

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Análisis proteómico de exomas en la búsqueda de biomarcadores de
nefropatía diabética**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Zubiri Azcárate

Directores

Fernando Vivanco Martínez
Gloria Álvarez Llamas

Madrid, 2013

Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Análisis proteómico de exosomas en la búsqueda de biomarcadores de nefropatía diabética

Tesis Doctoral

Irene Zubiri Azcárate, 2013

Directores: Dr. Fernando Vivanco Martínez

Dra. Gloria Álvarez Llamas

La medida más segura de toda fuerza es la resistencia que vence

Stefan Zweig

A mis padres, Daniel y Elena.

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a mis Directores de tesis, la Dra. Gloria Álvarez y al Dr. Fernando Vivanco. A mis padres Daniel y Elena. A mis hermanos. A Javi. A mis amigas. A toda mi familia. Sin la ayuda y el apoyo que ellos me han proporcionado durante estos años no hubiera llegado al punto en el que ahora me encuentro.

Son muchos los amigos y compañeros de laboratorio que me han ayudado a llevar a buen puerto este trabajo, entre ellos me gustaría dar las gracias especialmente a Aroa Sanz y Alberto Benito por lo mucho que han trabajado conmigo en esta tesis. Por supuesto también agradecer su ayuda a; Fernando de La Cuesta, Carlos Pastor, Marina Pérez, Bárbara Cases, María Posada, Marta Martín y Laura González.

Agradezco la ayuda prestada para la realización de este trabajo a la Unidad de Microscopía Electrónica y a la Unidad de Proteómica de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid muy especialmente a Montse. A la Unidad de Proteómica del CNIC, a Juan Antonio y Enrique. Al laboratorio Fisiopatología Vasculor y la Unidad de Proteómica del Hospital de Paraplégicos de Toledo especialmente a Maru y Vero.

A todos mis amigos del laboratorio de Nefrología por haberme apoyado y enseñado tantas cosas estos años, a Sara. Me gustaría dar las gracias también al Dr. Ortiz y a Beatriz Fernández. A Alicia y Germán por la maquetación. A todas las personas que me han ayudado personal o profesionalmente durante estos años.

Resumen: La nefropatía diabética es la causa más común de enfermedad renal terminal. La detección temprana de riesgo de ND antes de que un daño renal avanzado haya ocurrido supondría un gran avance en la lucha contra esta enfermedad. Con ese fin, en esta tesis doctoral, se ha abordado el estudio proteómico de la ND desde dos puntos de vista distintos. Por un lado se ha llevado a cabo por primera vez un análisis cualitativo y cuantitativo del conjunto de proteínas que componen los exosomas de orina humana, en el contexto de la ND. Este estudio nos ha permitido identificar 352 proteínas cuya presencia en exosomas de orina no había sido descrita hasta el momento. Ha permitido además establecer, un panel de 25 proteínas significativamente variadas en nefropatía diabética. Por otra parte hemos estudiado el tejido renal de animales que presentaban ND en estadios tempranos. Este estudio nos ha permitido detectar cambios a nivel de expresión proteica, que ocurren al inicio de la enfermedad dando lugar a una serie de posibles biomarcadores tempranos de la misma (Regucalcina). Las técnicas desarrolladas para el aislamiento y estudio de los exosomas han sido aplicadas con éxito en las muestras de orina de estos animales que presentaban ND en estadios tempranos, pudiendo así corroborar datos obtenidos en el estudio del tejido renal.

Summary: Diabetic nephropathy (DN) is the most common cause of end-stage renal disease (ESRD). The early detection of DN before an advanced kidney injury occurs would suppose a great advance in the fight against this disease. With this aim, in this doctoral thesis, two different proteomic approaches were proposed. On the one hand a qualitative and quantitative analysis of the urine exosome proteome was performed for the first time in ND context. This approach led us to identify 352 proteins that had not been previously described in the urine exosome proteome and allowed us to establish a panel of 25 differentially expressed proteins in DN. On the other hand, a proteomic analysis of kidney tissue proteins of an animal model of early of DN was performed. This study allowed us to detect significantly varied protein levels, occurring at the initial stages of the disease therefore being promising possible biomarkers for the early detection of DN. The techniques, here developed for the isolation and exosomal proteome analysis were successfully applied to the study of the urine exosomes of this early model of DN and permitted the confirmation of the data obtained in the kidney tissue approach.

Índice

Introducción	19
1. LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.	21
1.1 El Riñón.	21
1.2 Fisiopatología de la Nefropatía Diabética.	22
2. EXOSOMAS	25
2.1 Biogénesis y características de los exosomas.	26
2.2 Papel fisiológico y patológico de los exosomas, funciones.	28
2.3 Los Exosomas como fuente de biomarcadores. Antecedentes de estudios clínicos basados en el análisis de exosomas.	29
2.4 Exosomas de orina y su papel en enfermedades renales.	29
3. PROTEÓMICA.	31
3.1 Preparación de la muestra.	31
3.1.1 Lisis celular	31
3.1.2 Solubilización	32
3.1.3 Limpieza de extractos.	32
3.1.4 Concentración o fraccionamiento.	32
3.1.5 Depleción.	33
3.1.6 Digestión.	33
3.2 Técnicas para la separación de proteínas.	33
3.3 Espectrometría de masas (MS). Identificación de proteínas.	34
3.3.1 Estructura de un espectrómetro de masas.	34
3.3.2 Identificación de proteínas por MS.	36
3.4 Análisis de expresión diferencial de proteínas. Proteómica Cuantitativa.	37
4. PROTEOMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.	39
4.1 Estudios proteómicos en tejido renal.	39
4.2 Estudios proteómicos en orina.	40

5. ESTUDIO PROTEOMICO DE EXOSOMAS DE ORINA.	41
Objetivos	45
Material y métodos	49
1. ANÁLISIS DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DEPLECIÓN DE PROTEINAS MAYORITARIAS CONTAMINANTES.	51
1.1 Selección de pacientes y recogida de muestras.	51
1.2 Aislamiento de exosomas.	52
1.3 Depleción de uromodulina (proteína Tamm Horsfall THP).	54
1.4 Depleción de Albumina.	55
1.5 Confirmación de la identidad exosomal, mediante microscopía electrónica y western blot.	57
1.6 Electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE).	58
2. ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN ND.	60
2.1 Análisis diferencial por 2D-DIGE de saturación.	60
2.2 Análisis diferencial por nLC-MS/MS (Orbitrap®); análisis cualitativo y cuantitativo “label-free”.	61
3. MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO PROTEOMICO DE LA NEFROPATÍA DIABETICA EN TEJIDO COMPLETO, ORINA Y EXOSOMAS.	64
3.1 Inducción de hiperglicemia mediante inyección de estreptozotocina (STZ).	64
3.2 Recogida de muestras de orina.	64
3.3 Disección renal y caracterización del daño en el modelo animal.	64
3.4 Obtención de extracto protéico a partir de riñón de rata y preparación de la muestra para el análisis proteómico diferencial por 2D-DIGE.	65
3.5 Electroforesis bidimensional diferencial 2D-DIGE.	65
3.6 Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF MS.	68
3.7 Análisis por Western Blot de proteínas diferenciales en tejido orina y exosomas.	69

3.8	Análisis diferencial del tejido renal por técnicas inmunohistoquímicas.	70
3.9	Validación de la expresión diferencial de regucalcina en tejido y exosomas mediante “Selected Reaction Monitoring” (SRM).	70

Resultados **73**

1.	ANÁLISIS DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DEPLECIÓN DE PROTEÍNAS MAYORITARIAS CONTAMINANTES.	75
1.1	Aislamiento de exosomas.	75
1.2	Depleción de uromodulina (proteína Tamm Horsfall THP).	77
1.3	Depleción de albumina.	79
1.4	Confirmación de la identidad exosomal, mediante microscopía electrónica y western blot.	81
2.	ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN ND.	84
2.1	Análisis diferencial por 2D-DIGE de saturación.	84
2.2	Análisis diferencial por NLC-MS/MS (Orbitrap®)	85
2.2.1	Análisis cualitativo: Caracterización del proteoma exosomal en individuos sanos.	85
2.2.2	Análisis cuantitativo libre de marcaje	85
2.3	Validación de las proteínas diferenciales por SRM	87
3.	MODELO ANIMAL. DESARROLLO DE ND TEMPRANA EN RATAS.	89
3.1	Caracterización del daño renal en el modelo animal.	89
3.2	Análisis proteómico diferencial del tejido renal por 2D-DIGE	91
3.3	Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF	93
3.4	Análisis por WB/IHQ/SRM de proteínas diferenciales en tejido, orina y exosomas de orina.	93
3.4.1	Validación del análisis diferencial en tejido renal por Western Blot.	94
3.4.2	Análisis diferencial del tejido renal por técnicas inmunohistoquímicas.	94

3.4.3	Búsqueda de una fuente de biomarcadores más accesible: exosomas y orina.	95
3.4.4	Validación de la expresión diferencial de regucalcina en tejido y exosomas mediante “Selected Reaction Monitoring” SRM.	97
3.5	Traslación de resultados a humano. Regucalcina como potencial marcador.	99
	<i>Discusión</i>	<i>101</i>
1.	ANÁLISIS DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DEPLECIÓN DE PROTEÍNAS MAYORITARIAS CONTAMINANTES.	104
1.1	Métodos de aislamiento	104
1.2	Depleción de albúmina y THP.	105
1.3	Confirmación de la identidad exosomal, mediante microscopía electrónica y western blot.	107
2.	ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN ND.	109
2.1	Análisis diferencial por nLC-MS/MS (Orbitrap®)	109
2.1.1	Análisis cualitativo	109
2.1.2	Análisis cuantitativo: “Label-free”	111
3.	ANÁLISIS PROTEOMICO DIFERENCIAL DEL TEJIDO RENAL EN ESTADIOS TEMPRANOS DE ND .	114
	<i>Conclusiones</i>	<i>119</i>
	<i>Referencias</i>	<i>123</i>

Abreviaturas

2-DE: Electroforesis bidimensional

2D-DIGE: Electroforesis bidimensional diferencial.

ADN : Ácido desoxiribonucleico.

AGEs: “Advanced Glycation End products”.

AM: Adrenomodulina.

AMBp: Precursor de α microglobulina/ bikunina.

ANXA: Anexina.

APOD: Apolipoproteína D.

APS: Persulfato amónico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNmi: Micro ácido ribonucleico.

ASC-2: Cointegrador-2 de señal de activación transcripcional.

BVA: Análisis de variaciones biológicas.

BSA: Albúmina de suero bovino.

BUN: Nitrógeno ureico.

CA2: Anhidrasa carbonica 2

CE: Electroforesis capilar.

CHAPS: [3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato].

Chip-nLC-(SRM)-QQQ-MS: Triple cuadrupolo, acoplado en línea con un sistema de nano-cromatografía en modo chip.

CID: Disociación inducida por colisión.

CILAIR: Comparación de la velocidad de incorporación de aminoácidos marcados con isótopos. **DAB:** diaminobenzidina.

DIA : Análisis diferencial en gel.

DM: Diabetes mellitus.

DTT: Ditiotreitól.

ECD: Disociación por captura de electrones “electrón capture dissociation”.

EDA : Análisis de datos extendido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ESCRT: “endosomal sorting complex required for transport”.

ESI: Ionización por electroespray.

ETD: Disociación por transferencia de electrones.

EuroKUP: “European kidney and urine proteomics”.

FT-ICR: Resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier.

GADPH: Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.

GSTP: Glutación S transferasa.

H2Odd: Agua di-destilada.

HIBADH : 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, mitochondrial.

HKUPP: “kidney and urine proteome Project”.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

Hrs: Sustrato del factor de crecimiento hepático tirosina-quinasa regulado.

HSP: Proteínas de choque termico de la familia “heat shock”

HUPO: “Human proteome Project”.

I/R: Isquemia/reperfusión.

ICAT: Marcaje de afinidad codificado por isótopos.

ICPL: Marcaje proteico codificado por isótopos.

IEF: Isoelectroenfoque.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG : Inmunoglobulina G.

IHQ: Inmunohistoquímica.

ILV: Vesículas intralumenales.

IPA: “Ingenuity Pathway Analysis “

IPG: Gradiente de pH inmovilizado.

IT: Trampa iónica.

iTRAQ: Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta.

LAMP1: Proteína de membrana I con asociación.

LBPA: Ácido lisobifosfatídico.

LC: Cromatografía líquida.

m/z: masa/carga.

MALDI: Ionización mediante desorción por láser asistida por matriz.

MLL3: Histona-lisina-N- metil transferasa 3.

MS: Espectrometría de masas.

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem.

MVB: Cuerpos multivesiculares.

ND: Nefropatía diabética.

NF- κ B: Factor nuclear κ B.

NO: Óxido nítrico.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PBS: Tampón fosfato salino.

PBS-T: Tampón fosfato salino con detergente Tween.

PCA: Análisis de Componentes Principales.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGs: Productos de Degradación de la Glucosa.

pI: Punto isoelectrico.

PMF: Huella dactilar peptídica.

PPAR γ : Receptor de activación de proliferación de peroxisomas.

Q: Cuadrupolo.

Q-Q-LIT: cuadrupolo-cuadrupolo- trampa iónica lineal.

Q-Q-Q: Triple cuadrupolo.

RPS27A: Precursor de la proteina ribosomal y ubiquitina S27A.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SELDI: Desorción/ionización mediante láser realizada por superficie.

SILAC: Marcaje con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivos celulares.

SMP-30: Proteína marcadora de senescencia-30.

SRM: Monitorización por reacción simple.

STZ: Estreptozotocina.

TCEP: Tris (2-carboxietil)-fosfina hidrocloreuro.

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta-1.

THP : Proteína Tamm-Horsfall.

TIC : Cromatograma total de iones.

TNF α : Factor de necrosis tumoral α .

TOF: Tiempo de vuelo.

Tsg101: Gen 101 susceptible a tumores.

V-ATPasaB : Subunidad B de la ATPasa tipo V.

VDAC1: Canal aniónico selectivo dependiente de voltaje 1.

WB: Western Blot.

Introducción

1. LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.

1.1 El Riñón.

El riñón es un órgano vital que realiza funciones fundamentales para el mantenimiento del organismo:

- Eliminación de productos metabólicos de desecho en forma de orina.
- Mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base.
- Función endocrino-metabólica, destacando la producción de eritropoyetina.

Los riñones eliminan la urea y otros productos desechables de la sangre filtrando aproximadamente 200 litros de plasma para producir aproximadamente un litro de orina al día. Este proceso se realiza principalmente a través de las unidades de filtración denominadas nefronas. La nefrona es la unidad estructural y funcional de los riñones y participa en procesos de filtración, reabsorción y secreción. Cada nefrona está formada por el corpúsculo renal o corpúsculo de Malpighi (formado a su vez por el glomérulo y la cápsula de Bowman), por el túbulo contorneado proximal, los segmentos delgado y grueso del asa de Henle y por el túbulo contorneado distal. Los corpúsculos de Malpighi y los túbulos proximal y distal pertenecen a la zona denominada corteza, mientras que los dos segmentos del asa de Henle se localizan en la médula (Figura 1). La orina formada en la nefrona se recoge en los túbulos colectores, donde se concentra.

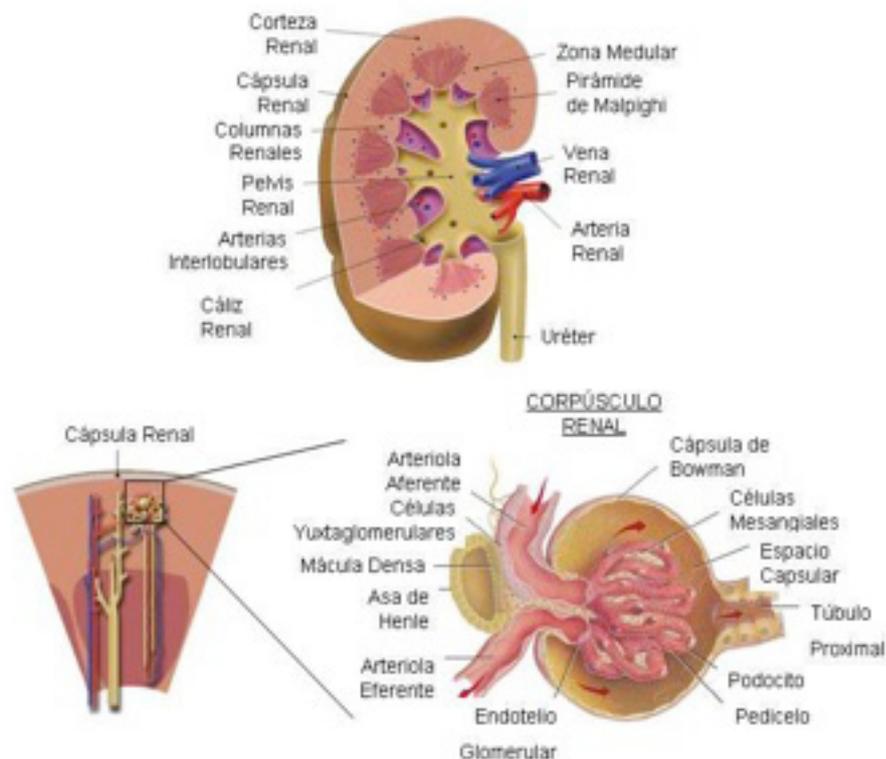


Figura 1. Representación esquemática del riñón y de la nefrona.

El glomérulo está formado por una red capilar rodeada de células endoteliales y podocitos y por un núcleo de células mesangiales. Los túbulos están formados por células tubuloe-piteliales, que son las responsables de la regulación del tráfico de solutos en el proceso de creación de la orina. En el túbulo proximal se produce la reabsorción de sustancias metabólicas útiles como glucosa, sodio, aminoácidos y péptidos.

1.2 Fisiopatología de la Nefropatía Diabética.

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia crónica como resultado de la falta o la resistencia a insulina. La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. La Organización Mundial de la Salud reconoce tres formas de diabetes mellitus: tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional, cada una con diferentes causas y con distinta incidencia. Es una de las enfermedades con mayor impacto socio-sanitario, tanto por su elevada frecuencia como por sus complicaciones crónicas. Éstas incluyen complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y desarrollo precoz de la enfermedad macrovascular (enfermedad cardíaca, cerebral y enfermedad vascular periférica). La aparición de complicaciones es de difícil predicción, ya que en su génesis confluyen diversos factores, que van desde los niveles de glucosa en sangre o factores hemodinámicos e inflamatorios, hasta la predisposición genética.

La nefropatía diabética (ND) es una de las principales complicaciones y la causa más común de enfermedad renal terminal. El daño renal crónico se caracteriza por la disminución progresiva del tamaño del riñón. En la ND, esta fase de atrofia se ve precedida por otra etapa de aumento del tamaño renal. La disminución del tamaño renal se asocia a una pérdida de células parenquimatosas renales (atrofia glomerular y tubular), que a su vez suele implicar un incremento en la producción de matriz extracelular y en el número de fibroblastos y leucocitos (fibrosis e inflamación intersticial). Se cree que las células tubuloe-piteliales pueden tener un papel importante en la inflamación y fibrosis renal [1]. Son células capaces de producir citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión en respuesta a varios estímulos, inmunes y no inmunes [2] contribuyendo de esta manera a la atracción de células infiltrantes.

Los altos niveles de glucosa son considerados tradicionalmente los principales responsables del desarrollo de la ND. Sus acciones se realizan directa o indirectamente, estas últimas mediante la generación de Productos de Degradación de la Glucosa (PDGs) o de AGEs (“Advanced Glycation End products”). Los altos niveles de glucosa contribuyen a la ND al promover la síntesis de mediadores secundarios del daño renal, la hipertrofia y muerte celular, el incremento de la síntesis de matriz extracelular y la acumulación de macrófagos.

a) Diagnóstico, tratamiento y pronóstico.

La detección temprana de riesgo de ND antes de que un daño renal avanzado haya ocurrido supondría un gran avance en la lucha contra esta enfermedad. Este objetivo hasta el momento ha resultado difícil de alcanzar ya que gran parte de los eventos que generan daño estructural en el riñón ocurren de manera silenciosa.

La práctica clínica rutinaria no permite llevar a cabo biopsias renales por tratarse de un procedimiento muy invasivo. La presencia de microalbuminuria es un signo de nefropatía incipiente y se usa como ensayo para la detección precoz de la afectación renal ([National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse](#)). Actualmente, la microalbuminuria es el mejor biomarcador no invasivo disponible para la detección de esta enfermedad. Sin embargo el valor predictivo de esta, está siendo cuestionado ultimamente ya que muchos pacientes normoalbuminuricos presentan importantes daños renales en el momento de la aparición de la microalbuminuria, presentando cambios histopatológicos avanzados [3, 4]. Además está claro que no es un buen marcador para seguir el avance de la enfermedad ya que una buena parte de los pacientes con microalbuminuria revierten su estado [5, 6], volviendo a ser normo albuminuricos y sólo una pequeña parte de los pacientes con microalbuminuria evoluciona a estados de macroalbuminuria o proteinuria[5].

La detección temprana de la microalbuminuria así como el control de la glucemia y de la tensión sanguínea mediante la inhibición del sistema renina – angiotensina, son medidas que han hecho que la mortalidad disminuya y que sea posible retrasar la progresión de la ND. Sin embargo, muchos pacientes desarrollan la enfermedad hasta su estadio final a pesar de estar recibiendo la terapia adecuada. [7]

Por estos motivos la búsqueda de nuevos marcadores que nos ayuden a prevenir el desarrollo de ND en pacientes diabéticos es de gran interés.

b) Estadios de la nefropatía diabética. Clasificación clínica del paciente.

Estadio I: No provoca síntomas. Existe hiperfiltración glomerular y los niveles de creatinina sérica y orina son normales. Tampoco hay alteraciones histológicas.

Estadio II: Aparece aproximadamente después de 5 años de evolución. Es silente. Mantiene función renal normal aunque comienzan a aparecer alteraciones mínimas en el glomérulo como inicio de engrosamiento de membranas basales o ligero aumento de la matriz mesangial.

Estadio III: Presencia de microalbuminuria (más de 30 mg de albúmina en 24 horas o 20 mg/litro de orina). La creatinina en sangre es normal. La hipertensión arterial asociada puede empeorar la lesión renal. Expansión mesangial y de las membranas basales.

Estadio IV: Aparición después de 15 años del diagnóstico. Proteinuria persistente y disminución de la función renal. Creatinina sérica en límites altos de lo normal (mayor o igual de 1.3 mg/dl en la mujer o varones de menos de 65 kg de peso o mayor o igual 1.5 mg/dl en varones). Puede presentarse como síndrome nefrótico. Histología: glomerulosclerosis parcheada. Engrosamiento de membranas basales. Expansión mesangial. Se asocia a retinopatía en más del 75%, coronariopatía en más del 45% y enfermedad cerebro vascular en más de 25% de los casos.

Estadio V: Aparición en general después de 20 años de evolución. Proteinuria persistente. Creatinina sérica mayor de 2.2 mg/dl. Hipertensión arterial. Con presencia de glomerulosclerosis, lesiones nodulares, fibrosis intersticial y atrofia tubular.

c) Aproximación a su estudio.

Hoy en día los estudios que se llevan a cabo para conseguir comprender mejor la ND desde el punto de vista de la investigación básica se realizan mediante ensayos que emplean modelos animales, tejidos obtenidos a través de biopsia o trasplantes de riñón humano, fluidos biológicos como sangre y orina que pueden reflejar cambios en el riñón y en la última década además existe un creciente interés en el estudio de las micropartículas presentes en dichos fluidos.

Estas aproximaciones al estudio de la ND, emplean diversas técnicas de biología molecular (PCR, WB, IHQ, citometría, microscopía confocal, etc) y distintas aproximaciones genómicas y proteómicas. En esta tesis nos centraremos en los estudios proteómicos que más adelante serán descritos en mayor detalle.

2. EXOSOMAS

En 1981 *Trams et al.*[8] propusieron el termino exosoma para referirse a vesículas membranosas desprendidas desde la membrana celular, pudiendo éstas aparecer como vesículas de mayor (500-1000nm) o menor (40 nm) tamaño. Pocos años después *Johnstone et al.*[9] descubrieron proteínas específicas como el receptor de transferrina que eran secretadas por reticulocitos en maduración en forma de vesículas de tamaño menor a 100nm a las que llamaron exosomas.

Hoy en día los exosomas se definen como vesículas membranosas 40-100 nm de diámetro, de origen endocítico, con forma de copa y una densidad de flotación en gradiente de sacarosa de 1,10 a 1,19 g/cm³, contienen ARN y microARN pero están desprovistos de ADN. Estas vesículas son liberadas al espacio extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas por diversos tipos celulares tales como células dendríticas, reticulocitos, linfocitos B, varios tipos de células madre, células epiteliales o endoteliales [8, 10-16]. Es posible aislar exosomas desde cultivos celulares así como desde distintos fluidos biológicos como sangre, orina, semen, líquido amniótico, o líquido pleural [10, 16-20]

Además de exosomas, se pueden aislar distintos tipos de microvesículas presentes en la orina [21] (tabla 1). Estas microvesículas no tienen origen endocítico y suelen presentar un tamaño mayor que el de los exosomas (mayor de 1µm) se suelen generar por escisión directa desde la membrana plasmática, aunque existen también entre estas, microvesículas de menor tamaño, que encajan dentro del rango de los exosomas [22]. En orina existen vesículas derivadas de las microvellosidades de los podocitos que están dentro del rango de tamaño y densidad de los exosomas [23]. Debido a este solapamiento, estas vesículas suelen estar incluidas dentro de las muestras exosomales cuando éstas son aisladas desde la orina [24]. Por este motivo, sigue a día de hoy habiendo gran controversia en torno a la denominación de las muestras exosomales y a la posibilidad de diferenciar las micropartículas que puedan estar presentes en las muestras (tales como cuerpos apoptóticos o microvesículas de mayor tamaño). En esta tesis nos referiremos como exosomas o fracción exosomal al subproteoma que obtenemos al aislarlos por distintos métodos a partir de orina, aunque no sea posible descartar que exista cierta contaminación de otras microvesículas del mismo rango de tamaño presentes en la muestra.

	EXOSOMAS	MICROVESICULAS SECRETADAS	CUERPOS APOPTÓTICOS
Tamaño (diámetro)	30-100 nm	100-1000 nm	50-500nm
Densidad de flotación	1,10-1,19 g/ml	Desconocida	1,16-1,28 g/ml
Morfología	Forma de copa	Heterogenea	Heterogenea
Composición lipídica	LBPA, poca exposición de fosfatidilserina, ceramidas, esfingomiolina, "rafts"lipídicos	Alta exposición de fosfatidil serina, colesterol	Alta exposición de fosfatidil serina
Marcadores proteicos	Alix, Tsg 101, HSC70, CD63, CD81,CD9	Selectinas, integrinas, CD40, metaloproteinasas	Histonas

Origen celular	MVB	Membrana plasmática	-
Modo de liberación extracelular	Constitutivo y regulado	Regulado	Regulado
Mecanismo de liberación	Exocitosis de MVB	Escisión desde la membrana plasmática	Contracción de la célula durante la apoptosis
Composición	Proteínas, ARNm, ARNm.	Proteínas, ARNm, ARNm	Proteínas, ARNm, ARNm

Tabla 1. Características de las distintas microvesículas membranosas extracelulares [25].

2.1 Biogénesis y características de los exosomas.

Los exosomas tienen un origen endocítico y para entender bien sus características y su composición, es necesario tratar de comprender la vía endocítica y los procesos que llevan a su formación.

a) La vía endocítica y biogénesis de los exosomas.

En las células eucariotas, moléculas de la membrana plasmática como lípidos, proteínas transmembrana y receptores, además de solutos y ligandos se internalizan mediante procesos de invaginación de la membrana plasmática a través de la vía endocítica dando lugar a endosomas tempranos [26].

Estos endosomas tempranos pueden tener distintos destinos:

- Pueden ser reciclados, volviendo a la superficie celular.
- Pueden ser trasladados a la red trans-golgi.[27, 28]
- Pueden ser dirigidos a la ruta de endosomas tardíos y lisosomas [29, 30].

Es el tercer destino el que nos interesa a la hora de explicar la vía por la que se forman los exosomas. En este caso los endosomas tempranos, pueden dar lugar a invaginaciones de membrana generando una curvatura en la misma hacia la luz del endosoma, dando lugar a la formación de vesículas intralumenales (ILV); mediante este proceso de vesiculación se forman los cuerpos multivesiculares (MVB). Durante la invaginación de la membrana plasmática, proteínas transmembrana quedan incorporadas en las porciones de membrana invaginada mientras que componentes citosólicos quedan englobados en las ILV [30, 31]. Dependiendo de sus características bioquímicas los MVB tienen dos posibles destinos, derivar en la formación de MVB degradativos con destino lisosomal o en MVB exocíticos, cuya membrana se volverá a fusionar con la membrana plasmática dando lugar a la liberación de exosomas al medio extracelular. La vía que lleva a los endosomas tempranos hasta los lisosomas se desarrolla mediante mecanismos mejor conocidos que la que lleva a la formación de MVB exocíticos; la formación de MVB con proteínas y lípidos cuyo destino no es ser degradados. Los MVB exocíticos presentan ILV con membranas ricas en miembros de la familia proteica de las tetraspaninas y moléculas presentadoras de antígenos del tipo MHC, además son ricas en un fosfolípido de

difícil degradación llamado ácido lisobifosfatídico (LBPA). Parece que la formación de exosomas requiere de la participación de ceramidas y es independiente de la cascada de acción de los complejos ESCRT. Se cree que LBPA y alix pueden jugar un papel importante en la generación de MVB exocíticos. Existen indicios de que LBPA bajo el control de alix puede regular la formación de ILV en la membrana de los endosomas tardíos, ya que estas moléculas, parecen controlar procesos de fusión de vesículas y el de la fusión con la membrana plasmática. LBPA y alix están implicados de manera selectiva en el tráfico y distribución de proteínas y lípidos desde el endosoma hasta destinos distintos del lisosomal y puede que hacia los exosomas [32]. Sin embargo este proceso puede estar acoplado a la maquinaria Hrs-ESCRT responsable de la vesiculación que sufren los endosomas tempranos para dar lugar a MVB (parece que este nexa se daría a través de la interacción de Alix y Tsg 101).

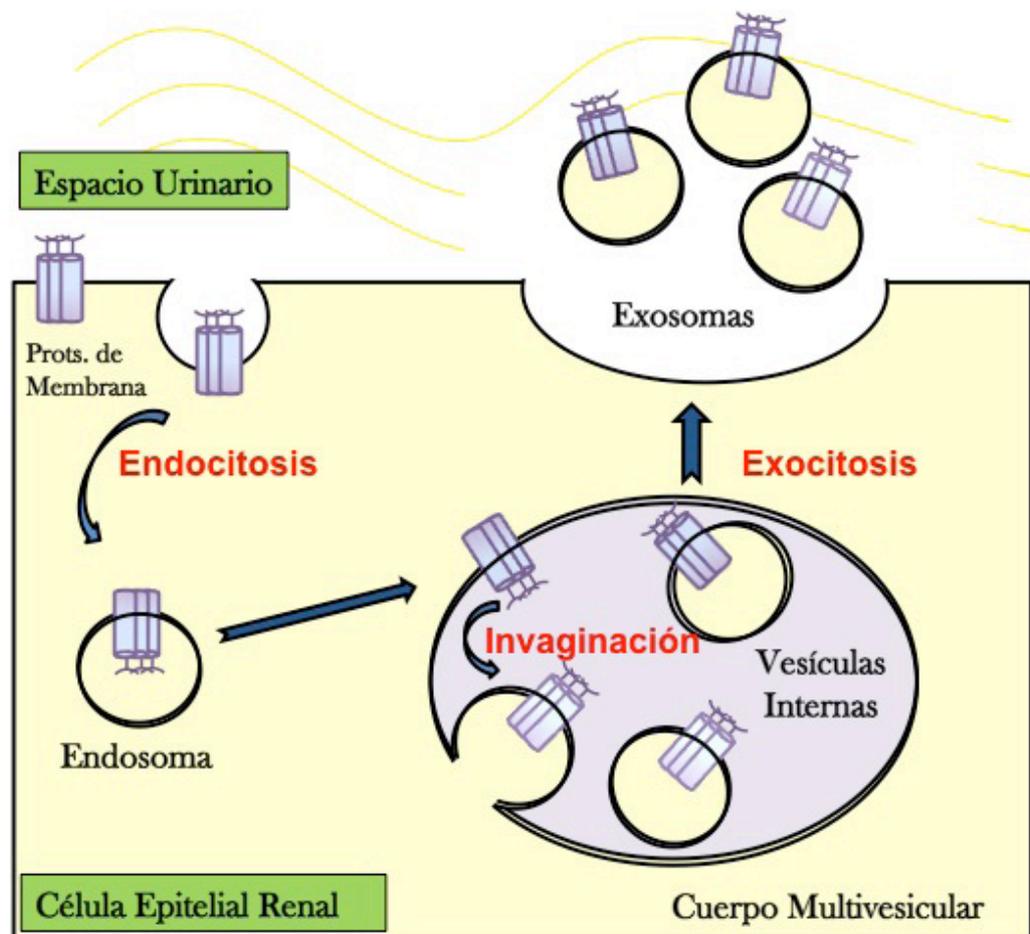


Figura 2. Representación esquemática del proceso de secreción y formación de los exosomas de orina.

Este proceso de formación de los exosomas define sus características concretas y su composición, ya que durante la vesiculación para la formación de ILV, componentes citoplasmáticos como proteínas solubles, micro ARN y ARNm y otras moléculas quedan englobadas en los exosomas, mientras que lípidos y proteínas de determinadas características quedan incorporados durante la invaginación de la membrana plasmática. Este proceso es responsable también de la orientación de las membranas lipídicas de los exosomas, idéntica a la de las células [33]. Se piensa que además de los componentes citoplasmáticos englobados de manera aleatoria existen pro-

teínas y moléculas de ARN que pueden ser incorporadas a los exosomas de manera selectiva[34-36].

b) Componentes proteicos de los exosomas.

Los exosomas han sido analizados de manera exhaustiva en varios tipos celulares así como fluidos corporales empleando métodos de espectometría de masas (MS), Western blot (WB), estudios de fluorescencia en células en los que los mecanismos de vesiculación están activados y métodos de inmunodetección empleando microscopía electrónica.[25]

La composición proteica de los exosomas varía dependiendo del origen celular de los mismos, aunque existe un grupo de proteínas conservado para todos los exosomas, con independencia del origen celular. A este grupo de proteínas características de los exosomas pertenecen proteínas implicadas en el proceso de la formación de los MVB como Alix, Tsg 101 o clatrina. Otra clase de proteínas detectadas con frecuencia es la de la familia Rabs, la mayor familia de pequeñas GTPasas que regulan procesos de acoplamiento y fusión en las membranas plasmáticas y fusión de membranas de los exosomas [37]. También se han visto con mucha frecuencia en estos estudios distintos tipos de anexinas (I,II,IV,V,VI,VII y XI) que participan en mecanismos de tráfico y fusión de membranas. Los exosomas son ricos en tetraspaninas (CD63, CD81 y CD9) y en proteínas “heat shock” (HSP60, HSP70, HSPA5, CCT2). Se ha visto que los exosomas portan además enzimas metabólicas (como aldolasa I, enolasa I, GADPH, GSTP, periredoxinas, etc.) proteínas ribosomales (como RPS3), proteínas transmembrana (como LAMP1), proteínas de señalización, ATPasas, proteínas del citoesqueleto (como actinas, tubulinas, cocirina,ezrina,etc) y ubiquitinas [25] entre otras.

Existe una base de datos de proteínas y ARN llamada Exocarta (www.exocarta.org), elaborada con datos obtenidos a partir de 75 publicaciones basadas en estudios realizados en exosomas de diversos orígenes celulares. En este catálogo encontramos 2624 proteínas, 901 ARNm y 274 micro ARN, que han sido detectados en exosomas. Es una base de datos de libre acceso de gran utilidad para contrastar estudios proteómicos y genómicos [25]

2.2 Papel fisiológico y patológico de los exosomas, funciones.

Los exosomas son multifuncionales: por un lado los exosomas son responsables de la eliminación de proteínas y lípidos en exceso o senescencia, por otro, existen importantes evidencias sobre el papel de los exosomas en la señalización celular de una manera selectiva [38-42], tales como: la regulación de la respuesta inmune, presentación antigénica, transferencia de ARN y proteínas, transferencia de partículas infecciosas y señalización intercelular [43]. Se sabe además que los exosomas pueden provocar efectos en células diana como mínimo a través de tres posibles mecanismos:

- Pueden adherirse a la superficie de células diana de forma altamente específica, sin fusionarse con ellas, a través de moléculas de adhesión y receptores específicos de la superficie celular, llevando a una activación de receptores y con ello influyendo en la regulación de la señalización celular [39-42, 44].

- De manera hipotética los exosomas pueden fusionarse directamente con las células diana transfiriendo a éstas, todo su contenido (proteínas, ARNm, microARN, lípidos y moléculas de señalización).
- El contenido exosomal puede ser incorporado a la célula diana tras la endocitosis de los exosomas y procesamiento de los mismos a través de la vía endocítica; este mecanismo está más documentado en la bibliografía [40-42, 45].

