012 Feb 25 [cited 2019 Sep 5];44(2):178–82. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.1047>
74. Schiemann B. An Essential Role for BAFF in the Normal Development of B Cells Through a BCMA-Independent Pathway. *Science (80- ) [Internet]*. 2001 Sep 14 [cited 2019 Sep 5];293(5537):2111–4. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1061964>
75. Zhai Y-L, Zhu L, Shi S-F, Liu L-J, Lv J-C, Zhang H. Increased APRIL Expression Induces IgA1 Aberrant Glycosylation in IgA Nephropathy.

- Medicine (Baltimore) [Internet]. 2016 Mar [cited 2019 Sep 5];95(11):e3099. Available from:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201603150-00057>
76. Zheng F, Kundu GC, Zhang Z, Ward J, DeMayo F, Mukherjee AB. Uteroglobin is essential in preventing immunoglobulin A nephropathy in mice. *Nat Med* [Internet]. 1999 Sep 1 [cited 2019 Sep 5];5(9):1018–25. Available from: [http://www.nature.com/articles/nm0999\\_1018](http://www.nature.com/articles/nm0999_1018)
  77. Gharavi AG, Yan Y, Scolari F, Schena FP, Frasca GM, Ghiggeri GM, et al. IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22–23. *Nat Genet* [Internet]. 2000 Nov [cited 2019 Sep 5];26(3):354–7. Available from:  
[http://www.nature.com/articles/ng1100\\_354](http://www.nature.com/articles/ng1100_354)
  78. Bertinetto FE, Calafell F, Roggero S, Chidichimo R, Garino E, Marcuccio C, et al. Search for genetic association between IgA nephropathy and candidate genes selected by function or by gene mapping at loci IGAN2 and IGAN3. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 Sep 5];27(6):2328–37. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfr633>
  79. Pouria S, Feehally J. Glomerular IgA deposition in liver disease. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2019 Sep 5];14(10):2279–82. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article/14/10/2279/1805982>
  80. Beaufils H1, Jouanneau C, Katlama C, Sazdovitch V HJ. HIV-associated IgA nephropathy--a post-mortem study. - PubMed - NCBI. [cited 2019 Sep 5]; Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=7724026>
  81. Coppo R. Clinical and histological risk factors for progression of IgA nephropathy: an update in children, young and adult patients. *Journal of Nephrology*. 2017.
  82. Chee Kay Cheung, PhD M, Jonathan Barratt, PhD F. Clinical presentation and diagnosis of IgA nephropathy. *UpToDate*. 2019;
  83. Herlitz LC, Bomback AS, Stokes MB, Radhakrishnan J, D'Agati VD, Markowitz GS. IgA Nephropathy with Minimal Change Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2014 Jun 6 [cited 2019 Sep 5];9(6):1033–9.

Available from:

<http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.11951113>

84. Lv J, Yang Y, Zhang H, Chen W, Pan X, Guo Z, et al. Prediction of Outcomes in Crescentic IgA Nephropathy in a Multicenter Cohort Study. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2019 Sep 5];24(12):2118–25. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2012101017>
85. Kiryluk K, Julian BA, Wyatt RJ, Scolari F, Zhang H, Novak J, et al. Genetic studies of IgA nephropathy: past, present, and future. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2010 Nov 13 [cited 2019 Sep 5];25(11):2257–68. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-010-1500-7>
86. Sevillano AM, Diaz M, Caravaca-Fontán F, Barrios C, Bernis C, Cabrera J, et al. IgA Nephropathy in Elderly Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2019 Aug 7 [cited 2019 Sep 5];14(8):1183–92. Available from: <http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.13251118>
87. Barbour SJ, Coppo R, Zhang H, Liu ZH, Suzuki Y, Matsuzaki K, et al. Evaluating a New International Risk-Prediction Tool in IgA Nephropathy. *JAMA Intern Med*. 2019;179(7).
88. Berthoux F, Mariat C, Thibaudin L, Afiani A, Mohey H, Laurent B. Predicting the Risk for Dialysis or Death in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;
89. Orth SR, Stöckmann A, Conradt C, Ritz E, Ferro M, Kreuzer W, et al. Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney Int* [Internet]. 1998 Sep [cited 2019 Sep 5];54(3):926–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815307109>
90. Sevillano AM, Cabrera J, Gutiérrez E, Morales E, Mérida E, Huerta A, Cavero T, Hernández E, Moreno JA PM. Malignant hypertension: a type of IgA nephropathy manifestation with poor prognosis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Sep 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sevillano+AND+malignant+hypertension>
91. El Karoui K, Hill GS, Karras A, Jacquot C, Moulonguet L, Kourilsky O, et al. A Clinicopathologic Study of Thrombotic Microangiopathy in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2019 Sep

- 5];23(1):137–48. Available from:  
<http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2010111130>
92. Coppo R. IgA Nephropathy: A European Perspective in the Corticosteroid Treatment. *Kidney Dis* [Internet]. 2018 Jun [cited 2019 Sep 5];4(2):58–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29998120>
93. Noris M, Mescia F, Remuzzi G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2012 Nov 18 [cited 2019 Sep 5];8(11):622–33. Available from:  
<http://www.nature.com/articles/nrneph.2012.195>
94. Gutiérrez E. IgA nephropathy: is a new approach beyond proteinuria necessary? *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2019 Feb 18 [cited 2019 Feb 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30778825>
95. Gutiérrez E. IgA nephropathy: is a new approach beyond proteinuria necessary? *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2019 May 18 [cited 2019 Sep 5];34(5):921–4. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30778825>
96. Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L, Cattran DC. Predicting progression in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2001 Oct [cited 2019 Sep 5];38(4):728–35. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11576875>
97. Iijima K, Yoshikawa N, Shiozawa S, Matsuyama S, Kobayashi K, Yoshiya K, et al. Immune Abnormalities and Clinical Course in Childhood IgA Nephropathy. *Nephron* [Internet]. 1990 [cited 2019 Sep 5];56(3):255–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2077407>
98. Coppo R, Troyanov S, Camilla R, Hogg RJ, Cattran DC, Cook HT, et al. The Oxford IgA nephropathy clinicopathological classification is valid for children as well as adults. *Kidney Int*. 2010;77(10):921–7.
99. Tesar V, Troyanov S, Bellur S, Verhave JC, Cook HT, Feehally J, et al. Corticosteroids in IgA Nephropathy: A Retrospective Analysis from the VALIGA Study. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015 Sep [cited 2019 Sep 5];26(9):2248–58. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677392>
100. Shen XH, Liang SS, Chen HM, Le WB, Jiang S, Zeng CH, et al. Reversal of active glomerular lesions after immunosuppressive therapy in patients

- with IgA nephropathy: a repeat-biopsy based observation. *J Nephrol*. 2015;28(4):441–9.
101. Haas M, Verhave JC, Liu Z-H, Alpers CE, Barratt J, Becker JU, et al. A Multicenter Study of the Predictive Value of Crescents in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017 Feb [cited 2019 Sep 5];28(2):691–701. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2016040433>
  102. Zhao N, Hou P, Lv J, Moldoveanu Z, Li Y, Kiryluk K, et al. The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney Int* [Internet]. 2012 Oct [cited 2019 Sep 5];82(7):790–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815556342>
  103. Rizk D V., Saha MK, Hall S, Novak L, Brown R, Huang Z-Q, et al. Glomerular Immunodeposits of Patients with IgA Nephropathy Are Enriched for IgG Autoantibodies Specific for Galactose-Deficient IgA1. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2019 Aug 23 [cited 2019 Aug 30];ASN.2018111156. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2018111156>
  104. Smith A, L'Imperio V, De Sio G, Ferrario F, Scalia C, Dell'Antonio G, et al.  $\alpha$ -1-Antitrypsin detected by MALDI imaging in the study of glomerulonephritis: Its relevance in chronic kidney disease progression. *Proteomics* [Internet]. 2016 Jun [cited 2019 Sep 2];16(11–12):1759–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201500411>
  105. Kwak NJ, Wang EH, Heo IY, Jin DC, Cha JH, Lee KH, et al. Proteomic analysis of alpha-1-antitrypsin in immunoglobulin A nephropathy. *Proteomics - Clin Appl*. 2007;1(4):420–8.
  106. Pérez V, Navarro-Muñoz M, Bayés B, Lauzurica R, Pastor MC, Troya M, et al. Effect of Low Doses of Atorvastatin on the Urinary Peptide Profile of Kidney Transplant Patients. *Transplant Proc* [Internet]. 2009;41(6):2111–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.170>
  107. Navarro-Muñoz M, Ibernón M, Bonet J, Pérez V, Pastor MC, Bayés B, et al. Uromodulin and  $\alpha$ 1-antitrypsin urinary peptide analysis to differentiate glomerular kidney diseases. *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(5):314–25.
  108. Lemley K V, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, et al.

- Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2002 Apr [cited 2019 Sep 5];61(4):1475–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008525381548370X>
109. Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK, Wharram BL, Shedden KA, Misek DE, et al. Podocyte hypertrophy, &quot;adaptation,&quot; and &quot;decompensation&quot; associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2019 Sep 5];16(10):2953–66. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2005050488>
  110. Good DM, Zürbig P, Argilés A, Bauer HW, Behrens G, Coon JJ, et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2010 Nov [cited 2019 Jul 15];9(11):2424–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616184>
  111. Heybeli C, Unlu M, Yildiz S, Çavdar C, Sarioglu S, Camsari T. IgA nephropathy: Association of C4d with clinical and histopathological findings and possible role of IgM. *Ren Fail*. 2015;37(9):1464–9.
  112. Sahin OZ, Yavas H, Taslı F, Gibyeli DG, Ersoy R, Uzum A, et al. Prognostic value of glomerular C4d staining in patients with IgA nephritis. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 9];7(6):3299–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031752>
  113. Endo M. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 1998 Aug 1 [cited 2019 Sep 5];13(8):1984–90. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/13.8.1984>
  114. Ouyang Y, Zhu L, Shi M, Yu S, Jin Y, Wang Z, et al. A Rare Genetic Defect of MBL2 Increased the Risk for Progression of IgA Nephropathy. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Mar 22 [cited 2019 Sep 6];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00537/full>
  115. Pirulli D, Boniotto M, Vatta L, Crovella S, Spano A, Morgutti M, et al. Polymorphisms in the promoter region and at codon 54 of the MBL2 gene are not associated with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2019 Sep 6];16(4):759–64. Available from:

- <http://academic.oup.com/ndt/article/16/4/759/1808823>
116. Haapasalo K, Meri S. Regulation of the Complement System by Pentraxins. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Aug 2 [cited 2019 Sep 6];10. Available from:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01750/full>
  117. Medjeral-Thomas NR, Troldborg A, Constantinou N, Lomax-Browne HJ, Hansen AG, Willicombe M, et al. Progressive IgA Nephropathy Is Associated With Low Circulating Mannan-Binding Lectin–Associated Serine Protease-3 (MASP-3) and Increased Glomerular Factor H–Related Protein-5 (FHR5) Deposition. *Kidney Int Reports* [Internet]. 2018 Mar [cited 2019 Sep 5];3(2):426–38. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468024917304515>
  118. Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E, Anter J, Segarra A, Espinosa M, et al. Elevated factor H–related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2017 Oct [cited 2019 Sep 6];92(4):953–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253817302545>
  119. Coppo R, Peruzzi L, Loiacono E, Bergallo M, Krutova A, Russo ML, et al. Defective gene expression of the membrane complement inhibitor CD46 in patients with progressive immunoglobulin A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2019 Sep 5];34(4):587–96. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article/34/4/587/4964991>
  120. Ademowo OS, Hernandez B, Collins E, Rooney C, Fearon U, van Kuijk AW, et al. Discovery and confirmation of a protein biomarker panel with potential to predict response to biological therapy in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014;1–8. Available from:  
<http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/annrheumdis-2014-205417>  
<http://ard.bmj.com/content/early/2014/09/03/annrheumdis-2014-205417.abstract>
  121. Siwy J, Mischak H, Zürbig P. Proteomics and personalized medicine: a focus on kidney disease. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2019 Sep 2 [cited 2019 Sep 6];16(9):773–82. Available from:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14789450.2019.1659138>
  122. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: New

- technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* [Internet]. 1998 Aug [cited 2019 Sep 6];19(11):1853–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740045>
123. Latosinska A, Frantzi M, Vlahou A, Merseburger AS, Mischak H. Clinical Proteomics for Precision Medicine: The Bladder Cancer Case. *Proteomics Clin Appl* [Internet]. 2018 Mar [cited 2019 Sep 6];12(2):1700074. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prca.201700074>
124. Niwa T. Biomarker discovery for kidney diseases by mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2008;870(2):148–53.
125. Siwy J, Zürbig P, Argiles A, Beige J, Haubitz M, Jankowski J, et al. Noninvasive diagnosis of chronic kidney diseases using urinary proteome analysis. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2019 Sep 3];32(12):2079–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27984204>
126. Julian BA, Wittke S, Haubitz M, Zürbig P, Schiffer E, McGuire BM, et al. Urinary biomarkers of IgA nephropathy and other IgA-associated renal diseases. *World J Urol*. 2007;25(5):467–76.
127. Marek-Bukowiec K, Konieczny A, Ratajczyk K, Witkiewicz W. Candidate Urine Peptide Biomarkers for IgA Nephropathy: Where Are We Now? *Dis Markers* [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 2];2018:5205831. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29606986>
128. Pérez V, Ibernón M, López D, Pastor MC, Navarro M, Navarro-Muñoz M, et al. Urinary peptide profiling to differentiate between minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS One*. 2014;9(1):1–9.
129. Pérez V, Navarro-Muñoz M, Mas S, Bayés B, Pastor MC, Martínez-Cáceres E, et al. Proteomic approach to the study of statin pleiotropy in kidney transplant patients. *Pharmacology*. 2011;87(3–4).
130. Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, Holland EC, et al. Serum Peptide Profiling by Magnetic Particle-Assisted, Automated Sample Processing and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2004;76(6):1560–70.
131. Pérez V, López D, Boixadera E, Ibernón M, Espinal A, Bonet J, et al.

- Comparative differential proteomic analysis of minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *BMC Nephrol.* 2017;18(1):1–9.
132. Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, Walden M, Rupprecht HD, Floege J, et al. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2005;67(6):2313–20.
133. Shui HA, Huang TH, Ka SM, Chen PH, Lin YF, Chen A. Urinary proteome and potential biomarkers associated with serial pathogenesis steps of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(1):176–85.
134. Smith A, L'Imperio V, De Sio G, Ferrario F, Scalia C, Dell'Antonio G, et al.  $\alpha$ -1-Antitrypsin detected by MALDI imaging in the study of glomerulonephritis: Its relevance in chronic kidney disease progression. *Proteomics.* 2016;16(11–12):1759–66.
135. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, Kotanko P, Lhotta K, Jennings P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant [Internet].* 2010;25(6):1896–903. Available from: <http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ndt/gfp748>
136. Vyletal P, Bleyer AJ, Kmoch S. Uromodulin biology and pathophysiology - An update. Vol. 33, *Kidney and Blood Pressure Research.* 2010. p. 456–75.
137. Lhotta K. Uromodulin and chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res [Internet].* 2010;33(5):393–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20948228>
138. Obara T, Mizoguchi S, Shimozuru Y, Sato T, Hotta O. The complex of immunoglobulin A and uromodulin as a diagnostic marker for immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2012 Oct;16(5):713–21.
139. Wu J, Wang N, Wang J, Xie Y, Li Y, Liang T, et al. Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010;24(14):1971–8.
140. Kang SH, Choi SR, Park HS, Lee JY, Sun IO, Hwang HS, et al. The Oxford classification as a predictor of prognosis in patients with IgA nephropathy. Vol. 27, *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2012. p. 252–8.

