

**ESTUDI DELS PATRONS DE PROLIFERACIÓ LIMFOCITÀRIA, NIVELLS D'INTERLEUQUINES CIRCULANTS I VIES DE SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR PODOCITÀRIA EN MALALTS AMB SÍNDROME NEFRÒTICA IDIOPÀTICA EN RELACIÓ AMB LA RESPOSTA AL TRACTAMENT I AL PRONÒSTIC**

Autor: Neus Roca Saladrigues

Director: Alfons Segarra Medrano

Tutor: Joan Bertrán Comulada

Línia d'investigació: Nefrologia.

Programa doctorat: Ciències Experimentals i Tecnologies.

Universitat de Vic-Universitat Central de Catalunya (UVic-UCC).

Novembre 2020.

## INDEX

<b>ABREVIATURES</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	2
<b>2. MARC TEÒRIC</b> .....	5
<b>2.1. Definició i epidemiologia</b> .....	5
<b>2.2. Classificació</b> .....	6
<b>2.3. Patogènia</b> .....	10
<b>2.4. Presentació clínica</b> .....	14
<b>2.5. Tractament</b> .....	16
<b>2.6. Pronòstic</b> .....	18
<b>2.7. Biomarcadors en estudi</b> .....	18
<b>2.8. Paper de la lesió endotelial en la SNI</b> .....	26
<b>2.9. Resposta inflamatòria en la SNI</b> .....	27
<b>3. HIPÒTESI</b> .....	29
<b>4. OBJECTIUS</b> .....	31
<b>4.1. Primer objectiu</b> .....	31
<b>4.1. Segon objectiu</b> .....	31
<b>4.1. Tercer objectiu</b> .....	32
<b>4.1. Quart objectiu</b> .....	32
<b>5. MÈTODES</b> .....	33

<b>5.1. Mètodes estudi 1</b> .....	33
<b>5.1.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi</b> .....	33
<b>5.1.2. Determinacions bioquímiques</b> .....	34
<b>5.1.3. Estudi anatomopatològic</b> .....	35
<b>5.1.4. Anàlisi estadístic</b> .....	35
<b>5.2. Mètodes estudi 2</b> .....	36
<b>5.2.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi</b> .....	36
<b>5.2.2. Determinacions bioquímiques</b> .....	37
<b>5.2.3. Estudi anatomopatològic</b> .....	37
<b>5.2.4. Anàlisi estadístic</b> .....	37
<b>5.3. Mètodes estudi 3</b> .....	38
<b>5.3.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi</b> .....	38
<b>5.3.2. Determinacions bioquímiques</b> .....	39
<b>5.3.3. Estudi anatomopatològic</b> .....	40
<b>5.3.4. Anàlisi estadístic</b> .....	40
<b>5.4. Mètodes estudi 4</b> .....	41
<b>5.4.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi</b> .....	41
<b>5.4.2. Determinacions bioquímiques</b> .....	42
<b>5.4.3. Estudi anatomopatològic</b> .....	43

5.4.4. Anàlisi estadístic .....	43
<b>6. RESULTATS .....</b>	<b>45</b>
6.1. Estudi 1 .....	45
6.1.1. Característiques de la població estudiada .....	45
6.1.2. Relació entre les variables demogràfiques, clíniques i bioquímiques .....	47
6.2. Estudi 2 .....	50
6.2.1. Característiques de la població estudiada .....	50
6.2.2. Variables associades a la resposta de corticosteroides en pacients amb NCM i GFS .....	55
6.3. Estudi 3 .....	58
6.3.1. Diagrama de flux per a la selecció dels pacients .....	58
6.3.2. Característiques clíniques i bioquímiques dels pacients ..	59
6.3.3. Anàlisi de components principals (PCA) .....	60
6.3.4. Anàlisi per clúster .....	62
6.3.5. Variables associades a la resposta amb corticoides .....	63
6.4. Estudi 4 .....	67
6.4.1. Selecció i característiques clíniques, bioquímiques i histològiques dels pacients .....	67
6.4.2. Variables associades a la resposta als corticoides .....	70
6.4.3. Variables associades a la resposta als corticoides .....	72
6.4.4. Re-biòpsies .....	73