El mejor ejemplo del papel de los exosomas la comunicación célula-célula es el papel de los exosomas en la señalización en células madre y células del sistema inmune.

2.3 Los Exosomas como fuente de biomarcadores. Antecedentes de estudios clínicos basados en el análisis de exosomas.

Por todo lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta las evidencias claramente documentadas en la literatura podemos afirmar, que los exosomas son una importante fuente de información y una prometedora apuesta en la búsqueda de biomarcadores para diversas enfermedades. Como ya se ha comentado con anterioridad, los exosomas portan información de las células que los secretan, conteniendo tanto moléculas citoplasmáticas como de membrana. Pueden ser aislados a partir de células o tejidos en cultivo así como de fluidos biológicos como orina y sangre. Por todo ello, en la última década han sido estudiados en una gran variedad de procesos patológicos para una mejor comprensión de los mismos, así como para encontrar nuevas dianas terapéuticas y marcadores tempranos de enfermedad. Varios estudios de exosomas de la orina han permitido una mejor comprensión de distintas enfermedades renales tales como la enfermedad renal aguda, la nefropatía de Inmunoglobulina A, el síndrome nefrótico o la nefropatía poliquística como se detalla a continuación.

2.4 Exosomas de orina y su papel en enfermedades renales.

Los exosomas de la orina podrían desempeñar un importante papel en la fisiología renal. Puede que sean mediadores de la transferencia de información en la cascada de eventos que ocurren cuando tiene lugar la hipertrofia del tubo renal que se observa cuando existe una pérdida de nefronas, como ocurre en la ND. En este proceso el aumento de la tasa de filtración glomerular de nefronas individuales coincide con el aumento de la capacidad de transporte de sales y agua en los segmentos *distales* de la nefrona. Asociado a este proceso se puede observar una marcada elongación del tubo así como un aumento de la luz del mismo [46]. Es posible que esta transferencia de información a *lo largo de la nefrona* ocurra en estado fisiológico normal. De hecho se han detectado proteínas propias del túbulo proximal en el túbulo colector como es el caso del canal de agua acuaporina-1 [47] y de la enzima generadora de amonio glutaminasa [48, 49]. Esta transferencia de información *tardía* puede que no siempre sea beneficiosa. Se ha especulado con la posibilidad de que la proteína uromodulina, una proteína polimérica muy abundante en orina, juegue un papel en este proceso, limitando la fusión de exosomas con los segmentos *distales* de las nefronas. Se sabe que los exosomas quedan atrapados en las largas fibras poliméricas que forma esta proteína. Esto podría evitar que los exosomas entren en contacto con las superficies celulares a menos que la red polimérica se disuelva localmente [46, 47]. Si estas especu-

Introducción

laciones quedasen demostradas se podría explicar por qué mutaciones o deficiencias de uromodulina son causa de enfermedad renal [50, 51].

Otra vía por la que los exosomas podrían jugar un importante papel en la fisiología renal es a través de la acción directa de proteínas exosomales en la luz del túbulo renal. Un ejemplo de esto puede ser la demostrada abundante presencia de una enzima convertora de angiotensina en los exosomas de orina [10, 52], que podría desempeñar un importante papel en el sistema-renina angiotensina intralumenal [53].

También es muy posible que la principal función fisiológica de los exosomas de orina, sea la eliminación de proteínas senescentes de las células, ya que este podría ser un método más eficiente para la eliminación de proteínas que la degradación lisosomal o la degradación por parte del proteosoma [24].

Aunque en esta tesis nos centraremos en el estudio de los exosomas de la orina, también los exosomas de la sangre pueden jugar un importante papel en la fisiología y patofisiología renal, afectando especialmente a aquellas células cuya membrana plasmática está en contacto directo con el compartimento vascular, como son células del sistema inmune y las células endoteliales.[24]

3. PROTEÓMICA.

La Proteómica es la disciplina que estudia de manera dinámica todas las proteínas expresadas por un organismo, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente, lo que se denomina proteoma [54]. Las proteínas son las biomoléculas que actúan como efectores finales de los procesos que tienen lugar en las células, por lo que el estudio proteómico es la manera más adecuada de analizar los procesos biológicos que tienen lugar en un organismo, así como de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a dichos procesos.

Su principal ventaja radica en que no se realiza una pre-selección de candidatos a estudiar sino que se trata de un abordaje global y sin sesgo, lo cual permite estudiar el proteoma en conjunto.

El análisis del proteoma de un organismo tradicionalmente se ha llevado a cabo mediante separación de las proteínas por electroforesis bidimensional en gel (2-DE) y posterior identificación de las mismas por espectrometría de masas (MS). Este tipo de estudios proteómicos se conocen en la actualidad como Proteómica Clásica. La aparición del método de ionización por electroespray (ESI) [55], que permite realizar la identificación de proteínas por MS en línea y de forma inmediata tras su separación por cromatografía líquida (LC-MS), ha abierto un nuevo campo en la Proteómica que se conoce como Proteómica de Segunda Generación. Esta nueva rama de la Proteómica permite realizar identificaciones a gran escala de las proteínas presentes en una mezcla y su creciente desarrollo ha dado lugar a la descripción de multitud de proteomas que no se conocían hasta el momento.

3.1 Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra para su análisis proteómico, es un paso crítico que va a limitar la cantidad y la calidad de los datos obtenidos. Las muestras generalmente estudiadas se componen de: células, tejidos, fluidos o micropartículas. En los dos primeros casos, es necesario disgregar el tejido y/o romper las células para obtener el proteoma y en el caso de las micropartículas será necesario realizar un correcto aislamiento de las mismas y posterior lisado, para así tener acceso a su proteoma.

En cualquier caso es fundamental que las estrategias de extracción purificación proteica, concentración limpieza, etc. sean compatibles con el tipo de análisis posterior seleccionado. En los siguientes puntos se indican brevemente procedimientos comúnmente empleados previos al análisis proteómicos, sin pretender realizar una compilación exhaustiva, ya que los procedimientos elegidos serán altamente dependientes del tipo de muestra y el análisis a realizar.

3.1.1 Lisis celular

La rotura de las células se puede realizar por métodos físicos: choque osmótico, rotura mecánica, congelación/descongelación, sonicación, etc.; o químicos, que están

basados en el empleo de detergentes. Los detergentes disocian las interacciones lípido-proteína e interacciones hidrofóbicas entre proteínas, rompiendo las membranas y ayudando además a solubilizar las proteínas. Generalmente se combinan ambos tipos de métodos realizándose una lisis física en solución con detergente.

3.1.2 Solubilización

Para realizar una correcta solubilización de las proteínas de una muestra ésta debe llevarse a cabo en un medio tamponado suplementado con una serie de aditivos. En primer lugar, los tampones de solubilización deben contener alta concentración de un agente caótopo, generalmente urea o una combinación de ésta con tiourea, que desnatura las proteínas mediante la ruptura de enlaces hidrofóbicos, así como de las interacciones intramoleculares. En segundo lugar, se debe incluir un detergente que mantenga a las proteínas en disolución al impedir que se formen de nuevo las interacciones hidrofóbicas, como [3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato] (CHAPS), SDS, Tritón X-100, entre otros. La presencia de un agente reductor (ditiotreitól (DTT), β -mercaptoetanol, fosfinas..) que produzca la ruptura de los puentes disulfuro entre residuos de cisteína es también fundamental para una solubilización eficaz. En aquellos casos en el que la muestra vaya a ser analizada mediante 2-DE, la presencia de anfolitos, o mezcla de compuestos cargados, ayuda a solubilizar las proteínas y evita que precipiten al entrar en la primera dimensión de la 2-DE al impedir la agregación por interacciones por carga. Además, los anfolitos contienen grupos amino, de tal manera que, al competir con los grupos amino de las proteínas, contribuyen a minimizar el efecto negativo de los cianatos producidos por la urea. Si se emplea un detergente iónico en la solubilización de la muestra, éste debe ser eliminado antes de la separación por 2-DE. Si el análisis proteómico se llevara a cabo por LC-MS, es preciso incluir etapas adicionales de limpieza para evitar la influencia de detergentes.

3.1.3 Limpieza de extractos.

Existen distintas aproximaciones para llevar a cabo la limpieza de extractos proteicos que van a ser analizados mediante técnicas proteómicas, la mayoría de ellos persiguen la eliminación de sales, lípidos, detergentes que pudieran estar presentes en la muestra tras la solubilización de la misma y pudieran interferir con el método seleccionado para el análisis. Entre las más empleadas se encuentran la precipitación con acetona o empleando Kits comerciales de limpieza que están basados en el mismo principio de precipitación y que incluyen además reactivos que favorecen la resolubilización de la muestra (como por ejemplo el 2D-Clean up, GE healthcare). La diálisis es otro método muy empleado para la eliminación de sales presentes en la muestra. Estos métodos de limpieza permiten además llevar a cabo cambios de tampón, pudiendo sustituir el empleado durante el proceso de solubilización por un tampón más compatible con el método de análisis.

3.1.4 Concentración o fraccionamiento.

La gran complejidad de los proteomas en estudio exige generalmente un prefraccionamiento y/o concentración de las muestras, ya que en ocasiones tras aplicar los procesos de lisis y solubilización las muestras se encuentran muy diluidas y han de ser concentradas. Esta concentración se puede llevar a cabo durante el paso de limpieza (precipitación y resuspensión en menor volumen) o empleando otros métodos como

por ejemplo unidades de ultrafiltración para reducir el volumen de muestra eliminando parte de la solución y obteniendo muestras más concentradas.

El fraccionamiento de la muestra permite separar las proteínas presentes en una muestra, dando lugar a fracciones más sencillas que serán analizadas por separado. Según la muestra en estudio y la técnica elegida para su análisis, el fraccionamiento se podrá llevar a cabo basándose en distintos parámetros proteicos y empleando distintos sistemas; así las proteínas podrán ser separadas, según su carga (cromatografía de intercambio iónico), tamaño (SDS-PAGE), polaridad (cromatografía de fase reversa) o punto isoeléctrico (“Off-gel”, IEF).

3.1.5 Depleción.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior las muestras biológicas, son generalmente mezclas muy complejas. Estas pueden además presentar un gran número de proteínas mayoritarias, como ocurre por ejemplo en el plasma (20 proteínas mayoritarias que suponen el 90% del contenido proteico) o en el caso que nos ocupa el de la orina de pacientes con albuminuria. La presencia de dichas proteínas mayoritarias dificulta la identificación de proteínas menos abundantes por MS. Las proteínas minoritarias suelen ser además las de mayor interés en la búsqueda de biomarcadores. Por todo ello muchas veces es necesario aplicar técnicas de depleción previas al análisis por MS, ya que esto permitirá una reducción en la complejidad de la muestra favoreciendo la identificación de proteínas poco abundantes con mayor interés clínico.

3.1.6 Digestión.

La tripsina es la proteasa más comúnmente utilizada para digerir las proteínas y obtener péptidos tripticos, ya que su corte es altamente reproducible en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina. Existen otras proteasas como la pepsina y la quimotripsina que pueden ser empleadas para la digestión peptídica pero son mucho menos empleadas a la hora de llevar a cabo análisis por MS. Generalmente antes de la digestión se lleva a cabo una reducción y una alquilación de las proteínas y se aplica posteriormente el método de digestión. Existen distintas metodologías para llevar a cabo la digestión: se puede realizar en gel, en disolución, de manera manual, automatizada, etc. dependiendo del análisis al que se les vaya a someter y de los métodos de fraccionamiento, limpieza etc, que se le hayan aplicado a la muestra antes de la digestión.

3.2 Técnicas para la separación de proteínas.

El análisis directo por espectrometría de masas de la mayoría de proteomas es algo inabordable dada la complejidad de los mismos, resultando únicamente en un número

muy limitado de identificaciones correspondientes a un pequeño subgrupo compuesto por las proteínas mayoritarias presentes en la muestra. En consecuencia, resulta imprescindible realizar un “fraccionamiento” o separación previa de las proteínas (“top-down”) o péptidos (“bottom-up”) de las muestras, previo al análisis por MS.

En el abordaje clásico por 2DE existe una doble separación por pI y PM previa a la identificación proteica por MS, comúnmente por MALDI-TOF/TOF.

La cromatografía líquida, mono o multidimensional, combinando generalmente una separación de intercambio iónico y una cromatografía de fase reversa posterior es una herramienta muy potente que acoplada a un espectrometro de masas permite la identificación simultanea de cientos o miles de proteínas en un único análisis.

3.3 Espectrometría de masas (MS). Identificación de proteínas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se emplea para determinar la masa molecular de un compuesto mediante el uso de instrumentos que pueden medir la relación masa/carga (m/z) de iones en fase gaseosa, trabajando en condiciones de vacío, llamados espectrómetros de masas. A finales de los 90 se desarrollaron dos técnicas de ionización que permitieron realizar análisis de proteínas y péptidos, entre otras biomoléculas, por MS. La primera de ellas es la denominada ionización mediante desorción por láser asistida por matriz (matrix-assisted laser desorption ionization: MALDI) desarrollada por Karas y Hillenkamp en 1988 [56]. La segunda de ellas es la ionización por electroespray (electrospray ionization: ESI), desarrollada por Fenn y colaboradores [57].

3.3.1 Estructura de un espectrómetro de masas.

Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos, que en orden secuencial de actuación en un análisis por MS son: fuente de ionización (MALDI, ESI), analizador(Q, TOF, trampa iónica, etc.) de masas y detector. La fuente de ionización convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que pasen al analizador de masas, donde son separadas según su relación masa/carga. Al detector llegan secuencialmente y las señales captadas por el mismo, son integradas por un sistema informático que genera los correspondientes espectros de masas, donde se representan la abundancia (intensidad) de los iones en el eje de ordenadas y la relación m/z en abscisas. Por comparación con los espectros recogidos en las bases de datos y empleando los motores de búsqueda adecuados se procederá a la identificación de las proteínas.

Las configuraciones más habituales hasta la fecha son: Triple cuadrupolo (Q-Q-Q), cuadrupolo y tiempo de vuelo (Q-TOF), trampa iónica (IT), cuadrupolo-cuadrupolo-trampa iónica lineal (Q-Q-LIT) Transformada de Fourier (FT) y Orbitrap.

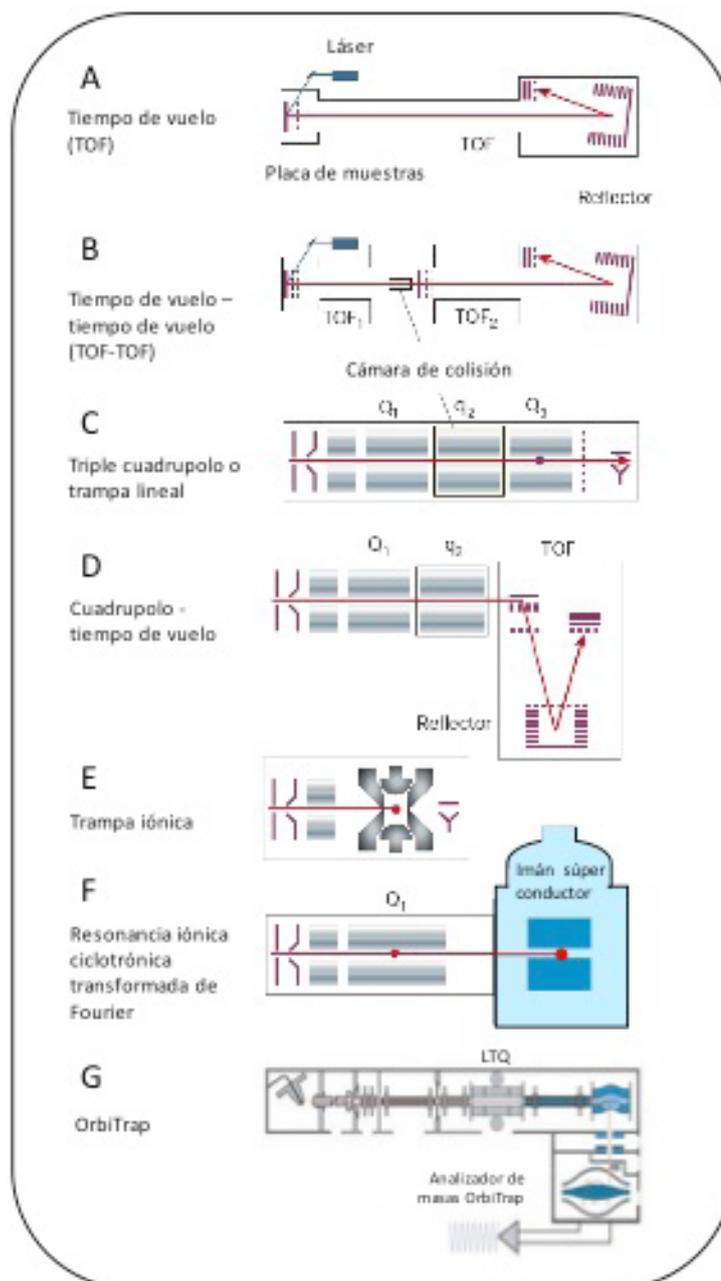


Figura 3. Tipos de espectrómetros de masas empleados en Proteómica. A. En los equipos MALDI-TOF los iones son acelerados y separados en un tubo de vuelo de acuerdo a sus diferentes velocidades. B. El MALDI-TOF-TOF incluye una celda de colisión entre dos tubos de vuelo. C. En el triple cuadrupolo los iones son seleccionados en el primer cuadrupolo (Q1), fragmentados en la celda de colisión (Q2) y sus fragmentos separados en el (Q3). En una trampa lineal, los iones son capturados en una sección cuádruple conductor representada por un punto rojo en Q3. A continuación son sometidos a un campo de resonancia y se escanean a su salida. D. El cuadrupolo-TOF combina la parte frontal de un triple cuadrupolo con un analizador de masas para los fragmentos peptídicos tipo TOF. E. La trampa iónica tridimensional funciona de manera similar a la lineal, reteniendo los iones peptídicos, fragmentando los de determinada m/z y escaneando los fragmentos a su salida para generar el espectro de fragmentación. F. El FT-MS retiene también los iones pero ayudándose de campos magnéticos de alta intensidad. En la figura aparece representada la configuración que combina una trampa lineal para separación y fragmentación de iones y el FT-MS para detectar los fragmentos con alta resolución. G. Trampa iónica lineal con analizador de masas OrbiTrap. Adaptado de: Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422(6928):198-207 (2003).

3.3.2 Identificación de proteínas por MS.

La identificación de proteínas por MS se lleva a cabo mediante las siguientes aproximaciones:

a) Huella dactilar peptídica (peptide mass fingerprint, PMF)

Consiste en la identificación de una proteína mediante el registro de las masas de los péptidos obtenidos tras digestión enzimática, que generalmente se realiza con tripsina. Cada proteína puede ser identificada en base a las masas de los péptidos que la forman, y eso constituye lo que denominamos huella dactilar peptídica. Este tipo de identificación se realiza para proteínas purificadas o mezclas simples de proteínas, que pueden provenir de manchas proteicas de un gel 2-DE y bandas de geles unidimensionales o fracciones de LC de baja complejidad. Una vez obtenido el espectro en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF, se utiliza un programa informático denominado motor de búsqueda que compara el espectro obtenido con los espectros teóricos de una base de datos que contiene las digestiones teóricas de todas las proteínas descritas y nos da un listado de las posibles proteínas ordenadas según su mayor correlación con el espectro, lo que se corresponde con un mayor valor de significación.

b) Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Actualmente se emplean en la mayoría de los casos espectrómetros de masas con dos analizadores de masas en tándem para llevar a cabo identificación de proteínas. Estos equipos permiten realizar la medición de m/z de los péptidos intactos en el primer analizador de masas y, tras una fragmentación de algunos de los péptidos en una cámara de colisión (por disociación inducida por colisión (CID)), la medición de las m/z de los fragmentos de los mismos en el segundo analizador de masas. Esto permite realizar la identificación de la proteína con información adicional a la realizada por huella peptídica, ya que el espectro de fragmentación de un péptido es característico de cada péptido. Este espectro de fragmentación puede incluso permitir la secuenciación total o parcial del péptido. La obtención de la secuencia de aminoácidos de un péptido, utilizando exclusivamente los datos presentes en el espectro de fragmentación se conoce como secuenciación de novo.

Para realizar MS/MS de mezclas poco complejas se emplean los espectrómetros de masas tipo MALDI-TOF-TOF. El análisis de identificación proteica de muestras de gran complejidad en cuanto a número de proteínas y rango dinámico lineal se aborda por LC-MS/MS (fuente ESI)

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de fragmentación como alternativa a la CID en busca de una mejor secuenciación peptídica. Existen dos nuevos métodos basados en la transferencia de electrones de los iones presentes en la cámara de colisión denominados disociación por captura de electrones (electron capture dissociation, ECD) y disociación por transferencia de electrones (electron transfer dissociation, ETD)[58].

3.4 Análisis de expresión diferencial de proteínas. Proteómica Cuantitativa.

La metodología tradicionalmente utilizada para realizar un análisis comparativo de dos grupos de muestras mediante análisis proteómico está basada en la 2-DE, y sigue siendo la más utilizada hoy en día, mediante la metodología 2D-DIGE (“Differential in gel electrophoresis”), debido a su menor coste con respecto a LC-MS y a una mayor facilidad de implementación en el laboratorio. La tecnología 2D-DIGE, o electroforesis bidimensional en gel con marcaje fluorescente, permite la comparación de perfiles proteicos entre los distintos grupos y la identificación mediante análisis estadístico de manchas proteicas de intensidad variable significativa que posteriormente son identificadas por espectrometría de masas. Es una técnica que cuenta con gran sensibilidad y reproducibilidad al incluir en cada análisis una muestra “pool” compuesta por una alícuota de todas las muestras que componen el estudio y que actúa como patrón interno en todo el estudio, superando enormemente a la electroforesis 2-DE convencional con tinción de plata en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad y rango dinámico lineal.

Aún así, los avances en LC-MS experimentados en los últimos años nos han dotado de un gran número de nuevas estrategias para realizar análisis cuantitativos basados en la abundancia o intensidad de los péptidos (MS) y/o de los fragmentos de éstos (MS/MS), y su uso está en constante crecimiento. La mayoría de los métodos empleados se basan en el uso de isótopos estables con los que se marcan las proteínas de uno o varios de los grupos de estudio. Las propiedades químicas de los compuestos marcados con los isótopos estables son idénticas a las de sus homólogos no marcados, excepto en masa, lo que permite emplearlos como estándares internos o referencias relativas en un análisis por espectrometría de masas [59]. Dentro de los métodos de marcaje isotópico podemos encontrar, entre otros: marcaje de afinidad codificado por isótopos (Isotope-Coded Affinity Tag, ICAT), marcaje metabólico con ^{15}N , marcaje enzimático con ^{18}O , marcaje proteico codificado por isótopos (Isotope-Coded Protein Labeling, ICPL), marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification, iTRAQ), marcaje con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivos celulares (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC) [31] y una reciente variante aplicada a tejidos denominada comparación de la velocidad de incorporación de aminoácidos marcados con isótopos (Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates, CILAIR) [60]. Aunque estos métodos permiten cuantificaciones fiables, tienen la desventaja de permitir la comparación de un número limitado de muestras en paralelo (salvo el método iTRAQ, en el que se pueden comparar hasta 8), de un alto coste de los reactivos, posibilidad de marcaje incompleto en algunos de ellos y una importante complejidad de la preparación de la muestra, así como la necesidad de mayores concentraciones de ésta [59].

Por estos motivos, una metodología bastante reciente denominada cuantificación libre de marcaje (“label free”) se emplea cada vez de manera más frecuente debido a que no requiere ningún marcaje, lo que minimiza el número de pasos en la preparación de la muestra y evita las desventajas antes comentadas. De este modo la cuantificación de las proteínas en base a todos los péptidos detectados en el espectrómetro de masas, y no sólo de aquellos correctamente marcados. Uno de los primeros métodos empleados para realizar cuantificación libre de marcaje es el de conteo de espectros (“spectral counting”). Este método está basado en la existencia de una correlación entre la frecuencia con la que un espectrómetro de masas en tándem fragmenta un ión de un m/z dado y la abundancia de la proteína de la que procede ese ion [61]. Es decir, al aumentar la abundancia de una proteína en una muestra aumenta el número de péptidos resultado de la digestión protei-

ca, por lo que cabe esperar: a) un aumento en el porcentaje de cobertura de secuencia, b) un aumento en el número de péptidos únicos identificados, y c) un aumento de espectros de MS/MS adquiridos [59]. De estos 3 factores, sólo se encontró una relación lineal proporcional a la abundancia proteica para el número de espectros MS/MS adquiridos y es por tanto en esta medida en la que se basa la metodología de conteo para la cuantificación. Para realizar una normalización, se puede emplear la suma de todas las intensidades de los iones o “total ion chromatogram” (TIC) [62].

Tras una primera fase de descubrimiento de potenciales biomarcadores, donde se estudia un número no muy elevado de muestras, se procede a una segunda fase de validación. Para ello, la metodología “selected reaction monitoring” (SRM) resulta idónea por su poder de resolución y sensibilidad. Se basa en el análisis por espectrometría de masas, empleando un equipo que permita una previa selección de las transiciones específicas asociadas a los péptidos de las proteínas de interés, que permita que éstas sean detectadas y cuantificadas, pudiéndose validar así las diferencias encontradas previamente en la fase de descubrimiento entre controles y grupos de pacientes. Esta técnica requiere habitualmente del empleo de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QQQ) acoplado en línea a nano cromatografía líquida (nLC). En el que el primer cuadrupolo del equipo, Q1, se emplea para seleccionar un ión precursor de masa conocida. Este ión pasa al Q2, donde es fragmentado mediante CID. Los fragmentos resultantes son analizados en el Q3, y las transiciones precursor-fragmento seleccionadas de antemano se emplean para cuantificar el péptido [63] (figura 4). También se puede realizar este análisis en espectrómetros de masas tipo trampa iónica, ya que en éstos la trampa puede funcionar como un tercer cuadrupolo en el que monitorizar las transiciones. Para realizar una cuantificación por SRM debemos conocer la/s proteína/s de interés, motivo por el cual, no permite su empleo para análisis diferencial en la fase de descubrimiento de biomarcadores. Sin embargo, esta técnica, que lleva empleándose desde hace décadas para cuantificar compuestos de bajo peso molecular (principalmente en la industria farmacéutica), se está imponiendo como técnica de validación de biomarcadores debido a su gran selectividad y sensibilidad, así como por el manejo de alto número de muestras que permite.

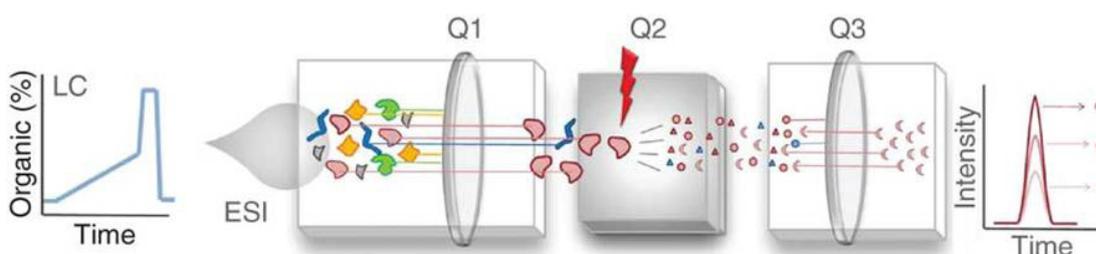


Figura 4. Figura esquemática en la que podemos observar los componentes y funcionamiento de un triple cuadrupolo (QQQ).

4. PROTEOMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.

Tal y como se ha comentado con anterioridad, no existe actualmente un adecuado tratamiento ni un adecuado método para la detección temprana de la ND y prevención de la misma. Esto es probablemente debido a que no se ha llegado a comprender de manera global y clara el complejo mecanismo a través del cual cursa la enfermedad, por ello, no es extraño que no se consiga una buena prevención de esta importante complicación derivada de la DM ya que una mejor comprensión de su patogénesis y patofisiología son cruciales para su prevención y tratamiento [64]. Durante la última década la proteómica ha sido ampliamente aplicada en investigación biomédica [65]. Se han establecido una serie de colaboraciones internacionales con el fin de unificar los esfuerzos en el estudio de esta y otras enfermedades renales desde el punto de vista proteómico como EuroKUP (European kidney and urine proteomics, www.eurokup.org) y la HKUPP (kidney and urine proteome project, www.hkup.org, respaldada por la HUPO, human proteome project)

La orina ha resultado ser la fuente de estudio preferida en la búsqueda de biomarcadores para la ND, ya que refleja el estado fisiopatológico del riñón y se puede obtener en grandes cantidades de manera no invasiva. Además presenta la ventaja de ser la más útil a la hora de trasladar los resultados a la práctica clínica [66, 67] ya que los biomarcadores identificados en ellas se podrían identificar en orina de pacientes, pudiendo facilitar el diagnóstico sin llevar a cabo prácticas invasivas. También se han llevado a cabo estudios a partir de tejido renal obtenido desde biopsias humanas o desarrollando modelos animales. Existen, aunque en menor número, estudios proteómicos *in vitro* empleando cultivos celulares a alta concentración de glucosa [68-71] y estudios en suero de pacientes y controles sanos con nefropatía diabética [72-74]. En los últimos años además el estudio de micropartículas de orina provenientes del riñón, tales como los exosomas ha ganado una gran importancia en el estudio de enfermedades renales y ha generado un gran interés en la comunidad científica internacional.

En los siguientes apartados se resumen, las principales aportaciones llevadas a cabo en este campo.

4.1 Estudios proteómicos en tejido renal.

El análisis proteómico del tejido renal se ha abordado desde muchos puntos de vista, empleando diversas fuentes de estudio, como biopsias, o gran variedad de modelos animales (ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ), ratones OVE26, ratas espontáneamente diabéticas OLETF, ratones db/db, etc.). Muchos de estos estudios se han centrado en el descubrimiento de proteínas que presentan una expresión diferencial en modelos animales con ND establecida, permitiendo detectar variaciones que afectaban a la vía del sistema elastina-elastasa y variaciones en un alto número de proteínas como por ejemplo un aumento en los niveles de calbindina-D28K, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D [75-77], así como alteraciones con especial implicación en vías metabólicas [78]. Existe además otra serie de estudios centrados exclusivamente en el estudio de la proteómica glomerular [79, 80] o en la búsqueda de marcadores de progresión de ND en

un modelo animal [81], en el estudio de la glicosilación de proteínas [82, 83] o en la eficacia de distintos tratamientos para la mejora de la ND [84, 85].

Todos estos estudios en conjunto han generado importantes e interesantes resultados que poco a poco aumentan la información para una mejor comprensión de los mecanismos por los que cursa esta enfermedad, así como gran número de candidatos a ser buenos biomarcadores para la detección y seguimiento de la misma. Algunos de ellos, con aparente aplicación clínica que está siendo testada a través de diversos ensayos clínicos. Pero hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio de proteómica del riñón en un modelo de ND temprana como el que en esta tesis se presenta.

4.2 Estudios proteómicos en orina.

El estudio proteómico de la orina para una mejor comprensión de la ND se ha abordado también desde distintos puntos de vista; se han realizado estudios para un seguimiento de la evolución de la misma [86-88], para la búsqueda de marcadores que permitan discriminar entre ND y otro tipo de nefropatías [89-92] y para la búsqueda de marcadores tempranos en estadios iniciales de la enfermedad [93, 94].

La mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de la fracción de bajo peso molecular (peptidoma). La electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-MS) es una de las herramientas más empleadas en el estudio del perfil peptidómico de la orina [93-95]. La mayoría de estos estudios han llegado a la conclusión de que los fragmentos de colágeno tienen una menor presencia en orina de pacientes con ND, apareciendo éstos como biomarcadores relevantes de 3 a 5 años antes del establecimiento de la macroalbuminuria. Por otra parte se han encontrado importantes diferencias entre el perfil peptidómico de pacientes microalbuminúricos con función renal normal de aquellos con función renal disminuida, mediante un análisis por LC-MALDI-TOF identificándose fragmentos de colágeno ($\alpha 1(IV)$ y $\alpha 1$) disminuidos y sugiriendo estos péptidos como potenciales marcadores de la progresión de la ND [95].

La tecnología SELDI-TOF ha sido también empleada con éxito en distintos estudios [91, 92], encontrándose una firma molecular de 12 espectros que permitían diferenciar a los pacientes que desarrollaron microalbuminuria de aquellos que permanecieron normoalbuminúricos 10 años después de realizar el estudio [96]. Otras tecnologías aplicadas recientemente al estudio del proteoma urinario han sido la tecnología de microfluidos en chip [89], la tecnología iTRAQ [88] y la técnica de 2D-DIGE para establecer diferencias de expresión proteica entre orina de pacientes en un estado avanzado de ND y controles sanos.[86, 87]

Adicionalmente se ha empleado un modelo temprano de ND en ratas en los dos primeros meses de desarrollo de la enfermedad, igual al empleado para los experimentos presentados en esta tesis, para llevar a cabo un estudio del proteoma de la orina de estos animales a distintos tiempos con el objetivo de determinar cambios en los perfiles proteómicos que dieran como resultado la posibilidad de obtener biomarcadores tempranos y de progresión de la enfermedad a través de una aproximación "label free". En él se encontraron interesantes diferencias y entre ellas se prestó especial atención al aumento del precursor del α -colágeno, que fue validado mediante SRM [93].

5. ESTUDIO PROTEOMICO DE EXOSOMAS DE ORINA.

A pesar de que en los últimos años el interés en el estudio de las micropartículas ha provocado un rápido aumento del número de publicaciones relacionadas con el estudio proteómico de exosomas de orina, al realizar una búsqueda exhaustiva, no encontramos ningún trabajo publicado que aborde el estudio proteómico de los exosomas de orina en ND. Sin embargo, sí existen antecedentes para un correcto aislamiento de esta fracción [46, 97, 98], comparativas sobre ventajas y desventajas del empleo de distintos métodos de aislamiento [99, 100] y tratamiento de la muestra [101] o estudios proteómicos de exosomas de orina en otro tipo de enfermedad renal [102, 103] o en enfermedades no renales [104-107]. Creemos que es importante tener en cuenta estos antecedentes ya que resultarán muy útiles a la hora de explicar y entender por qué se ha procedido de una manera determinada al abordar y llevar a cabo el trabajo presentado en esta tesis y en qué antecedentes nos hemos basado para poder alcanzar una mejor comprensión de la ND a través del estudio de los exosomas de orina.

Para un buen estudio proteómico de exosomas hay que tener muy en cuenta el grado de pureza de las muestras y el rendimiento obtenido en el aislamiento. Obtener un rendimiento óptimo depende principalmente de dos factores. Por un lado, la forma en que se trata la muestra de orina, desde el punto de vista de la recogida y conservación y etapas previas al aislamiento. Por otro lado, al propio método de aislamiento empleado. Se ha publicado un estudio sobre la influencia del manejo y almacenamiento de las muestras de orina en lo que respecta a la conservación y recuperación de proteínas exosomales. Para ello, analizaron mediante electroforesis e inmunodetección, el rendimiento y la calidad de la muestra obtenida. Los resultados experimentales demostraron la importancia de la adición de inhibidores de proteasas para evitar la degradación de las muestras recogidas, demostrando también que la degradación de proteínas en la primera orina de la mañana debida al almacenamiento y retención en la vejiga no era significativa. Confirmaron la importancia de congelar las muestras a -70°C , ya que las muestras así conservadas daban lugar a una mayor rendimiento en la recuperación de proteínas exosomales que las congeladas a -20°C (análisis realizados siete meses después). También se puso de manifiesto la importancia de agitar vigorosamente las muestras con ayuda de un vortex, durante el proceso de descongelación de la muestra, ya que esto aumentaba significativamente el rendimiento en la recuperación de proteínas exosomales [101].

El hecho de que la conservación a menor temperatura así como la agitación de la muestra den lugar a una mejor recuperación de los exosomas puede deberse a un menor secuestro de los exosomas por parte de la proteína Tamm-Horsfall (THP) o uromodulina [46]. Esta proteína es la proteína más abundante en orina de individuos sanos y a bajas temperaturas forma agregados dando lugar a grandes redes poliméricas, entre las que los exosomas pueden quedar atrapados. Al llevar a cabo centrifugaciones a baja velocidad, estas redes poliméricas tienden a precipitar arrastrando con ellas parte de los exosomas presentes en la muestra. Se han descrito también protocolos para la recuperación de estos exosomas atrapados que aumentan el rendimiento del proceso de extracción [46].

En cualquier caso, la mayoría de los estudios en los que se comparan métodos para el aislamiento de exosomas, se han centrado en el estudio de orina de individuos sanos, pero no se han evaluado, la eficiencia de estos métodos y su aplicabilidad sobre muestras de pacientes que presentan proteinuria. En 2010 se publicó un estudio que abordaba esta problemática,

comparando métodos de ultrafiltración y ultracentrifugación con una variante del método de ultracentrifugación que incluía un paso posterior de purificación de la muestra precipitada mediante cromatografía de exclusión por tamaño [100] obteniéndose preparaciones más limpias. De manera similar en esta tesis, se presenta otra aproximación metodológica distinta que persigue el mismo fin, pero buscando acortar los tiempos de análisis y facilitar su implantación en el laboratorio, desde un punto de vista clínico.