141. Rocchetti MT, Papale M, D'Apollo AM, Suriano IV, Di Palma AM, Vocino G, et al. Association of Urinary Laminin G-Like 3 and Free K Light Chains with Disease Activity and Histological Injury in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(7):1115–25.
142. Tomita H, Sanford RB, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2012 Apr [cited 2019 Sep 3];81(8):733–44. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318421>
143. Liu W, Stanton RC, Zhang Z. The kallikrein-kinin system in diabetic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [Internet]. 2017 [cited 2019 Sep 3];26(5):351–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538015>
144. Pereira RL, Buscariollo BN, Corrêa-Costa M, Semedo P, Oliveira CD, Reis VO, et al. Bradykinin receptor 1 activation exacerbates experimental focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2011;79(11):1217–27.
145. Schanstra JP, Zürbig P, Alkhalaf A, Argiles A, Bakker SJL, Beige J, et al. Diagnosis and Prediction of CKD Progression by Assessment of Urinary Peptides. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 Sep 3];26(8):1999–2010. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589610>
146. Sogabe A, Uto H, Kanmura S, Nosaki T, Oyamada M, Tokunaga K, et al. Correlation of serum levels of complement C4a desArg with pathologically estimated severity of glomerular lesions and mesangial hypercellularity scores in patients with IgA nephropathy. *Int J Mol Med*. 2013;32(2):307–14.
147. Tsuruta T, Yamamoto T, Matsubara S, Nagasawa S, Tanase S, Tanaka J, et al. Novel function of C4a anaphylatoxin. Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis. *Am J Pathol*. 1993;142(6):1848–57.
148. Roberts ISD. Oxford classification of immunoglobulin A nephropathy: An update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22(3):281–6.
149. Kalantari S, Rutishauser D, Samavat S, Nafar M, Mahmudieh L, Rezaei-Tavirani M, et al. Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA

nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. PLoS One. 2013;8(12).

# ANEXOS

---

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Poor histological lesions in IgA nephropathy may be reflected in blood and urine peptide profiling

Fredzzia Graterol<sup>1†</sup>, Maribel Navarro-Muñoz<sup>1,2†</sup>, Meritxell Ibernon<sup>1†</sup>, Dolores López<sup>3</sup>, Maria-Isabel Troya<sup>1</sup>, Vanessa Pérez<sup>1,2</sup>, Josep Bonet<sup>1,2</sup> and Ramón Romero<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** IgA nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis worldwide, leading to renal failure in 15% to 40% of cases. IgAN is diagnosed by renal biopsy, an invasive method that is not risk-free. We used blood and urine peptide profiles as a noninvasive method of linking IgAN-associated changes with histological lesions by Oxford classification.

**Methods:** We prospectively studied 19 patients with biopsy-proven IgAN and 14 healthy subjects from 2006 to 2009, excluding subjects with crescentic glomerulonephritis and collecting clinical and biochemical data at the time of diagnosis and during follow-up (24 months). Histological lesions were evaluated by Oxford classification. Proteomic analysis was performed by combining magnetic bead (MB) technology and mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to obtain peptide profiles. Doubling of serum creatinine was considered a variable of poor renal prognosis.

**Results:** We identified 55 peptides—13 in serum, 26 in plasma, and 16 in urine—that differentiated IgAN patients from healthy subjects. A significant association was noted between serum/plasma and urine peptides and histological findings—ie, tubulointerstitial damage, segmental glomerulosclerosis, and endocapillary injury. We also identified 3 peptides—corresponding to bradykinin, uromodulin, and alpha-1-antitrypsin—that were associated with severity of lesions, such as tubulointerstitial damage and segmental glomerulosclerosis. Moreover, blood peptides with *m/z* 2953, 5337, 9287, and 9289 and urine peptides with *m/z* 1769, 1898, 1913, 1945, 2491, 2756, 2977, 3004, 3389, and 4752 correlated significantly with poor renal function.

**Conclusions:** In patients with IgAN, the use of noninvasive approaches, such as blood and urine proteomics, can provide valuable information beyond that of standard diagnostic techniques, allowing us to identify blood and urine peptide profiles that are associated with poor histological lesions in IgAN patients.

## Background

IgA nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis worldwide and is a significant cause of renal disease, leading to end-stage renal disease (ESRD) in 15% to 40% of patients after 20–25 years of follow-up [1]. For this reason, methods must be developed to make an early diagnosis. Several clinical risk factors, such as male gender, hypertension, increased serum

creatinine level, proteinuria >1 g/day, and absence of hematuria, are associated with a poor prognosis [2]. Further, histopathological findings at the time of diagnosis, such as glomerulosclerosis and chronic tubulointerstitial damage, are also predictors of poor renal outcome [3–5].

A diagnosis of IgAN is biopsy-proven, based on pathological criteria that include the presence of diffuse mesangial IgA deposits by immunofluorescence. The Oxford classification is a recent histological classification system that is based on 4 scores: interstitial fibrosis/tubular atrophy (IFTA), segmental glomerulosclerosis, endocapillary hypercellularity, and mesangial hypercellularity [6,7]. This new assessment has demonstrated that each variable correlates with clinical outcome [8,9].

\* Correspondence: ramon.romero@uab.es

†Equal contributors

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Germans Trias i Pujol Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Carretera de Canyet, s/n 08916-Badalona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Health Sciences Research Institute "Germans Trias i Pujol", Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n, 08916-Badalona, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

In the past decade, proteomics has been applied extensively to various fields of medicine, including nephrology [10-15]—particularly in urine, because it can be obtained noninvasively, allowing one to identify glomerular kidney disease (GKD)-related markers [16-26]. Profiling methods are gaining popularity in the quest for new putative biomarkers for glomerular disorders [27-35]. Magnetic bead (MB)-based fractionation methods, coupled with MALDI-TOF MS, were introduced recently as a urinary peptide profiling strategy [36-38] and have emerged as a suitable platform for rapid, high-throughput analysis.

The main objective of our study was to identify peptide profiles in blood and urine that are associated with IgAN and its histological lesions.

## Methods

### Study population

This prospective study was performed between June 2006 and November 2009 in the Nephrology Department, Germans Trias i Pujol Hospital (Barcelona, Spain). All procedures were conducted per the Declaration of Helsinki of 1971, as revised in 2008. The Clinical Research Ethics Committee of Germans Trias i Pujol Hospital approved the study protocol, and all patients gave written informed consent to participate.

### Study procedures

For inclusion, patients had to be aged older than 18 years; show clinical signs of renal disease, such as proteinuria with stable renal function or various degrees of renal

failure and the presence of hematuria; and be indicated for renal biopsy. Only patients with primary IgAN were included. Patients with crescentic glomerulonephritis were excluded.

Healthy subjects were used as controls to establish a normal peptide profile.

### Measurement of clinical and biochemical parameters

The following clinical data were collected at the time of diagnosis: age, gender, history of hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia. Biochemical data were collected at the time of study and after 2 years of follow-up: serum levels of creatinine, uric acid, albumin, and cholesterol; and proteinuria. Statin therapy and antihypertensive treatments that were based on renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)-blocking drugs, such as angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) and angiotensin II receptor blockers (ARB), were recorded (Table 1).