<b>7. DISCUSSIÓ</b> .....	75
<b>7.1. Estudi 1</b> .....	75
<b>7.1.1. Limitacions de l'estudi</b> .....	77
<b>7.2. Estudi 2</b> .....	78
<b>7.2.1 Limitacions de l'estudi</b> .....	81
<b>7.3. Estudi 3</b> .....	81
<b>7.3.1. Limitacions de l'estudi</b> .....	84
<b>7.4. Estudi 4</b> .....	85
<b>7.4.1. Limitacions de l'estudi</b> .....	87
<b>8. CONCLUSIONS</b> .....	89
<b>8.1. Conclusions objectiu 1</b> .....	89
<b>8.2. Conclusions objectiu 2</b> .....	89
<b>8.3. Conclusions objectiu 3</b> .....	90
<b>8.4. Conclusions objectiu 4</b> .....	90
<b>8.5. Conclusions finals</b> .....	91
<b>9. AGRAÏMENTS</b> .....	92
<b>10. REFERÈNCIES</b> .....	93
<b>11. ANNEX</b> .....	106

## **ABREVIATURES**

AUC: àrea sota la corba

FvW: factor de Von Willebrand

GFS: Glomerulosclerosi focal i segmentària

Hgl: Haptoglobina

Hx: Hemopexina

NCM: Nefropatia per canvis mínims

NM: Nefropatia membranosa

OR: Odds ratio

PCR: proteïna C reactiva

SN: Síndrome nefròtica

SNI: Síndrome nefròtica idiopàtica

suPAR: receptor soluble de la urokinasa

TFG: taxa de filtrat glomerular

Tregs: cèl·lules T reguladores

VCAM-1: molécula de citoadhesió vascular-1

## 1. INTRODUCCIÓ

La Síndrome nefròtica és la principal forma de presentació de lesió glomerular. És una síndrome heterogènia, que engloba múltiples etiologies. La forma més freqüent durant l'edat pediàtrica és Síndrome nefròtica idiopàtica (SNI) amb el patró histològic de nefropatia per canvis mínims (NCM) (Eddy et.al. 2003). Altres formes de presentació histològica prevalents són la glomeruloesclerosi focal i segmentaria (GFS) i la nefropatia membranosa (NM). En la població adulta la forma més freqüent és la secundària per nefropatia diabètica, però dintre de les formes primàries la nefropatia membranosa és la forma histològica predominant (Hull R.P. et.al. 2008).

La patogènia de la SNI és encara desconeguda. Varies línies d'investigació han evidenciat la potencial implicació del sistema immunitari (Kaneko K. et.al. 2009), l'associació de la SNI amb l'atòpia, les infeccions, les vacunacions i els processos limfoproliferatius (Takahashi et.al. 2007) així com la resposta al tractament amb corticoides, immunosupressors i immunomoduladors, són arguments sòlids que ho ratifiquen. Així mateix, varis models experimentals han evidenciat l'activació de cèl·lules T amb diferents fenotips de polarització de la resposta (Th1, Th2, Th17/Treg), de cèl·lules B i de components de la immunitat innata en aquests pacients (Garin EH. 2000; Colucci M. et. al. 2018). Tot i l'extensa investigació realitzada en aquest camp però, el mecanisme de desregulació immunològica exacte que condueix a l'alteració de la barrera de filtració glomerular i en conseqüència a la síndrome nefròtica és desconegut fins el moment.