En 2004 se mostró por primera vez el potencial de los exosomas para favorecer la detectabilidad de proteínas poco abundantes con significado fisiopatológico partiendo de muestras de orina de humanos sanos. Desde entonces, se han llevado a cabo varios trabajos centrados en la búsqueda de biomarcadores de enfermedades renales y del tracto urinario mediante el estudio de los exosomas de orina. La mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo empleando LC-MS/MS, generando un perfil a gran escala del proteoma de los exosomas urinarios de humanos sanos que ha quedado recogido en una gran base de datos, de acceso público (<http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lkem/exosome/>). Esta base de datos proporciona una lista de 1160 proteínas presentes en los exosomas urinarios y contiene potenciales proteínas biomarcadoras que pueden ser la base de hipótesis referentes al mecanismo de distintas enfermedades [52]. En otro análisis general del proteoma de la orina patológica [108] se identificaron un gran número de proteínas de membrana, presumiblemente debido a la presencia de exosomas en esas muestras. Las proteínas exosomales representan alrededor de un 3% del total de las proteínas de la orina, por tanto el aislamiento de estas muestras proporciona un enriquecimiento de la muestra de unas 30 veces en proteínas exosomales, permitiendo que proteínas minoritarias del proteoma de la orina sean fácilmente detectables. En 2009 Gonzales et al. llevaron a cabo un estudio mediante el análisis de LC-MS/MS del proteoma y el fosfoproteoma de exosomas de orina, describiendo un perfil proteómico que incluía 1132 proteínas exosomales, de las que 177 habían sido previamente descritas como proteínas asociadas a distintas enfermedades. Pudieron describir además 14 fosfoproteínas. En paralelo se identificaron 27 proteínas diferencialmente expresadas, entre exosomas aislados en orina de ratas sanas y los aislados en orina de ratas a las que se les había generado un daño renal agudo mediante la inyección de cisplatino. Este estudio se realizó mediante 2D-DIGE seguido de identificación por MALDI-TOF-TOF y concluyó que la Fentuinina-A podría emplearse como nuevo marcador exosomal, para la detección del daño renal agudo [102].

Buscando una mejor comprensión del proceso por el que cursan la Nefropatía IgA y la nefropatía por engrosamiento de la membrana basal, se identificaron 1877 proteínas exosomales de orina, de entre las cuales 4 (aminopetidasaN, precursor de vasorina, α -anti tripsina y ceruloplasmina) fueron seleccionadas como posibles biomarcadores para diferenciar entre estas dos patologías.

Se ha visto además, que el análisis de exosomas puede resultar útil para la clasificación de otros procesos patológicos relacionados con el túbulo renal como la enfermedad del riñón poliquístico [109], enfermedad de almacenamiento lisosomal (como la enfermedad de Nieman-Pick y la cistinosis) y mutaciones en los transportadores (como el síndrome de Gitelman y Bartter) [52].

Los exosomas urinarios han mostrado ser útiles para la clasificación de daño hepático que puede afectar al riñón de forma secundaria [110]. Se ha propuesto también que el análisis del proteoma exosomal en pacientes con hipertensión puede contribuir a encontrar biomarcadores que predigan qué drogas son más efectivas para provocar un descenso de la presión sanguínea en un paciente dado (medicina personalizada) [111].

Queda claro por tanto el potencial de estas microvesículas en el estudio de la ND, objetivo que se aborda desde un punto de vista proteómico en la presente tesis doctoral.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en descubrir nuevos mecanismos fisiopatológicos operantes en el desarrollo de Nefropatía Diabética, para una mejor comprensión de la misma y descubrimiento de nuevos marcadores de diagnóstico, evolución y potenciales dianas terapéuticas. Para ello, nos centramos principalmente en el estudio de los exosomas aislados de orina como nueva fuente de proteínas marcadoras.

Para este abordaje general, planteamos los siguientes objetivos particulares:

1. Puesta a punto de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de exosomas de orina de individuos sanos y pacientes con Nefropatía Diabética (ND) mediante 2DE, LC-MS/MS y SRM.
2. Identificación de nuevas proteínas presentes en exosomas de orina de individuos sanos y pacientes ND. Análisis cualitativo del proteoma exosomal por LC-MS/MS.
3. Análisis diferencial cuantitativo del proteoma de exosomas de la orina en individuos sanos y pacientes ND en estadios avanzados por LC-MS/MS (cuantificación libre de marcaje).
4. Análisis diferencial cuantitativo del proteoma del riñón en un modelo animal de ND en estadio temprano mediante 2D-DIGE. Identificación de potenciales marcadores en fluidos biológicos directamente accesibles: orina y exosomas de orina.
5. Validación de los resultados obtenidos en la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas y candidatos a marcador de ND mediante técnicas complementarias: Western Blot, Inmunohistoquímica y monitorización de reacción seleccionada (SRM).

Material y métodos

I. ANÁLISIS DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DEPLECIÓN DE PROTEÍNAS MAYORITARIAS CONTAMINANTES.

I.1 Selección de pacientes y recogida de muestras.

a) Selección de pacientes.

Los pacientes seleccionados para todos los estudios realizados, padecían nefropatía diabética de grado avanzado III-V (pre-diálisis). Se descartaron aquellos pacientes que sufrieran además afecciones graves de otro tipo, como enfermedades hepáticas, pulmonares, infecciosas o cáncer. Como controles se seleccionaron individuos sanos mayores de 45 años de edad para que la media de edad por grupos fuera comparable y así poder descartar diferencias debidas al envejecimiento renal y no a la enfermedad en estudio. Todas las personas implicadas en el estudio fueron debidamente informadas sobre el mismo, se firmó además un consentimiento informado que garantizaba la confidencialidad y el estudio fue aprobado por el comité ético de el IIS-Fundación Jiménez Díaz.

Tabla 1: Características de los pacientes en estudio empleados en la fase de caracterización y descubrimiento, en el estudio libre de marcaje empleando el Orbitrap.

	Sexo	Edad	Creatinina mg/dl	Albuminuria mg/dl	Alb/creatinina mg/g
Paciente 1	hombre	77	37,8	1286,6	3403,7
Paciente 2	mujer	48	82,4	743,6	902,4
Paciente 3	mujer	35	37,4	5,9	15,8
Paciente 4	mujer	63	55	120,2	218,5
Paciente 5	mujer	78	46,1	1325	2874,2

Tabla 2: Características de los pacientes empleados en la fase de validación en los estudios de SRM empleando un nLC- chip cube-QQQ.

	Sexo	Edad	Creatinina mg/dl	Albuminuria mg/dl	Alb/creatinina mg/g
Paciente 1	hombre	77	52,7	264	500,9
Paciente 2	mujer	56	153	232	151,6
Paciente 3	mujer	76	43,6	497,9	878,4

b) Recogida de muestras.

Se recogió la segunda orina de la mañana, en un recipiente esteril de plástico. Se recogió siempre un volumen mínimo de 50 ml para asegurar un rendimiento suficiente de exosomas extraídos para un análisis proteómico, siendo preferibles volúmenes entorno a los 100 ml. A cada muestra se le añadió una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (104 mM AEBSF, 80 μ M aprotinina, 4mM bestatina, 2mM leupeptina, 1,5 mM pepstatina, 1,4 mM E-64. Sigma Aldrich P8340, 50 μ l por cada 100 ml). Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis, ya que la recuperación de exosomas a partir de muestras que han estado congeladas y almacenadas más 7 meses, es mayor para muestras congeladas a -80°C que a -20°C [101].

1.2 Aislamiento de exosomas.

Las muestras congeladas a -80°C se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora, se llevaron después a un baño a 37°C hasta que estuvieron completamente descongeladas (aproximadamente 15 minutos) y se agitaron vigorosamente empleando un vortex durante al menos 2 minutos. Es necesario solubilizar de manera adecuada el contenido de las mismas cuando han sido previamente congeladas, ya que este paso afectará al rendimiento final en la recuperación de exosomas.[101]

a) Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación.

Una vez descongeladas y agitadas estas muestras fueron sometidas a un primer paso de centrifugación de baja velocidad 17.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recomienda llevar a cabo este paso en frío cuando las muestras han sido previamente congeladas, como es el caso de las muestras empleadas en este estudio; para las muestras que no han sido congeladas es preferible llevar a cabo todos los pasos de centrifugación y ultracentrifugación a 25°C, ya que así se evitará la formación de agregados de la proteína uromodulina, también llamada proteína Tamm Horsfall (THP). El propósito de este paso de centrifugación es eliminar restos celulares y de membrana y recuperar el sobrenadante.

La THP es una proteína que polimeriza y forma grandes agregados que dan lugar a redes capaces de atrapar exosomas (especialmente cuando la orina es sometida a bajas temperaturas). Parte de estos agregados de THP, al centrifugar a 17.000g precipitan junto con los restos celulares. Resuspendiendo este precipitado en solución de aislamiento (10 mM trietanolamina y 250 mM sacarosa en H₂O, pH 7,6) reduciéndolo, por adición de DTT (200 mg/ml) y calentándolo a 37°C durante 10 minutos, se consigue disgregar estas redes y liberar los exosomas que pudieran estar atrapados en ellas. [46]

Este paso de enriquecimiento mediante tratamiento reductor, se evaluó en uno de los métodos de aislamiento probados (detallados en esta sección y en Resultados), para aumentar la recuperación de estos exosomas atrapados por las redes de THP. Para recuperar estos exosomas y separarlos de los restos celulares, el precipitado tratado con DTT en solución de aislamiento se llevó a un tubo limpio y se añadieron 10 ml de esta misma disolución. Se centrifugó otra vez a 17.000g para volver a

recuperar el sobrenadante y unirlo al sobrenadante obtenido en la primera centrifugación. Esta vez se descartó definitivamente el precipitado.

El sobrenadante resultante de estas dos centrifugaciones de baja velocidad se llevó a botellas de policarbonato. Por cada 100 ml de sobrenadante se utilizaron 2 tubos específicos de ultracentrifugación de 25 ml de capacidad cada uno (Bottle, with Cap Assembly, Polycarbonate, Beckman Coulter) (50 ml en cada ciclo de centrifugación, 2 ciclos) y se sometieron a ultracentrifugación a 175.000g durante 70 minutos a 4°C.

El nuevo sobrenadante resultante del primer ciclo de ultracentrifugación se descartó y al precipitado se le añadió el volumen adicional de 50 ml para llevar a cabo el ciclo de ultracentrifugación siguiente. Se emplearon 2 tubos en vez de 4 porque se sabe que el rendimiento en la extracción es mayor cuanto menor es el número de tubos empleados. Por ello, es importante escoger un número de tubos tal que nos permita una mejor extracción sin alargar en exceso el tiempo de experimentación; en nuestro caso 4 tubos hubieran permitido una extracción más rápida aunque de menor rendimiento, mientras que emplear un tubo por muestra hubiera aumentado el rendimiento pero hubiera alargado el proceso hasta el punto de hacerlo menos eficiente [97]. Descartado el sobrenadante, se resuspendió el precipitado del primer tubo en 50 µl de solución de aislamiento (u otros tampones dependiendo cual sea el siguiente paso, tal y como se detallará más adelante), se transfirió al segundo tubo para resuspender el segundo precipitado de exosomas y así sucesivamente en caso de que se emplearan más de dos tubos, hasta resuspender todos los precipitados exosomales en un mismo volumen de 50 µl.

La solubilización del precipitado exosomal generalmente es difícil y problemática. Esta dificultad está causada por diversos motivos; el precipitado en ocasiones no es fácilmente visible, en otras ocasiones no se resuspende fácilmente en un volumen tan pequeño y es necesario aumentar un poco el volumen en el que sería teóricamente recomendable resuspenderlo; por otra parte, la forma de los tubos no ayuda a eliminar todo el sobrenadante. Además, es necesario secar bien las paredes del tubo antes de su uso y eliminar completamente los residuos de sobrenadante de orina que queden junto al precipitado, para que la disolución de éste no quede contaminada por restos de sobrenadante de orina. Para una correcta solubilización del precipitado, es recomendable pipetear el líquido una y otra vez sobre el precipitado, tratando de tocar lo menos posible las paredes del tubo y realizarlo lentamente, intentando no formar espuma, ya que esto dificultaría todavía más el proceso de resuspensión.

Los exosomas solubilizados en solución de aislamiento u otros tampones se congelaron a -80°C.

b) Aislamiento de exosomas con Exoquick®.

Se empleó una solución comercial para la precipitación de exosomas llamada Exoquick®. Para la extracción con Exoquick® se siguió el protocolo recomendado por el fabricante; se centrifugó 1 ml de orina a 3.000g para eliminar restos celulares y células muertas. Se recuperó el sobrenadante, se llevó a un tubo limpio de plástico y se le añadió 1 ml de Exoquick®. La muestra se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente la mezcla se centrifugó a 1.500g a temperatura ambiente durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 50 µl de

solución de aislamiento (u otros tampones dependiendo cual sea el siguiente paso, como se explica más adelante). Las muestras se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Este reactivo fue empleado sobre muestras de orina control y sobre muestras de orina de pacientes, siguiendo las indicaciones del fabricante, como se ha comentado y también empleando el doble de volumen de partida para las muestras control para intentar mejorar los resultados.

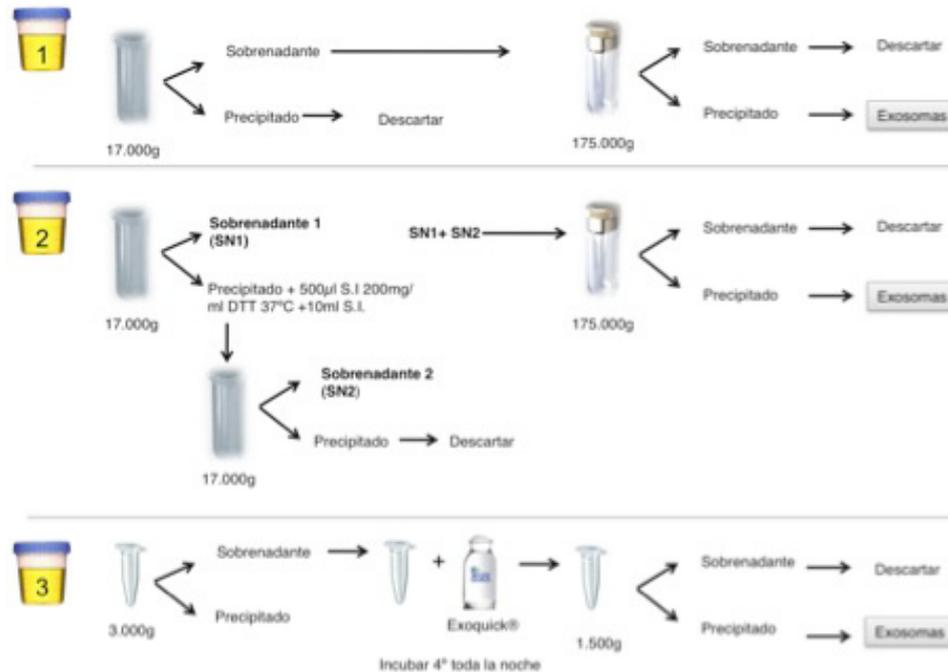


Figura 1. Los tres métodos de extracción, que se han evaluado en la presente tesis doctoral, descritos de manera esquemática.

1.3 Depleción de uromodulina (proteína Tamm Horsfall THP).

La THP es la proteína más abundante en orina y como ya se ha comentado, puede disminuir el rendimiento del proceso de aislamiento. Además, puede contaminar el precipitado obtenido por lo que se evaluó la opción de deplecionarla. El precipitado de exosomas obtenido por ultracentrifugación, una vez solubilizado en 50 µl de solución de aislamiento, fue sometido a un proceso de reducción con DTT (200mg/ml) y se calentó a 95°C durante 2 minutos. Este paso se llevó a cabo para reducir la THP y así evitar la polimerización de esta y con ello su coprecipitación durante el proceso de ultracentrifugación. Para separar la THP reducida del precipitado exosomal se añadieron 20 ml de solución de aislamiento, se llevó a un tubo de ultracentrifugación limpio y se repitió el paso de ultracentrifugación. El precipitado final obtenido tras la ultracentrifugación, teóricamente libre de THP se resuspendió en 50 µl de solución de aislamiento (u otro tampón dependiendo del siguiente paso) y el sobrenadante que contendría la THP reducida se eliminaba junto con la solución de aislamiento.

Cabe destacar que esta etapa extra de ultracentrifugación no solo elimina la THP, sino que adicionalmente supone una limpieza del precipitado exosomal.

1.4 Depleción de Albumina.

La albúmina supone también un problema a la hora de abordar un estudio proteómico de exosomas de orina, especialmente cuando la enfermedad en estudio provoca la aparición de altos niveles proteicos en este fluido. La albumina cuando se encuentra muy concentrada en orina, como es el caso de las orinas de pacientes con proteinuria y ND en particular de grado avanzado co-precipita junto con los exosomas al ultracentrifugar la orina, dando lugar a una muestra contaminada con proteínas solubles de orina que no pertenecen a la fracción exosomal. Para eliminar esta contaminación por albúmina se emplearon tres métodos distintos, basados en tres reactivos comerciales llamados Albumin Removal SwellGel Discs® (Pierce), Albusorb® (Biotech Support Group) y ProteoPrep® Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit (Sigma Aldrich). Estos tres reactivos comerciales están diseñados para la depleción de proteínas mayoritarias del plasma y aquí se aplicaron sobre el precipitado exosomal, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante al aplicarlo a plasma. Se compararon los resultados obtenidos a partir de cada uno de ellos. Tras la aplicación de cualquiera de los tres reactivos, el precipitado exosomal ha de ser recuperado mediante la adición de 20 ml de solución de aislamiento y un nuevo ciclo de ultracentrifugación. Tras ello el precipitado será resuspendido en 50 µl solución de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS). Este proceso de depleción se llevó a cabo en exosomas no lisados. El éxito de la recuperación por ultracentrifugación requiere que los exosomas estén intactos, ya que si estuvieran lisados debido al procesamiento de la muestra, no se podrían recuperar por este método. Por otra parte si llevásemos a cabo la depleción de albúmina en exosomas previamente lisados, no podríamos asegurar que sólo proteínas contaminantes no exosomales fueran eliminadas. Los tres reactivos comerciales eran teóricamente compatibles con experimentos de 2D-PAGE y comprendían los pasos que se detallan a continuación.

Albumin Removal SwellGel Discs®: Se colocaron dos discos SwellGel en unas mini columnas (“mini spin columns”) para hidratar los discos se añadieron 380µl de H₂O. Se rompió la parte de abajo de las mini columnas y se colocaron en tubos de centrifuga de 1,5 ml. Se centrifugaron los tubos durante un minuto a 12.000 g y se eliminó el agua en exceso. Se añadieron entonces 50 µl de exosomas obtenidos por ultracentrifugación, resuspendidos en solución de aislamiento y contaminados por albúmina. Se incubó la muestra durante 2 minutos para permitir la unión de la albúmina a los discos y se centrifugó a 12.000g para recuperar la muestra que no se hubiera unido a los discos y volver a cargarla en la columna. Se repitieron los pasos de incubación y recarga del eluido en la columna hasta un total de 4 veces. Se recuperó el eluido y se llevo la columna a un nuevo tubo colector limpio. La columna se lavó con 100µl de solución de unión/lavado (“Binding/wash buffer”) para poder recuperar la muestra que pudiera quedar en la columna sin estar unida a los discos y poder unir la a lo recuperado anteriormente. Mediante este procedimiento teóricamente recuperaríamos los exosomas intactos, mientras que la albumina contaminante habría quedado unida a los discos colocados en las mini columnas.

Albusorb®: Se acondicionó el reactivo, se pesaron 35 mg de Albusorb® en polvo y se añadieron 400 µl de un tampón llamado “Binding Buffer BBI” suministrado con el kit comercial; se agitó con un “vortex” durante 3 minutos y se centrifugó durante 2 minutos a 3.000g, se descartó el sobrenadante y se repitió ese paso de acondicionamiento del reactivo Albusorb®. El reactivo acondicionado quedó en forma de precipitado, se le añadieron 250 µl de la solución BBI y 50µl de exosomas obtenidos por ultracentrifugación, resuspendidos en solución de aislamiento y contaminados por albúmina. Se agitó en rotación durante 10 minutos, se centrifugó a 3.000g durante 2 minutos y se recupero el sobrenadante que debía

contener la fracción exosomal libre de albúmina, ya que esta se quedará unida al reactivo Albusorb® precipitado.

ProteoPrep®: La mini columna de afinidad, se colocó sobre un tubo colector y se rompió la parte de abajo de la misma eliminando por centrifugación a 5.000g 10 segundos, el líquido conservante de la columna. Posteriormente, se añadió la solución de equilibrado (0,4 ml) suministrada con el kit comercial (solución de Tris-HCl pH 7,4), se centrifugo a 5.000g durante 10 segundos. Se repitió este paso hasta llegar a un total de tres ciclos de equilibrado. A los 50µl de exosomas obtenidos por ultracentrifugación, resuspendidos en solución de aislamiento y contaminados por albúmina se le añadieron 50µl de solución de equilibrado y se cargaron los 100 µl en la columna. Se incubó la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente en la columna, para permitir la unión de albúmina e IgG a la columna de afinidad, después se llevó la columna a un tubo colector nuevo, se centrifugó a 8.000g durante 1 minuto. El eluido se volvió a cargar en la columna, se repitieron los pasos de incubación y centrifugación. Se recuperó el eluido. A la columna se añadieron 125 µl de solución de equilibrado para recuperar las proteínas que no se hubieran unido de manera específica a la misma y se añadieron al eluido obtenido en los anteriores ciclos. De esta manera se podrá recuperar la fracción exosomal en la solución de equilibrado de las columnas.

La fracción retenida por la columna se puede recuperar añadiendo una disolución proporcionada por el kit comercial “Protein extraction reagent type 4” que contiene 7M urea, 2M tiourea y 1% de detergente (C7BzO); añadiendo 150 µl de este reactivo a la columna, los anticuerpos que ésta contiene se desnaturalizan y liberan las proteínas unidas. Centrifugando a 8.000g durante 1 minuto se puede recuperar el eluido en una solución compatible con la electroforesis diferencial.

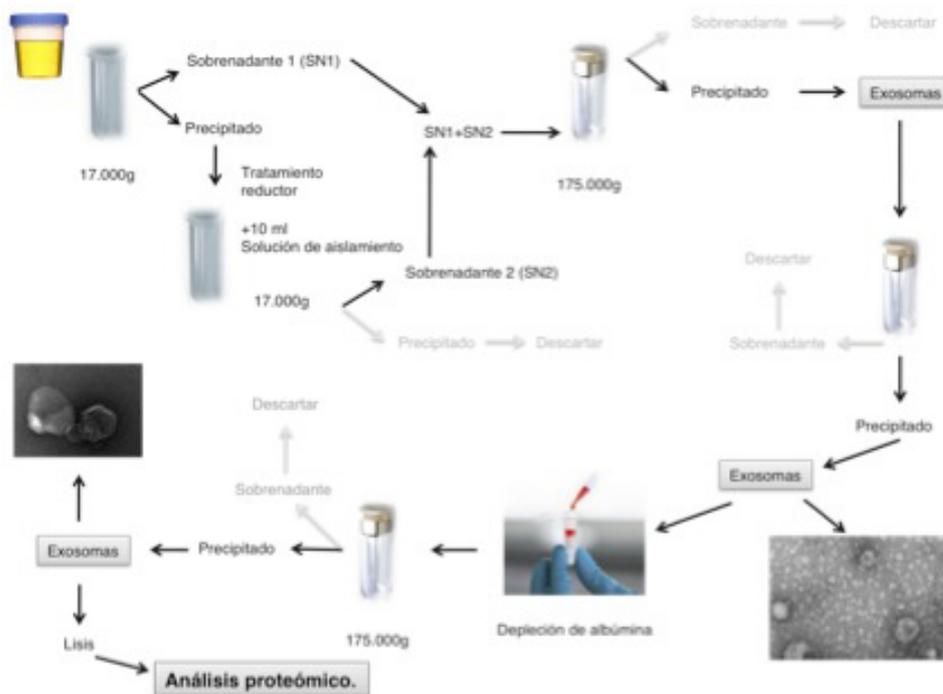


Figura 2. Protocolo definitivo para el aislamiento de exosomas y su posterior análisis proteómico.

1.5 Confirmación de la identidad exosomal, mediante microscopía electrónica y western blot.

a) Microscopía electrónica.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en colaboración con el Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Universidad Complutense de Madrid. El precipitado exosomal, obtenido por ultracentrifugación aplicando el paso de enriquecimiento, se resuspendió en 500 μ l 4% paraformaldehído en PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2). En una ocasión sin aplicar el paso para la depleción de albumina y en otro aplicándolo. Se depositó una gota sobre una pequeña lámina de Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging Company). Sobre esta gota se colocó una rejilla recubierta con Formvar-Carbon (Ted Pella Inc. CA-USA) y se dejó flotando sobre ella durante 10 minutos. Con la ayuda de unas pinzas de punta fina se apoyó el borde de la rejilla sobre papel de filtro para eliminar el exceso de líquido de la rejilla. A continuación se colocó la rejilla sobre una gota de H₂O durante 5 minutos. Para conseguir el contraste necesario para visualizar las muestras se llevó a cabo una tinción negativa; para ello se colocó la rejilla sobre una gota de acetato de uranilo 2% en H₂O durante 30 segundos. Se empleó nuevamente papel de filtro para apoyar la rejilla y eliminar el exceso de líquido por capilaridad. Se dejó secar la rejilla durante 5 minutos sobre un papel de filtro (la cara revestida hacia arriba). Se observó el resultado con un microscopio de transmisión JEM 1010(JEOL) que permitió captar las imágenes que corroboran la presencia de exosomas en la muestra.

b) Western Blot.

En este caso el precipitado de exosomas obtenido mediante la precipitación con Exoquick® y del precipitado obtenido por ultracentrifugación empleando el paso de enriquecimiento, se solubilizó empleando un tampón de lisis (7 M urea 2M tiourea y 4% de CHAPS) y se cuantificó empleando el método de Bradford (Bradford ultra, Expedeon). En cada pocillo se cargaron 25 μ g de proteínas exosomales, se añadió solución de carga 4x (252mM Tris- HCl, 40% Glicerol, 8% SDS) y se llevó a una concentración final de 1x, y añadiendo posteriormente un 5% de b-mercaptoetanol y trazas de azul de bromofenol. La muestra se calentó durante 5 minutos a 95°C.

Estas muestras se cargaron en un gel de acrilamida y se llevó a cabo la electroforesis, SDS-PAGE a 70-100 V, en un tampón compuesto por 0,03M Tris (Biorad), 0,2M glicina (Biorad) y 0,1% dodecil sulfato sódico SDS (Biorad). El gel separador empleado contenía un 10% de acrilamida/bisacrilamida (ProtoGel), Tris-HCl 1M pH8,8, 10% SDS, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED, BioRad), y una solución 10% persulfato amónico (APS, BioRad) preparada en el momento en H₂O. El gel concentrador empleado estaba compuesto por 4% de acrilamida/bisacrilamida, 1M Tris-HCl pH6,8, solución de 10% SDS, TEMED y solución de 10% APS.

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Biorad) por electrotransferencia a 10V durante 1 hora. Se bloquearon las membranas para evitar uniones inespecíficas con un 5% de leche en PBS-T durante una hora, a temperatura ambiente. Se incubaron las membranas durante toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos para los marcadores exosomales, Alix, 1:500 (ratón,

Santa-Cruz), Tsg101, 1:500 (ratón, Abcam) y el anticuerpo contra el marcador negativo Calnexina, 1:2500 (conejo, Enzo life sciences). Se lavaron las membranas durante 10 minutos con PBS-T (este lavado se repitió 5 veces). Se incubaron las membranas con anticuerpos conjugados con peroxidasa durante una hora; un anticuerpo de conejo anti ratón (Santa Cruz) con concentración 1:2500 para la detección de Alix y Tsg 101 y un anticuerpo de cabra anti conejo (Santa Cruz) con una concentración de 1:5000 para la detección de Calnexina. Todos los anticuerpos se emplearon diluidos en 5% de leche en PBS-T. El revelado se llevó a cabo empleando ECL® (GE Healthcare)

1.6 Electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE).

a) Preparación de la muestra.

Las muestras obtenidas tras la extracción (y los pasos de depleción, en caso de que se lleven a cabo) tuvieron que ser tratadas para su limpieza y eliminación de sales, que de otro modo interfieren en el enfoque. Se empleó para ello un kit comercial llamado 2D-Cleanup (GE- Healthcare). Este kit consta de dos reactivos que favorecen la precipitación de proteínas, un reactivo de lavado (acetona) y uno que favorece la solubilización del precipitado proteico que se obtiene. Todas las muestras fueron cuantificadas mediante el método de Bradford después de haberles aplicado este protocolo siguiendo las indicaciones del fabricante.

b) Isoelectroenfoque (1ª dimensión)

Para realizar la 2D-PAGE, al volumen de extracto proteico de exosomas de orina que contenía la cantidad de proteína que se deseaba analizar (exosomas lisados tras la extracción por ultracentrifugación con/sin paso de enriquecimiento o empleando el reactivo comercial Exoquick®, con/sin depleción de THP y/o albumina) se le añadió el volumen de tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M y CHAPS 4%) necesario hasta completar el volumen de carga (350µl para las tiras de 17 cm) recomendado por el fabricante. En el momento previo a cargar las muestras, se les añadió 0,5% de anfólitos (BioRad), 20mM DTT (BioRad) y una punta de espátula de azul de bromofenol. Las tiras IPG empleadas fueron de rango no lineal de pH 3-11 y de longitudes de 17cm (GE Healthcare). La rehidratación se realizó de manera activa a 50V durante 12 horas, en una fuente IPGphor (GE Healthcare). Las tiras se cubrieron con aceite mineral (BioRad) para evitar la evaporación de la muestra durante el proceso. El programa de isoelectroenfoque (IEF) empleado fue el siguiente: 200V 1h, 500V 1h, 1000V 1h, gradiente de 1000V a 8000V en 1h y 8000V hasta que se acumularon 60000V.

c) SDS-PAGE (2ª dimensión).

Previo a la segunda dimensión, se trataron las tiras IPG durante 15 minutos con 1% DTT y 2,5% de yodoacetamida (IAA), sucesivamente, en tampón de equilibrado (Tris-Cl 1,5M pH 8,8, urea 6M, glicerol 30%). La segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE al 10%, en los que sólo se polimeriza el gel separador y la tira

IPG se coloca directamente en contacto con la región superior de éstos. Los geles se corrieron en el sistema EttanDalt Six (GE Healthcare) durante toda la noche a 0,5 W/gel.

La composición de los geles de acrilamida y del tampón en el que se llevó a cabo la electroforesis son las mismas que se han especificado en el apartado 1.5.b. La única diferencia este caso, es que el tampón con el que se llenó la cámara superior del sistema EttanDalt Six, tenía el doble de concentración de SDS que la especificada anteriormente para el tampón de electroforesis.

d) Tinción de plata.

Tras la SDS-PAGE, se tiñeron los geles con plata empleando el kit de tinción PlusOne Silver Staining (GE Healthcare) con algunas variaciones respecto a las recomendadas por el fabricante, según se detalla a continuación.

Las distintas soluciones del kit de tinción se prepararon como se indica para 100 ml: Fijación: 40% de metanol y 10% de ácido acético; sensibilización: 30% de etanol, 4% tiosulfato de sodio (5% peso/volumen desde una disolución comercial proporcionada en el kit), 68mg/ml de acetato de sodio (se preparó con antelación y se conservó a 4°C para que estuviera fría en el momento de su utilización); tinción de plata: 0.25% de nitrato de plata; revelado: 25mg/ml de carbonato de sodio con 20-40µl de formaldehído (37% peso/volumen desde una disolución comercial proporcionada en el kit); disolución de parada: 14.6 mg/ml de EDTA. Se prepararon 250ml por cada gel a teñir.

Para la tinción de los geles, se sacaron con cuidado de los cristales, y se colocaron en una bandeja con solución de fijación, durante 30 minutos como mínimo. Se eliminó la disolución de fijación y se añadió la disolución fría de sensibilización durante 20 minutos. Se eliminó la solución de sensibilización y se lavaron los geles con H₂Odd durante 5 minutos, un total de tres veces. A continuación se añadió la solución de plata y se tiñeron los geles durante 15 minutos. Se eliminó la solución de plata y se volvieron a lavar los geles con H₂Odd; esta vez se llevaron a cabo dos lavados de un minuto cada uno. Se eliminó el agua y se añadió la disolución de revelado. Cuando las manchas proteicas eran claramente visibles y sin dejar que el fondo del gel se oscureciera se eliminó la disolución de revelado y se añadió la disolución de parada. Después de 10 minutos en solución de parada, ésta se sustituyó por H₂Odd y se realizaron dos lavados de 10 minutos. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación. Una vez teñidos, los geles se escanearon en un densitómetro GS-800 (BioRad).

2. ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN ND.

2.1 Análisis diferencial por 2D-DIGE de saturación.

La puesta a punto de la electroforesis bidimensional para exosomas extraídos de orina de individuos sanos y de pacientes con ND permitió, además de hacer un buen seguimiento de la eficacia de los métodos de aislamiento para una correcta extracción y depleción de los exosomas, llevar a cabo un estudio comparativo por electroforesis bidimensional diferencial en gel 2D-DIGE.

Para este estudio se empleó el kit comercial para muestras escasas con marcaje de saturación ("CyDye DIGE Fluor Labeling Kit for Scarce Samples"; GE Healthcare) ya que el rendimiento obtenido en la extracción no siempre permitía obtener una cantidad de muestra suficiente para emplear el DIGE de marcaje mínimo.

a) Preparación de la muestra.

Las muestras exosomales se obtuvieron a partir de muestras de orina de 6 individuos sanos y de 7 pacientes con ND. Los exosomas se aislaron por ultracentrifugación aplicando el paso de enriquecimiento y se les aplicó el protocolo de depleción de albúmina pero no el de THP.

5 µg de cada una de las muestras cuantificadas por el método Bradford, fueron precipitados, empleando el kit 2D Clean-up descrito con anterioridad (apartado 1.6.a) y se resuspendieron en 9 µl de la solución de lisis recomendada para DIGE (7M urea, 2M tiourea, 10mM Tris y 4% CHAPS, pH 8.0). En las primeras muestras analizadas, se midió el pH de las proteínas en solución de lisis utilizando tiras de medición de pH de rango 5.0 a 10.0 (Merck), y se comprobó que ninguna de las muestras variaba significativamente el pH 8.0 requerido para el correcto marcaje de las mismas. Para los experimentos de análisis diferencial, se elaboró un estándar interno que contenía una alícuota de cada una de las muestras del experimento. A continuación, se redujeron las muestras con TCEP durante 1 hora a 37°C en oscuridad, y se marcaron durante 30 minutos a 37°C, con Cy5 las muestras y con Cy3 el estándar interno. Las cantidades de TCEP y fluorocromo añadidas se determinaron en experimentos de optimización del marcaje, y fueron: 1nmol de TCEP y 2nmol de Cy3. Tras realizar el marcaje, se añadió un volumen de solución equivalente al de la mezcla de marcaje, compuesto por 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 0,5% Anfólitos pH 3-11, ditiotreitól 10mM DTT.

b) Isoelectroenfoque.

Una vez marcadas, las muestras se cargaron en tiras IPG previamente rehidratadas pasivamente durante 14 horas. En los experimentos de análisis diferencial, se mezcló previamente cada muestra con un volumen equivalente del estándar interno.

La carga de la muestra se llevó cabo mediante el método de carga en copa (“cup-loading”). El programa de IEF de las muestras fue el descrito para el 2D-PAGE de estas mismas muestras(en el apartado 1.6.b), salvo para la rehidratación que como ya se ha comentado en este caso se llevó a cabo de forma pasiva.

c) SDS-PAGE

Igual que en el caso del 2D-PAGE las tiras tuvieron que ser rehidratadas en un paso previo a la segunda dimensión, pero en este caso llevando a cabo un solo paso de equilibrado, en el que se empleó un 1% de DTT durante 15 minutos en la solución de equilibrado. La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE igual a la descrita para el 2D-PAGE.

Las imágenes de fluorescencia de cada uno de los fluorocromos se tomaron empleando un escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) a una resolución de 100 ppm, previa optimización de la intensidad del láser para cada fluorocromo a resolución de 1000 ppm.

d) Análisis diferencial mediante 2-D DIGE.

En la sección de resultados se detallan las dificultades encontradas en el análisis del proteoma exosomal por lo que el análisis estadístico no se llevó a término. Más adelante (en el apartado 3.5.c) se comenta de modo general el modo de abordar un análisis diferencial mediante 2D-DIGE.

2.2 Análisis diferencial por nLC-MS/MS (Orbitrap®); análisis cualitativo y cuantitativo “label-free”.

Para llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo libre de marcaje, se recogieron muestras de orina de 5 individuos sanos y de 5 pacientes con nefropatía diabética (ver tabla 1). Los exosomas de estas muestras se aislaron por ultracentrifugación aplicando el paso de enriquecimiento y se les aplicó el protocolo de depleción de albúmina pero no el de THP.