### Renal biopsy

Percutaneous renal biopsies were performed and processed routinely for light, immunofluorescence, and electron microscopy per standard procedures.

Light microscopy sections were stained with hematoxylin/eosin, Schiff's periodic acid, methenamine silver, Masson trichrome, and Congo red.

At the time of the biopsy, a single pathologist reviewed all renal biopsy slides and scored the pathological variables per the Oxford classification as follows:

**Table 1 Demographic, clinical, and biochemical data of IgAN patients**

	IgAN patients	
	At the time of initial biopsy	At the end of follow-up
Number of patients	19	
Age, years	42 (33-52)	44 (35-54)
Gender (Male), n (%)	15 (79)	
Hypertension (Yes), n (%)	12 (63)	
Diabetes (Yes), n (%)	1 (5)	
Dyslipidemia (Yes), n (%)	9 (47)	
Serum creatinine, mg/dl	2.00 (1.40-2.57)	3.16 <sup>a</sup> (1.26-6.18)
Uric acid, mg/dl	7.40 (5.45-8.30)	7.40 (6.55-9.20)
Serum albumin, g/l	34.00 (31.00-39.00)	40.00 <sup>a</sup> (36.75-42.40)
Cholesterol, mg/dl	194.00 (157.00-221.75)	147.00 <sup>a</sup> (131.50-213.00)
Proteinuria, g/24 hours	2.28 (1.20-4.26)	1.30 (0.52-3.27)
RAAS blockade (Yes), n (%)	7 (37)	
ACEI	5 (26)	
ARB	1 (5)	
ACEI plus ARB	1 (5)	
Statins (Yes), n (%)	4 (21)	

Data are expressed as median and ranges. <sup>a</sup>Significant Wilcoxon test ( $P < 0.05$ ) in IgAN patients between the time of initial biopsy and the end of follow-up. RAAS: renin-angiotensin-aldosterone system; ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB: angiotensin II receptor blockers.

IFTA  $\leq 25\%$  (T0), 26% to 50% (T1) or  $>50\%$  (T2); segmental glomerulosclerosis absent (S0) or present (S1); endocapillary hypercellularity absent (E0) or present (E1); and mesangial hypercellularity  $\leq 0.5$  (M0) or  $> 0.5$  (M1) [6].

#### Blood samples

Blood samples were collected from the participants on the same day that the renal biopsy was performed. Serum and plasma-EDTA samples were obtained by centrifugation at 2200 g for 10 min, aliquoted to avoid freeze-thaw cycles, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

#### Urine samples

Fresh, first-morning urine samples were collected from the participants on the same day that the renal biopsy was performed. Briefly, urine samples were centrifuged at 2100 g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to remove particulate material and cellular debris. The supernatant was adjusted to 6.5 pH with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1 M) to minimize precipitation during storage, aliquoted to avoid freeze-thaw cycles, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use [36]. Protease inhibitors were not added. Normalization of the samples to urinary protein concentration was not necessary to analyze peptide profiles [38].

#### Peptide enrichment and identification by MALDI-TOF MS analysis

Peptides in serum and plasma (80  $\mu\text{l}$ ) and urine supernatant (110  $\mu\text{l}$ ) were extracted using MB. The profiling kit that we used to analyze blood samples was the MB-IMAC Cu kit (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), which is based on the affinity of peptides to immobilized copper ions on the surface of MB. In the urine samples, the beads that we used were coated with C18 aliphatic chains, wherein peptides were captured by hydrophobic interactions (Dynabeads<sup>®</sup> RP-C18, Invitrogen, the Netherlands).

Each serum, plasma, and urine sample was processed in duplicate, and each duplicate was spotted twice on the MALDI target (AnchorChip 600/384, Bruker Daltonics). Thus, 4 MALDI spectra were obtained for each sample, acquired for  $m/z$  values from 1000 to 10,000. ClinProTools (v2.0; Bruker Daltonics) was used to analyze peptide profiles, subtract baseline values, and normalize the spectra. Further details on the MALDI-TOF MS analysis are described in our previous report [38,39].

#### Statistical analysis

Normality of the variables was assessed by Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables were expressed as median and range and were compared by Mann-Whitney  $U$ -test or Kruskal-Wallis test, as appropriate. Wilcoxon test was performed for paired samples as required to

assess differences at the end of follow-up. Categorical variables were analyzed using chi-square or Fisher's exact probability test. Associations between variables were assessed using the Spearman correlation coefficient.

Statistical analyses were performed using SPSS, v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A two-tailed  $p$ -value of  $<0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### Patients

Nineteen IgAN patients were enrolled, and 14 healthy subjects were included in the study as controls. The baseline clinical and biochemical characteristics of the IgAN patients are summarized in Table 1. Healthy subjects ranged in age from 26 to 41 years (median 30 years); 6 were male (43%). The entire control group had normal renal function without hematuria or proteinuria, and none was treated.

Significant differences were observed between IgAN patients and healthy subjects with regard to age and renal function but not gender. Also, we compared clinical and biochemical variables at the time of biopsy with those at the end of the follow-up (24 months) (Table 1). During the follow-up, 5 patients (26.3%) with impaired serum creatinine doubled their serum creatinine levels. In contrast, proteinuria levels fell, albeit insignificantly. Further, serum cholesterol and serum albumin levels differed significantly between baseline and at the end of the follow-up.

### Identification of IgAN-related peptides in blood and urine

The blood and urinary peptide profiles of IgAN patients differed significantly from those of healthy subjects; using ClinProTools, we obtained 13 differential peaks in serum, 26 in plasma, and 16 in urine that discriminated IgAN patients from healthy subjects and achieved statistical significance (Additional file 1). Two peaks in plasma and 6 peaks in urine were identified in our earlier reports [38,39].

Our results suggest that peptides that were detected in plasma by MALDI-TOF at  $m/z = 1063$  and  $m/z = 1898$  correspond to bradykinin (KNG1) and complement factor C4 (C4A), respectively [39]. Similarly, peptides that were detected in urine by MALDI-TOF at  $m/z = 1898$  and 1913 corresponded to uromodulin peptides (UMOD); those at  $m/z = 1945$ , 2392, and 2505 corresponded to alpha-1-antitrypsin peptides (A1AT); and that at  $m/z = 2714$  corresponded to beta-2-microglobulin (B2M) [38].

### Association between IgAN-related peptides and histological lesions by Oxford classification

The histological lesions of the IgAN patients are summarized in Table 2.

**Table 2 Scores of histological lesions by Oxford classification in IgAN patients**

Histological lesions	IgAN patients
IFTA, n (%)	
T0	6 (32)
T1	8 (42)
T2	5 (26)
Segmental glomerulosclerosis, n (%)	
S0	3 (16)
S1	16 (84)
Endocapillary hypercellularity, n (%)	
E0	12 (63)
E1	7 (37)
Mesangial hypercellularity, n (%)	
M0	0 (0)
M1	19 (100)

Interstitial fibrosis/tubular atrophy (IFTA).

The blood and urine peptides of IgAN patients were associated with IFTA lesions (Additional file 2). In evaluating tubulointerstitial damage T2 (>50%) in patients with IgAN, we noted that serum peptides at *m/z* 5966 and 9289 increased in peak area compared with the other 2 groups (T0, T1). Moreover, serum peptides at *m/z* 1466, 1617, 3193, 3264, 5337, 5889, and 5905 increased in peak area with respect to T1.

Similarly, plasma peptides at *m/z* 2661 and 2790 rose in peak area versus the other 2 groups (T0, T1), but plasma peptides at *m/z* 1063 and 1078 decreased in peak area in IgAN patients with tubulointerstitial damage T2 compared with subjects with T0 and T1.