La resposta als corticoides s'ha definit com el principal indicador pronòstic a llarg termini, independentment del patró histològic subjacent, en totes les edats (Nakayama M.et.al.2003; Ruth E.M. et.al. 2005). Els pacients corticoresistents tenen un pitjor pronòstic, i la meitat d'aquests desenvoluparan insuficiència renal crònica terminal. Tot i que la corticoresistència s'associa més a GFS (Maas R.J.et.al. 2016), no és exclusiva

d'aquesta entitat i també pot observar-se en pacients amb NCM en el debut o al llarg de la seva evolució. En l'actualitat, per definir el tipus de patró histològic subjacent cal realitzar una biòpsia renal, que es practica de forma sistemàtica en els adults en el diagnòstic i en els nens en aquells que presenten una presentació atípica o una mala resposta a la corticoteràpia. En els darrers anys, s'han realitzat varis estudis enfocats a la recerca de biomarcadors no invasius en la SNI que permetin caracteritzar des de l'inici el patró histològic subjacent i així poder classificar als pacients i oferir tractaments més dirigits en cada cas (Stone H.et.al. 2019, Segarra A. et.al. 2012). En l'actualitat, però, no disposem de cap biomarcador validat pel seu ús en la pràctica clínica diària.

L'objectiu del nostre projecte es aprofundir en l'estudi de potencials biomarcadors de mostres de sèrum i teixit renal de pacients pediàtrics i adults amb SNI secundària a NCM, GFS i/o NM, i correlacionar-los amb el subtipus histològic, variables clíniques i de resposta al tractament.

La present tesi doctoral aporta noves dades a la literatura prèvia sobre potencials biomarcadors que poden tenir un paper rellevant en la caracterització inicial de la SNI i al seu pronòstic. Per poder respondre a la hipòtesis i als objectius plantejats, s'han realitzat quatre estudis: tres estudis transversals i un de cohorts retrospectiu, durant el període de durada de la tesi.

Els estudis inclosos en aquesta tesi pertanyen a una mateixa línia de recerca. El primer estudi ha estat publicat en una revista de divulgació científica de reconegut prestigi internacional:

**Relationship between soluble urokinase-type plasminogen activator receptor and serum biomarkers of endothelial activation in patients with idiopathic nephrotic syndrome**



N. Roca, Jatem E, Martin ML, Muñoz M, Molina M, Martinez C, Segarra A  
Clinical Kidney Journal, 2020 Jan. DOI: <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz173>

El segon estudi ha estat acceptat per a la seva publicació en breu en una revista de divulgació científica de reconegut prestigi internacional:

**Activation of the acute inflammatory phase response of Idiopathic Nephrotic Syndrome: association with clinicopathological phenotypes and with response to corticosteroids**

Roca N, Martinez C, Jatem E, Madrid A, Lopez M, Segarra A.  
Clinical Kidney Journal, acceptat i pendent de publicar.

Dels altres dos estudis també s'han elaborat dos articles que estan pendents de valoració per a la seva publicació.

Els premis i beques del treball d'investigació obtinguts són els següents:

1. Premi "José Simón González" a la millor comunicació oral presentada en el XLIII Congrés de la Asociación Española de Nefrología Pediátrica. Valencia, 19 de Maig de 2018.
2. Beca Consultori Bayès. Vic, 28 de Setembre 2018.

## **2. MARC TEÒRIC**

### **2.1. Definició i epidemiologia**

La síndrome nefròtica (SN) es la presentació clínic-analítica de lesions produïdes a nivell glomerular i es defineix per la presència de proteïnúria d'alt grau (superior 40mg/m<sup>2</sup>/h en nens i 3,5 gr/24h/1.73m<sup>2</sup> en adults) associat a hipoalbuminèmia (<2,5g/dl) i edemes (Eknoyan G. et.al. 2012, 2020). La proteïnúria és un signe de la pèrdua de permeabilitat selectiva de la barrera de filtració glomerular secundària a la lesió podocitària.

La major part de casos de síndrome nefròtica durant l'edat pediàtrica són de causa primària, constituent la síndrome nefròtica idiopàtica (SNI) la glomerulopatia pediàtrica més freqüent (Eddy et.al. 2003). La majoria d'aquests, presenten una bona resposta a la corticoteràpia amb bon pronòstic renal a llarg termini. Per contra, un 20% dels debuts de síndrome nefròtica són corticoresistents i poden evolucionar a malaltia renal crònica (Ruth E. M. et. al. 2005). L'edat de presentació i la resposta al tractament són els dos factors pronòstics més importants. La incidència de síndrome nefròtica idiopàtica durant l'edat pediàtrica és de 2-7 per 100.000 nens i la prevalença de 16 casos per cada 100.000 nens (Eddy A et.al 2003). És més freqüent en el sexe masculí (2:1) en nens. L'edat de presentació habitual és entre els 2-10anys.