Se empleó un sistema nLC-MS/MS en un espectrómetro de masas Orbitrap® (Thermo-Fisher). La técnica libre de marcaje (“label free”) fue la elegida para llevar a cabo el análisis semicuantitativo ya que no requiere ningún marcaje isotópico, lo que minimiza el número de pasos en la preparación de la muestra, evita las desventajas de otros métodos que implican marcaje evitando así el alto coste de los reactivos de marcaje y/o la síntesis de péptidos estándar marcados isotópicamente [59] y permite realizar la cuantificación de las proteínas en base a todos los péptidos detectados en el espectrómetro de masas, y no sólo de aquellos correctamente marcados. Se trata de un método semi-cuantitativo, que se ha realizado de modo similar a trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio.

a) Limpieza, concentración y digestión triptica de la muestra:

Las exosomas aislados por ultracentrifugación y deplecionados se lisaron y limpiaron, (como se detalla en apartados anteriores) la mezcla proteica resultante se cargó en un sistema SDS-PAGE. La electroforesis se realizó hasta que las muestras superaron el gel concentrador y alcanzaron el gel separador. En ese momento se paró la electroforesis y se tiñó el gel con Coomassie coloidal (Fermentas). De este modo todas las proteínas se concentran en una única banda que se recortará y se digerirá en su totalidad [61]. Para llevar a cabo la tinción el gel se lavó durante 5 minutos con H₂O dd (tres lavados) se añadió después la tinción de Coomassie y se dejó tiñendo el gel durante toda la noche. Al día siguiente se destiñó el gel en H₂O dd (tantos lavados como fueran necesarios para tener un fondo limpio). Una vez teñido el gel, se procedió a la escisión de las bandas correspondientes a cada una de las muestras. Tras la reducción de los puentes disulfuro con 10mM DTT y la posterior alquilación con 50mM IAA se llevó a cabo la digestión con tripsina porcina modificada (Promega) durante toda la noche a 37°C, añadida en una relación; 1µg:50µg (tripsina:proteína) en bicarbonato amónico 50mM (grado HPLC, Scharlau), pH 8,5. Para parar la reacción se empleó 1 µl de ácido trifluoroacético (Merck). Se recogió la disolución y se llevó a un tubo limpio para llevar a sequedad en un speed vac (Termo-Fisher). La mezcla peptídica se disolvió en ácido acético (Merck) 1% en H₂O dd, para el análisis LC-MS.

b) Análisis nLC-MS/MS.

Las mezclas de péptidos tripticos resultantes se analizaron cargándolas en una nano-columna de fase reversa C-18 (75 mm de diametro interno y 25 cm de longitud, Acclaim PepMap100, Thermo Scientific) en un gradiente continuo de acetonitrilo (Merck) de 0 a 43% de fase B (95% acetonitrilo, 0.5% ácido acético) durante 90 min, en el que se alcanzaba posteriormente un 90% de fase B en 1 min, en la que los péptidos se separaron a un flujo de 300nl/min en un HPLC Ultimate 3000 (LC-Packings) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-orbitrap XL (Thermo Fisher, San José, CA, USA)

A lo largo de la carrera cromatográfica se adquirieron espectros de resolución mejorada mediante transformada de Fourier (resolución=30000) y los espectros de MS/MS de los diez iones precursores de mayor intensidad. La exclusión dinámica se fijó en 30 segundos. Para la identificación de las proteínas, se lanzaron búsquedas con los espectros de fragmentación en SEQUEST™ (Thermo Fisher Scientific), MAS-COT™ (Matrixscience) y Tandem (The GPM, thegpm.org) empleando el paquete informático Proteome Discoverer 1.2.0.207 (Thermo Fisher Scientific). Las búsquedas se llevaron a cabo con los siguientes parámetros: se asumió una digestión triptica completa y errores de 15ppm y 0,8 Da para espectros de MS y MS/MS, respectivamente (MSIPL_Human_3.67.fasta (1.0, 87040 entradas)); como modificaciones dinámicas se seleccionaron la oxidación en M, fosforilación en S o T y deamidación en Q o N. Se estableció un valor de 0,05 como punto de corte del valor de la tasa de falsos-positivos (false discovery rate, FDR) para las identificaciones. Para el análisis semicuantitativo "Label-free" se empleó el programa Scaffold 3 (versión 3.6.2) (Proteome Software Inc., Portland, OR). Asignando probabilidad a las proteínas en base al algoritmo Protein Prophet. Las proteínas que contenían péptidos similares

y no pudieron ser diferenciadas, únicamente en base al análisis de MS/MS fueron agrupadas para satisfacer el principio de parsimonia.

c) Validación de proteínas diferenciales por SRM.

Tras una primera fase de descubrimiento de potenciales biomarcadores, donde se estudia un número no muy elevado de muestras, se procede a una segunda fase de validación. Para ello, la metodología “selected reaction monitoring” (SRM) resulta idónea por su poder de resolución y sensibilidad. Se basa en el análisis por espectrometría de masas, empleando un equipo que permita una previa selección de las transiciones específicas asociadas a los péptidos de las proteínas de interés, que permita que éstas sean detectadas y cuantificadas. Para ello, se estudiaron por este método extractos proteicos de exosomas (30 µg/ muestra) obtenidos a partir de orina de una nueva cohorte de individuos (3 pacientes y 3 controles, ver tabla 2). Para ello las muestras proteicas fueron reducidas con DTT 10mM (30 minutos, 37°C, en agitación), alquiladas con IAA 55mM (15 minutos, 37°C, oscuridad y agitación) y digeridas con tripsina bovina modificada (Merck) en un ratio 1µg:20µg (tripsina:proteína) (toda la noche, 37°C, oscuridad y agitación). La reacción de digestion se detuvo mediante la adición de 1µl de ácido trifluoroacético (Merck). La mezcla de péptidos tripticos obtenida se sometió a un proceso de limpieza con unas columnas C18 (“spin columns”) (Protea Bioesciences) siguiendo el protocolo comercial. La muestra se llevó a sequedad en un speed-vac y se resuspendió en fase móvil A (acetonitrilo 5%, ácido fórmico 0,1%) con un 10% de acetonitrilo (Merk). Las muestras se analizaron en modo SRM (Selected Reaction Monitoring) empleando un triple cuadrupolo 6460 LC/MS/MS (Agilent Technologies) conectado en línea a un HPLC-chip cube (Agilent Technologies) y a módulos de cromatografía líquida de la serie 1200 (Agilent Technologies) auto muestreador preenfriado para nano LC.

La separación de péptidos se llevó a cabo en un chip ProtID Zorbax 300B-C18-5µm con una columna analítica de 43x0.075-mm y una columna de enriquecimiento de 40nL (Agilent Technologies). Se inyectaron tres microlitros de muestra y la separación se llevó a cabo a 0,4µl/min en un gradiente continuo de 3-15%B durante 2 minutos, alcanzando el 50% a los 44 minutos y posteriormente el 99% de B en 2 minutos (fase B: 100% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico).

El control del sistema se gestionó empleando el programa informático Mass Hunter Software (v4.0). El espectrometro de masas trabajó en modo de ion positivo con un voltaje capilar de 1950 V, la fuente de gas a una temperatura de 325°C y un flujo de 5L/min. El fragmentador se fijó en 130V y un “dwell time” de 50 ms el delta EMV a 400V y la energía de collision se optimizó para cada transición SRM.

Las transiciones teóricas se diseñaron empleando Skyline (v.1.1.0.2905)[116] y se revisaron manualmente. La especificidad de los peptidos para una proteína se confirmó el programa Blast® (Basic Local Alignment search tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se seleccionaron los péptidos proteotioicos para el analisis SRM. Las señales individuales se normalizaron en base al TIC (total ion current) y las áreas de los picos fueron calculadas para llevar a cabo la comparación.

3. MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO PROTEOMICO DE LA NEFROPATÍA DIABETICA EN TEJIDO COMPLETO, ORINA Y EXOSOMAS.

3.1 Inducción de hiperglicemia mediante inyección de estreptozotocina (STZ).

Se emplearon diez ratas macho, Wistar kyoto (Criffa, Barcelona, Spain) de 5 semanas de edad, 230 ± 23 g de peso y conocida sensibilidad a la diabetes Mellitus inducida por estreptozotocina (STZ). A cinco de esas ratas se les provocó el desarrollo de diabetes mediante una única inyección intraperitoneal de STZ (Sigma, St. Louis, MO). La dosis inyectada fue de 50 mg/kg empleando una disolución 0,01M citrato (pH 4.5) como vehículo [112]. A las cinco ratas restantes se les inyectó el vehículo sin el tóxico, para poder emplearlas como control. Todos los animales fueron sacrificados ocho semanas después de la inducción de la diabetes. Todo el estudio se llevo a cabo respetando la normativa de la Unión Europea. A los animales diabéticos se les administraba de 1 a 4 unidades de insulina, en función de la glucemia presentada por estos, (Insulatard NPH; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) mediante una inyección subcutánea cada tres días, con el propósito de evitar la muerte de estos animales pero sin corregir totalmente la hiperglucemia. La administración de insulina comenzó siete días después de la inyección con STZ, una vez se hubo comprobado que la glucemia de los animales era superior a 400mg/dl (Glucocard; Menarini, Barcelona)

3.2 Recogida de muestras de orina.

Tanto las ratas diabéticas como las control fueron llevadas a jaulas metabólicas, se recogió de la orina de 24 horas. Esta orina se recogió en tubos estériles que contenían 50 μ l de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich P8340) y trazas de azida sódica (Sigma- Aldrich) para evitar el crecimiento de colonias bacterianas.

Las orinas recogidas de ratas control se mezclaron para ser tratadas como una única muestra y lo mismo se hizo con las orinas de las ratas diabéticas, ya que el volumen excretado por cada animal era insuficiente para un estudio proteómico individual a nivel exosomal. Este procedimiento se llevó a cabo un día antes del sacrificio. Todas las muestras fueron centrifugadas a 2.000g durante 15 minutos, se separaron 5ml de cada una para hacer estudios del proteoma de la orina completa y se congelaron a -80°C .

3.3 Disección renal y caracterización del daño en el modelo animal.

Los riñones se perfundieron con solución salina fría. Una vez extraídos y decapsulados, una parte de cada riñón se separó y congeló en N₂ líquido para los estudios de expresión proteica a nivel de tejido completo. Otra parte se fijó para que pudiera ser empleado para estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Esta fijación se llevó a cabo conservando las secciones en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Después se deshidrataron e incluyeron en parafina para su estudio histológico. Para ello, estas secciones se cortaron

con un microtomo en láminas de 3 μm y fueron montadas en cristales de poly-L-lisina (DAKO). El tejido se desparafinó con xilol (Panreac Química SAU) y se hidrató mediante un gradiente decreciente de etanol. La morfología de los riñones se evaluó por tinción tricrómica de Masson y tinción con hematoxilina/ eosina, mediante microscopía óptica. Para la tinción con hematoxilina/ eosina, las secciones de riñón se fijaron con 70 % etanol, se lavaron en H₂O (se dejaron secar al aire), se sumergieron en hematoxilina durante 5 minutos y se lavaron con agua, se sumergieron un instante en eosina. Para la tinción con tricrómico de Masson se empleó un kit comercial (Masson trichrome goldner, Bio-óptica, Strumentazioni Scientifiche) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Para la tinción con rojo sirio, los núcleos se tiñeron con hematoxilina durante 8 minutos y se lavaron durante 10 minutos, se tiñeron durante una hora con rojo sirio, se lavaron las muestras con agua acidificada y se secaron bien antes de proceder a la deshidratación y montaje de las muestras.

Para comprobar la lesión renal se examinó cada muestra por separado evaluando los túbulos proximales y distales así como los glomérulos. Se definió el daño tubular como tal cuando se observa desorganización epitelial, aumento del lumen, vacuolización, descamaciones, necrosis y pérdida de la estructura del borde en cepillo en los túbulos proximales. El daño glomerular se definió como aumento en la expansión de la matriz mesangial y daño intersticial cuando hay presencia de fibrosis. Para evaluar la fibrosis intersticial, teñimos las secciones de tejido renal con una mezcla que contiene Rojo Sirio y ácido pícrico durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos fueron deshidratados y tratados con medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich), para su conservación.

3.4 Obtención de extracto proteico a partir de riñón de rata y preparación de la muestra para el análisis proteómico diferencial por 2D-DIGE.

Los fragmentos de los riñones conservados en nitrógeno líquido fueron pulverizados mediante el empleo de un mortero de titanio preenfriado con nitrógeno líquido y un martillo. El riñón pulverizado se llevó desde el mortero hasta un tubo de 1,5 ml con la ayuda de una espátula y se resuspendió en tampón de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS), mediante agitación vigorosa con ayuda de un vórtex durante al menos cinco minutos y posterior sonicación, en un baño con hielo durante 10 minutos. Se procedió después a una centrifugación a 4°C y 12.000g durante 10 minutos para eliminar el material que no se hubiera solubilizado correctamente en el tampón. Se cuantificó del extracto proteico mediante el método de Bradford y se hicieron alicuotas de 100 μg de proteína total. Cada una de estas alicuotas fue sometida a limpieza y desalado mediante la aplicación del kit comercial 2D-Cleanup. El precipitado obtenido tras la aplicación del kit fue resuspendido en tampón de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, Tris 30mM, pH 8,5) y se volvió a cuantificar mediante el método de Bradford, ya que el rendimiento obtenido tras este paso de limpieza no es siempre del 100%. El empleo de 30mM de Tris en el tampón de lisis garantiza en este caso el pH óptimo que deben tener las muestras para que el marcaje con fluorocromos sea óptimo, tal y como se detalla más adelante.

3.5 Electroforesis bidimensional diferencial 2D-DIGE.

Se llevó a cabo un análisis proteómico diferencial por electroforesis bidimensional empleando extractos proteicos obtenidos a partir del tejido completo del riñón de ratas

control (n=5) frente a las ratas con ND tratadas con STZ(n=5), para ello se empleó la técnica de DIGE mínimo (GE Healthcare) que permite el análisis de 50 µg de proteína total por muestra, en lugar de DIGE de saturación (marcaje de 5 µg de proteína por total por muestra) como era el caso explicado en el apartado anterior (2.1) . En este caso, sí se obtenían rendimientos de proteína suficientes para emplear el marcaje mínimo, al tratarse de extractos de tejido completo.

a) Marcaje de las muestras.

Antes de llevar a cabo el isoelectroenfoque, es necesario marcar covalentemente las proteínas de las muestras con el fluorocromo correspondiente. Para ello, las muestras se resuspendieron en 50 µl del tampón de lisis a pH 8,5 con Tris-HCl 30 mM tras el paso de limpieza. Para que la reacción de marcaje se produzca adecuadamente es necesario que el pH de las muestras se encuentre entre 8,0 y 9,0 por lo que, una vez resuspendidas en este tampón, adicionalmente se comprobó que el pH de cada muestra continuaba dentro de este rango. El pH se midió aplicando 1 µl de cada muestra sobre papel indicador de pH (Merck).

Los fluorocromos, se suministran como polvo sólido formando parte del kit DIGE (CyDye DIGE Fluor, minimal labeling kit, GE Healthcare)y se reconstituyeron en dimetilformamida anhidra (Sigma-Aldrich), creando una solución madre a una concentración de 1mM. Para su utilización, la cantidad que se iba a emplear debió ser diluída (de nuevo en dimetilformamida) hasta la concentración de la solución de trabajo (400pmol/µl). Se añadió a cada muestra, constituida por 50 µg de proteína total, 1µl (400 pmol/ 50 µg proteína) de la solución de trabajo del fluorocromo correspondiente (Cy3 ó Cy5 según el diseño experimental). Por otra parte se preparó una mezcla de todas las muestras del experimento (25 µg de cada muestra) para ser marcada con Cy2, añadiéndose 400 pmol del fluorocromo por cada 50 µg de muestra a marcar. Esta mezcla se empleó como estandar interno ya que en ella están representadas todas las muestras del estudio y la cargaremos en cada uno de los geles del estudio. El diseño experimental incluyó 5 muestras por grupo, marcadas de manera alterna con Cy3 o Cy5, para evitar un marcaje preferencial de uno de los grupos en caso de que uno de los fluorocromos diera lugar a un marcaje más eficiente, como se muestra en la siguiente tabla.

GEL	Cy3	Cy5	Cy2
1	Control 1 (50 µg)	Diabética 1 (50 µg)	Estándar interno (50 µg)
2	Diabética 2 (50 µg)	Control 2 (50 µg)	Estándar interno (50 µg)
3	Control 3 (50 µg)	Diabética 3 (50 µg)	Estándar interno (50 µg)
4	Diabética 4 (50 µg)	Control 4 (50 µg)	Estándar interno (50 µg)
5	Control 5 (50 µg)	Diabética 5 (50 µg)	Estándar interno (50 µg)

Tabla 4. Diseño experimental para el estudio comparativo por 2D-DIGE.

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

b) Electroforesis bidimensional.

Para llevar a cabo el isoelectroenfoco, en un tubo se combinaron aleatoriamente una muestra marcada con Cy3 con una marcada con Cy5 y se añadió el volumen correspondiente a 50 μ g del estándar interno marcado con Cy2. Se le añadió el volumen necesario de tampón de muestra para obtener la composición final adecuada para el IEF (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, anfólitos pH 4-7 1% (GE Healthcare), DTT 10mM). En este caso las muestras se cargaron empleando la técnica de “cup-loading” sobre tiras de pH 4-7 de 24 cm previamente rehidratadas de manera pasiva con 450 μ l de tampón de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, anfólitos pH 4-7 1%, DTT 10mM). Las tiras y la muestra se cubrieron con aceite mineral para así evitar que estas se secasen durante el proceso. El IEF se llevó a cabo en una fuente IPGphor (GE Healthcare) empleando el siguiente programa de enfoque: 200V durante 1h, 500V durante 1h, 1000V durante 1h, gradiente de voltaje de 1000V a 8000V en 3h y 8000V hasta que se acumularon 60000V. La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10% empleando el sistema EttanDalt Six System (GE Healthcare) a 0,5 W/Gel durante toda la noche.

c) Digitalización y análisis de las imágenes.

Sin extraer los geles de los cristales y habiendo empleado cristales de baja fluorescencia las imágenes de los geles 2D-DIGE se digitalizaron empleando un escáner de fluorescencia (Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare). Se obtuvieron las imágenes emitidas por cada fluorocromo por separado (aplicando las longitudes de onda de excitación y emisión específicas de cada fluorocromo) con una resolución de 100 μ m. Las imágenes fueron entonces importadas a los diferentes módulos del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare), versión 6.5, con el que se realizó el procesamiento y análisis estadístico de las mismas.

Se trata de una aplicación informática de análisis automático de imagen que consta de varios módulos: Image Loader, DIA (Differential In-gel Analysis), BVA (Biological Variation Analysis), EDA (Extended Data Analysis) y XML (Toolbox), cada uno de los cuales desempeña una función en el análisis de las imágenes digitalizadas de los geles 2D-DIGE. Mediante el módulo “Image Loader”, se generó un proyecto en el que se incluyeron las imágenes de los geles, haciéndolas accesibles al resto de los módulos. A continuación, todos los mapas proteicos de un mismo proyecto se analizaron mediante el módulo “DIA (Differential In-gel Analysis)”, que detecta y cuantifica las manchas proteicas de las tres imágenes (Cy2, Cy3, Cy5) correspondientes a cada gel. El algoritmo que emplea este módulo para la detección de las manchas se basa en la co-detección de las tres señales fluorescentes (2 muestras y 1 control interno, mezcla de todas las muestras en estudio) y permite diferenciar las señales de manchas verdaderas de los artefactos del gel. Por su parte, la cuantificación se basa en el cálculo de las relaciones entre las señales fluorescentes Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2,

lo que permite tener un valor de intensidad de fluorescencia normalizado para cada mancha. Una vez completada esta fase, los datos generados mediante DIA fueron importados al módulo “BVA (Biological Variation Analysis)”, que permite el emparejamiento de las manchas detectadas entre las imágenes de los diferentes geles del proyecto para obtener después datos estadísticos sobre los niveles de expresión de las manchas en los diferentes grupos de estudio. Se concluyó que existe variación cuando los niveles de expresión estaban variados en $\pm 1,5$ veces y dicha variación se consideró estadísticamente significativa cuando se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$) determinado por la prueba t-Student. Por último, los datos contenidos en los archivos generados por BVA se analizaron en el módulo “EDA (Extended Data Analysis)” que ofrece un análisis estadístico avanzado. Éste, se empleó para llevar a cabo el Análisis de Componentes Principales (PCA); es un método estadístico cuyo objetivo es la simplificación y reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos con numerosas variables, de tal manera que los datos transformados mantienen las características básicas de los datos iniciales con una pequeña pérdida de información[113]. En otras palabras, se trata de encontrar una serie de componentes capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de las variables originales. De esta forma se obtiene una imagen simplificada del conjunto de datos inicial, que sigue describiéndolos en su mayor parte, pero que resulta mucho más sencilla a la hora de interpretarlos y puede usarse para ver la agrupación de los datos y encontrar valores extremos o atípicos dentro de los mismos.

d) Tinción de los geles y escisión de manchas proteicas.

Tras la digitalización de las imágenes los geles del experimento 2D-DIGE se tiñeron con plata (como se detalla en el apartado 1.6.b) para poder cortar las manchas proteicas expresadas de manera diferencial y poder así identificarlas.

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

Las manchas proteicas de los geles 2-DE escindidas manualmente, tras su tinción con plata fueron digeridas automáticamente empleando un Ettan Digester (GE Helathcare). El protocolo de digestión empleado fue descrito por Shevchenko et al. [114] con mínimas variaciones: los fragmentos de gel fueron sometidos a reducción empleando 10mM de DTT en 50 mM de bicarbonato amónico y a posterior alquilación con 50mM de IAA en 50 mM de bicarbonato amónico, después se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM en metanol 50% (grado HPLC, Scharlau) y acetonitrilo 50% y se secaron en un Speedvac. A continuación, se añadió tripsina porcina modificada a una concentración de 20ng/ μ l en bicarbonato amónico 20mM para llevar a cabo la digestión a 37°C durante una noche. La extracción de los péptidos se realizó empleando acetonitrilo 60% y 0,5% ácido trifluoroacético (99.5% pureza; Sigma Aldrich).

Una alícuota de 0,5 μ l de la solución de digestión se depositó en una placa 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI (Applied Biosystems). La misma cantidad de matriz se aplicó en cada punto con muestra de la placa de MALDI (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) (Sigma Aldrich) en acetonitrilo acuoso 60% y ácido trifluoroacético 0,5%). Los espectros de MS y MS/MS se obtuvieron en un equipo 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems). Los espectros fueron adquiridos en modo reflector de ion positivo

con un láser Nd: YAG, 350 nm de longitud de onda, a 200 Hz de frecuencia y se promediaron de 1000 a 2000 espectros. Los experimentos fueron adquiridos de manera uniforme con intensidad de láser fija. Para el modo de análisis de MS/MS 1kV, los precursores fueron acelerados en la fuente 1 a 8 kV, seleccionados con una resolución relativa de 200 (FWHM) y supresión metaestable. Los iones fragmento generados por colisión con el aire en una cámara CID fueron acelerados hasta 15kV en la fuente 2. Para el análisis automático de los espectros de masa obtenidos se empleó el paquete informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (Applied Biosystems). La calibración interna de espectros de masas del MALDI-TOF se llevó a cabo empleando dos iones resultantes de la autodigestión de la tripsina, con una relación masa carga (m/z) de $m/z=843,510$ y $m/z=2211,105$. Para las calibraciones de MALDI-MS/MS se emplearon espectros de iones fragmento obtenidos para Glub-fibrinopeptide(4700 Cal Mix, Applied Biosystems). Los datos de MS y MS/MS fueron combinados mediante el paquete informático GPS Explorer Software versión 3.6 (Applied Biosystems); de esta manera se realizó una búsqueda frente a una base de datos de proteína no redundante (NCBIInr o SwissProt) empleando Mascot versión 2.2 (Matrix Science) [115], con una tolerancia de precursor de 50ppm, una tolerancia de masa 0,6 Da en los fragmentos de MS/MS y permitiendo la presencia máxima de 1 único punto de corte fallido. Los espectros de MS y MS/MS y los resultados de las búsquedas fueron inspeccionados en detalle manualmente empleando los paquetes informáticos antes comentados. Las identificaciones, en base a espectros de fragmentación (MS/MS) fueron aceptadas cuando su intervalo de confianza (C.I.%), proporcionado por el programa GPS era mayor o igual a 95%. La puntuación obtenida a partir de los distintos buscadores no puede ser directamente comparada; por este motivo el programa GPS calcula este C.I., que permite combinar los resultados de la búsqueda en las distintas bases de datos realizadas para los fragmentos de MS y MS/MS. Este valor de C.I.% indica que la probabilidad de que la identidad de la secuencia sea un suceso casual es menor al 5%. Para el espectro de huella peptídica (MS), las identificaciones fueron aceptadas cuando el C.I% proporcionadas por el programa GPS era igual a 99% o mayor.

3.7 Análisis por Western Blot de proteínas diferenciales en tejido orina y exosomas.

Se cargaron 25 μ g de proteína total por muestra en el caso de proteínas procedentes del extracto de tejido completo de los riñones de rata control y diabética (n=4) para la validación de los datos obtenidos mediante 2D-DIGE. Para intentar detectar estas variaciones en orina se cargaron también 25 μ g de proteínas de orina (concentrada 30 veces), obtenidas a partir de la alícuota de 5 ml que había sido separada de la mezcla de las orinas recogidas de los animales de cada grupo. Para intentar detectar las variaciones en proteínas exosomales, se cargaron 10 μ g de proteína exosomal total, extraídas (por ultracentrifugación aplicando el paso de enriquecimiento) a partir de la mezcla de la orina de todos los animales de un mismo grupo (50 ml). La albúmina fue deplecionada empleando el método proteoprep® tanto en el caso de las muestras de orina como en las de exosomas.

Para llevar a cabo el Western blot, las condiciones fueron las mismas que las recogidas en el apartado 1.5.b, a excepción de las características específicas que a continuación se detallan; el SDS-PAGE se llevó a cabo siempre en geles de acrilamida al 14% (con un gel concentrador al 4%). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con 7,5% de leche en PBS-T.

Las membranas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-regucalcina concentración 1:200 (cabra, Santa Cruz), el anticuerpo anti-I-Cristalina, concentración 1:200 (conejo, Santa Cruz) y V-ATPasa B 1:100 (ratón, Santa Cruz). Para el anticuerpo anti-HIBADH, concentración 1:100 (conejo, Abcam) las membranas tuvieron que ser incubadas durante toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron después con anticuerpos secundarios específicos conjugados con HRP, durante una hora a temperatura ambiente. La regucalcina fue detectada con un anticuerpo secundario de burro anti cabra 1:2000 (Santa Cruz). I-Cristalina con un anticuerpo secundario de cabra anti conejo 1:2000 (Nordic), ATPasa con un secundario en conejo anti ratón 1:2000 (Nordic) y HIBADH con un secundario cabra anti conejo 1:10000. Todos los anticuerpos se diluyeron en un 5% de leche en PBST.

3.8 Análisis diferencial del tejido renal por técnicas inmunohistoquímicas.

Las muestras incluidas en parafina y cortadas en finas láminas de 3 µm (como se describe en el apartado anterior) se desparafinaron, se rehidrataron y se expuso el antígeno empleando la plataforma PTlink (DAKO). Después de lavar con tampón de lavado (wash buffer, DAKO) durante 5 minutos, se bloquearon las muestras con una solución al 10% de BSA en tampón de lavado, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones nuevamente y se trataron con 3% H₂O₂ durante 5 minutos para bloquear la peroxidasa interna propia del tejido. Tras este bloqueo, las secciones de tejido se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa durante 1h a temperatura ambiente. Se procedió al revelado con 0,05% 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (DAKO, Denmark). Las secciones se contrastaron con hematoxilina y se lavaron en agua, se deshidrataron empleando una batería ascendente de alcoholes y se montaron con DPX. Para descartar tinciones no específicas se realizó un control negativo de cada muestra omitiendo el anticuerpo primario. La cuantificación de las regiones teñidas en las secciones de tejido estudiadas por inmunohistoquímica u otras tinciones fue realizada empleando el Software Image Pro-Plus. La tinción positiva se expresa como porcentaje de área teñida respecto del área total evaluada en cada muestra (se toma la media de valores adquiridos para 15 campos por sección renal, empleando un aumento 200x).

Las diluciones empleadas para los distintos anticuerpos fueron: Regucalcina (Santa Cruz) 1:50, detectada con un anticuerpo secundario de burro anti cabra 1:200 (Santa Cruz). I-Cristalina (Santa Cruz) 1:1000, con un anticuerpo secundario de cabra anti conejo 1:500 (Nordic) y ATPasa (Santa Cruz) 1:500 con un secundario en conejo anti ratón 1:200 (Nordic). Todos los anticuerpos se diluyeron en 1% BSA en Wash buffer.

3.9 Validación de la expresión diferencial de regucalcina en tejido y exosomas mediante “Selected Reaction Monitoring” (SRM).

Se estudiaron por este método extractos proteicos individuales de tejido (obtenidos de cada uno de los animales de cada grupo n=4), extractos proteicos de orina y de exosomas obtenidos a partir de dos mezclas de orina recogidas de las 5 ratas control y de las 5 ratas diabéticas, respectivamente. Las muestras proteicas fueron reducidas, alquiladas, digeridas, sometidas a limpieza y llevadas a sequedad, tal y como se detalla en el apartado 2.2.c. Tras ello fueron resuspendidas en fase móvil A (acetonitrilo 5%, ácido fórmico 0,1%). Las

muestras se analizaron en modo SRM empleando el mismo equipo y parámetros que en el estudio de validación descrito en el apartado 2.2c.

Las transiciones teóricas se diseñaron empleando Skyline (v.1.1.0.2905)[116] y se revisaron manualmente. La especificidad de los péptidos para una proteína se confirmó el programa *Blast*[®] (*Basic Local Alignment search tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se seleccionaron los péptidos proteotípicos para el análisis SRM (tabla 3).

Péptidos proteotípicos de la regucalcina analizados	
R.VGVDAPVSSVALR.Q [51, 63]	635
K.FCALNWEDQSVFILAMVDEDK.K [76, 96]	844
R.YFAGTMAEETAPAVLER.H [112, 128]	619

Tabla 5. Péptidos proteotípicos de la regucalcina analizados en el estudio comparativo por SRM.

Resultados

1. ANÁLISIS DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DEPLECIÓN DE PROTEÍNAS MAYORITARIAS CONTAMINANTES.

1.1 Aislamiento de exosomas.

Se probaron dos métodos distintos para el aislamiento de exosomas de orina, uno basado en ultracentrifugación y otro basado en un reactivo comercial llamado Exoquick®. El primer método es un método largo, requiere una media de 4 horas de trabajo experimental para la extracción de exosomas de una muestra e instrumental y material específicos (ultracentrifuga, rotores, tubos de ultracentrifuga). El segundo método es sencillo y requiere poco tiempo de trabajo experimental, permitiendo el aislamiento de una muestra en aproximadamente 1 hora de trabajo, no requiere instrumental específico ni maquinaria complejas pero supone un elevado gasto económico.

a) Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación:

Este método, se llevo a cabo aplicando dos protocolos. Uno sencillo, basado en centrifugación y ultracentrifugación de la muestra de orina y otro muy similar que comprendía un paso extra entre la centrifugación y la ultracentrifugación. Este paso extra se aplicó para la obtención de un mayor rendimiento del aislamiento de exosomas a partir de la orina [46].

- Centrifuga de baja velocidad y ultracentrifugación:

Mediante este método, se obtuvo un buen aislamiento de proteínas exosomales, la preparación y limpieza de la muestra así como la cantidad obtenida a partir de 100 ml de orina fue suficiente para que pudiera ser evaluada mediante electroforesis bidimensional en gel (2-DE). Se pudo obtener así un perfil con manchas proteicas bien enfocadas, definidas y reproducible (figura 1,A).

- Centrifuga de baja velocidad, enriquecimiento de la fracción exosomal con tratamiento reductor (DTT) y ultracentrifugación:

Mediante este método se obtuvo un mayor rendimiento en el aislamiento de proteínas a partir de la misma cantidad de orina. La muestra obtenida era igualmente compatible con la obtención de un perfil bidimensional 2-DE definido y reproducible. (Fig 1,B)

Se compararon los perfiles de manchas proteicas obtenidos mediante las dos variantes del método, se observó el mismo patrón de manchas protéicas, siendo el segundo más rico y pudiendo observarse en él mayor numero de manchas, ya que muchas eran indetectables en el primero debido a su baja abundancia.

Resultados

Se procedió también a comparar el perfil del proteoma aislado por este método con el obtenido para el proteoma de la orina (figura 1 C). Se pudo comprobar así que el enriquecimiento obtenido con el paso de reducción se debía a una mayor recuperación de exosomas, pudiendo descartar la posibilidad de tener un mayor rendimiento por una mayor contaminación de proteínas de orina. La diferencia entre ambos patrones era clara. Se consiguió por tanto aislar un subproteoma de la orina y poner a punto un método para su estudio de este mediante 2D-PAGE. Para todos los experimentos y análisis posteriores, se empleó por tanto este método que incluye el paso de enriquecimiento por reducción y resuspensión de las redes de THP que atrapan exosomas en la centrifugación de baja velocidad.

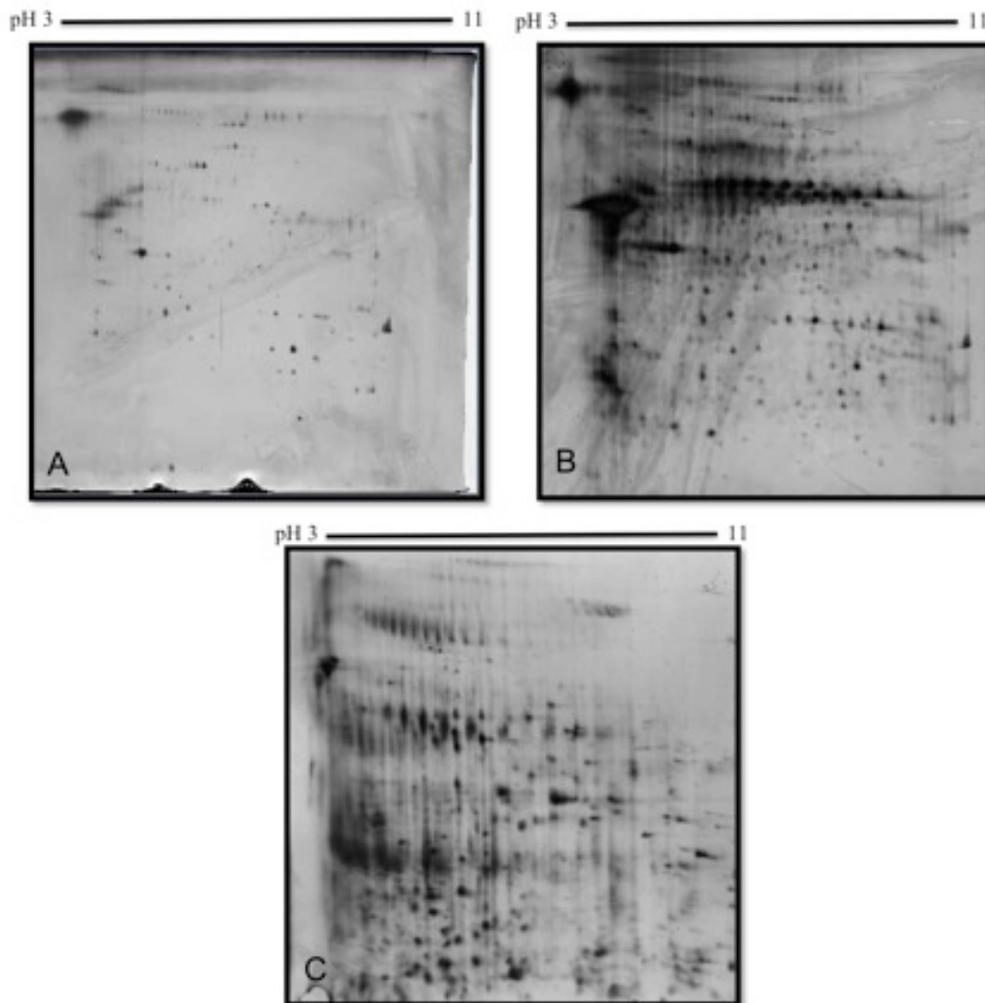


Figura 1. Análisis de la fracción exosomal obtenida por centrifugación sin y con el paso adicional de enriquecimiento (A y B respectivamente) a partir de 100 ml de la misma orina para cada uno de los geles; Se observa una clara similitud entre el perfil de ambos y una patente diferencia al compararlos con el perfil proteico completo de la orina (C).

b) Aislamiento de exosomas con Exoquick.

El aislamiento de exosomas a partir de orina, mediante el método que implica la precipitación con el reactivo comercial Exoquick® no dio lugar a una recuperación

proteica susceptible de ser cuantificada cuando la muestra de partida era orina de controles sanos. La cuantificación proteica en el precipitado obtenido por este método indicaba que no se había conseguido aislar correctamente la fracción exosomal, cuando se partió de 1 ml de orina, ni cuando se partió del doble de volumen inicial para intentar mejorar los resultados. Cuando este reactivo se empleó para aislar exosomas desde la orina de pacientes con ND sí se obtenían proteínas; el perfil proteico obtenido (Fig 2.A) era distinto al obtenido cuando el aislamiento se llevaba a cabo mediante métodos de ultracentrifugación, siendo más parecido al proteoma de la orina de paciente (Fig 2, B).