In urine, peptides at *m/z* 1945 and 2491 increased in peak area in IgAN patients with T2 tubulointerstitial damage (>50%), but peptides at *m/z* 1769, 1898, 2977, 3004, 3389, 3406, 4658, and 4752 fell compared with the T0 and T1 groups. Further, as shown in Figure 1a-c, bradykinin peptide (*m/z* 1063) and UMOD peptide (*m/z* 1898) decreased in parallel with the progression of

tubulointerstitial damage. But, A1AT peptide increased proportionally to tubulointerstitial damage.

As shown in Figure 2a-d, urine peptides at *m/z* 1945, 2392, and 4013 increased in peak area in IgAN patients with S1 lesions, but the peptide at *m/z* 3389 fell in peak area compared with IgAN patients with S0 lesions. No associations were observed between segmental glomerulosclerosis and blood peptides.

A lack of endocapillary hypercellularity (E0) was associated with increased peak areas of peptides at *m/z* 1546 and 3264, but the *m/z* 3242 peptide declined in peak area in the serum of IgAN patients (Figure 3a-c). Moreover, E0 correlated with decreased peak area of peptides at *m/z* 3242 and *m/z* 8602 in the plasma of IgAN patients compared with endocapillary hypercellularity (E1) (Figure 4a-b). No associations were observed in the urine peptides.

No associations were observed between blood or urine peptides and mesangial hypercellularity in IgAN patients.

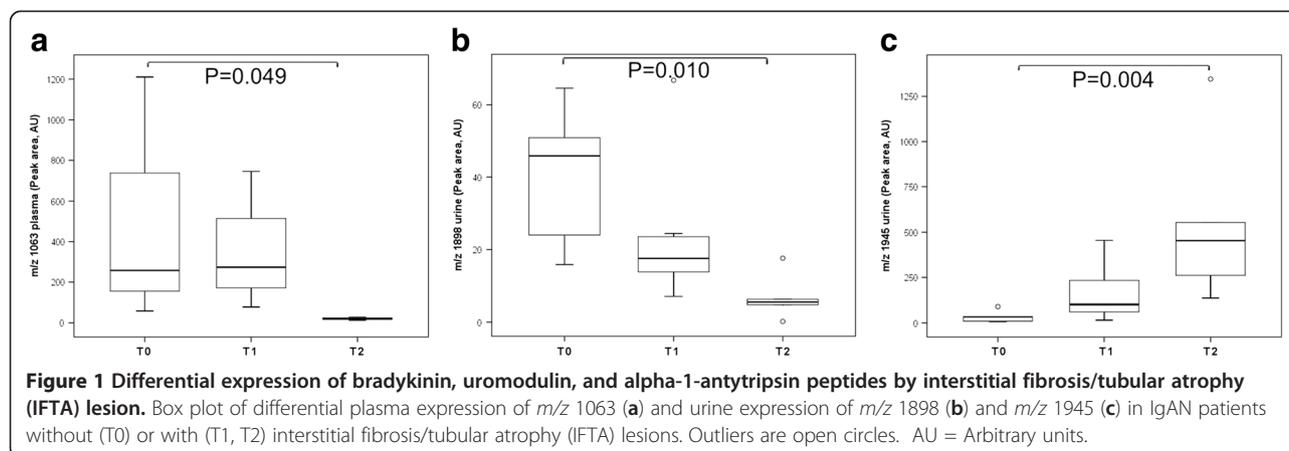
#### Association between peptides and doubling of serum creatinine in IgAN

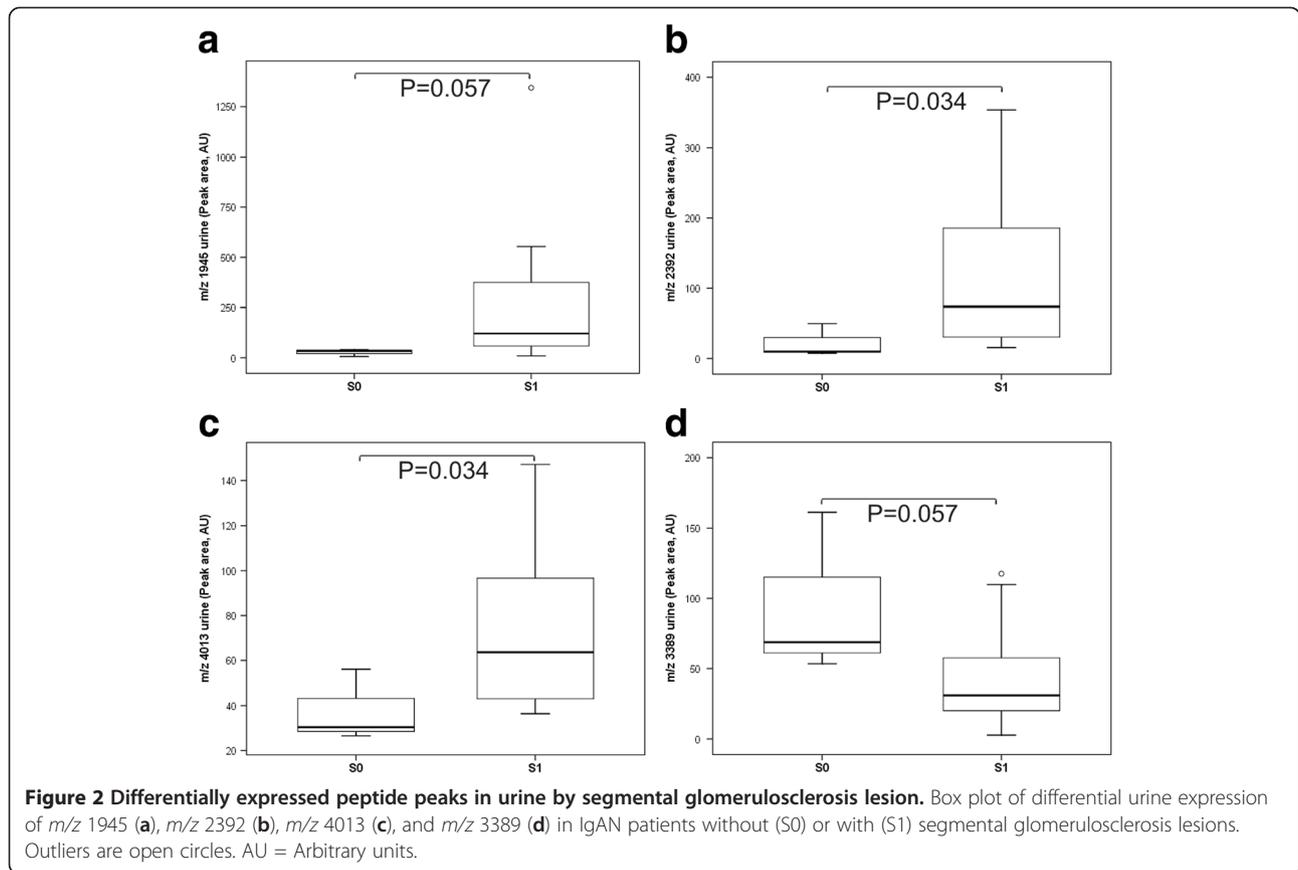
Serum peptides at *m/z* 2953, 5337, and 9289 and plasma peptides at *m/z* 9287 were linked with the doubling of serum creatinine in IgAN patients. Also, urine peptides at *m/z* 1769, 1898, 1913, 1945, 2491, 2756, 2977, 3004, 3389, and 4752 correlated with poor creatinine levels in IgAN patients (Table 3).

#### Association between peptides and clinical parameters

Urinary UMOD-derived peptides (*m/z* 1898, 1913) correlated inversely between baseline serum creatinine, and *m/z* 1913 also correlated inversely with proteinuria. Urinary A1AT-derived peptides (*m/z* 1945, 2392 and 2505) showed a positive association with proteinuria. Also, *m/z* 1945 showed a positive correlation with serum creatinine.