En l'edat adulta, la principal causa de síndrome nefròtica és la secundària, essent la nefropatia diabètica la més prevalent. D'altra banda, la nefropatia membranosa és la principal causa primària. (Medawar W et.al., 1990). La incidència de la síndrome nefròtica en adults és de 5 casos per 100.000 habitants. En l'adolescència i l'edat adulta no s'observen diferències entre sexes. La corticoresistència s'observa en el 10-20% dels pacients amb nefropatia de canvis mínims (Ballarin J. et. al. 2018) i el 50% d'aquells amb glomeruloesclerosi focal i segmentària (Chun M. et.al. 2004).

## 2.2. Classificació

La síndrome nefròtica es pot classificar segons la seva etiologia, evolució clínica o patró histològic.

### Segons la seva etiologia:

(Eddy et.al. 2003; Hull R. P. et.al. 2008)

#### - SN Primària:

- Síndrome nefròtica idiopàtica o de canvis mínims: no es coneix la seva causa.
- D'origen genètic: la major part d'aquests presenten un debut durant el primer any de vida. Parlem de síndrome nefròtica congènita quan apareix abans dels 3 mesos i síndrome nefròtica infantil quan apareix entre els 4-12mesos (Habbib R. 1993). El maneig d'aquests pacients és diferent a la resta ja que són resistents a la corticoteràpia i a la resta d'immunosupressors emprats habitualment.

Dintre d'aquest grup diferenciem:

- Mutacions en gens que codifiquen per proteïnes podocitàries: NPHS1 (SN tipus Finlandés), NPHS2, WT1 (Síndrome de Denys Drash), Síndrome de Frasier, esclerosi mesangial difusa aïllada, LAMB2 (Síndrome de Pierson), PLCE1 (NPHS3), ACTN4, TRPC6 y CD2AP.
- Formes sindròmiques: Sd Schimke (displasia espondiloepifisària, immunodeficiència de cèl·lules T i glomeruloesclerosi), Galloway-Mowat (SN congènit, microcefàlia i hèrnia d'hiat) i Nail-Patella (osteoncodisplasia y SN).

#### - SN Secundària:

- Malalties sistèmiques: vasculitis, Lupus, Purpura se Schonlein Henoch, Amiloidosi, Síndrome hemolític urèmic, Diabetes mellitus, Poliarteritis nodosa, Artritis reumatoide, Granulomatosi de Wegener i altres col·lagenopaties.

- Malalties infeccioses: Citomegalovirus, hepatitis B i C, HIV, toxoplasma, sífilis, malària.
- Neoplàsies: leucèmia, limfoma de Hodgkin.
- Fàrmacs: AINEs, sals d'or, penicilamina, captopril.
- Apareixen en el curs d'altres glomerulopaties: síndrome d'Alport, nefropatia per IgA (tot i que molt rarament es manifesten en forma de síndrome nefròtica pura).

La **classificació de la síndrome nefròtica clínica**, s'estableix segons la resposta dels pacients a la corticoteràpia (Eknoyan G. et.al. 2012, 2020).

- **Corticosenible:** la major part de pacients pediàtrics presenten remissió amb el tractament amb corticoteràpia (80-90%). D'aquests, 80% presentaran noves recaigudes al llarg del seu curs
  - Brot únic o recaigudes infreqüents: <2 recaigudes en 6 mesos o <3 recaigudes/any.
  - Recaigudes freqüents: >2 recaigudes en 6 mesos o >3 recaigudes/any, en qualsevol moment evolutiu.
  - Corticodepenent: recaigudes al disminuir la corticoteràpia o en <15 dies d'aturar-la.

En el cas dels adults, el 75% solen ser corticosensibles.