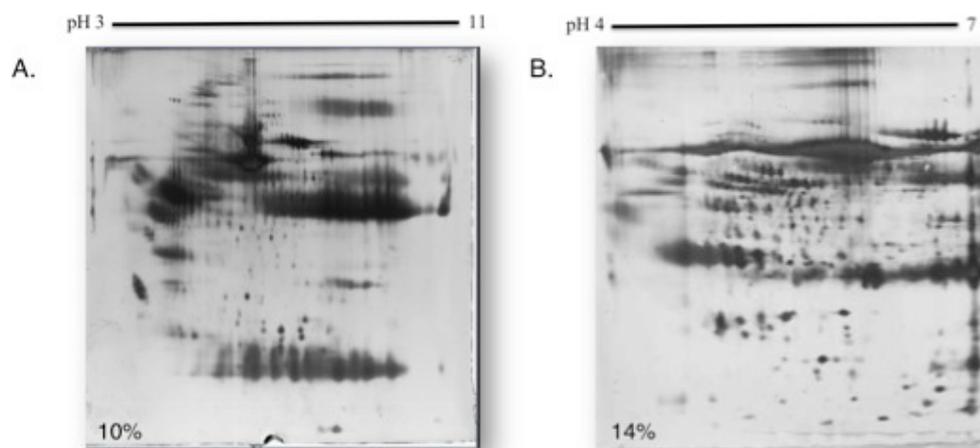


Figura 2. 2D-PAGE de la fracción exosomal de la orina de un paciente ND con proteinuria, obtenida empleando el reactivo comercial Exoquick® a partir de 1 ml de orina.

1.2 Depleción de uromodulina (proteína Tamm Horsfall THP).

La THP es la proteína más abundante en la orina. Esta proteína polimeriza formando redes poliméricas de gran tamaño, principalmente a bajas temperaturas. Cuando la muestra de orina es sometida a ultracentrifugación para el aislamiento de los exosomas, las redes de THP pueden co-precipitar con los exosomas presentes en la muestra dando lugar a una contaminación de este precipitado exosomal y pudiendo impedir la detección o identificación de proteínas menos abundantes así como alterar el perfil bidimensional de las proteínas propiamente exosomales. Por estos motivos se llevó a cabo una evaluación de la necesidad de depleción de esta proteína mayoritaria en la orina, siguiendo el protocolo descrito por Pisitkun y su grupo [97] que queda recogido en el apartado de material y métodos.

Es importante no confundir este proceso de eliminación de la proteína THP (la THP queda en el sobrenadante que será descartado) con el descrito con anterioridad para el enriquecimiento del proceso de extracción. Por ser dos protocolos similares (tratamiento reductor en calor y centrifugación aplicados con el fin de despolimerizar las redes de THP) es fácil que den lugar a confusión y es importante destacar que en el apartado anterior, las redes poliméricas que precipitan (solo una parte habrá precipitado a esta velocidad) en la primera centrifugación de baja velocidad para el aislamiento de exosomas, son reducidas y resuspendidas para ser recuperadas junto con los exosomas atrapados en ellas en el sobrenadante que será posteriormente ultracentrifugado. Mientras que, en este apartado resaltamos la importancia de eliminar la proteína THP que precipitará junto con los exo-

Resultados

somas en el precipitado obtenido tras la ultracentrifugación (en este caso, una vez llevado a cabo el tratamiento la THP quedará en el sobrenadante y será descartada)(ver figura 1, en el apartado de material y métodos).

Se observó que la depleción de THP mediante reducción con DTT del precipitado de exosomas y nueva ultracentrifugación permitiría un obtener un precipitado exosomal más limpio, pero implicaba también una pérdida considerable de rendimiento en la recuperación de proteínas exosomales.

Por otra parte se vió que la depleción de THP no es siempre completa, en la figura 3 se observa una muestra sometida a este tratamiento en la que la depleción ha sido parcial. De modo similar, la Fig 1(A, B) muestra como aún cuando el protocolo se aplicó dos veces, si bien ésta mejoró, sigue siendo incompleta. Por tanto los resultados sugieren que dependiendo de la muestra de partida, la efectividad del tratamiento será distinta y los perfiles puede que no sean reproducibles. Además, este procedimiento implica una manipulación de la muestra sin asegurar una completa eliminación de la proteína y empobreciendo la recuperación de proteínas exosomales. Considerando que la THP, no es una proteína propia de un estado patológico provocado por la ND sino que debe aparecer sin presentar diferencias significativas entre grupos y que por ser su pI muy ácido y su peso molecular alto, no distorsiona especialmente el perfil bidimensional de y no dificulta la visualización de las demás manchas proteicas, este paso no fue incluido en el análisis diferencial posterior.

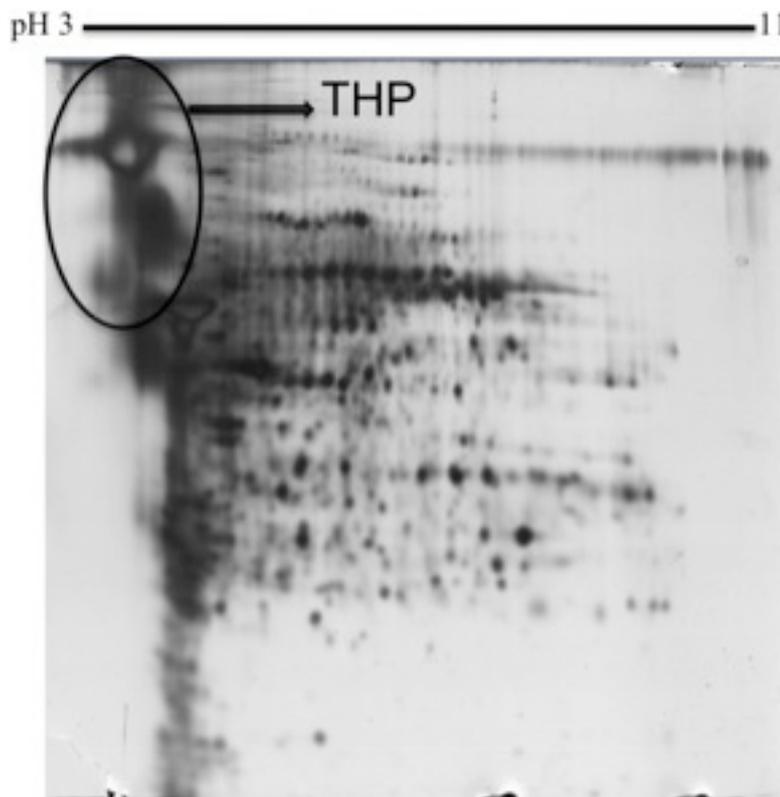


Figura 3. Perfil bidimensional de las proteínas exosomales obtenidas mediante el método de ultracentrifugación aplicando el paso de enriquecimiento, y la depleción de la proteína THP. Exosomas obtenidos a partir de 100 ml orina control. Se puede observar que mediante este protocolo la proteína THP se ha eliminado sólo parcialmente.

1.3 Depleción de albumina.

Los pacientes con enfermedad renal, como los pacientes con ND, presentan de modo característico una elevada concentración de proteínas en la orina (proteinuria), siendo la albumina la proteína mayoritaria. Al aislar exosomas a partir de orina de pacientes con albuminuria se observó que la albumina co-precipitaba y contaminaba el precipitado exosomal (figura 4) distorsionando la resolución del perfil 2DE y haciendo que estas muestras no fueran comparables con muestras de controles sanos sin proteinuria, (figura 1, B). Por otro lado, la cuantificación de estas muestras ricas en albumina no respondería a la misma concentración de proteínas exosomales que las cuantificadas en una muestra control. Por estos motivos se vió que para dar un salto cualitativo y cuantitativo en el análisis diferencial del proteoma de la enfermedad renal es necesario una depleción de albumina del precipitado exosomal ya que de lo contrario sería la principal proteína diferencial. Por otra parte, la gran cantidad de albumina presente en estos precipitados exosomales dificulta la detección de proteínas minoritarias exosomales presentes en la muestra al llevar a cabo un estudio cualitativo en muestras exosomales de pacientes con ND.

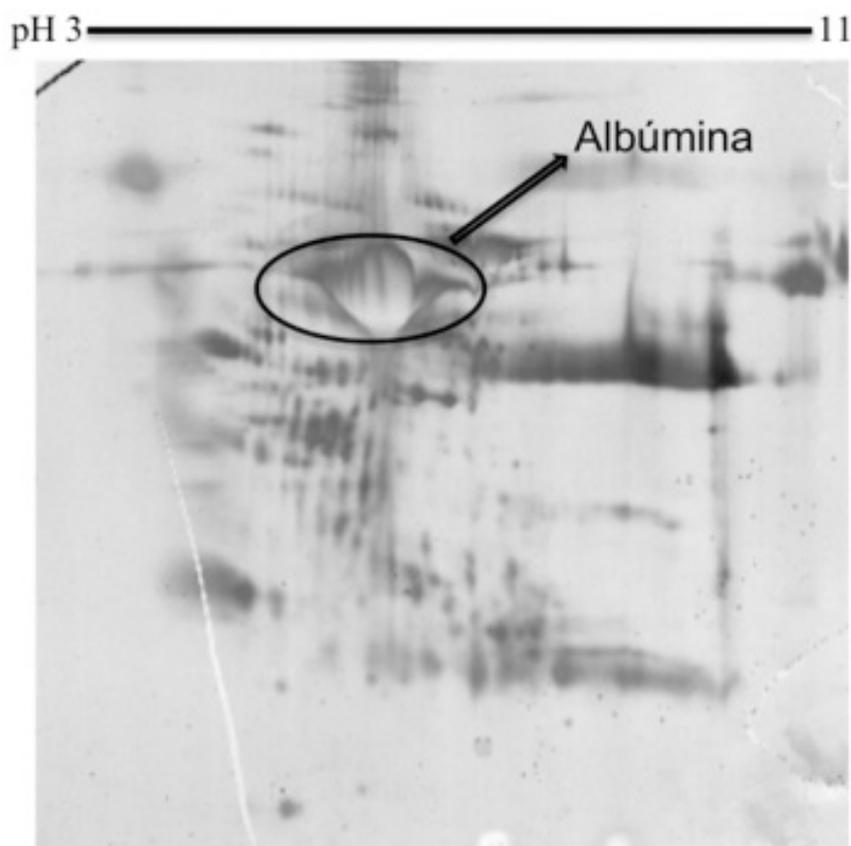


Figura 4. 2D-PAGE de proteínas exosomales obtenidas por ultracentrifugación a partir de orina de paciente ND con proteinuria, sin depleción de albumina.

Con este propósito, se testaron tres reactivos comerciales distintos, Albusorb[®], Swell gel blue albumin removal kit y ProteoPrep[®] Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit del precipitado exosomal aislado por ultracentrifugación, en una primera aproximación. Se emplearon los métodos descritos por el fabricante con modificaciones específicas puestas

Resultados

a punto en esta tesis doctoral para su aplicación a la fracción exosomal de orina, ya que están descritos para muestras de plasma.

En el caso de los dos primeros los resultados fueron muy poco satisfactorios, ya que ambos métodos (Albusorb[®], figura 5 A, Swell gel blue albumin removal kit figura 5 B) provocaban la pérdida de una gran cantidad de manchas proteicas. Observamos cómo en ambos geles bidimensionales hay muy pocas manchas proteicas y la albúmina y la cadena pesada de IgG son claramente visibles, representando prácticamente la totalidad de las proteínas presentes en el gel. Empleando el tercer método, ProteoPrep[®] Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit, basado en columnas de afinidad con anticuerpos específicos para estas proteínas, se consiguió eliminar con éxito la albúmina. Como podemos observar en el gel resultante tras aplicar el tratamiento de depleción de la muestra, se obtiene un perfil limpio y no se observa pérdida de manchas proteicas mientras que se consigue una depleción total de albúmina (figura 5 C). Para asegurarnos de que otras proteínas no quedaban retenidas en la columna de manera inespecífica se llevo a cabo una electroforesis bidimensional de la fracción retenida por la columna de afinidad y se pudo comprobar así que no se retenían proteínas de manera inespecífica (Figura 5 D).

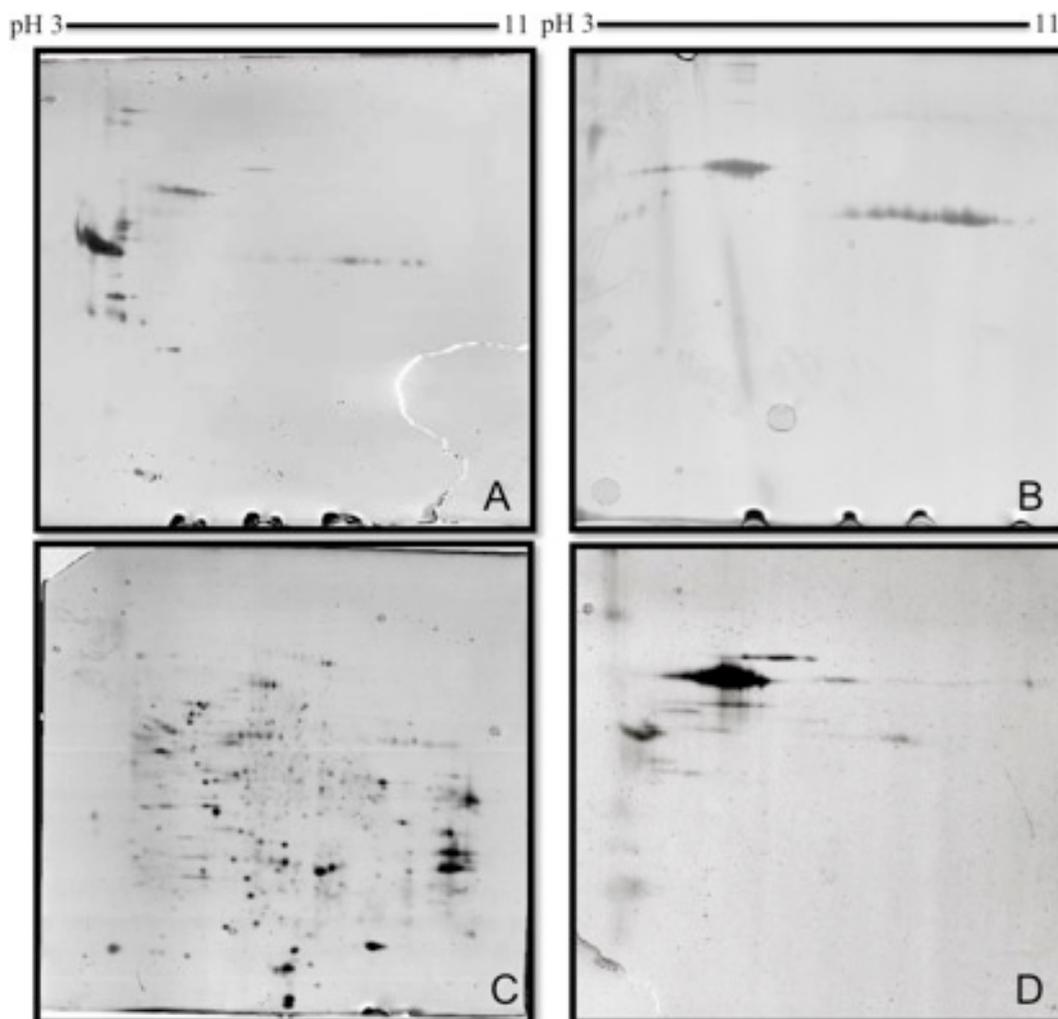


Figura 5. 2D-PAGE de la fracción exosomal de orina patológica deplecionada empleando Albusorb[®] (A), Swell gel blue albumin removal kit (B), ProteoPrep[®] Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit (C) y la fracción retenida al llevar a cabo el tratamiento con ProteoPrep[®] Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit (D).

El método ProteoPrep[®], se probó también sobre las muestras aisladas empleando el reactivo Exoquick[®] (figura 6 A) y en muestras de orina completa de pacientes con albuminuria (figura 6, B).

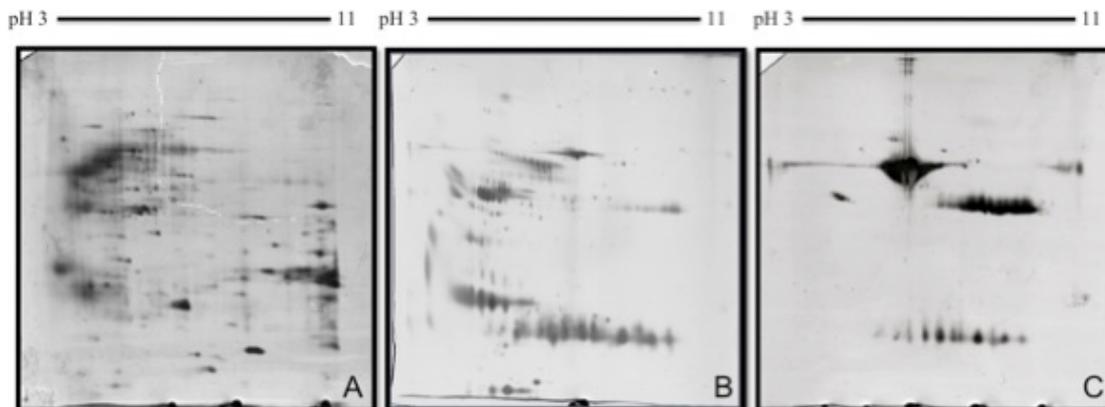


Figura 6. 2D-PAGE de la fracción exosomal aislada empleando el reactivo exoquick (A) y una muestra de orina completa (B), ambas tratadas con Proteoprep[®] y la fracción retenida de la muestra de orina (C). En ambos casos las muestras correspondían a un paciente ND con albuminuria.

1.4 Confirmación de la identidad exosomal, mediante microscopía electrónica y western blot.

a) Microscopía electrónica:

Las micropartículas aisladas de orina se visualizaron mediante técnicas de microscopía electrónica descritas en el apartado de materiales y métodos.

Se pudo comprobar que el tamaño de las micropartículas detectadas era el esperado para los exosomas (40-100 nm) y que estos presentaban la típica forma de copa descrita en la literatura [117].

En la figura 7 podemos observar cuatro imágenes captadas a través de esta técnica. En tres de ellas se llevó a cabo la depleción de albúmina (figura 7 A) y en una de ellas se observó el precipitado obtenido tras la primera ultracentrifuga llevada a cabo para el aislamiento de exosomas (figura 7 B). En la imagen en la que la albúmina no ha sido deplecionada se aprecia un fondo más sucio y con cierta contaminación de partículas lipídicas. En las muestras deplecionadas el fondo es más limpio y homogéneo, ya que cada paso de depleción implica un paso extra de ultracentrifugación que sirve además como paso de limpieza de impurezas de la muestra dando lugar a fracciones exosomales con menos contaminación de elementos de la orina.

No se pudieron observar exosomas extraídos mediante el método comercial Exoquick[®].

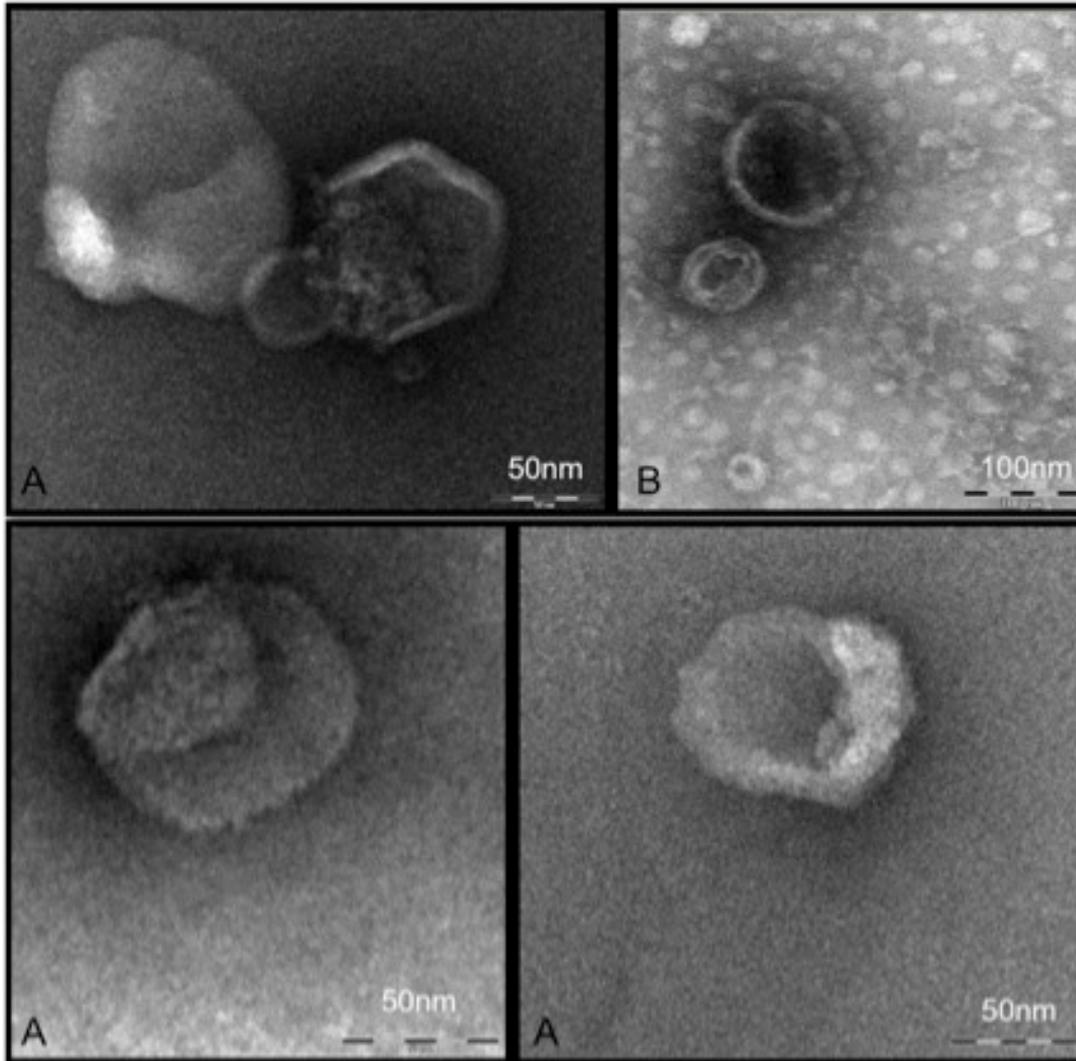


Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica en las que se pudieron observar exosomas aislados por ultracentrifugación aplicando el protocolo para el enriquecimiento en la recuperación exosomal. Escala 50nm para las imágenes de los exosomas sometidos a depleción de albumina (A). Escala 100nm para la imagen que muestra exosomas que no fueron sometidos a depleción (B).

b) Western Blot:

Las proteínas características de la membrana exosomal Alix y Tsg 101 pudieron ser detectadas en la fracción exosomal aislada de la orina, certificando que la técnica es adecuada para el aislamiento de estas micropartículas (ver figura 8). Estas proteínas características de la membrana de los exosomas no pudieron ser detectadas en la orina (concentrada 30 veces) ni en el extracto proteico obtenido a partir de células renales HK2. Para descartar la presencia de otras microvesículas secretadas a la orina pero de otro origen distinto al exocítico se empleó el anticuerpo específico para la detección de la calnexina. La calnexina es una proteína característica del retículo endoplasmático rugoso y por tanto característica de orgánulos membranosos de distinto origen al exosomal. En este caso se pudo observar claramente la presencia de la calnexina en el extracto celular que se empleó como control positivo de la técnica, pero no en la fracción exosomal ni en la muestra de orina concentrada (en este

último caso probablemente por baja concentración, ya que en la orina se podrían encontrar microvesículas distintas a los exosomas). Cuando se intentaron aislar exosomas mediante el método de Exoquick® ninguno de los marcadores exosomales pudo ser detectado.

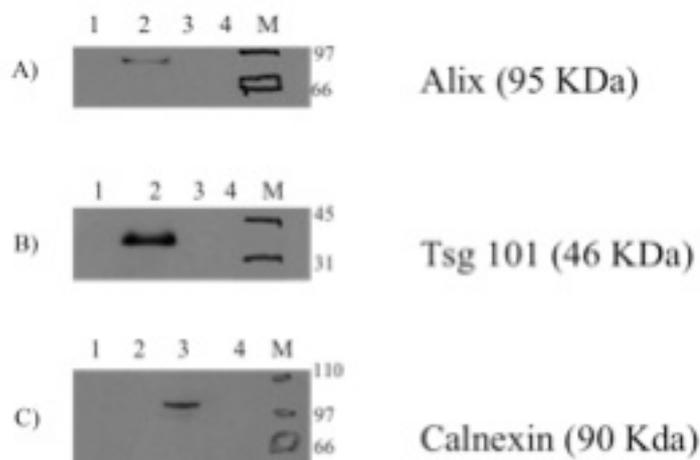


Figura 8. Detección por WB de Alix y Tsg en las fracciones exosomales aisladas por ultracentrifugación (2) pero no en la fracción exosomal aislada empleando el reactivo Exoquick® en orina (4) ni en la línea celular de células epiteliales del túbulo HK2 (3), en esta última calnexina se detecto claramente, mientras que no pudo ser detectada en las demás fracciones.

2. ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN ND.

2.1 Análisis diferencial por 2D-DIGE de saturación.

Para poder llevar a cabo un seguimiento del correcto aislamiento de los exosomas de orina, se puso a punto la 2D-PAGE que a su vez nos permitió realizar un análisis diferencial por 2D-DIGE. Para ello, se empleó el kit de marcaje de saturación ya que permite el análisis de 5 µg por muestra. El rendimiento obtenido en la extracción de proteínas exosomales es muy distinto dependiendo de la orina de partida. Aunque se parta siempre del mismo volumen (100 ml), la concentración de la muestra en estudio y por tanto el rendimiento en la extracción exosomal no es siempre igual, aunque ésta se realice de la misma manera.

El análisis por 2D DIGE llevó a cabo empleando 6 muestras de individuos sanos y 7 muestras de pacientes con ND en estadio avanzado.

Los resultados fueron tales que 4 de los 13 geles presentaban un perfil alterado, haciendo inviable un análisis diferencial ya que el hecho de que todas las muestras estén presentes en el estandar interno, presente en cada uno de los geles hizo que aquellas muestras que presentaban un perfil alterado, afectaran a la totalidad del experimento. Así aunque la comparación de geles hubiera sido posible en algunas de las regiones del gel, no consideramos que fueran las condiciones optimas para llevarla a cabo el estudio y por tanto decidimos no seguir adelante con esta aproximación.

Idealmente sería deseable hacer un primer análisis en geles 2D-PAGE teñidos con plata para comprobar que muestras dan un perfil óptimo. Éstas se seleccionarían para el análisis 2D-DIGE, evitando así que las muestras cuyo perfil esté distorsionado influyan en todos los geles impidiendo el análisis. La complejidad del protocolo y la limitada disponibilidad de muestra con volumen mínimo requerido, hicieron inviable en este caso el llevar a cabo un análisis previo de control.

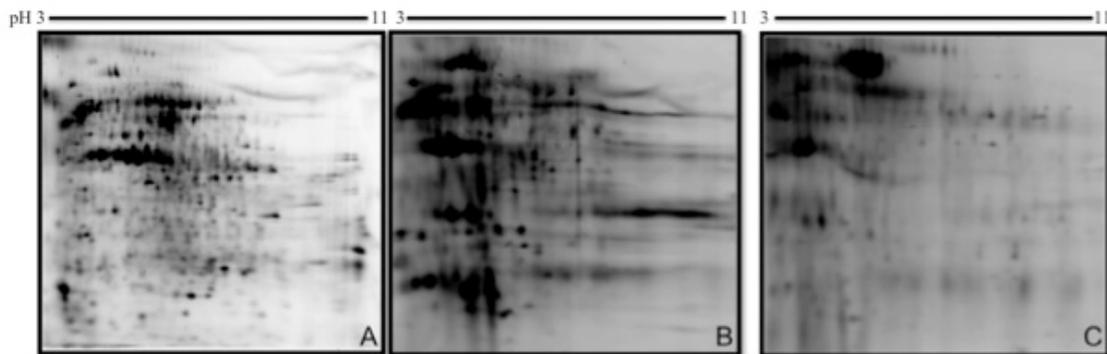


Figura 9. Imágenes geles 2D-DIGE de exosomas de orina humana; perfil normal de una muestra exosomal(A), perfil alterado (B), estandar interno afectado en cierta medida por aquellas muestras que presentan un perfil alterado (C).

2.2 Análisis diferencial por NLC-MS/MS (Orbitrap®)

2.2.1 Análisis cualitativo: Caracterización del proteoma exosomal en individuos sanos.

En una aproximación inicial se empleó la orina de un paciente con elevada albuminuria para aislar exosomas por ultracentrifugación aplicando el paso de enriquecimiento pero sin llevar a cabo la depleción de albumina, ni la de la THP, para poder evaluar la necesidad de deplecionar la albumina en experimentos en los que el objetivo no sea comparar muestras sino descubrir nuevas proteínas presentes en los exosomas de orina. En esta aproximación se pudo detectar un número de proteínas (ver tabla?) de 30 a un 60 % menor que en los posteriores ensayos en los que la albumina fue deplecionada. Así se pudo comprobar que la estrategia de depleción albúmina puesta a punto en la presente tesis doctoral, favorece claramente la detección e identificación de proteínas favoreciendo ampliamente el estudio del proteoma de exosomas de orina.

Empleando la metodología óptima descrita con anterioridad se llevó a cabo un análisis del perfil proteómico de los exosomas de orina asociado a un estado sano y a la ND. Se aislaron exosomas de 5 muestras de orina de controles sanos y de 5 muestras de individuos con ND y se deplecionó la albumina de dichas muestras. Para el análisis se empleó un equipo de alta sensibilidad, LC-MS/MS Orbitrap® que permitió detectar inequívocamente 562 proteínas (Ver tabla #) detectadas como mínimo con 2 péptidos identificados por proteína (11274 espectros adquiridos) con un 99% y un 95% de confianza de proteína y péptido respectivamente. Entre las 562 proteínas identificadas, 207 habían sido previamente identificadas en exosomas de orina, 108 habían sido identificadas en exosomas de distinto origen y 244 no habían sido previamente descritas en exosomas (las 3 restantes correspondían a la uromodulina, albúmina y THP).

Estableciendo un valor de corte de 3 péptidos identificados por proteína se pudieron identificar 254 proteínas (9392 espectros adquiridos) (ver tabla#), 90 de estas proteínas pudieron ser detectadas en ambos grupos. Entre estas 254 proteínas, con 239 se llevó a cabo un mapeo y una clasificación empleando el programa “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA). Se vio que 90 proteínas eran proteínas citoplasmáticas, 61 se localizaban en el espacio extracelular, 44 en la membrana plasmática y 30 eran proteínas nucleares. 78 de ellas eran enzimas (22 peptidasas, 10 kinasas y 1 fosfatasa) 22 eran proteínas transportadoras y 12 eran proteínas de regulación transcripcional. Es interesante destacar además que 41 de las proteínas identificadas en este estudio por LC-MS/MS forman parte de mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y función de del sistema renal y urológico.

2.2.2 Análisis cuantitativo libre de marcaje

Cinco réplicas biológicas de los dos grupos en estudio (donantes sanos y pacientes de ND) fueron analizadas por LC-MS/MS en un Orbitrap® siguiendo el protocolo detallado en el apartado de material y métodos. Se cargó la misma cantidad de proteína por muestra en un SDS-PAGE sin dejar que ocurriera la separación, concentrando todas las proteínas en una única banda que fue posteriormente digerida y cargada en el sistema LC-MS. El análisis cuantitativo se llevó a cabo empleando el programa Scaffold, basado en el número de espectros asignados a cada proteína.

Resultados

El criterio para seleccionar las proteínas variadas de manera significativa en ND se basó en las siguientes premisas: a) p valor menor a 0,01 para evitar resultados engañosos que sean consecuencia de muestras individuales desviadas de la media de forma anormal y b) proteínas identificadas en al menos 7 de cada 10 muestras o en un mínimo de 3 muestras, cuando estas son detectadas en un solo grupo. De esta manera se pudieron seleccionar 25 proteínas (tabla 1): 18 proteínas disminuidas en ND y 7 proteínas aumentadas en este grupo. 8 de estas 25 pudieron ser detectadas sólo en uno de los grupos. En concreto 8 proteínas fueron seleccionadas para una posterior validación ya que pudieron ser identificadas con una cobertura de secuencia de al menos un 5% en todas las muestras individuales en las que habían sido detectadas: AMBP, VDAC1, IGK, LOC100290146, ANXA2, RPS27A, APOD and CA2 además de éstas se quiso validar la proteína MLL3, ya que pudo ser detectada en 4 de las 5 réplicas biológicas del grupo de ND y en ninguna de las control.

Gen	Nombre de la proteína	PM (kDa)	Fold Change	Test exacto de Fisher (P-Valor) (95%)
AMBP	Precursor de α microglubulina/ bikunina	55	5,5	0,0000017
MLL3	Histona-lisina-N- metil transferasa 3	1067	2,2	0,0028
VDAC1	Canal aniónico selectivo dependiente de voltaje 1	34	-1,2	0,005
IGK@	Proteína IGK@	28	2,5	0,000034
KRT13	Isoforma 1 de la queratina, tipo I citoesquelética 13	94	6,5	5×10^{-22}
KRT6A	Queratina, tipo II citoesquelética 6A	139	3,1	0,00000022
ACTG1	Actina, citoplasmática 2	191	-1,4	0,0000083
LOC100290146	Proteína putativa no caracterizada DKFZp686G11190	55	-1,1	0,0055
ANPEP	Aminopeptidasa N	180	-2,0	0,00000026
ANXA2	Isoforma 2 de la Anexina A2	61	-1,2	0,0092
LOC100126583	LOC100126583 Proteína putativa no caracterizada DKFZp686L19235	56	2,8	0,0078
KRT5	Queratina, tipo II citoesquelética 5	311	4,0	0,00000024
EZR	Ezrina	100	-1,6	0,0026
MASP2	Isoforma 1 de la lectina unidora de manano serin proteasa 2	165	-1,9	0,00056

ENO1	Isoforma alpha-enolasa de alpha enolasa.	112	-2,0	0,0019
APOD	Apolipoproteína D	36	-2,6	0,00069
OLFM4	Olfactomedina-4	82	-2,1	0,0041
PDCD6IP	Proteína 6 de interacción con muerte celular programada	159	-10,0	0,0000018
GGT1	Isoforma 1 de la Gamma-glutamyltranspeptidasa 1	150	-3,8	0,00000005
CA2	Anhidrasa carbónica 2	54	-2,6	0,00001
TPII	Isoforma 1 de la triosafosfato isomerasa.	77	-2,4	0,000025
GSTA1	Glutación S-transferasa A1	65	-1,6	0,00085
BHMT	Betaina-homocisteína S-metiltransferasa 1	85	-1,8	0,00035
PODXL	Precursor de la proteína 1 tipo podocalixina.	61	-1,8	0,00035

Tabla 1. Listado de las 25 proteínas variadas de manera significativa en ND

2.3 Validación de las proteínas diferenciales por SRM

La metodología SRM permite la detección específica de proteínas de interés en base a sus péptidos proteotípicos. Para este estudio de validación se reclutaron tres nuevos pacientes y tres nuevos controles (tabla 2, apartado material y métodos) y se efectuaron dos pinchazos por muestra. Como muestra la figura 10, la tendencia observada en la fase de descubrimiento fue confirmada por SRM para MLL3 (con dos transiciones) para AMBP (con dos transiciones) y para VDAC 1 (con una transición)

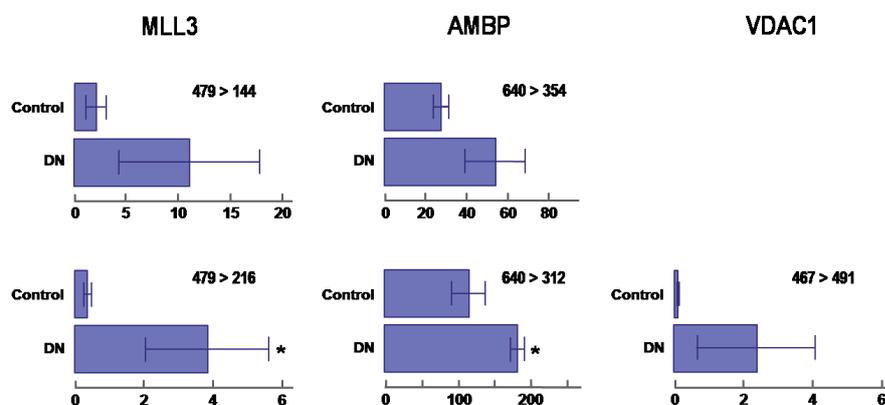


Figura 10. Datos obtenidos por SRM para AMBP, transiciones 640-321 y 640-354. A. MLL3, transiciones 479-216 y 479-144, B. VDAC 1 transición 467-491.