Most patients had varying degrees of hematuria at diagnosis; thus, it was not possible to compare the influence of hematuria on peptide profile changes.



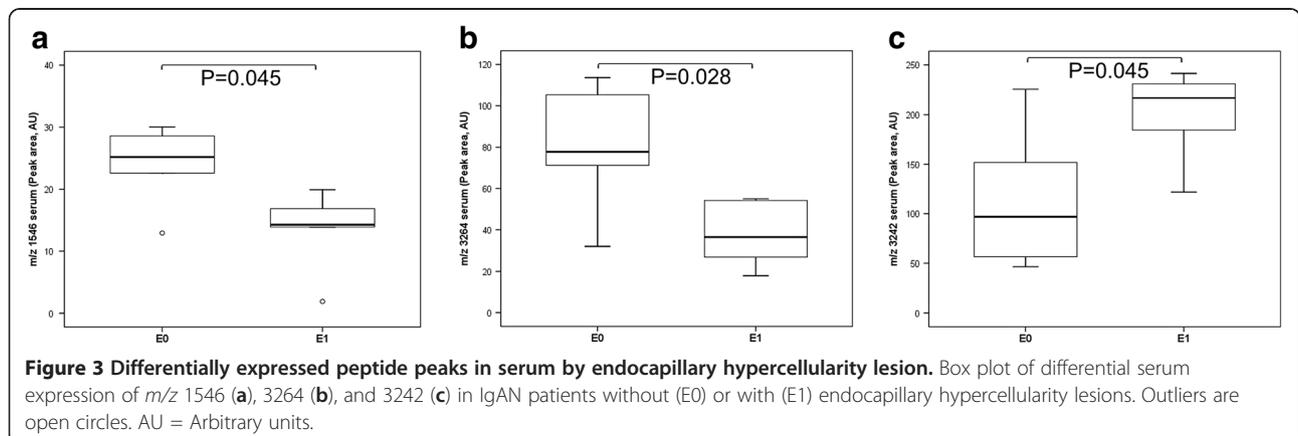


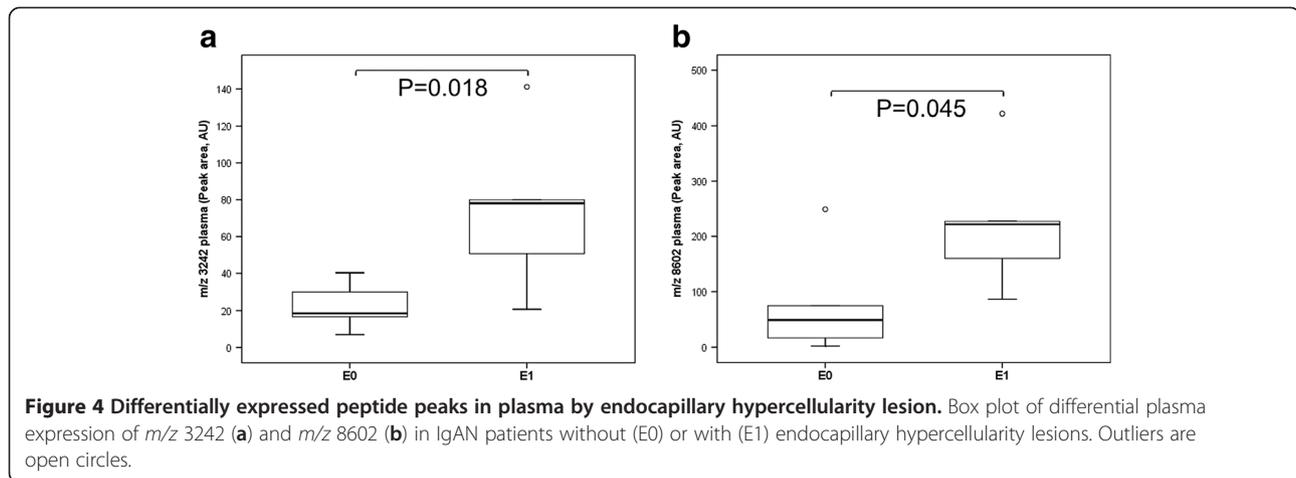
## Discussion

In this preliminary prospective study, peptide patterns in blood and urine were observed in patients with IgAN that allowed us to differentiate them from healthy subjects. Bradykinin peptide and a fragment of complement C4a were identified in blood samples, as were UMOD, A1AT, and B2-microglobulin peptides in urine. Moreover, these peptides were associated with poor histological lesions in IgAN patients, particularly with tubulointerstitial damage and segmental glomerulosclerosis.

In IgAN, much effort has been aimed to correlate a wide range of histological lesions with clinical outcome. In this report, we used the Oxford classification to explore IgAN-associated changes from blood and urine peptide profiles, because it is the most recent pathological classification system and was developed as a reproducible method of predicting the risk of disease progression with regard to clinical outcome and histological lesions.

Recently, new methods have been described to identify biological biomarkers in various fluids using proteomic





techniques. In our previous report [38], we demonstrated that MB-based profiling and MALDI-TOF MS identify disparities in urine between GKD patients and controls, suggesting that establishment of a differential peptide profile is the initial step toward classifying GKD. In the current study, the majority of peptides, specifically high levels of an A1AT-derived peptide (*m/z* 1945) and low levels of a UMOD-derived peptide (*m/z* 1898) and bradykinin (*m/z* 1063), was linked to tubulointerstitial damage.

Alpha-1-antitrypsin protects the extracellular matrix from neutrophil attack through its anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. Kwak et al. [40] reported increased levels of A1AT peptides in kidney tissue and urine in IgAN patients compared with healthy subjects. The authors speculated that renal tubular epithelial cells produce A1AT in response to tubulointerstitial damage. Consistently, our results reinforce the suggestion that high levels of A1AT in urine might constitute a response

to the inflammatory process in GKD. Likewise A1AT has a function in tubulointerstitial injury; we noted an inverse association between UMOD-derived peptides and tubulointerstitial lesions, consistent with other groups that have described low urinary UMOD levels in association with tubular atrophy and interstitial infiltration in renal biopsies [41].

Uromodulin is a glycoprotein that is expressed on renal tubular epithelial cells and is the most abundant protein in urine. Recent studies have implicated UMOD in chronic kidney disease [41-43]. In a previous report, we observed an inverse correlation between UMOD peptides, serum creatinine, and proteinuria in patients with GKD [38].

Further, in IgAN, Wu et al. [37] described a urine peptide profile, noting downregulation of peptide that corresponded to UMOD, allowing them to discriminate IgAN from healthy subjects. In the current study, our peptide profile could be a biomarker of histological lesions but is not specific for IgAN.

Rocchetti et al. [23] reported a significant decrease in the urinary excretion of kininogen in IgAN patients, particularly in unresponsive ACEI therapy patients. The authors speculated that this difference reflects the severity of renal damage in IgAN patients. Similarly, we found a decreased in kininogen-derived peptide bradykinin (*m/z* 1063) in plasma from IgAN patients with severe tubulointerstitial damage T2. But, we could not demonstrate this effect because most patients did not receive ACEI or ARB agents at baseline. Thus, we could not compare the effects of these drugs on peptide profiles.

Bradykinin is a nonapeptide that is derived from the kininogen protein, a robust agonist of the bradykinin 2 receptor, enhancing the production of nitric oxide and prostaglandins. Potent renal vasodilator, antithrombotic and antifibrotic effects of kinins have been observed recently in diabetic nephropathy [44]. Furthermore, upregulation of bradykinin receptor has

**Table 3 Relationship between doubling of serum creatinine and peptide peaks**

Biofluid	Peptides ( <i>m/z</i> )	R	p*
Serum	2953	0.624	0.040
	5337	-0.615	0.044
	9289	0.711	0.014
Plasma	9287	0.615	0.044
Urine	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	-0.631	0.004
	3389	-0.529	0.020
4752	-0.530	0.020	

been described to mediate the progression of focal segmental glomerulosclerosis [45].

In a previous report, Kang et al. [9] observed that segmental glomerulosclerosis and IFTA reflect chronic damage, which can be used to predict the long-term prognosis of patients with IgAN. Our findings suggest that a rise in peptides at  $m/z$  1945, 2392, and 4013 and a decline in the peptide at  $m/z$  3389 observed in patients with S1 reflect chronic glomerular injury.

Endocapillary and mesangial hypercellularity lesions were not associated with renal outcome in the original Oxford cohorts, although few reports have reported such findings. In our study, we identified 5 peptides—in serum at  $m/z$  1546, 3264, and 3242 and in plasma at  $m/z$  3242, 8602—of which the plasma and serum peptides at  $m/z$  3242 and plasma peptide at  $m/z$  8602 increased and serum peptides at  $m/z$  1546 and 3264 decreased in the presence of endocapillary hypercellularity.

Further, many IgAN patients showed mesangial hypercellularity—this score is defined as the number of mesangial cells per mesangial area. Previous studies have shown that mesangial hypercellularity correlates with an active lesion; perhaps patients with M1 have a good response to treatment.

A limitation of this study is that we could not confirm that peptides of bradykinin, UMOD and A1AT are related specifically to IgAN, because our population was in various stages of kidney disease and degrees of interstitial injury. Interestingly, we found a relationship between peptide profiles in the serum, plasma, and urine of IgAN patients with the doubling of serum creatinine levels—particularly, in the urine samples with UMOD and A1AT peptides. Based on these findings, we propose that this peptide profile is a potential biomarker predictor of renal outcome, but we can not exclude the possibility that these peptides constitute a biomarker of chronic kidney diseases. It is necessary to expand this population study to other types of GKD to mitigate the limitations on its reproducibility and thus obtain a specific peptide profile.

Similarly, our patients had mesangial hypercellularity, and all were classified as M1. This feature of our study population did not allow us to evaluate the influence of this injury on peptide profiles. Finally, identifying peptides in biological fluids is critical in determining their function in the disease process.

## Conclusions

IgAN is a glomerular disease, the pathogenic mechanism of which remains unknown. Proteomic analysis allows us to obtain a peptide profile that can enhance the diagnosis and prognosis of this glomerular disease. Further studies with more patients are needed to determine the function

of bradykinin, UMOD, and A1AT peptides in the pathogenesis of IgAN.

## Additional files

**Additional file 1: Differentially expressed peptide peaks between IgAN patients and healthy subjects.**

**Additional file 2: Differentially expressed peptide peaks by interstitial fibrosis/tubular atrophy (IFTA) lesion.**

## Competing interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship or publication of this article. The results presented in this paper have not been published previously in whole or in part, except in abstract format.

## Authors' contributions

FG: participated in the conception and design of the study, carried out the collection of samples, clinical data management, statistical analysis and involved in drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content. MNM: participated in the conception and design of the study, carried out the collection of samples, analysis and interpretation of proteomic data, statistical analysis and involved in drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content. MI: participated in the conception and design of the study, carried out the collection of samples, clinical data management, statistical analysis and involved in drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content. DL: helped out the histological analysis. MIT: participated in the statistical analysis. VP: participated in the collection of samples. JB: involved in revising the manuscript critically for important intellectual content and has given final approval of the version to be published. RR: made substantial contributions to conception and design, involved in revising the manuscript critically for important intellectual content and has given final approval of the version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI06/0878) and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-RETICS REDinREN RD 06/0016), Spain. This work was presented as a Free Oral Communication at the 49<sup>th</sup> ERA-EDTA Congress, May 24–27, 2012 in Paris, France.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Germans Trias i Pujol Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Carretera de Canyet, s/n 08916-Badalona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Health Sciences Research Institute "Germans Trias i Pujol", Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n, 08916-Badalona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Department of Pathology, Germans Trias i Pujol Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Carretera de Canyet, s/n 08916-Badalona, Barcelona, Spain.

Received: 6 November 2012 Accepted: 5 April 2013

Published: 11 April 2013

## References

1. Barratt J, Feehally J: **IgA nephropathy**. *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(7):2088–2097.
2. Frimat L, Briancon S, Hestin D, Aymard B, Renoult E, Huu TC, Kessler M: **IgA nephropathy: prognostic classification of end-stage renal failure**. *L'Association des Néphrologues de l'Est. Nephrol Dial Transplant* 1997, **12**(12):2569–2575.
3. D'Amico G: **Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors**. *Am J Kidney Dis* 2000, **36**(2):227–237.
4. Daniel L, Saingra Y, Giorgi R, Bouvier C, Pellissier JF, Berland Y: **Tubular lesions determine prognosis of IgA nephropathy**. *Am J Kidney Dis* 2000, **35**(1):13–20.