3. MODELO ANIMAL. DESARROLLO DE ND TEMPRANA EN RATAS.

Se realizó un modelo de ND temprana en ratas Whistar Kyoto mediante la inyección de estreptozotocina (n=5). Un día antes del sacrificio, a las 8 semanas, se recogió orina de estos animales y de ratas tratadas con el vehículo de la inyección (n=5), que sirvieron como control sano. En el momento del sacrificio se perfundieron y recuperaron los riñones de estos animales para poder evaluar al alteración del proteoma renal en un estadio temprano de ND. De este modo y con el análisis de las orinas recogidas, se persiguió el descubrimiento de nuevos marcadores moleculares que faciliten un diagnóstico temprano y un seguimiento de la enfermedad o que incluso presenten la posibilidad de ser empleados como dianas terapéuticas de la misma. Al mismo tiempo el estudio a nivel del tejido nos permitirá conocer en profundidad los mecanismos fisiopatológicos por los que cursa la ND.

3.1 Caracterización del daño renal en el modelo animal.

Siguiendo la clasificación histológica establecida por la sociedad de enfermedad renal en 2010 [118] y en base a los parametros bioquímicos medidos en sangre en el momento del sacrificio se clasificó el daño como un daño temprano, ND de clase IIa, ya que se pudo observar una leve expansión mesangial, un engrosamiento de la membrana basal glomerular [118], cierta fibrosis intersticial y ligera acumulación de matriz extracelular. No se encontraron signos característicos de estadios de afección más severos (expansion mesangial severa, esclerosis nodular, etc). Los resultados del análisis bioquímico mostraron elevados niveles de urea y nitrógeno ureico (BUN) en la sangre de los animales diabéticos con respecto a los sanos pero no se encontraron variaciones significativas en los niveles de creatinina sérica. Todo ello en conjunto indica que se obtuvo un modelo en el que ya existe un daño renal provocado por la diabetes sin ser éste todavía un daño severo (figura 11).

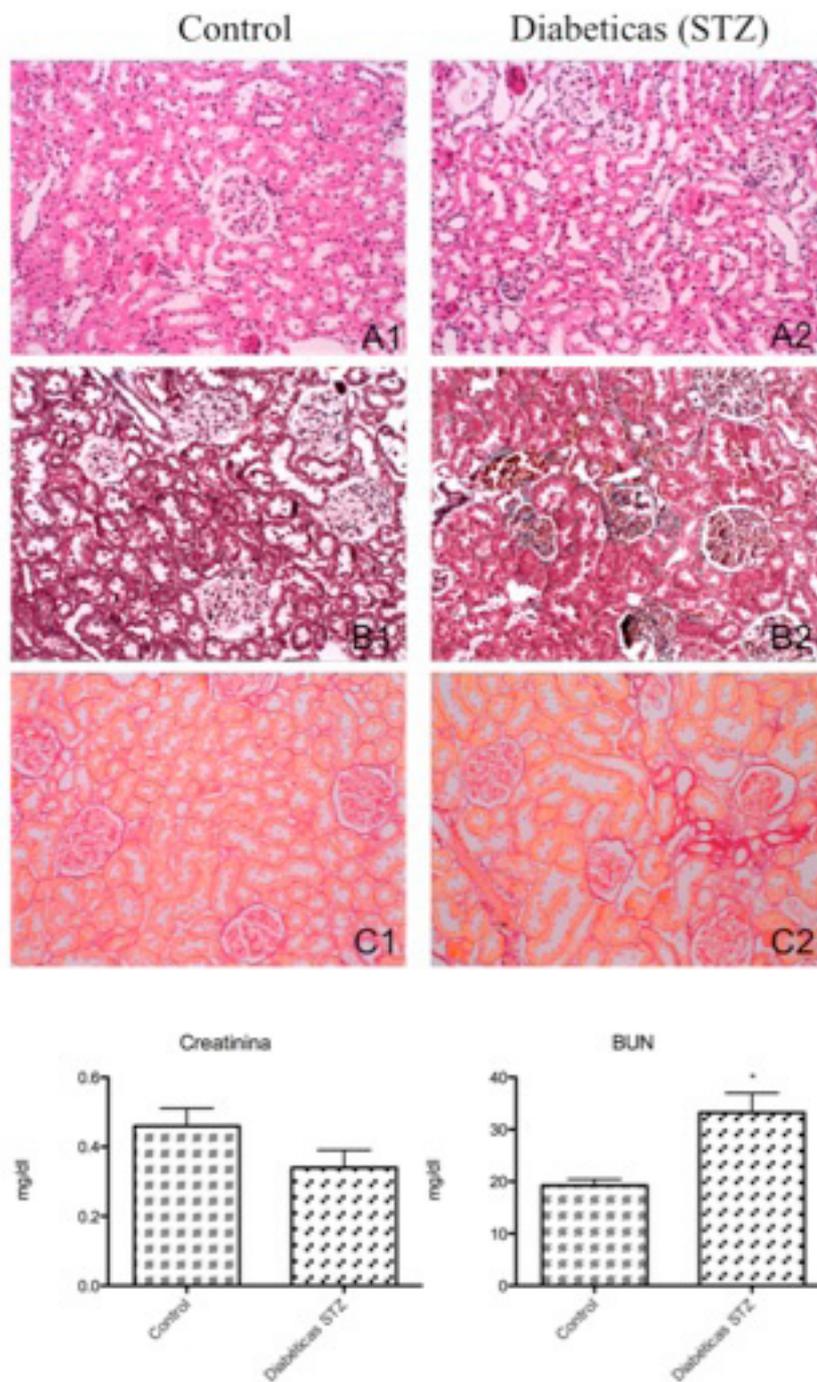


Figura 11. Imágenes representativas de microscopía óptica de la morfología del tejido del riñón de ratas sanas (A1, B1, C1) y diabéticas (A2, B2, C2). Aumento 200X. Se evaluó el daño renal empleando la tinción de hematoxilina eosina (A1, A2) y tricrómico de Masson (B1, B2). La tinción de rojo sirio (C1, C2) se utilizó para evaluar la fibrosis intersticial. La analítica de la sangre mostró diferencias significativas $*p < 0,0244$, en los niveles de derivados nitrogenados de la urea BUN entre grupos.

3.2 Análisis proteómico diferencial del tejido renal por 2D-DIGE

Se llevo a cabo un análisis proteómico diferencial de extractos proteicos obtenidos a partir de tejido renal de animales sanos y animales con ND temprana.

Se observaron 27 manchas proteicas que presentaban una expresión significativamente diferencial entre ambos grupos (Tabla 2) (dieciocho manchas proteicas estaban significativamente aumentadas y nueve significativamente disminuidas en el grupo diabético al compararlo con el grupo control)

Nº de la mancha proteica en el gel patrón.	Valor del t-test	Average ratio
94	0,001492	-2,0373
112	0,008559	-1,6151
113	0,01204	-2,8571
371	0,04064	-1,7328
640	0,03666	1,6309
774	0,003225	2,3532
781	0,04144	-1,572
859	0,00149	1,4076
868	0,001578	1,5495
875	0,002592	1,6893
899	0,0005381	1,8545
983	0,01212	1,6147
1017	0,04525	-2,1105
1145	0,004042	-2,9642
1214	0,009165	1,5513
1381	0,007695	1,5901
1401	0,004223	1,5299
1505	0,04532	1,7483
1537	0,005475	1,6495
1572	0,01124	1,5411
1584	0,0007771	1,5078
1597	0,02062	1,5579
1680	0,007775	1,8106
1684	0,003832	-4,5574
1768	0,04444	-1,5498
1804	0,01082	1,5309
1812	0,008982	1,5359

Tabla 2. 27 manchas proteicas con expresión significativamente diferencial, entre grupos.

En la figura 12 se muestran imágenes fluorescentes representativas de los geles de cada uno de los grupos y del estandar interno en el que están representadas todas las muestras en estudio.

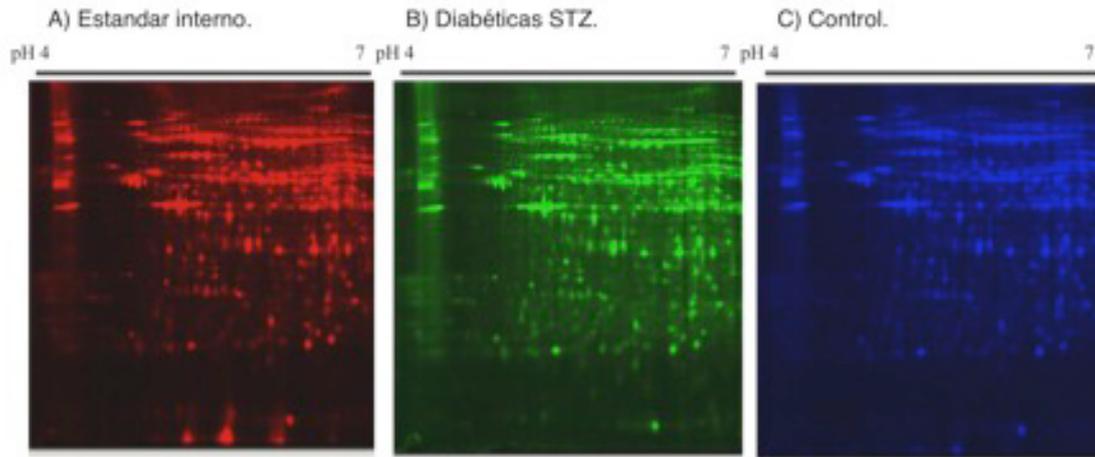


Figura 12. Imágenes fluorescentes representativas del proteoma del riñón de rata correspondientes al estándar interno (A) y a los dos grupos en estudio, gel de riñón de rata diabética (B) y gel de riñón de rata control (C).

El gel patrón, en base al cual se compararon todas las manchas proteicas de todos los gels en estudio, se puede observar en la figura 13,A. En él están marcadas las manchas proteicas diferenciales. En el análisis de componentes principales (PCA), elaborado con las manchas proteicas significativamente variadas en el análisis estadístico de t de Student, se distingue la correcta separación de los dos grupos en estudio mediante la primera componente principal (Figura 13,B).

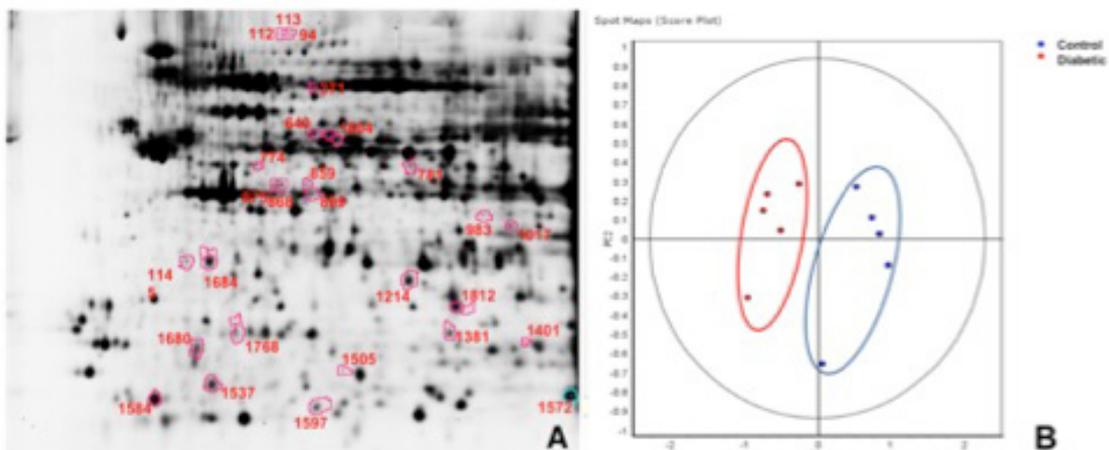


Figura 13. Gel patrón del análisis 2D-DIGE en el que las 27 manchas proteicas significativamente variadas están marcadas con numeros rojos y resaltadas en rosa (A). El análisis PCA elaborado con las manchas proteicas significativamente variadas en el análisis estadístico de t de Student muestra una correcta separación de los dos grupos en estudio mediante la primera componente principal; vemos en rojo los puntos correspondientes al grupo diabético y en azul al grupo control (B).

3.3 Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF

La identificación de las manchas proteicas diferencialmente expresadas entre los dos grupos fue realizada a partir de un gel compuesto por una mezcla de proteínas provenientes de los riñones sanos y los que presentaban ND con un total de 200 µg de proteína (100 µg correspondientes a cada grupo). 12 de las 27 manchas proteicas diferenciales pudieron ser identificadas por espectrometría de masas, MALDI-TOF-TOF. En la tabla 3, observamos la información detallada sobre el valor t de student resultante del análisis estadístico, el ratio calculado para la expresión de las proteínas (el signo positivo indica un aumento y el negativo una disminución en los riñones de las ratas diabéticas respecto a los de las ratas control), el número de acceso de las proteínas, en la base de datos así como el nombre de las mismas. Observamos que una de las manchas contenía una mezcla de dos proteínas lo cual hizo imposible detectar a cual de ellas se debía la variación.

Nº de Mancha proteica en gel patrón	ID de la proteína (Uniprot)	Nombre de la proteína	Valor T-test	Average ratio
640	P62815	Subunidad B de la ATPasa tipo V, isoforma cerebral	0.03	1.6309
774	P32551 and P07335	Subunidad I del complejo citocromo b-c1 mitocondrial y Creatina kinasa tipo B.	0.003	2.3532
859	Q86YZ3	Hornerina	0.001	1.4076
899	P13086	Subunidad b de la succinil-CoA ligasa.	0.0005	1.8545
1214	Q811X6	l-cristalina	0.009	1.5513
1381	Q68G31	Proteina con dominio de tipo biosíntesis de fenacina.	0.007	1.5901
1537	P19234	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2	0.005	1.6495
1584	P22734	Catecol O-metiltransferasa	0.0007	1.5078
1680	P00787	Catepsina B	0.007	1.8106
1684	Q03336	Regucalcina	0.003	-4.5574
1812	P29266	3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, mitocondrial	0.008	1.5359

Tabla 3. Proteínas con expresión diferencial en ND detectados por 2D-DIGE e identificadas por espectrometría de masas.

3.4 Análisis por WB/IHQ/SRM de proteínas diferenciales en tejido, orina y exosomas de orina.

Entre las proteínas diferenciales identificadas, seleccionamos un subgrupo de cuatro proteínas para la validación por diferentes motivos.

La regucalcina o SMP 30 se eligió por ser de entre todas las proteínas la que presenta mayor variación entre grupos (-4,55), I- Cristalina y la subunidad B de la ATPasa tipo 5 (V-ATPasaB) fueron identificadas en exosomas de orina humana en el análisis LC-MS/MS, cabo en exosomas de orina humana, motivo por el cual consideramos interesante llevar a cabo un estudio en mayor profundidad, sobre la expresión diferencial de estas proteínas. La proteína 3-hidroxiisobutirato dehidrogenasa (HIBADH) se eligió porque no había sido previamente descrita en ND.

3.4.1 Validación del análisis diferencial en tejido renal por Western Blot.

El análisis proteico diferencial que se llevó a cabo mediante la técnica de Western Blot corroboró los resultados obtenidos por 2D-DIGE. Encontramos diferencias significativas en el caso de la regucalcina y misma tendencia de cambio para las demás proteínas si bien las diferencias no fueron significativas. Se empleó la tubulina endógena, como control interno para la normalización de estos resultados (figura 14).

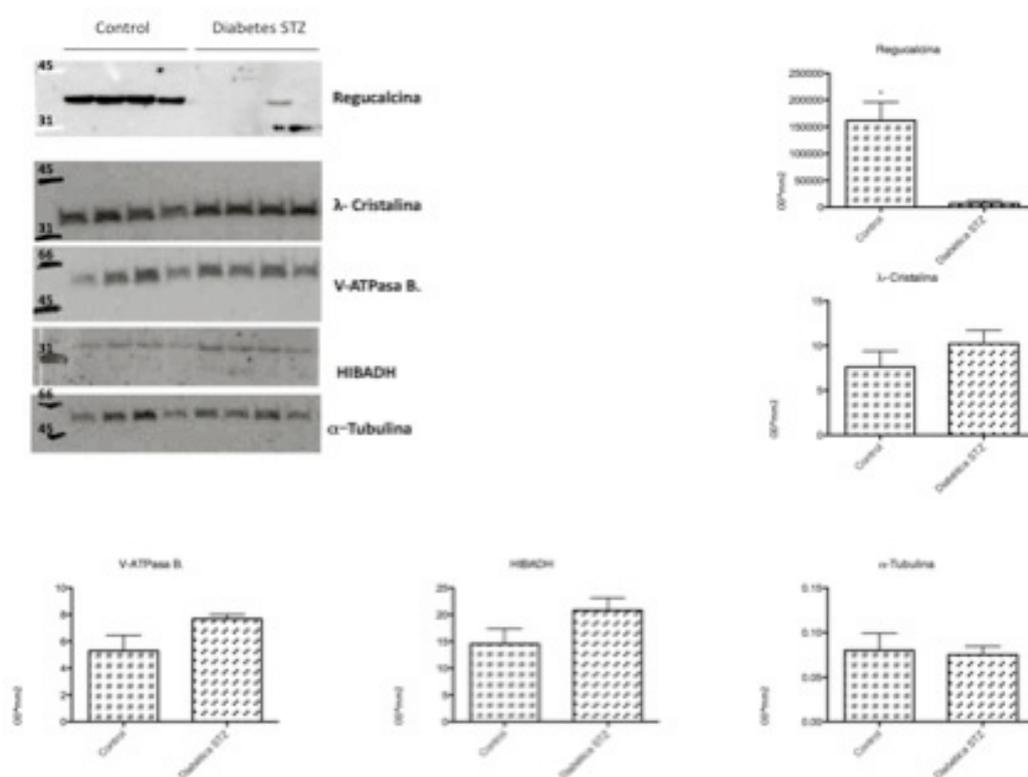


Figura 14. 25 µg de proteína total por carril, gel 10% acrilamida, n=4. Regucalcina, I-cristalina, V-ATPasaB e HIBADH muestran una expresión diferencial en el riñón de ratas control y diabéticas. Los datos están normalizados en base a la tubulina endógena. Los datos confirmaron los resultados previos obtenidos por 2D-DIGE. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). *p=0,021.

3.4.2 Análisis diferencial del tejido renal por técnicas inmunohistoquímicas.

El análisis inmunohistoquímico (IHQ) mostró la distribución de las proteínas en el tejido y permitió llevar a cabo una comparativa del contenido proteico total entre el tejido de riñón sano y diabético, corroborando nuevamente la diferencia encontrada para la expresión de la regucalcina y la tendencia de aumento anteriormente vista para la I-Cristalina y V-ATPasaB por WB y 2D-DIGE. Figura 15.

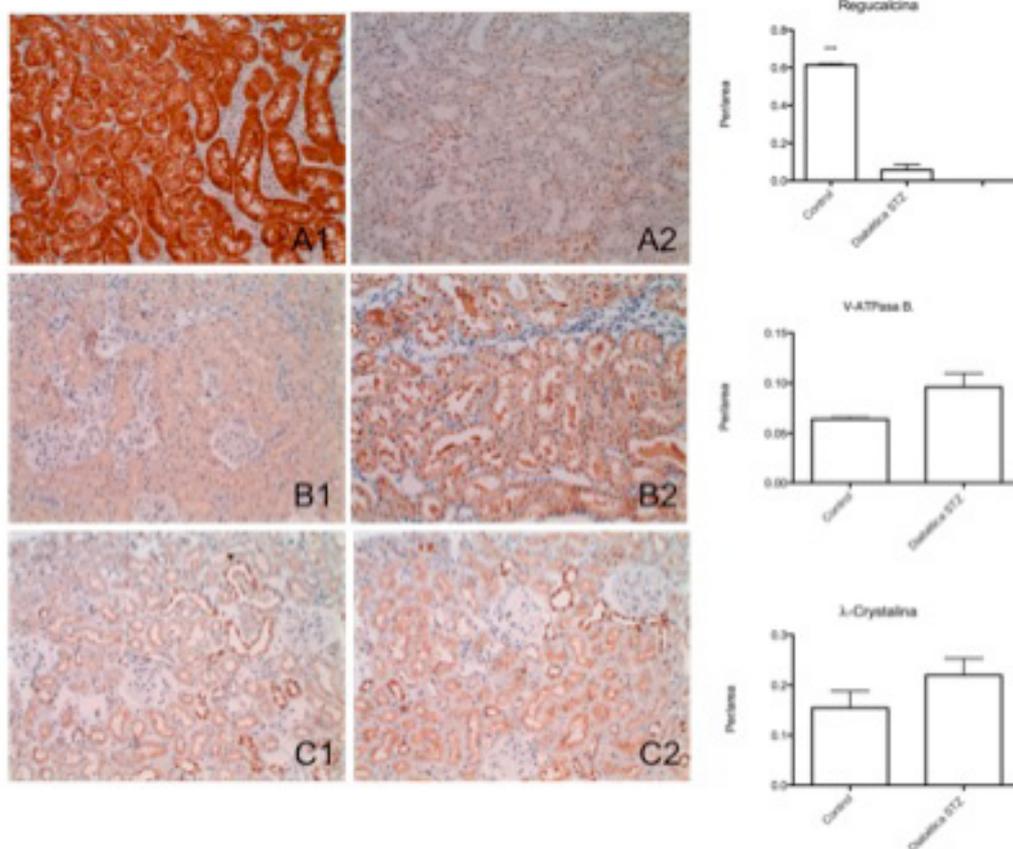


Figura 15. El análisis inmunohistoquímico mostró una presencia mínima de regucalcina en el riñón de las ratas diabéticas (A2) comparando con la abundancia encontrada en los riñones de las ratas control (A1). La tendencia contraria pudo ser observada para la I-Cristalina (B1 y B2) y para V-ATPasa B (C1 y C2), presentando éstas mayor expresión en el riñón de ratas diabéticas que en el de las ratas control y confirmando así los resultados obtenidos por otras técnicas. Aumento 200X. Las barras de error representan el error estandar de la media (SEM) *** p= 0.0001. La cuantificación se realizó empleando el programa informatico Image Pro-Plus.

3.4.3 Búsqueda de una fuente de biomarcadores más accesible: exosomas y orina.

La proteómica de tejidos es una herramienta de gran valor para el descubrimiento de nuevos mecanismos implicados en el desarrollo de una patología como la ND. Nos permite estudiar el conjunto de proteínas presentes en el tejido sin hacer una preselección de potenciales biomarcadores. Sin embargo en terminos de diagnóstico y prevención de una enfermedad es preciso dar un paso más. Para lograrlo hemos realizado un estudio sobre la expresión de este subgrupo de proteínas en una muestra biológica más accesible como es la orina en general y las microparticulas exosomales aisladas a partir de la misma, en particular.

La orina es una fuente rica en biomarcadores que se puede obtener de forma sencilla y muy poco invasiva. Por otra parte los exosomas han adquirido gran relevancia en los últimos años como fuente de estudio y son por ello portadores de gran cantidad de información que puede resultar de interés clínico [25, 43]. Además se trata de un subproteoma cuyo análisis en comparación con el de la orina completa facilitarí la detección de proteínas minoritarias que se encuentren en esa fracción.

En el estudio que llevamos a cabo mediante la técnica de WB, se emplearon 25 microgramos de proteína total de orina por muestra, concentrada 30 veces en volumen y 10 microgramos de proteína exosomal. Todas las muestras fueron tratadas para la eliminación de la albumina e IgG.

Vemos en los resultados de la figura 16 como la regucalcina no pudo ser detectada en orina a pesar de ser mayor la cantidad de proteína total en estudio, Sin embargo ésta se detectaba claramente al estudiar las proteínas exosomales, extraídas de la orina de las ratas del grupo control. Entre las proteínas exosomales extraídas de la orina de el grupo con ND tampoco pudo ser detectada, siguiendo por tanto la tendencia vista en el riñón.

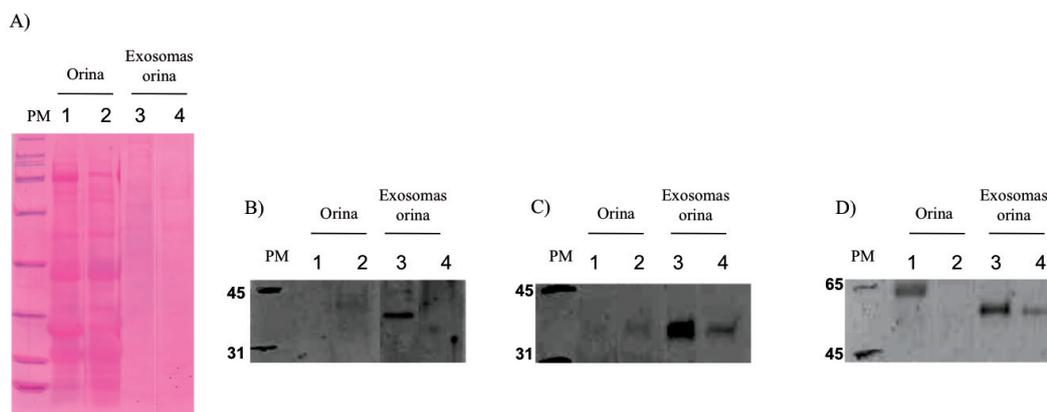


Figura 16. Análisis de expresión de proteínas excretadas en orina y de exosomas de la orina (WB). Las muestras corresponden a la mezcla de orinas de todos los animales de cada grupo (5 animales diabéticos y 5 controles sanos). Las muestras de exosomas corresponden a exosomas extraídos desde la mezcla de orinas de todos los animales de cada grupo. A) membrana teñida con Ponceau como control de carga. B) La regucalcina no pudo ser detectada en orina de grupo diabético (carril 1), en la orina del grupo control (carril 2) ni en los exosomas del grupo diabético (carril 4). Sólo se pudo detectar la presencia de regucalcina en los exosomas de orina del grupo control (carril 3), siguiendo la tendencia observada para el tejido. C). Los niveles de l-cristalina en exosomas del grupo control fueron más elevados que en el grupo diabético. D) V-ATPasaB solo se pudo detectar en exosomas y presentó una mayor expresión en exosomas del grupo control que en exosomas del grupo diabético. PM; marcadores de peso molecular.

La presencia de l-cristalina en la muestra de exosomas la detección era clara, siendo mayor la expresión en los exosomas obtenidos a partir del grupo control que a partir del grupo con ND, mostrando por tanto la tendencia opuesta a la observada en tejido.

Lo mismo se observó para la V-ATPasaB en exosomas, mayor expresión en exosomas control que en los STZ, al contrario de lo observado en tejido. En este caso la proteína no pudo ser detectada en orina.

HIBADH no pudo ser detectada en ninguna de las muestras.

Observando la membrana teñida con Ponceau vimos que la cantidad de proteína cargada en el gel era la misma para para las muestras que estábamos comparando corroborando los resultados obtenidos previamente en la cuantificación proteica.

3.4.4 Validación de la expresión diferencial de regucalcina en tejido y exosomas mediante “Selected Reaction Monitoring” SRM.

En vista de los resultados anteriores, la regucalcina se presenta como el candidato más robusto a marcador de ND, tanto a nivel de tejido como de Exosomas, dada su diferencia en expresión. Para ahondar en su estudio y evaluar el potencial de la tecnología de “selection reaction monitoring” (SRM) en la ND, desarrollamos un método de análisis de la regucalcina con un equipo de espectrometría de masas, un triple cuadrupolo, acoplado en línea con un sistema de nano-cromatografía en modo chip (chip-nLC-(SRM)-QQQ-MS). Este tipo de análisis es muy sensible y específico para la detección y cuantificación de proteínas candidatas a ser biomarcadores y está basado en la detección de masas de péptidos proteotípicos de una proteína y los fragmentos derivados de estos precursores. Posibilita la monitorización simultánea de múltiples masas (proteínas) de una misma muestra al mismo tiempo.[119] De confirmarse los resultados anteriores, la metodología SRM supone una enorme ventaja en cuanto a capacidad de análisis de un elevado número de muestras (“high throughput”), automatización y reducción en el tiempo global de análisis.

Se midieron un total de 9 transiciones, correspondientes a 3 péptidos distintos (3 transiciones por péptido de regucalcina). Observamos cómo la expresión de la regucalcina en tejido en el grupo de animales con ND (n=4) es menor que en el grupo control (n=4) (figura 17), observándose una disminución significativa para la transición 635.4>638.4 y corroborando la tendencia observada mediante otras técnicas para las demás transiciones.

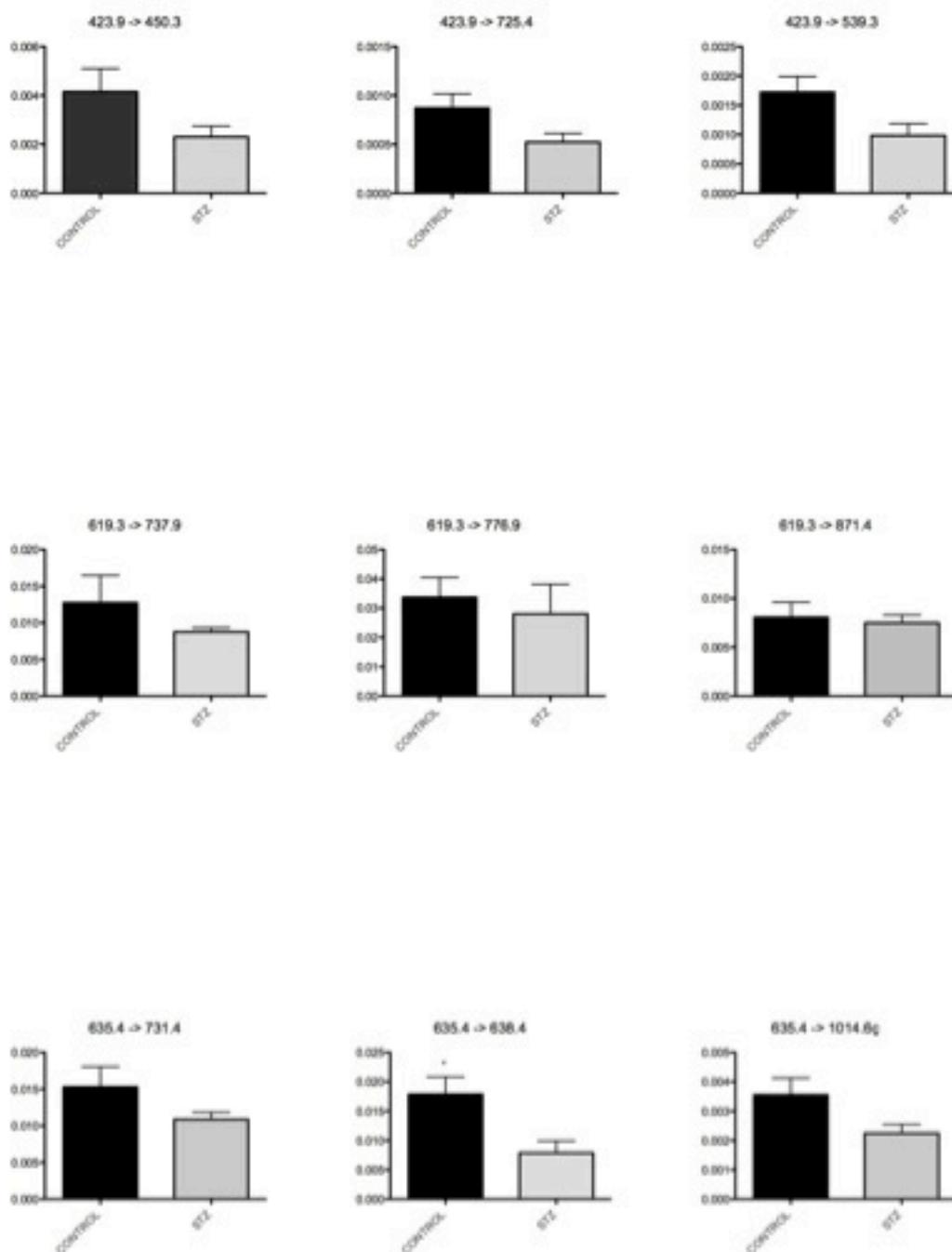


Figura 17. Análisis SRM de regucalcina de tejido en un equipo Chip-nLC-QQQ-MS. Se analizaron 3 transiciones de tres péptidos proteotípicos distintos que permitió observar una mayor abundancia en el tejido sano de riñón que en el patológico, * $p < 0,04$.

Esta misma tendencia se vio al analizar la regucalcina en Exosomas. Se midieron 3 transiciones de dos péptidos proteotípicos en una muestra extraída de la mezcla de las orinas recogidas de cinco animales para cada grupo. Al realizar el análisis se observó que la regucalcina solo pudo ser detectada en los exosomas del grupo control (figura 18).

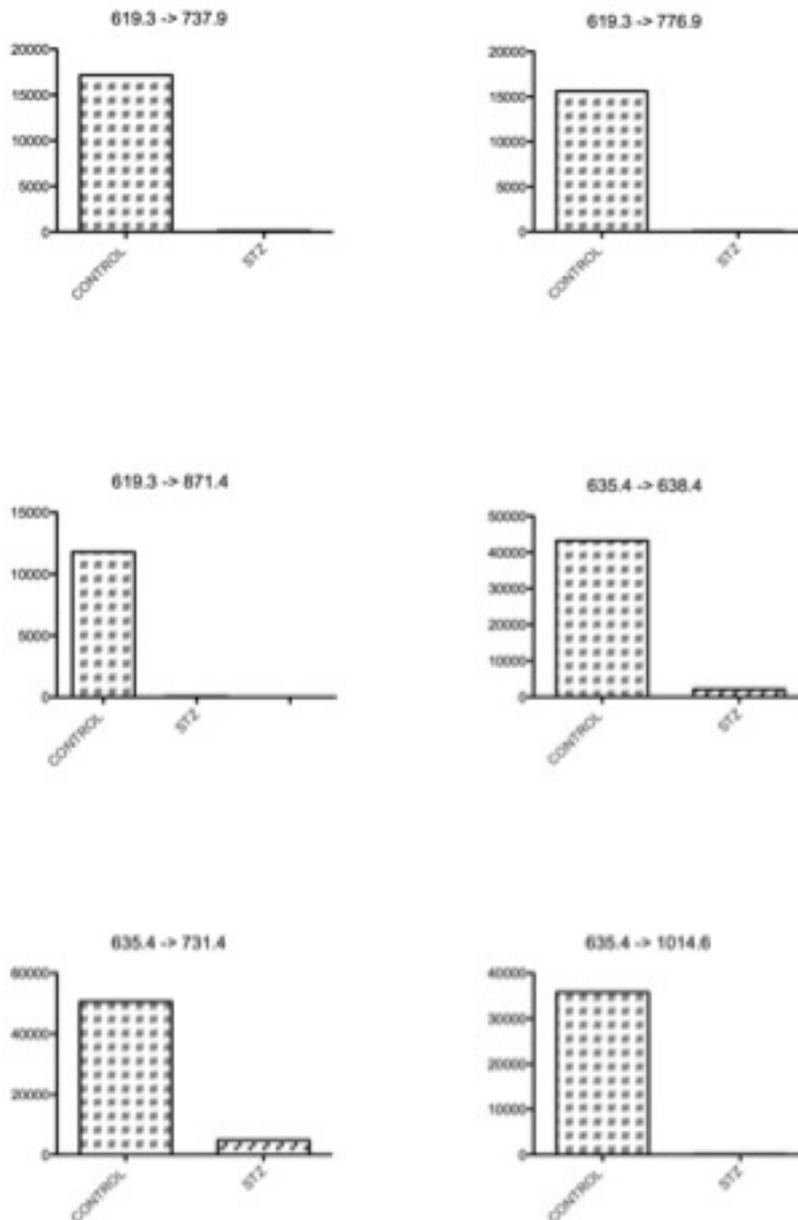


Figura 18. Los exosomas extraídos de la orina del grupo control y del grupo diabético fueron analizados por SRM y la regucalcina solo pudo ser detectada en las muestras control.

3.5 Traslación de resultados a humano. Regucalcina como potencial marcador.

En todos los experimentos llevados a cabo en el modelo animal de ND temprana, pudimos observar que la regucalcina aparece como el candidato más robusto a marcador de dicha enfermedad, tanto a nivel de tejido como de Exosomas. Para ahondar en su estudio y evaluar el potencial real de esta proteína como marcador temprano de ND llevamos a cabo un análisis por WB en 4 individuos sanos y 4 enfermos de ND. Como se muestra en la figura 19, pudimos detectar la presencia de regucalcina en todas las muestras de indivi-

duos sanos, mientras que no obtuvimos señal en el caso de las muestras de pacientes con ND, obteniendo por tanto nuevos indicios sobre el potencial de esta proteína como posible biomarcador para la detección temprana de la ND. Comprobamos que efectivamente esa variación detectada en el modelo animal era detectable en muestras obtenidas desde orina humana.



Figura 19. Análisis diferencial por WB de la expresión de regucalcina, en exosomas de orina humana. 15 μ g de proteína total por carril, gel 14% de acrilamida, n=4.