5. Myllymaki JM, Honkanen TT, Syrjanen JT, Helin HJ, Rantala IS, Pasternack AI, Mustonen JT: **Severity of tubulointerstitial inflammation and prognosis in immunoglobulin A nephropathy.** *Kidney Int* 2007, **71**(4):343–348.
6. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn JA, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas M, Herzenberg AM, Hill PA, Hogg RJ, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura T, Lai FM, Leung CB, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mackinnon B, Mezzano S, Schena FP, Tomino Y, Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, Zhang H: **The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification.** *Kidney Int* 2009, **76**(5):534–545.
7. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn JA, Cattran DC, Coppo R, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F, Feehally J, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas M, Herzenberg AM, Hill PA, Hogg RJ, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura T, Lai FM, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mackinnon B, Mezzano S, Schena FP, Tomino Y, Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, Zhang H: **The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility.** *Kidney Int* 2009, **76**(5):546–556.
8. Coppo R, Troyanov S, Camilla R, Hogg RJ, Cattran DC, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Amore A, Alpers CE, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn JA, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator SN, Emma F, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo AB, Geddes CC, Groene HJ, Haas M, Herzenberg AM, Hill PA, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura T, Lai FM, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mezzano S, Schena FP, Tomino Y, Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, Zhang H: **The Oxford IgA nephropathy clinicopathological classification is valid for children as well as adults.** *Kidney Int* 2010, **77**(10):921–927.
9. Kang SH, Choi SR, Park HS, Lee JY, Sun IO, Hwang HS, Chung BH, Park CW, Yang CW, Kim YS, Choi YJ, Choi BS: **The Oxford classification as a predictor of prognosis in patients with IgA nephropathy.** *Nephrol Dial Transplant* 2012, **27**(1):252–258.
10. Thongboonkerd V: **Biomarker discovery in glomerular diseases using urinary proteomics.** *Proteomics Clin Appl* 2008, **2**(10–11):1413–1421.
11. Thongboonkerd V, Klein JB, Jevans AW, McLeish KR: **Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases.** *Contrib Nephrol* 2004, **141**:292–307.
12. Thongboonkerd V: **Renal and Urinary Proteomics.** *Proteomics Clin Appl* 2008, **2**(7–8):947–949.
13. Niwa T: **Biomarker discovery for kidney diseases by mass spectrometry.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008, **870**(2):148–153.
14. Barratt J, Topham P: **Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease.** *CMAJ* 2007, **177**(4):361–368.
15. Casado-Vela J, del Pulgar TG, Cebrian A, Alvarez-Ayerza N, Lacal JC: **Human urine proteomics: building a list of human urine cancer biomarkers.** *Expert Rev Proteomics* 2011, **8**(3):347–360.
16. Park MR, Wang EH, Jin DC, Cha JH, Lee KH, Yang CW, Kang CS, Choi YJ: **Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA nephropathy.** *Proteomics* 2006, **6**(3):1066–1076.
17. Janech MG, Raymond JR, Arthur JM: **Proteomics in renal research.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **292**(2):F501–F512.
18. Pang JX, Ginanni N, Dongre AR, Hefta SA, Opitek GJ: **Biomarker discovery in urine by proteomics.** *J Proteome Res* 2002, **1**(2):161–169.
19. Candiano G, Musante L, Bruschi M, Pretetto A, Santucci L, Del Boccio P, Pavone B, Perfumo F, Urbani A, Scolari F, Ghiggeri GM: **Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome.** *J Am Soc Nephrol* 2006, **17**(11):3139–3148.
20. Hellin JL, Bech-Serra JJ, Moctezuma EL, Chocron S, Santin S, Madrid A, Vilalta R, Canals F, Torra R, Meseguer A, Nieto JL: **Very low-molecular-mass fragments of albumin in the plasma of patients with focal segmental glomerulosclerosis.** *Am J Kidney Dis* 2009, **54**(5):871–880.
21. Magistroni R, Ligabue G, Lupo V, Furci L, Leonelli M, Manganelli L, Masellis M, Gatti V, Cavazzini F, Tizzanini W, Albertazzi A: **Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin.** *Nephrol Dial Transplant* 2009, **24**(5):1672–1681.
22. Ngai HH, Sit WH, Jiang PP, Xu RJ, Wan JM, Thongboonkerd V: **Serial changes in urinary proteome profile of membranous nephropathy: implications for pathophysiology and biomarker discovery.** *J Proteome Res* 2006, **5**(11):3038–3047.
23. Rocchetti MT, Centra M, Papale M, Bortone G, Palermo C, Centonze D, Ranieri E, Di Paolo S, Gesualdo L: **Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy.** *Proteomics* 2008, **8**(1):206–216.
24. Shui HA, Huang TH, Ka SM, Chen PH, Lin YF, Chen A: **Urinary proteome and potential biomarkers associated with serial pathogenesis steps of focal segmental glomerulosclerosis.** *Nephrol Dial Transplant* 2008, **23**(1):176–185.
25. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS, Arthur JM: **Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease.** *J Am Soc Nephrol* 2007, **18**(3):913–922.
26. Yokota H, Hiramoto M, Okada H, Kanno Y, Yuri M, Morita S, Naitou M, Ichikawa A, Katoh M, Suzuki H: **Absence of increased alpha1-microglobulin in IgA nephropathy proteinuria.** *Mol Cell Proteomics* 2007, **6**(4):738–744.
27. Vanhoutte KJ, Laarakkers C, Marchiori E, Pickers P, Wetzels JF, Willems JL, van den Heuvel LP, Russel FG, Masereeuw R: **Biomarker discovery with SELDI-TOF MS in human urine associated with early renal injury: evaluation with computational analytical tools.** *Nephrol Dial Transplant* 2007, **22**(10):2932–2943.
28. Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, Walden M, Rupperecht HD, Floege J, Haller H, Mischak H: **Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy.** *Kidney Int* 2005, **67**(6):2313–2320.
29. Julian BA, Wittke S, Haubitz M, Zurbig P, Schiffer E, McGuire BM, Wyatt RJ, Novak J: **Urinary biomarkers of IgA nephropathy and other IgA-associated renal diseases.** *World J Urol* 2007, **25**(5):467–476.
30. Weissinger EM, Wittke S, Kaiser T, Haller H, Bartel S, Krebs R, Golovko I, Rupperecht HD, Haubitz M, Hecker H, Mischak H, Fliser D: **Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes.** *Kidney Int* 2004, **65**(6):2426–2434.
31. Xu BJ, Shyr Y, Liang X, Ma LJ, Donnert EM, Roberts JD, Zhang X, Kon V, Brown NJ, Caprioli RM, Fogo AB: **Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(10):2967–2975.
32. Rossing K, Mischak H, Dakna M, Zurbig P, Novak J, Julian BA, Good DM, Coon JJ, Tarnow L, Rossing P: **Urinary proteomics in diabetes and CKD.** *J Am Soc Nephrol* 2008, **19**(7):1283–1290.
33. Papale M, Di Paolo S, Magistroni R, Lamacchia O, Di Palma AM, De Mattia A, Rocchetti MT, Furci L, Pasquali S, De Cosmo S, Cignarelli M, Gesualdo L: **Urine proteome analysis may allow noninvasive differential diagnosis of diabetic nephropathy.** *Diabetes Care* 2010, **33**(11):2409–2415.
34. Lapolla A, Molin L, Seraglia R, Sechi A, Cosma C, Bonfante L, Chilelli NC, Ragazzi E, Traldi P: **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) 2011, **17**(3):245–253.
35. Lapolla A, Seraglia R, Molin L, Williams K, Cosma C, Reitano R, Sechi A, Ragazzi E, Traldi P: **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**(3):419–425.
36. Fiedler GM, Baumann S, Leichte A, Oltmann A, Kase J, Thiery J, Ceglarek U: **Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Clin Chem* 2007, **53**(3):421–428.
37. Wu J, Wang N, Wang J, Xie Y, Li Y, Liang T, Wang J, Yin Z, He K, Chen X: **Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010, **24**(14):1971–1978.
38. Navarro-Munoz M, Ibernon M, Bonet J, Perez V, Pastor MC, Bayes B, Casado-Vela J, Navarro M, Ara J, Espinal A, Fluvia L, Serra A, Lopez D, Romero R: **Uromodulin and alpha(1)-Antitrypsin Urinary Peptide Analysis to Differentiate Glomerular Kidney Diseases.** *Kidney Blood Press Res* 2012, **35**(5):314–325.
39. Perez V, Navarro-Munoz M, Mas S, Bayes B, Pastor MC, Martinez-Caceres E, Lauzurica R, Egido J, Romero R: **Proteomic approach to the study of statin pleiotropy in kidney transplant patients.** *Pharmacology* 2011, **87**(3–4):161–168.
40. Kwak NJ, Wang EH, Heo IY, Jin DC, Cha JH, Lee KH, Yang CW, Kang CS, Choi YJ: **Proteomic analysis of alpha-1-antitrypsin in immunoglobulin A nephropathy.** *Proteomics Clin Appl* 2007, **1**(4):420–428.

41. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, Kotanko P, Lhotta K, Jennings P: **Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression.** *Nephrol Dial Transplant* 2010, **25**(6):1896–1903.
42. Lhotta K: **Uromodulin and chronic kidney disease.** *Kidney Blood Press Res* 2010, **33**(5):393–398.
43. Vyletal P, Bleyer AJ, Kmoch S: **Uromodulin biology and pathophysiology—an update.** *Kidney Blood Press Res* 2010, **33**(6):456–475.
44. Tomita H, Sanford RB, Smithies O, Kakoki M: **The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy.** *Kidney Int* 2012, **81**(8):733–744.
45. Pereira RL, Buscariollo BN, Correa-Costa M, Semedo P, Oliveira CD, Reis VO, Maquigussa E, Araujo RC, Braga TT, Soares MF, Moura IC, Malheiros DM, Filho AP, Keller AC, Camara NO: **Bradykinin receptor 1 activation exacerbates experimental focal and segmental glomerulosclerosis.** *Kidney Int* 2011, **79**(11):1217–1227.

doi:10.1186/1471-2369-14-82

**Cite this article as:** Graterol et al.: Poor histological lesions in IgA nephropathy may be reflected in blood and urine peptide profiling. *BMC Nephrology* 2013 **14**:82.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