Discusión

La nefropatía diabética (ND) es una de las principales complicaciones causadas por la Diabetes Mellitus y es la causa más común de enfermedad renal en estadio terminal. La detección temprana de riesgo de ND antes de que un daño renal avanzado haya ocurrido supondría un gran avance en la lucha contra esta enfermedad. La consecución de este objetivo, hasta el momento, sigue pendiente ya que se trata de una patología muy compleja y gran parte de los eventos que generan daño estructural en el riñón ocurren de manera silenciosa.

La proteómica ha sido aplicada a la búsqueda de biomarcadores en ND con anterioridad, siendo la orina el fluido biológico más estudiado ya que puede reflejar el estado fisiopatológico del riñón y se puede obtener en grandes cantidades de manera no invasiva [66, 67].

Gracias a estos estudios se han identificado interesantes moléculas candidatas a ser empleadas como biomarcadores clínicos, algunas de ellas como por ejemplo el colágeno de tipo IV o la Cistatina C están siendo evaluadas en ensayos clínicos. También se han llevado a cabo diversos estudios a partir de tejido renal de biopsias humanas o modelos animales y en los últimos años además el estudio de micropartículas de orina provenientes del riñón, tales como los exosomas ha ganado importancia en el estudio de enfermedades renales y ha generado un gran interés en la comunidad científica internacional. Sin embargo, hasta este momento nunca se ha abordado el estudio de los exosomas desde un punto de vista proteómico en relación con la ND. Ya que debido a la proteinuria que presenta la orina de dichos pacientes, la aplicación de métodos de aislamiento de exosomas supone una gran dificultad añadida no resuelta hasta el momento.

En esta tesis doctoral, se ha abordado el estudio de la ND desde dos puntos de vista distintos. Por un lado se ha llevado a cabo por primera vez un análisis cualitativo y cuantitativo del conjunto de proteínas que componen los exosomas de orina, como un subproteoma de la misma, en el contexto de la ND. Los exosomas suponen un 3% del proteoma de la orina, por tanto el estudio de este subproteoma facilitará la detección de proteínas minoritarias presentes en la orina que no serían fácilmente detectables al estudiar el proteoma completo. Por otra parte estas microvesículas se generan en las células epiteliales del túbulo renal y en los podocitos y pueden aportar información directa del estado fisiopatológico del riñón, mientras que la orina al ser un filtrado del plasma refleja cambios en el riñón pero también en el resto del organismo.

Por otra parte hemos estudiado el tejido renal de animales diabéticos que todavía no han desarrollado la ND hasta grados que permitan llevar a cabo su detección, por los métodos empleados en la práctica clínica de rutina. Este estudio nos ha permitido detectar cambios a nivel de expresión proteica en un estadio temprano de la enfermedad dando lugar a una serie de posibles biomarcadores tempranos de la misma. Es la primera vez que se aplica la metodología de 2D-DIGE al estudio del tejido renal en estadios tempranos de ND. Por otra parte, las técnicas desarrolladas para el aislamiento y estudio de los exosomas han sido aplicadas con éxito en las muestras de orina de estos animales que presentaban ND en estadios tempranos, pudiendo así corroborar datos obtenidos en el estudio del tejido renal.

1. ANÁLISIS DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DEPLECIÓN DE PROTEINAS MAYORITARIAS CONTAMINANTES.

Los exosomas son vesículas membranosas 40-100 nm de diámetro, de origen endocítico, con forma de copa y una densidad de flotación en gradiente de sacarosa de 1,10 a 1,19 g/cm³. Estas vesículas son liberadas al espacio extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas, por diversos tipos celulares tales como células dendríticas, reticulocitos, linfocitos B, varios tipos de células madre, células epiteliales o endoteliales [10-16]. Es posible aislar exosomas de cultivos celulares así como de distintos fluidos biológicos como sangre y orina.

Para llevar a cabo un buen estudio proteómico de exosomas, hay que tener muy en cuenta el grado de pureza de las muestras y el rendimiento obtenido en el aislamiento. Ello depende principalmente de dos factores: por un lado la forma en que se trata la muestra de orina, desde el punto de vista de la recogida y conservación, y por otro lado del método de aislamiento empleado. Para la recogida, almacenamiento y descongelación de la muestra se siguieron las directrices publicadas por Zhou *et al.* [101].

1.1 Métodos de aislamiento

Se probaron dos métodos distintos para el aislamiento de exosomas de orina, uno basado en ultracentrifugación y otro basado en un reactivo comercial llamado Exoquick[®]. El primer método es un método largo, requiere una media de 4 horas de trabajo experimental para la extracción de exosomas de una muestra, un gran volumen inicial (100 ml) e instrumental y material específicos (ultracentrifuga, rotores, tubos de ultracentrifuga). El segundo en cambio es un método sencillo y requiere poco tiempo de trabajo experimental permitiendo el aislamiento de una muestra en aproximadamente 1 hora de trabajo, el volumen inicial de muestra es pequeño (1 ml) y no requiere instrumental específico ni maquinaria compleja [99] pero supone un elevado gasto económico.

Dentro del método de aislamiento por ultracentrifugación se probaron 2 variantes, una que incluía un paso de enriquecimiento en la recuperación de exosomas y uno que no.

La proteína Tamm-Horsfall (THP) o uromodulina es la proteína más abundante en orina y a bajas temperaturas tiende a formar agregados dando lugar a grandes redes poliméricas, entre las que los exosomas pueden quedar atrapados. Al llevar a cabo centrifugaciones a baja velocidad, estas redes poliméricas tienden a precipitar, arrastrando con ellas parte de los exosomas presentes en la muestra. El paso de enriquecimiento aplicado al método de ultracentrifugación consiste en reducir esta proteína para deshacer las redes que forma, solubilizarla y recuperarla junto con los exosomas que han precipitado atrapados por las redes en la centrifugación de baja velocidad; este paso se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito [46].

Las dos variantes del método de ultracentrifugación dieron lugar a buenos resultados en cuanto a rendimiento proteico, permitiendo su comparación mediante el estudio de los perfiles bidimensionales obtenidos para ambos extractos. Se pudo observar que el patrón de manchas proteicas era el mismo para ambas muestras (Resultados, figura 1A y 1B), pudiendo apreciarse un mayor número de manchas y mayor abundancia proteica en el gel obtenido con la muestra a la que se había aplicado el paso de enriquecimiento, indicando una mayor recuperación proteica. Se quiso descartar que ese mayor rendimiento se debiera a una mayor recuperación de proteínas sedimentadas en el paso de centrifugación a baja velocidad, ya que al resuspender el precipitado y reducirlo para despolimerizar la THP, resuspendemos y tratamos junto a éste los restos celulares y proteínas sedimentadas de la orina, aunque se repite el paso de centrifugación después del tratamiento, quisimos descartar que este proceso favoreciera una mayor recuperación de proteínas no exosomales. Al comparar el perfil bidimensional del proteoma aislado por este método (Resultados figura 1B) con el obtenido para el proteoma completo de la orina (Resultados, figura 1C) se pudo comprobar que los perfiles eran muy distintos y que el enriquecimiento obtenido con el paso de reducción se debía por tanto a una mayor recuperación de exosomas.

Los experimentos llevados a cabo para el aislamiento de exosomas empleando el reactivo Exoquick® no dieron lugar a resultados satisfactorios. La cuantificación proteica en el precipitado obtenido por este método indicaba que no se había conseguido aislar correctamente la fracción exosomal, cuando se partió de 1 ml de orina (como indica el fabricante), ni cuando se partió del doble de volumen inicial para intentar mejorar los resultados. Cuando este reactivo se empleó para aislar exosomas desde la orina de pacientes con ND sí se visualizaban proteínas; el perfil proteico obtenido (Resultados, figura 2 A) era distinto al obtenido cuando el aislamiento se llevaba a cabo mediante métodos de ultracentrifugación, más parecido al proteoma de la orina patológica (Resultados, Figura 2, B). Todos los resultados obtenidos mediante el empleo de esta mezcla de polímeros indican que a pesar de que este reactivo esté diseñado para favorecer la precipitación de exosomas, no es muy efectivo al ser aplicado a muestras de orina y además provoca una precipitación inespecífica de proteínas solubles mayoritarias presentes en la orina de pacientes con proteinuria, por lo que el uso de este reactivo quedó descartado para experimentos sucesivos.

Así, mediante el procedimiento basado en ultracentrifugación previamente descrito se consiguió aislar el subproteoma exosomal de la orina, conseguimos poner a punto un método para el adecuado estudio de este mediante 2D-PAGE, Este estudio nos permitió corroborar mediante una nueva técnica el beneficio que supone aplicar el método de enriquecimiento para aumentar la recuperación exosomal así como descartar el aislamiento mediante el método Exoquick® para este tipo de muestras. La puesta a punto del método 2D-PAGE además abre la puerta a un futuro estudio de dichas muestras por 2D-DIGE.

1.2 Depleción de albúmina y THP.

Al analizar la fracción exosomal de la orina de pacientes con ND, comprobamos que la proteinuria asociada a este tipo de patologías suponía un serio problema a la hora de llevar a cabo un estudio proteómico, ya que la presencia de una gran concentración de proteínas provoca una adhesión o coprecipitación de éstas (especialmente de la albúmina) junto a la fracción exosomal aislada. Esta coprecipitación además de complicar la detección e identificación de proteínas minoritarias, impedía la comparación de los perfiles proteicos

obtenidos mediante 2D-PAGE a partir de muestras de individuos sanos y patológicos por presentar estos perfiles muy distintos entre ellos.

Además existe otro problema que afecta a la cuantificación a la hora de llevar a cabo cualquier análisis comparativo entre grupos; la cantidad de proteínas exosomales cuantificadas será distinta para los distintos grupos, ya que en las muestras patológicas se cuantificará gran cantidad de albúmina haciendo que la representación de proteínas exosomales en dichas muestras sea menor que en las muestras de individuos sanos en las que toda la cantidad cuantificada corresponderá a proteínas exosomales.

Para superar estas dificultades hemos puesto a punto un protocolo óptimo, combinando un paso de depleción/ecualización de albúmina con el aislamiento de exosomas por ultracentrifugación compatible con el posterior análisis por 2D-PAGE y LC-MS/MS.

Gracias a la aplicación de este protocolo sobre todas las muestras en estudio, conseguimos obtener proteomas comparables entre grupos y pudimos aumentar la capacidad de detección e identificación proteica hasta en un 60% (como se comentará más adelante). La mayoría de los estudios publicados hasta el momento sobre comparación de métodos para el aislamiento de exosomas de orina, abordan el análisis partiendo de muestras de orina sana sin proteinuria [10, 98, 120]. Como alternativa al método que nosotros proponemos sólo existe un estudio publicado en 2010 que abordaba esta misma problemática [100]. En este estudio se evaluó una variante del método de ultracentrifugación que incluía un paso posterior de purificación de la muestra precipitada mediante cromatografía de exclusión por tamaño, obteniéndose preparaciones más limpias [100]. Al igual que en nuestro caso, en este estudio se observó que al llevar a cabo el aislamiento de exosomas por ultracentrifugación, el precipitado exosomal presentaba una importante contaminación de proteínas solubles abundantes en la orina con proteinuria (albúmina principalmente). Analizaron también la orina de controles sanos añadiendo una cantidad de albúmina similar a la que se encuentra en orina de pacientes con proteinuria, pudiendo comprobar que los problemas en el aislamiento eran los mismos que al llevarlo a cabo en orina de pacientes con proteinuria, ya que en este caso el precipitado exosomal presentaba también grandes cantidades de albúmina que no eran propias de las microvesículas. Se desconoce cual es el mecanismo, específico o inespecífico, que lleva a la coprecipitación de estas proteínas solubles. Los exosomas pueden contener albúmina pero la mayor parte de la que detectamos en la muestra después de la precipitación corresponde a una coprecipitación de proteínas solubles no exosomales que ha de ser eliminada para llevar a cabo una comparación entre muestras sanas y patológicas [100].

En el análisis por LC-MS/MS realizado en exosomas de orina de controles y pacientes, que se presenta en esta tesis, fuimos capaces de detectar la albúmina en las muestras de ambos grupos a pesar de haberla deplecionado en todas las muestras (Resultados, tabla#), observando una mayor presencia de esta proteína en muestras de pacientes que en las de controles. Es importante destacar que la etapa de depleción se lleva a cabo antes de proceder al lisado de los exosomas. Así, en el análisis proteómico diferencial es posible detectar albúmina a pesar de la depleción, ya que durante su formación éstos pueden englobar albúmina citoplasmática en su interior. Este hecho puede deberse a que las proteínas filtradas en el glomérulo se reabsorben a lo largo de la nefrona, quedando acumuladas en el citoplasma de las células tubulares. Este acúmulo será mayor en las células tubulares de pacientes con un mal funcionamiento glomerular, ya que será mayor la cantidad de proteínas mayoritarias reabsorbidas por estas células (entre ellas, albúmina) [100]. Por tanto, la fracción exosomal proveniente de orina de pacientes podrá contener mayor cantidad de

albúmina que la de controles (como hemos podido observar) pero en este caso se tratará de albúmina propia de la fracción en estudio y no de la albúmina contaminante eliminada antes del lisado exosomal.

La THP es la proteína más abundante en la orina de individuos sanos. Esta proteína polimeriza formando redes de gran tamaño que pueden co-precipitar con los exosomas al llevar a cabo el aislamiento por ultracentrifugación [46], dando lugar a una contaminación de este precipitado exosomal y pudiendo impedir la detección o identificación de proteínas menos abundantes. Por estos motivos se planteó la necesidad de deplecionarla. Los resultados obtenidos tras la depleción de THP mediante reducción con DTT del precipitado de exosomas y nueva ultracentrifugación permitían obtener un precipitado exosomal más limpio [97] pero implicaban una pérdida considerable de rendimiento en la recuperación de proteínas exosomales. Se vio además que la depleción de THP no era igual de eficiente en todos los casos, siendo incompleta en la mayoría de ellos y dependiente de la muestra de partida; la efectividad del tratamiento era por tanto distinta en cada caso y generaba perfiles proteicos no reproducibles. Por todo ello y considerando que la THP no es una proteína propia de un estado patológico provocado por la ND, sino que debe estar presente de modo no diferencial entre grupos (como efectivamente observamos en los datos obtenidos en el estudio comparativo entre muestras. Resultados tabla#), y que la pérdida de abundancia proteica experimentada al llevar a cabo este paso podía perjudicar la detección de proteínas minoritarias, no consideramos beneficioso el tratamiento. Por todos estos motivos este paso de depleción no fue incluido en el protocolo definitivo

1.3 Confirmación de la identidad exosomal, mediante microscopía electrónica y western blot.

Pudimos confirmar un correcto aislamiento de exosomas de orina, empleando técnicas de microscopía electrónica. Comprobamos que el tamaño de las micropartículas detectadas era el esperado para los exosomas (40-100 nm), así como la ausencia de microvesículas de mayor tamaño y observamos también que estos presentaban la típica forma de copa descrita en la literatura. Además por WB pudimos detectar Alix y Tsg 101 mediante el empleo de anticuerpos específicos. Estas dos proteínas participan en el proceso de biogénesis de los exosomas [121] y son por ello consideradas marcadores específicos de estas microvesículas [25]. La proteína de membrana de retículo endoplasmático rugoso calnexina que podría estar presente en la membrana de microvesículas con distinto origen al exosomal no pudo ser detectada en la fracción exosomal aislada por ultracentrifugación por lo que podemos considerar que son los exosomas los que conforman mayoritariamente la fracción aislada y que por tanto el método de aislamiento puesto a punto en esta tesis doctoral es apropiado para el estudio proteómico de la misma.

A partir de los datos aportados podemos concluir que, en la presente tesis doctoral hemos desarrollado una estrategia perfectamente compatible con el protocolo de enriquecimiento para el aislamiento de exosomas, descartando la depleción de THP por no resultar beneficiosa en el tipo de estudio que nos ocupa, hemos desarrollado un método para la depleción de albúmina que permite eliminar la albúmina adherida a las muestras sin dañar la integridad de los exosomas que permite además la obtención de muestras más limpias. Este protocolo de depleción de albumina es más rápido y sencillo que la aplicación de SEC alternativa ya descrita con anterioridad para la depleción de albúmina en muestras exosomales. En definitiva se ha desarrollado un protocolo que ha permitido llevar a cabo

Discusión

la comparación entre exosomas de orina de individuos sanos y de pacientes con ND por primera vez.

2. ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE EXOSOMAS DE ORINA HUMANA: ALTERACIÓN DEL PROTEOMA EN ND.

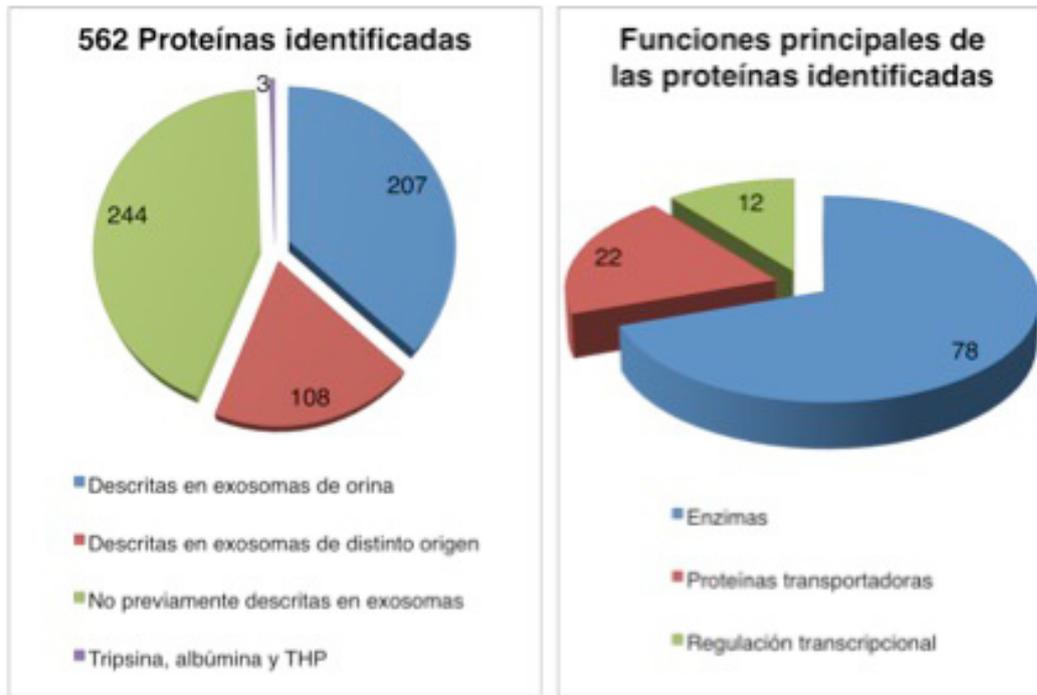
2.1 Análisis diferencial por nLC-MS/MS (Orbitrap®)

2.1.1 Análisis cualitativo

Empleando la metodología óptima descrita con anterioridad se llevó a cabo por vez primera un análisis del perfil proteómico de los exosomas de orina asociado a un estado sano y a la ND. Se aislaron exosomas de 5 muestras de orina de controles sanos y de 5 muestras de individuos con ND.

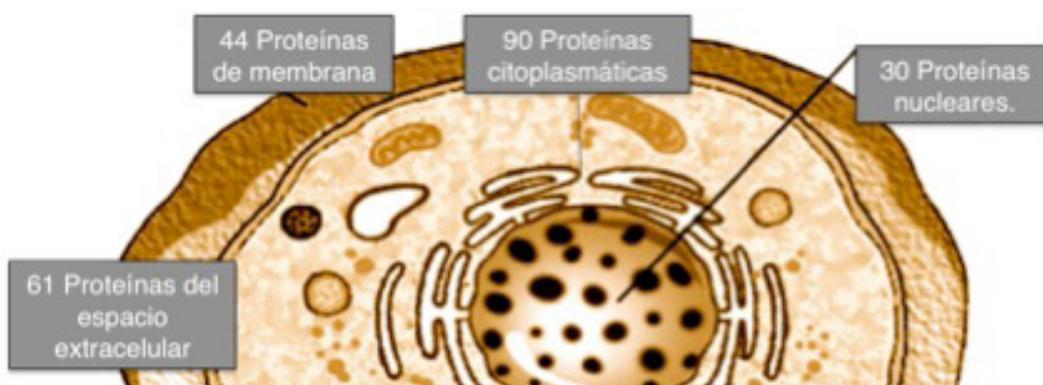
La depleción de albumina previa al análisis por nLC-MS/MS permitió detectar un mayor número de proteínas, como se ha comentado en el apartado 1.2 incrementando de un 30 a un 60 % el número de proteínas identificadas. Así queda de manifiesto que la estrategia de depleción de albúmina puesta a punto en la presente tesis doctoral, favorece claramente la detección e identificación de un número mayor de proteínas, favoreciendo ampliamente el estudio del proteoma de exosomas de orina.

Mediante el análisis por LC-MS/MS en un instrumento Orbitrap® se identificaron inequívocamente 562 proteínas (Ver tabla #) con un mínimo de 2 péptidos identificados por proteína y un 99% y un 95% de confianza de proteína y péptido respectivamente. De las 562 proteínas identificadas, 207 habían sido previamente identificadas en exosomas de orina, 108 habían sido identificadas en exosomas de distinto origen y 244 no habían sido previamente descritas en exosomas (datos basados en la literatura y en la base de datos Exocarta [25], “www.exocarta.org”). Así pudimos concluir que hemos constatado la presencia de 352 nuevas proteínas en exosomas de orina desconocida hasta este momento. Esta gran cantidad de datos supone una importante aportación al conocimiento actual sobre la composición proteica de los exosomas de orina en general y en el contexto de la ND en particular.



Estableciendo un valor de corte más restrictivo, de 3 péptidos identificados por proteína, pudimos identificar 254 proteínas (ver tabla). 239 de estas 254 proteínas, pudieron ser mapeadas y clasificadas empleando el programa “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA).

Se vio que 90 proteínas eran proteínas citoplasmáticas, 61 se localizaban en el espacio extracelular, 44 en la membrana plasmática y 30 eran proteínas nucleares. 78 de ellas eran enzimas (22 peptidasas, 10 kinasas y 1 fosfatasa), 22 eran proteínas transportadoras y 12 eran proteínas de regulación transcripcional. Es interesante destacar además que 41 de las proteínas identificadas en este estudio por LC-MS/MS forman parte de mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y función de del sistema renal y urológico.



La composición proteica de los exosomas varía dependiendo del origen celular de los mismos, aunque existe un grupo de proteínas conservado para todos los exosomas, con independencia del origen celular. Existen una serie de proteínas detectadas con frecuencia en exosomas que han podido ser identificadas en este estudio. Hemos identificado representantes de la familia Rab como, Rab 5, Rab 10, Rab 7A, ELKS/Rab 6

interacting protein. Estas proteínas representan la mayor familia de pequeñas GTPasas que regulan procesos de acoplamiento y fusión en las membranas plasmáticas y fusión de membranas de los exosomas [37]. En distintos estudios sobre la composición exosomal, se han visto también con mucha frecuencia distintos tipos de anexinas que participan en mecanismos de tráfico y fusión de membranas. En este estudio hemos detectado anexinas como la Anexina1, 2, 3, 4, 5, 6 y 11. Además, hemos identificado la proteína CD9 de la familia de las tetraspaninas, con elevada presencia conocida en exosomas. Por otro lado, se han identificado proteínas de la familia “heat shock” también características de los exosomas como HSP90, HSP70, HSP β 1. En la literatura está descrito además que los exosomas presentan una serie de enzimas metabólicas y como la aldolasa B, enolasa1, alcohol deshidrogena (NADP⁺), GSTP1, periredoxinas, etc. que han sido identificadas en este estudio. Completan el listado, entre otras, proteínas ribosomales (como RPS27A), proteínas transmembrana (como LAMP1), proteínas de señalización, ATPasas (ATP6V1A, ATP6V1B1, ATP6V1C1, ATP2B3, ATP2C1, ATP7B), proteínas del citoesqueleto (como actinas, tubulinas, ezrina, etc.) y ubiquitinas [25] todas ellas características de exosomas.

2.1.2 Análisis cuantitativo: “Label-free”

El análisis cuantitativo libre de marcaje mostró un panel de 25 proteínas significativamente variadas en ND (Resultados, tabla#). Entre estas 25, las variaciones observadas en el estudio “label-free” para el precursor de α microglubulina/bikunina (AMBP), la histona-lisina-N- metil transferasa 3 (MLL3) y el canal aniónico selectivo dependiente de voltaje 1 (VDAC1) pudieron ser validados por SRM en una cohorte independiente de pacientes con las mismas características clínicas (Material y métodos, tabla 2).

La AMBP es una proteína de membrana, una glicoproteína secretada con actividad inhibidora de serin proteasas que se expresa constitutivamente en hígado y riñón [122]. La presencia de AMBP en exosomas de orina ha sido descrita con anterioridad [10] y la variación observada en los niveles de la misma en orina se ha visto relacionada con la diabetes, encontrándose una menor expresión de esta proteína en orina de pacientes diabéticos de tipo 2 frente a muestras de orina control [123] (tendencia opuesta a la detectada en exosomas en el estudio que aquí se presenta). La implicación de esta proteína en otras enfermedades renales como el daño por isquemia/reperfusión (I/R) también ha sido descrita con anterioridad. En esta patología se ha visto que la administración de adrenomodulina (AM)/AMBP puede atenuar significativamente el daño en el riñón mediante una disminución de la respuesta inflamatoria [124] (los niveles de TNFa renal y sérico disminuyen significativamente tras el tratamiento con AM/AMBP). Estos datos en I/R sugieren que el aumento de los niveles de AMBP en el riñón puede ejercer un efecto protector. En base a los datos recogidos en la literatura, hipotetizamos que el descenso en los niveles de AMBP en orina de pacientes diabéticos documentado con anterioridad podrían estar relacionados con un descenso de la secreción hepática de AMBP al torrente sanguíneo, mientras que el aumento de AMBP en exosomas de pacientes con ND observado en este trabajo podría estar relacionado con un aumento de la expresión de la misma en células tubulares como un mecanismo protector en contra de los procesos desencadenados por la enfermedad. Así, esta proteína detectada en exosomas estaría siendo liberada desde el riñón, bien como producto de una incorporación aleatoria de esta proteína a los exosomas, en mayor cantidad en pacientes debido a una mayor producción de la misma como respuesta al daño, o, al contrario, a través de una incorporación selectiva dando como resultado la eliminación de esta proteína con efectos protectores como consecuencia de los mecanismos por los

que cursa la enfermedad y con un efecto por tanto perjudicial en los pacientes. Sería necesario llevar a cabo nuevos ensayos, con un mayor número de pacientes y distintas pruebas en tejido (QPCR, IHQ, etc.) para poder confirmar las hipótesis aquí planteadas, pero creemos que es interesante destacar la modulación en la expresión de esta proteína en relación con el daño renal y el descubrimiento del aumento de sus niveles en exosomas de orina de pacientes con ND, ya que su estudio en profundidad podría llevarnos a un mejor entendimiento de la enfermedad así como a un tratamiento más efectivo.

La histona-lisina-N- metil transferasa 3 (MLL3) también conocida como proteína de leucemia mieloide/linfoide de linaje mixto, es una histona metiltransferasa capaz de metilar la lisina 4 de la histona H3, una diana específica en la activación transcripcional para la modulación epigenética [125]. MLL3 es el componente central del complejo MLL2/3 también conocido como ASCOM. Este complejo ASCOM es un coactivador de receptores nucleares implicado en la activación transcripcional [125-127]. En este estudio pudimos detectar MLL3 solamente en las muestras exosomales de los pacientes con ND (se pudo identificar en 4 de las 5 muestras), mientras que no fue posible identificarla en ninguna de las muestras control. Consideramos por tanto que esta proteína se encontraba aumentada en los exosomas de orina de pacientes y esta tendencia pudo ser confirmada por SRM. Además de MLL3, pudimos identificar en exosomas de orina otras proteínas con capacidad de regular la expresión génica como MLL1 y MLL4 (también identificadas únicamente en muestras de paciente). Estos hallazgos refuerzan la idea existente sobre el importante papel de los exosomas en la mediación de la comunicación intercelular [38-42, 44]. En estudios previos se ha podido secuenciar el gen de MLL3 en exosomas de distinto origen [128] pero esta es la primera vez que se identifica la proteína MLL3 en exosomas.

La relación de MLL3 con la ND ha sido previamente descrita en un estudio genético de células periféricas de sangre. Mediante el empleo de análisis por la metodología de microarrays pudieron ser detectados 50 genes funcionales responsables de la ND; de entre estos 50 genes, 14 destacaban por su fuerte sobre-expresión siendo el gen de MLL3 uno de ellos [129]. Por otro lado la sobreexpresión de la proteína MLL3 ha sido relacionada con procesos de adipogénesis y con la expresión del receptor de activado de proliferación de peroxisomas PPARg [126]. El tejido adiposo funciona como un órgano endocrino, secretando hormonas y citoquinas que pueden regular el metabolismo de otros tejidos. Así, los adipocitos tienen un importante papel en la regulación del balance energético y la adipogénesis se encuentra por tanto fuertemente ligada a enfermedades metabólicas como la diabetes [130]. Se sabe que PPARg juega un importante papel en la fisiopatología renal. Los agonistas de este receptor ejercen efectos protectores en contra de varias enfermedades renales, entre ellas la ND, daño renal por isquemia, nefropatía IgA, daños renales asociados a quimioterapia, riñón poliquístico y enfermedades renales asociadas con el envejecimiento. Se cree que los agonistas de PPARg son efectivos retrasando e incluso previniendo la progresión las enfermedades renales mentadas, especialmente de la ND en la que PPARg es considerado como una prometedora diana terapéutica [131]. Por otro lado, el cointegrador-2 de señal de activación transcripcional (ASC-2), es un coactivador transcripcional para múltiples factores entre los que se incluye PPARg y su actividad está asociada a la metilación de la lisina 4 de la histona H3, llevada a cabo por MLL3 o su homólogo MLL4 formando parte del complejo ASCOM. Existen evidencias por tanto de que la proteína MLL3 juega un importante papel en procesos de adipogénesis, aún cuando su papel específico sigue siendo una incógnita. Se ha sugerido que ASCOM-MLL3 y ASCOM-MLL4 probable-

mente tienen una función crucial aunque redundante para la adipogénesis dependiente de complejos PPAR γ [126].

El canal aniónico selectivo dependiente de voltaje 1 (VDAC 1) también conocida como porina 1, ha sido identificada con anterioridad en exosomas de orina y en exosomas secretados por células B [132]. En este estudio comparativo por nLC-MS/MS detectamos esta proteína únicamente en las muestras del grupo control y obtuvimos los mismos resultados cuando analizamos una nueva cohorte de muestras por SRM; en este caso sólo pudimos detectar un péptido proteotípico en las muestras control que no pudo ser detectado en las muestras patológicas. VDAC 1 es una proteína de la membrana externa mitocondrial, presente también en la membrana plasmática [133], que adopta una configuración abierta a potencial 0 o menor de cero y cerrada a potenciales en torno a los 30-40 mV; la conformación abierta presenta una débil selectividad aniónica mientras que la conformación cerrada es catión-selectiva [134, 135]. Esta proteína está presente en células cardíacas, hepáticas, renales y en células de músculo esquelético. La VDAC 1 presente en la membrana plasmática es una ferricianida reductasa NADH dependiente, con funciones que afectan a la regulación del crecimiento y la muerte celular, estando putativamente implicada en la regulación de la apoptosis a través de su actividad oxido-reductasa [136]. La VDAC 1 mitocondrial funciona como una puerta de control para la entrada y salida de metabolitos mitocondriales, controlando por tanto la comunicación cruzada entre la mitocondria y el resto de la célula. VDAC 1 también tiene un papel clave en la apoptosis por vía mitocondrial, ya que parece encontrarse en un punto en el que convergen diversas señales de muerte y supervivencia celular a través de su asociación con distintos ligandos y proteínas como gelsolina (también detectada en exosomas en este estudio), Bcl-xL, calcio y ROS [137]. Gelsolina y Bcl-xL son dos proteínas con actividad anti-apoptótica, capaces de prevenir cambios mitocondriales apoptóticos como la liberación del citocromo C. Ambas pueden ejercer dicha acción a través de su unión a VDAC 1 mediante el cierre del canal ya que en la literatura queda recogido que el bloqueo de la actividad VDAC 1 resulta en una inhibición de la apoptosis [138]. Por otra parte, la regulación de la expresión de VDAC 1 y VDAC 2 ha sido previamente descrita en relación con la ND. En un estudio realizado con ratas tratadas con estreptozotocina (STZ), se observó que la expresión de estas proteínas era mayor en los riñones de las ratas enfermas que en los de ratas sanas. La expresión alterada de estas proteínas, se asoció a cambios en la función del túbulo intersticial, en la estructura de los podocitos así como a la apoptosis mitocondrial implicada en el desarrollo de la ND [84]. Nuestros resultados, apoyados en los datos publicados para VDAC1 en relación con la ND y la apoptosis, sugieren que podría haber una mayor tasa de apoptosis en el riñón patológico que en el sano, hecho que se traduce en una eliminación de VDAC1 vía secreción exosomal regulada negativamente, es decir, eliminación menor en el riñón patológico. Así esta proteína solo estará siendo secretada en condiciones fisiológicas en las que la tasa de apoptosis es menor y por ello solo es posible detectarla en las muestras de individuos sanos.

3. ANÁLISIS PROTEOMICO DIFERENCIAL DEL TEJIDO RENAL EN ESTADIOS TEMPRANOS DE ND .

Esta aproximación proteómica permitió detectar las diferencias existentes entre el tejido renal sano y el tejido renal de ratas en un estadio temprano de ND, mediante un estudio general sin llevar a cabo una preselección de proteínas candidatas [64, 139].

Para ello se empleó un modelo animal basado en el uso de STZ como tóxico para la destrucción de las células β pancreáticas, impidiendo así la síntesis de insulina y por tanto generando diabetes mellitus de tipo I a estos animales. Las ratas STZ diabéticas han sido ampliamente empleadas como modelo para el estudio del daño en órganos humanos como consecuencia de la diabetes, ya que estos animales desarrollan diversos daños como por ejemplo ND de manera muy similar a como ocurre en humanos [140, 141]. Se sabe que el daño severo de los órganos comienza a partir de la octava semana desde que se tratan los animales con STZ [84], por lo que ese es el momento que se eligió para llevar a cabo el sacrificio, cuando el daño ha comenzado pero sin dejar que avance hasta estadios severos. Se optó por el estudio de un estadio temprano de la enfermedad ya que permitirá encontrar marcadores de enfermedad que aparezcan antes que la albuminuria. Nuestro objetivo además era intentar detectar los biomarcadores candidatos que derivasen de este análisis en fuentes más directas y fáciles de adquirir que el tejido renal, como son la orina y los exosomas de orina ya que podrán ser más útiles a la hora de llevar a cabo un diagnóstico clínico, prevenir un daño irreversible o elegir un tratamiento más adecuado para cada caso.

Este análisis diferencial del tejido renal, nos permitió encontrar un subgrupo de 27 proteínas con una expresión significativamente diferencial entre tejido renal sano y el patológico, 11 de estas proteínas pudieron ser identificadas. Entre estas proteínas seleccionamos un subgrupo de 4 proteínas para llevar a cabo un estudio en mayor profundidad. Se escogieron estas cuatro por distintos motivos, la regucalcina o SMP-30, por ser la que mostraba mayor variación entre grupos (-4,55), la I-cristalina o L-gulonato 3-dehidrogenasa y la Subunidad B de la ATPasa tipo V, las escogimos porque habían sido previamente identificadas en exosomas en nuestro estudio por LC-MS/MS y 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, mitocondrial (HIBADH) porque nunca había sido descrita en el contexto de la ND.

La tendencia a la variación observada en el estudio de DIGE pudo ser confirmada para todas ellas por WB y para 3 de ellas por inmunohistoquímica. Sólo la regucalcina mostró datos significativos en dicha validación, permitiendo confirmar la clara diferencia en la expresión de la misma y perfilándose como el candidato más potente para ser considerado un marcador de enfermedad temprana.

Se pudo observar que la expresión de la proteína marcadora de senescencia-30 (SMP-30) o regucalcina estaba muy disminuida en el riñón de las ratas con ND. Esta proteína es una molécula multifuncional implicada en la regulación de la homeostasis celular del Ca^{2+} , en la síntesis del ascorbato y en la regulación del estrés oxidativo [142, 143]. La regucalcina se expresa de manera constitutiva en hígado y riñón y su expresión disminuye con la edad de manera independiente al sexo [144]. Se ha observado que la regucalcina está implicada en la disfunción de las células β pancreáticas, que su ausencia genera una deficiencia en los mecanismos de secreción de insulina [145] y que contribuye a un empeoramiento de la tolerancia de la glucosa observada habitualmente con la edad [146]

Se ha visto también, en concordancia con nuestros datos, que un aumento en los niveles de glucosa provoca un descenso de los niveles de regucalcina en las células endoteliales [147]. Se sabe además, que las citoquinas implicadas en la ND tales como TNF α y TGF β 1, provocan una disminución de los niveles de ARNm de regucalcina en células tubulares en cultivo [148] y existen evidencias sobre el papel protector que desempeña la regucalcina ante el daño renal [149]. La sobreexpresión de esta proteína suprime la apoptosis, la transición epitelio-mesenquimal inducido por TNF α y TGF β 1 en células tubulares en cultivo. Es además capaz de inhibir la activación transcripcional de NF-Kappa beta inducida por la NO sintasa inducida por TNF [150]. Otros estudios proteómicos han identificado un descenso en la expresión de la regucalcina en muestras de tejido con daño nefrotóxico [151-154] y su ARNm ha sido previamente sugerido como marcador del mismo [151-154]. Sin embargo, no se había descrito hasta la fecha ninguna herramienta que permitiera monitorizar la regucalcina del riñón. Nosotros demostramos en la presente tesis doctoral que los exosomas aislados desde orina podrían ser dicha herramienta, ya que hemos conseguido identificar por primera vez la regucalcina en exosomas de orina. Pudimos detectar esta proteína con una expresión menor tanto en tejido renal como en exosomas de rata diabética al compararlas con las muestras de los animales sanos, generando por tanto un medio adecuado para monitorizar el estado del riñón a través de una muestra de fácil adquisición como son los exosomas. En cambio cuando se quiso detectar regucalcina en orina, ésta no pudo ser detectada ni en orina normal ni en la diabética (ni siquiera concentrando las muestras 30 veces) por WB.

La importancia de estos prometedores resultados en exosomas de rata, se vio reforzada al llevar a cabo el análisis de la presencia de regucalcina en exosomas humanos por WB, ya que pudimos detectar la regucalcina en exosomas de individuos sanos, mientras que no fue posible detectarla en exosomas de paciente. Aunque es necesario llevar a cabo más experimentos empleando distintas técnicas para confirmar estos resultados, el descubrimiento de la presencia de regucalcina en los exosomas de orina humana de individuos sanos y no de pacientes con ND, ofrece la posibilidad de monitorizar cambios biomoleculares de relevancia clínica atribuidos a dicha enfermedad, eventos que tienen lugar en el tejido renal y que son detectables sin necesidad de recurrir a técnicas invasivas como una biopsia. Este hallazgo podría suponer un gran paso en la medicina translacional desde la investigación básica a la clínica, facilitando la posibilidad de llevar a cabo un diagnóstico temprano

Entre las proteínas con expresión significativamente variada identificadas en este estudio encontramos la l-cristalina o L-gulonato 3-dehidrogenasa, cuya expresión se encontró aumentada en el tejido renal de ratas diabéticas. Esta enzima cataliza la reacción de dehidrogenación del L-gluconato a deshidro-L-gulonato en el ciclo del uronato, que funciona como ruta alternativa a la vía metabólica de la glucosa suponiendo alrededor de un 5% del catabolismo diario de la glucosa. Además la l-cristalina es una enzima importante en el control del flujo metabólico de la formación del ácido ascórbico o xilitol. La acumulación de xilitol y la excreción del mismo a través del riñón parece ser una característica común observada en tejido dañado asociado con diabetes así como la depleción de mioinositol en el tejido. La única vía para el catabolismo del miositol es la vía de la glucoronato-xilulosa, en la que la miositol oxigenasa (MIOX) cataliza su conversión a ácido D-glucurónico y en pasos posteriores a xilitol. Se cree que el xilitol induce una sobreexpresión de MIOX mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, explicando por tanto la depleción de miositol que ha podido ser observada en otros trabajos [155]. Todos estos datos son coherentes con el aumento de expresión de l-cristalina en riñones de rata con ND detectado en este trabajo, ya que este aumento de la l-cristalina puede contribuir a elevar los niveles de xilitol como consecuencia de la activación de MIOX y la depleción del mioinositol del

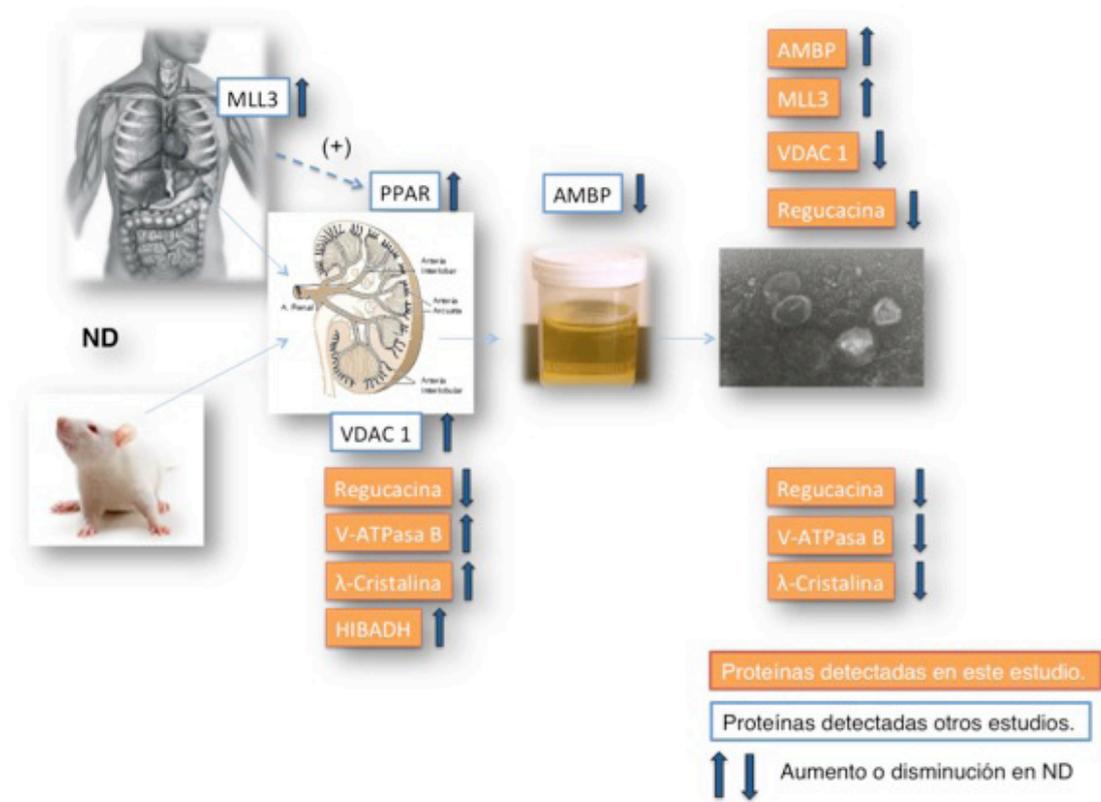
tejido. Es interesante comentar que en trabajos que se han llevado a cabo con anterioridad en nuestro laboratorio pudimos detectar bajos niveles de mioinositol excretado en orina de pacientes con enfermedad renal crónica al compararlos con los niveles presentados en orina de donantes sanos (datos en proceso de publicación). La presencia de I-cristalina en los exosomas de orina ha sido recientemente descrita [52]. En este trabajo, hemos detectado esta proteína en los exosomas de la orina con una tendencia opuesta a los observados en el tejido renal; la proteína I-cristalina estaba aumentada en los exosomas de los animales sanos.

De manera similar la subunidad B ATPasa tipo V (V-ATPasa B) que se encontró sobre expresada en tejido de ratas con ND, se detectó con mayor expresión en exosomas de ratas control. La V-ATPasa es una enzima altamente expresada en la membrana plasmática de células epiteliales del riñón y en las membranas de los orgánulos intracelular implicados en vías de secreción y de degradación [156]. Está implicada también en la regulación del pH extracelular mediante el transporte de protones a través de la membrana plasmática. Se sabe que mutaciones en genes que codifican isoformas específicas como la B1 o la A4 de la V-ATPasa en humanos, son responsables de la acidosis tubular renal hereditaria [157]. La acidosis metabólica es un trastorno frecuente en los pacientes diabéticos [158]. Un aumento de los niveles de esta proteína puede deberse a un mecanismo de compensación para tratar de reestablecer los niveles ácido-base normales. Otro importante papel de la V-ATPasa en la célula es el de la acidificación de los compartimentos intercelulares, este fenómeno es clave en los eventos de tráfico vesicular, reciclaje de la membrana plasmática y vías de degradación en las células. En este sentido, la V-ATPasa tiene una función vital en la vía endocítica y en la vía de degradación lisosomal en las células epiteliales del túbulo y probablemente en muchos otros tipos celulares [159, 160]. Nuestro estudio muestra la presencia de V-ATPasa en exosomas urinarios [52], y esta proteína podría jugar un papel relevante en los procesos exocíticos que llevan a la liberación del contenido exosomal al espacio extracelular.

La tendencia opuesta observada en los exosomas de orina, comparada con la tendencia observada en el tejido para I-cristalina y V-ATPasa, puede ser debida a una disminución de la exocitosis de estas proteínas como consecuencia del daño provocado por la patología. Este descenso en la exocitosis por vía exosomal de estas dos proteínas se traduce en un aumento de la presencia de las mismas en el tejido diabético, por otro lado lo que puede estar ocurriendo es que estas proteínas jueguen un papel activo en contra del daño tisular y que por tanto su eliminación por vía exosomal esté inhibida no como consecuencia directa de un mecanismo propio de la enfermedad sino como una respuesta fisiológica en contra de la misma.

Durante la invaginación de la membrana en los cuerpos multivesiculares (MVB), parte del citoplasma queda incorporado de manera aleatoria en el interior del exosoma. Hipotetizamos, que siendo mucho mayor la presencia de regucalcina en las células del riñón sano que en las del enfermo, la regucalcina se incorporará de manera inespecífica con mucha mayor frecuencia a los exosomas en células del riñón sano que del riñón diabético. En cambio en el caso de I-cristalina y V-ATPasa creemos que esta incorporación no tiene lugar de manera inespecífica sino que ocurre de manera selectiva pudiendo estar alterada la vía que lleva a su incorporación como consecuencia de mecanismos patológicos o como consecuencia de mecanismos protectores del tejido frente al daño tisular que está teniendo lugar en el riñón. Es importante destacar también que en el estudio comparativo libre de marcaje, llevado a cabo para comparar exosomas humanos de individuos sanos con pacientes de

ND, la I-cristalina y la V-ATPasa, sólo pudieron ser detectadas en muestras de individuos control, coincidiendo con los datos revelados por este estudio.



Conclusiones

1. En esta tesis doctoral se ha conseguido poner a punto por primera vez un protocolo que ha permitido llevar a cabo un estudio cualitativo y cuantitativo del proteoma exosomal obtenido a partir de orina de individuos sanos y de pacientes con nefropatía diabética con elevados niveles de proteinuria.
2. La depleción de albúmina co-precipitada con los exosomas ha permitido: A) la comparación no dirigida entre muestras sanas y patológicas y B) el aumento hasta en un 60% del número de proteínas detectadas por muestra.
3. Hemos identificado 352 nuevas proteínas en exosomas de orina cuya presencia en este tipo de muestras era desconocida hasta este momento. En particular, hemos identificado un panel de 41 proteínas exosomales que forman parte de mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y función de del sistema renal y urológico
4. El análisis cuantitativo libre de marcaje nos ha permitido establecer, un panel de 25 proteínas significativamente variadas en nefropatía diabética; este hallazgo supone el descubrimiento de un potencial panel de marcadores en una muestra de fácil acceso.
5. El descubrimiento y la validación de la variación en la expresión de: el precursor de α microglobulina/ bikunina (AMBP), la histona-lisina-N- metil transferasa 3 (MLL3) y el canal aniónico selectivo dependiente de voltaje 1 (VDAC1) es de gran interés para la traslación de la investigación básica aquí reocogida a la práctica clínica.
6. La identificación en exosomas de orina de MLL3, MLL1 y MLL4 como proteínas con capacidad de regular la expresión génica, refuerza la idea existente sobre el importante papel de los exosomas en la mediación de la comunicación intercelular.
7. Se ha identificado un panel de 11 proteínas diferencialmente expresadas en tejido renal sano y patológico en un modelo animal de nefropatía diabética en estadios tempranos.
8. La regucalcina es un potente marcador temprano de nefropatía diabética, cuya variación en tejido renal puede ser detectada en exosomas de orina gracias a las técnicas puestas a punto en esta tesis doctoral, abriendo una puerta a la detección temprana de la nefropatía diabética, en una muestra de fácil acceso.

Referencias

- [1] Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. *Understanding the nature of renal disease progression*. *Kidney international* 1997;51:2-15.
- [2] van Kooten C, Daha MR, van Es LA. *Tubular epithelial cells: A critical cell type in the regulation of renal inflammatory processes*. *Experimental nephrology* 1999;7:429-37.
- [3] Chavers BM, Bilous RW, Ellis EN, Steffes MW, Mauer SM. *Glomerular lesions and urinary albumin excretion in type I diabetes without overt proteinuria*. *The New England journal of medicine* 1989;320:966-70.
- [4] Fioretto P, Steffes MW, Mauer M. *Glomerular structure in nonproteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria*. *Diabetes* 1994;43:1358-64.
- [5] Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. *Regression of microalbuminuria in type I diabetes*. *The New England journal of medicine* 2003;348:2285-93.
- [6] Araki S, Haneda M, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Kashiwagi A, et al. *Factors associated with frequent remission of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes* 2005;54:2983-7.
- [7] Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. *Enhancing the predictive value of urinary albumin for diabetic nephropathy*. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006;17:339-52.
- [8] Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr. *Heine U*. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of microvesicles. *Biochimica et biophysica acta* 1981;645:63-70.
- [9] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. *Vesicle formation during reticulocyte maturation*. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry* 1987;262:9412-20.
- [10] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:13368-73.
- [11] Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugiere S, Tomaskovic-Crook E, et al. *Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice*. *Gut* 2003;52:1690-7.
- [12] van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, et al. *Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles*. *Gastroenterology* 2001;121:337-49.
- [13] Vrijksen KR, Sluijter JP, Schuchardt MW, van Balkom BW, Noort WA, Chamuleau SA, et al. *Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells*. *Journal of cellular and molecular medicine* 2010;14:1064-70.
- [14] Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, et al. *Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes*. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:10963-72.
- [15] Zhan R, Leng X, Liu X, Wang X, Gong J, Yan L, et al. *Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes*. *Biochemical and biophysical research communications* 2009;387:229-33.
- [16] Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, et al. *Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes*. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of cell biology* 1999;147:599-610.
- [17] Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LA, et al. *Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions*. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004;31:114-21.
- [18] Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. *Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma*. *International immunology* 2005;17:879-87.
- [19] Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, et al. *CD24 is a marker of exosomes secreted into*

Referencias

urine and amniotic fluid. *Kidney international* 2007;72:1095-102.

- [20] Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, et al. *Proteomic analysis of human prostates*. *The Prostate* 2003;56:150-61.
- [21] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. *Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication*. *Kidney international* 2010;78:838-48.
- [22] McConnell RE, Higginbotham JN, Shifrin DA, Jr., *Tabb DL, Coffey RJ, Tyska MJ*. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *The Journal of cell biology* 2009;185:1285-98.
- [23] Hara M, Yanagihara T, Hirayama Y, Ogasawara S, Kurosawa H, Sekine S, et al. *Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli*. *Human pathology* 2010;41:1265-75.
- [24] van Balkom BW, Pisitkun T, Verhaar MC, Knepper MA. *Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases*. *Kidney international* 2011;80:1138-45.
- [25] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. *Journal of proteomics* 2010;73:1907-20.
- [26] Conner SD, Schmid SL. *Regulated portals of entry into the cell*. *Nature* 2003;422:37-44.
- [27] Maxfield FR, McGraw TE. *Endocytic recycling*. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004;5:121-32.
- [28] Ganley IG, Espinosa E, Pfeffer SR. *A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells*. *The Journal of cell biology* 2008;180:159-72.
- [29] van der Goot FG, Gruenberg J. *Intra-endosomal membrane traffic*. *Trends in cell biology* 2006;16:514-21.
- [30] Piper RC, Katzmann DJ. *Biogenesis and function of multivesicular bodies*. *Annual review of cell and developmental biology* 2007;23:519-47.
- [31] Woodman PG, Futter CE. *Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity*. *Current opinion in cell biology* 2008;20:408-14.
- [32] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. *Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes*. *Science* 2008;319:1244-7.
- [33] Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. *The biogenesis and functions of exosomes*. *Traffic* 2002;3:321-30.
- [34] Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. *Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes*. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:20121-7.
- [35] Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, et al. *Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization*. *The Biochemical journal* 2004;380:161-71.
- [36] Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, et al. *Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line*. *PLoS one* 2010;5:e13247.
- [37] Mears R, Craven RA, Hanrahan S, Totty N, Upton C, Young SL, et al. *Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry*. *Proteomics* 2004;4:4019-31.
- [38] Nolte-t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MH. *Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1*. *Blood* 2009;113:1977-81.
- [39] Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. *Exosome: from internal vesicle of the*

- multivesicular body to intercellular signaling device*. Journal of cell science 2000;113 Pt 19:3365-74.
- [40] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nature cell biology 2007;9:654-9.
- [41] Fevrier B, Raposo G. *Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages*. Current opinion in cell biology 2004;16:415-21.
- [42] Smalheiser NR. *Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system*. Biology direct 2007;2:35.
- [43] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential*. Expert review of proteomics 2009;6:267-83.
- [44] Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD, Hallett MB. *Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2004;18:977-9.
- [45] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nature cell biology 2008;10:1470-6.
- [46] Fernandez-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. *Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation*. Kidney international 2010;77:736-42.
- [47] Sabolic I, Valenti G, Verbavatz JM, Van Hoek AN, Verkman AS, Ausiello DA, et al. *Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney*. The American journal of physiology 1992;263:C1225-33.
- [48] Wright PA, Burg MB, Knepper MA. *Microdissection of kidney tubule segments*. Methods in enzymology 1990;191:226-31.
- [49] Wright PA, Packer RK, Garcia-Perez A, Knepper MA. *Time course of renal glutamate dehydrogenase induction during NH4Cl loading in rats*. The American journal of physiology 1992;262:F999-1006.
- [50] Wolf MT, Beck BB, Zaucke F, Kunze A, Misselwitz J, Ruley J, et al. *The Uromodulin C744G mutation causes MCKD2 and FJHN in children and adults and may be due to a possible founder effect*. Kidney international 2007;71:574-81.
- [51] Bachmann S, Mutig K, Bates J, Welker P, Geist B, Gross V, et al. *Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice*. American journal of physiology Renal physiology 2005;288:F559-67.
- [52] Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, et al. *Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2009;20:363-79.
- [53] Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. *Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension*. Hypertension 2002;39:316-22.
- [54] Twyman RM. *Principles of Proteomics*. (2004).
- [55] Twyman RM. *Principles of Proteomics*. 2004.
- [56] Karas M, Hillenkamp F. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Analytical chemistry 1988;60:2299-301.
- [57] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 1989;246:64-71.
- [58] Domon B, Aebersold R. *Mass spectrometry and protein analysis*. Science 2006;312:212-7.
- [59] Zhu W, Smith JW, Huang CM. *Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics*. Journal of

Referencias

biomedicine & biotechnology 2010;2010:840518.

[60] Roelofsen H, Dijkstra M, Weening D, de Vries MP, Hoek A, Vonk RJ. *Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates (CILAIR) provides a quantitative method to study tissue secretomes*. Molecular & cellular proteomics : MCP 2009;8:316-24.

[61] de la Cuesta F, Barderas MG, Calvo E, Zubiri I, Maroto AS, Darde VM, et al. *Secretome analysis of atherosclerotic and non-atherosclerotic arteries reveals dynamic extracellular remodeling during pathogenesis*. Journal of proteomics 2012;75:2960-71.

[62] Wilm M. *Quantitative proteomics in biological research*. Proteomics 2009;9:4590-605.

[63] Pan S, Aebersold R, Chen R, Rush J, Goodlett DR, McIntosh MW, et al. *Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications*. Journal of proteome research 2009;8:787-97.

[64] Thongboonkerd V. *Study of diabetic nephropathy in the proteomic era*. Contributions to nephrology 2011;170:172-83.

[65] Mullen W, Delles C, Mischak H. *Urinary proteomics in the assessment of chronic kidney disease*. Current opinion in nephrology and hypertension 2011;20:654-61.

[66] Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argiles A, Jankowski V, Girolami MA, et al. *Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2007;18:1057-71.

[67] Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands JL, Schanstra JP, Coon JJ, et al. *Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future*. Journal of proteome research 2007;6:4549-55.

[68] Fan Q, Du S, Yang G, Wang L, Jiang Y. *Protein expression profile of human renal mesangial cells under high glucose*. American journal of nephrology 2011;34:18-25.

[69] Ramachandra Rao SP, Wassell R, Shaw MA, Sharma K. *Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role for calmodulin in glucose uptake*. American journal of physiology Renal physiology 2007;292:F1182-9.

[70] Li Z, Zhang H, Dong X, Burczynski FJ, Choy P, Yang F, et al. *Proteomic profile of primary isolated rat mesangial cells in high-glucose culture condition and decreased expression of PSMA6 in renal cortex of diabetic rats*. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire 2010;88:635-48.

[71] Million R, Puricelli L, Iori E, Trevisan R, Tessari P. *Skin fibroblasts as a tool for identifying the risk of nephropathy in the type 1 diabetic population*. Diabetes/metabolism research and reviews 2012;28:62-70.

[72] Kim HJ, Cho EH, Yoo JH, Kim PK, Shin JS, Kim MR, et al. *Proteome analysis of serum from type 2 diabetics with nephropathy*. Journal of proteome research 2007;6:735-43.

[73] Cho WC, Yip TT, Chung WS, Leung AW, Cheng CH, Yue KK. *Differential expression of proteins in kidney, eye, aorta, and serum of diabetic and non-diabetic rats*. Journal of cellular biochemistry 2006;99:256-68.

[74] Overgaard AJ, Hansen HG, Lajer M, Pedersen L, Tarnow L, Rossing P, et al. *Plasma proteome analysis of patients with type 1 diabetes with diabetic nephropathy*. Proteome science 2010;8:4.

[75] Thongboonkerd V, Barati MT, McLeish KR, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zheng S, et al. *Alterations in the renal elastin-elastase system in type 1 diabetic nephropathy identified by proteomic analysis*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2004;15:650-62.

[76] Thongboonkerd V, Zheng S, McLeish KR, Epstein PN, Klein JB. *Proteomic identification and immunolocalization of increased renal calbindin-D28k expression in OVE26 diabetic mice*. The review of diabetic studies : RDS 2005;2:19-26.

[77] V BM, McLeish KR, Rovin BH, Pierce WM, Epstein PN, Klein JB. *Altered elastase inhibitor and elastin*

- expression in type 2 diabetic kidneys defined by proteomic analysis.* analysis J Am Soc Nephrol 2003;14:600A.
- [78] Tilton RG, Haidacher SJ, Lejeune WS, Zhang X, Zhao Y, Kurosky A, et al. *Diabetes-induced changes in the renal cortical proteome assessed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.* Proteomics 2007;7:1729-42.
- [79] Satoskar AA, Shapiro JP, Bott CN, Song H, Nadasdy GM, Brodsky SV, et al. *Characterization of glomerular diseases using proteomic analysis of laser capture microdissected glomeruli.* Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 2012;25:709-21.
- [80] Blutke A, Block C, Berendt F, Herbach N, Kemter E, Amann K, et al. *Differential glomerular proteome analysis of two murine nephropathy models at onset of albuminuria.* Proteomics Clinical applications 2011;5:375-81.
- [81] Fugmann T, Borgia B, Revesz C, Godo M, Forsblom C, Hamar P, et al. *Proteomic identification of vanin-1 as a marker of kidney damage in a rat model of type 1 diabetic nephropathy.* Kidney international 2011;80:272-81.
- [82] Chougale AD, Bhat SP, Bhujbal SV, Zambare MR, Puntambekar S, Somani RS, et al. *Proteomic analysis of glycosylated proteins from streptozotocin-induced diabetic rat kidney.* Molecular biotechnology 2012;50:28-38.
- [83] Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szweda LI, et al. *Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation.* American journal of physiology Renal physiology 2005;289:F420-30.
- [84] Gong D, Chen X, Middleditch M, Huang L, Vazhoor Amarsingh G, Reddy S, et al. *Quantitative proteomic profiling identifies new renal targets of copper(II)-selective chelation in the reversal of diabetic nephropathy in rats.* Proteomics 2009;9:4309-20.
- [85] Fan QL, Yang G, Liu XD, Ma JF, Feng JM, Jiang Y, et al. *Effect of losartan on the glomerular protein expression profile of type 2 diabetic KKAY mice.* Journal of nephrology 2012;0.
- [86] Sharma K, Lee S, Han S, Lee S, Francos B, McCue P, et al. *Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of the urine proteome in human diabetic nephropathy.* Proteomics 2005;5:2648-55.
- [87] Rao PV, Lu X, Standley M, Pattee P, Neelima G, Girishes G, et al. *Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy.* Diabetes care 2007;30:629-37.
- [88] Jin J, Ku YH, Kim Y, Kim Y, Kim K, Lee JY, et al. *Differential proteome profiling using iTRAQ in microalbuminuric and normoalbuminuric type 2 diabetic patients.* Experimental diabetes research 2012;2012:168602.
- [89] Thongboonkerd V, Songtawe N, Sritippayawan S. *Urinary proteome profiling using microfluidic technology on a chip.* Journal of proteome research 2007;6:2011-8.
- [90] Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS, et al. *Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease.* Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2007;18:913-22.
- [91] Dihazi H, Muller GA, Lindner S, Meyer M, Asif AR, Oellerich M, et al. *Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients.* Clinical chemistry 2007;53:1636-45.
- [92] Papale M, Di Paolo S, Magistrini R, Lamacchia O, Di Palma AM, De Mattia A, et al. *Urine proteome analysis may allow noninvasive differential diagnosis of diabetic nephropathy.* Diabetes care 2010;33:2409-15.
- [93] Schlatzer DM, Dazard JE, Dharsee M, Ewing RM, Ilchenko S, Stewart I, et al. *Urinary protein profiles in a rat model for diabetic complications.* Molecular & cellular proteomics : MCP 2009;8:2145-58.
- [94] Zurbig P, Jerums G, Hovind P, Macisaac RJ, Mischak H, Nielsen SE, et al. *Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy.* Diabetes 2012;61:3304-13.

Referencias

- [95] Merchant ML, Perkins BA, Boratyn GM, Ficociello LH, Wilkey DW, Barati MT, et al. *Urinary peptidome may predict renal function decline in type 1 diabetes and microalbuminuria*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2009;20:2065-74.
- [96] Otu HH, Can H, Spentzos D, Nelson RG, Hanson RL, Looker HC, et al. *Prediction of diabetic nephropathy using urine proteomic profiling 10 years prior to development of nephropathy*. Diabetes care 2007;30:638-43.
- [97] Gonzales PA, Zhou H, Pisitkun T, Wang NS, Star RA, Knepper MA, et al. *Isolation and purification of exosomes in urine*. Methods Mol Biol 2010;641:89-99.
- [98] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, et al. *Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator*. American journal of physiology Renal physiology 2007;292:F1657-61.
- [99] Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, Distefano JK. *Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers*. Kidney international 2012.
- [100] Rood IM, Deegens JK, Merchant ML, Tamboer WP, Wilkey DW, Wetzels JF, et al. *Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome*. Kidney international 2010;78:810-6.
- [101] Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, et al. *Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery*. Kidney international 2006;69:1471-6.
- [102] Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H, et al. *Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury*. Kidney international 2006;70:1847-57.
- [103] Moon PG, Lee JE, You S, Kim TK, Cho JH, Kim IS, et al. *Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy*. Proteomics 2011;11:2459-75.
- [104] Arscott WT, Camphausen KA. *Analysis of urinary exosomes to identify new markers of non-small-cell lung cancer*. Biomarkers in medicine 2011;5:822.
- [105] Jansen FH, Krijgsveld J, van Rijswijk A, van den Bemd GJ, van den Berg MS, van Weerden WM, et al. *Exosomal secretion of cytoplasmic prostate cancer xenograft-derived proteins*. Molecular & cellular proteomics : MCP 2009;8:1192-205.
- [106] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, et al. *Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer*. British journal of cancer 2009;100:1603-7.
- [107] Welton JL, Khanna S, Giles PJ, Brennan P, Brewis IA, Staffurth J, et al. *Proteomics analysis of bladder cancer exosomes*. Molecular & cellular proteomics : MCP 2010;9:1324-38.
- [108] Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. *The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins*. Genome biology 2006;7:R80.
- [109] Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, et al. *Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2009;20:278-88.
- [110] Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E, Berisa A, Gil D, Embade N, et al. *Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples*. Proteomics Clinical applications 2010;4:416-25.
- [111] Esteva-Font C, Wang X, Ars E, Guillen-Gomez E, Sans L, Gonzalez Saavedra I, et al. *Are Sodium Transporters in Urinary Exosomes Reliable Markers of Tubular Sodium Reabsorption in Hypertensive Patients?* Nephron Physiology 2010;114:p25-p34.

- [112] Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ihalmo P, Lassila M, Holthofer H, Mezzano S, et al. *The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2009;20:353-62.
- [113] JE J. *A User's guide to principal components*. Wiley 1991.
- [114] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. Analytical chemistry 1996;68:850-8.
- [115] Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis 1999;20:3551-67.
- [116] MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. *Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments*. Bioinformatics 2010;26:966-8.
- [117] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nature reviews Immunology 2002;2:569-79.
- [118] Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. *Pathologic classification of diabetic nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2010;21:556-63.
- [119] Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. Molecular systems biology 2008;4:222.
- [120] Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB. *Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation*. Kidney international 2002;62:1461-9.
- [121] Falguieres T, Luyet PP, Bissig C, Scott CC, Velluz MC, Gruenberg J. *In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101*. Molecular biology of the cell 2008;19:4942-55.
- [122] Grewal JS, Tsai JY, Khan SR. *Oxalate-inducible AMBP gene and its regulatory mechanism in renal tubular epithelial cells*. The Biochemical journal 2005;387:609-16.
- [123] Riaz S, Skinner V, Srani SK. *Effect of high dose thiamine on the levels of urinary protein biomarkers in diabetes mellitus type 2*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 2011;54:817-25.
- [124] Shah KG, Rajan D, Jacob A, Wu R, Krishnasastri K, Nicastro J, et al. *Attenuation of renal ischemia and reperfusion injury by human adrenomedullin and its binding protein*. The Journal of surgical research 2010;163:110-7.
- [125] Cho YW, Hong T, Hong S, Guo H, Yu H, Kim D, et al. *PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex*. The Journal of biological chemistry 2007;282:20395-406.
- [126] Lee J, Saha PK, Yang QH, Lee S, Park JY, Suh Y, et al. *Targeted inactivation of MLL3 histone H3-Lys-4 methyltransferase activity in the mouse reveals vital roles for MLL3 in adipogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105:19229-34.
- [127] Nakajima D, Okazaki N, Yamakawa H, Kikuno R, Ohara O, Nagase T. *Construction of expression-ready cDNA clones for KIAA genes: manual curation of 330 KIAA cDNA clones*. DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes 2002;9:99-106.
- [128] Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. *Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma*. Nature genetics 2012;44:690-3.
- [129] Guttula SV, Rao AA, Sridhar GR, Chakravarthy MS, Nageshwararo K, Rao PV. *Cluster analysis and phylogenetic relationship in biomarker identification of type 2 diabetes and nephropathy*. International journal of diabetes in developing countries 2010;30:52-6.
- [130] Camp HS, Ren D, Leff T. *Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes*. Trends in molecular medicine 2002;8:442-7.
- [131] Yang J, Zhou Y, Guan Y. *PPARgamma as a therapeutic target in diabetic nephropathy and other renal*

Referencias

diseases. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2012;21:97-105.

[132] Buschow SI, van Balkom BW, Aalberts M, Heck AJ, Wauben M, Stoorvogel W. *MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis*. *Immunology and cell biology* 2010;88:851-6.

[133] Yu WH, Wolfgang W, Forte M. *Subcellular localization of human voltage-dependent anion channel isoforms*. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:13998-4006.

[134] Thinnies FP, Walter G, Hellmann KP, Hellmann T, Merker R, Kiafard Z, et al. *Gadolinium as an opener of the outwardly rectifying Cl(-) channel (ORCC)*. Is there relevance for cystic fibrosis therapy? *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2001;443 Suppl 1:S111-6.

[135] Hiller S, Garces RG, Malia TJ, Orekhov VY, Colombini M, Wagner G. *Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles*. *Science* 2008;321:1206-10.

[136] Lawen A, Ly JD, Lane DJ, Zarschler K, Messina A, De Pinto V. *Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1)--a mitochondrial protein, rediscovered as a novel enzyme in the plasma membrane*. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005;37:277-82.

[137] Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death*. *Molecular aspects of medicine* 2010;31:227-85.

[138] Kusano H, Shimizu S, Koya RC, Fujita H, Kamada S, Kuzumaki N, et al. *Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC*. *Oncogene* 2000;19:4807-14.

[139] Merchant ML, Klein JB. *Proteomic discovery of diabetic nephropathy biomarkers*. *Advances in chronic kidney disease* 2010;17:480-6.

[140] Sharma K, Han, D. C., Mogyrosi, A., Ziyadeh, F. N. *Structural and functional consequences of streptozotocin-induced diabetes on the kidney*. *Experimental Models of Diabetes* 1999;pp. 39-62.

[141] Liu D, Razzaque MS, Cheng M, Taguchi T. *The renal expression of heat shock protein 47 and collagens in acute and chronic experimental diabetes in rats*. *The Histochemical journal* 2001;33:621-8.

[142] Scott SH, Bahnson BJ. *Senescence Marker Protein 30: Functional and Structural Insights to its Unknown Physiological Function*. *Biomolecular concepts* 2011;2:469-80.

[143] Yamaguchi M. *The transcriptional regulation of regucalcin gene expression*. *Molecular and cellular biochemistry* 2011;346:147-71.

[144] Fujita T, Shirasawa T, Uchida K, Maruyama N. *Gene regulation of senescence marker protein-30 (SMP30): coordinated up-regulation with tissue maturation and gradual down-regulation with aging*. *Mechanisms of ageing and development* 1996;87:219-29.

[145] Senmaru T, Yamazaki M, Okada H, Asano M, Fukui M, Nakamura N, et al. *Pancreatic insulin release in vitamin C-deficient senescence marker protein-30/gluconolactonase knockout mice*. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2012;50:114-8.

[146] Hasegawa G, Yamasaki M, Kadono M, Tanaka M, Asano M, Senmaru T, et al. *Senescence marker protein-30/gluconolactonase deletion worsens glucose tolerance through impairment of acute insulin secretion*. *Endocrinology* 2010;151:529-36.

[147] Matsui-Hirai H, Hayashi T, Yamamoto S, Ina K, Maeda M, Kotani H, et al. *Dose-dependent modulatory effects of insulin on glucose-induced endothelial senescence in vitro and in vivo: a relationship between telomeres and nitric oxide*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2011;337:591-9.

[148] Nakagawa T, Yamaguchi M. *Nuclear localization of regucalcin is enhanced in culture with protein kinase C activation in cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells*. *International journal of molecular medicine* 2008;21:605-10.

- [149] Yumura W, Imasawa T, Suganuma S, Ishigami A, Handa S, Kubo S, et al. *Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice*. *Histology and histopathology* 2006;21:1151-6.
- [150] Nakagawa T, Yamaguchi M. *Overexpression of regucalcin enhances its nuclear localization and suppresses L-type Ca²⁺ channel and calcium-sensing receptor mRNA expressions in cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells*. *Journal of cellular biochemistry* 2006;99:1064-77.
- [151] Chiusolo A, Defazio R, Casartelli A, Bocchini N, Mongillo M, Zanetti E, et al. *Regucalcin down-regulation in rat kidney tissue after treatment with nephrotoxicants*. *Toxicology letters* 2008;182:84-90.
- [152] Arbillaga L, Vettorazzi A, Gil AG, van Delft JH, Garcia-Jalon JA, Lopez de Cerain A. *Gene expression changes induced by ochratoxin A in renal and hepatic tissues of male F344 rat after oral repeated administration*. *Toxicology and applied pharmacology* 2008;230:197-207.
- [153] Misawa H, Yamaguchi M. *Involvement of nuclear factor-1 (NF1) binding motif in the regucalcin gene expression of rat kidney cortex: the expression is suppressed by cisplatin administration*. *Molecular and cellular biochemistry* 2001;219:29-37.
- [154] Kurota H, Yamaguchi M. *Suppressed expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in the renal cortex of rats with chemically induced kidney damage*. *Molecular and cellular biochemistry* 1995;151:55-60.
- [155] Prabhu KS, Arner RJ, Vunta H, Reddy CC. *Up-regulation of human myo-inositol oxygenase by hyperosmotic stress in renal proximal tubular epithelial cells*. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:19895-901.
- [156] Brown D, Paunescu TG, Breton S, Marshansky V. *Regulation of the V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid-base homeostasis and vesicle trafficking*. *The Journal of experimental biology* 2009;212:1762-72.
- [157] Beyenbach KW, Wieczorek H. *The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation*. *The Journal of experimental biology* 2006;209:577-89.
- [158] Caravaca F, Arrobas M, Pizarro JL, Esparrago JF. *Metabolic acidosis in advanced renal failure: differences between diabetic and nondiabetic patients*. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1999;33:892-8.
- [159] Marshansky V, Ausiello DA, Brown D. *Physiological importance of endosomal acidification: potential role in proximal tubulopathies*. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2002;11:527-37.
- [160] Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada GH, Bourgoin S, et al. *V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway*. *Nature cell biology* 2006;8:124-36.