- **Corticoresistent:** falta de resposta al tractament amb corticoteràpia. Clàssicament, s'ha definit com a corticoresistent en població pediàtrica, aquells que presentaven proteïnúria persistent després de 8 setmanes amb tractament amb Prednisona via oral a 60mg/m<sup>2</sup>/d (Eknoyan G.et.al., 2012) o bé després de 4 setmanes amb Prednisona 60mg/m<sup>2</sup>/dia seguit de 3 bolus de Metilprednisolona (1g/1.73m<sup>2</sup>) endovenosos a dies alterns (Pasini A.et.al. 2017). En les noves actualitzacions de les guies KDIGO, la corticoresistència en el pacient pediàtric ve definida per la falta

de resposta després de 4 setmanes de prednisona 60g/m2/dia (Eknoyan G.et.al., 2020).

En el pacient adult amb SNI; es defineix com a corticoresistència, la falta de resposta després de tractament amb prednisona diari a 1mg/kg (dosi màxima 80mg) o tractament amb prednisona a dies alterns a 2mg/kg (dos màxima 120mg) durant 16 setmanes.

La corticoresistència es dóna en el 10-20% dels nens que debuten amb Síndrome nefròtica i en el cas dels adults, en el 20% que presenten nefropatia de canvis mínims i el 50% dels que presenten glomeruloesclerosi focal i segmentària. La corticoresistència pot manifestar-se al debut inicial o en brots posteriors i els pacients que la desenvolupen tenen pitjor pronòstic de funció renal a llarg termini.

Segons la lesió primària renal, la síndrome nefròtica es **classifica en varis patrons histològics** (Prince T.et.al. 2015):

- **Nefropatia de canvis mínims (NCM):** no es detecten alteracions glomerulars en la microscòpia òptica i en la microscòpia electrònica s'observa fusió dels podòcits. Els estudis per immunofluorescència solen ser negatius.  
És el patró més prevalent en l'edat pediàtrica (90% dels menors de 10 anys) i en adults representa el 10-15% dels casos.
- **Glomerulonefritis focal i segmentària (GFS):** en la microscòpia òptica, alguns glomèruls tenen aspecte normal mentre que d'altres presenten esclerosi i cicatrització segmentària. En la microscòpia electrònica es detecta un esborrament generalitzat dels peus podocitaris en les formes idiopàtiques. En la immunofluorescència s'objectiven dipòsits de IgM i C3 en les zones d'esclerosi segmentària.
- **Glomerulonefritis membranosa (NM):** s'objectiva un engruiximent global i difús de la paret dels capil·lars glomerulars.

- **Glomerulonefritis proliferativa mesangial:** s'observa augment difús de cèl·lules i matriu mesangial mitjançant ambdues microscòpies i en la microscòpia electrònica a més a més es detecta l'esborrament dels processos podocitaris de les cèl·lules epitelials. La immunofluorescència revela tinció traça per IgM i/o IgA en el mesangi.
- **Esclerosi mesangial difusa:** els glomèruls presenten una expansió del mesangi per increment de la matriu mesangial amb parets capil·lars que inicialment poden veure's normals però s'observa hipertròfia i hiperplàsia dels podòcits. En fases avançades es produeix esclerosi del mesangi.

L'estudi anatomopatològic del teixit renal permet un millor coneixement de les malalties renals. En el cas de la síndrome nefròtica dels pacients que debuten en l'edat pediàtrica, no existeix unanimitat en la indicació de la biòpsia renal com tècnica d'estudi. La majoria dels pacients que debuten en edat pediàtrica, presenten el patró de canvis mínims pel que d'entrada no es considera necessari la seva realització, tal i com es va descriure en l'Estudi Internacional de Malalties renals en el nen (ISKDC).

Les principals indicacions acceptades generalment (Alshami A.et.al. 2017) per a la realització de biòpsia renal en la població pediàtrica amb Síndrome nefròtica idiopàtica són:

- Edat atípica de debut: <1any o a partir de l'adolescència (>12anys)
- Si presenten corticoresistència en el debut o en algun moment del curs evolutiu
- Debut atípic: s'associa a insuficiència renal, macrohematúria o hipertensió arterial.

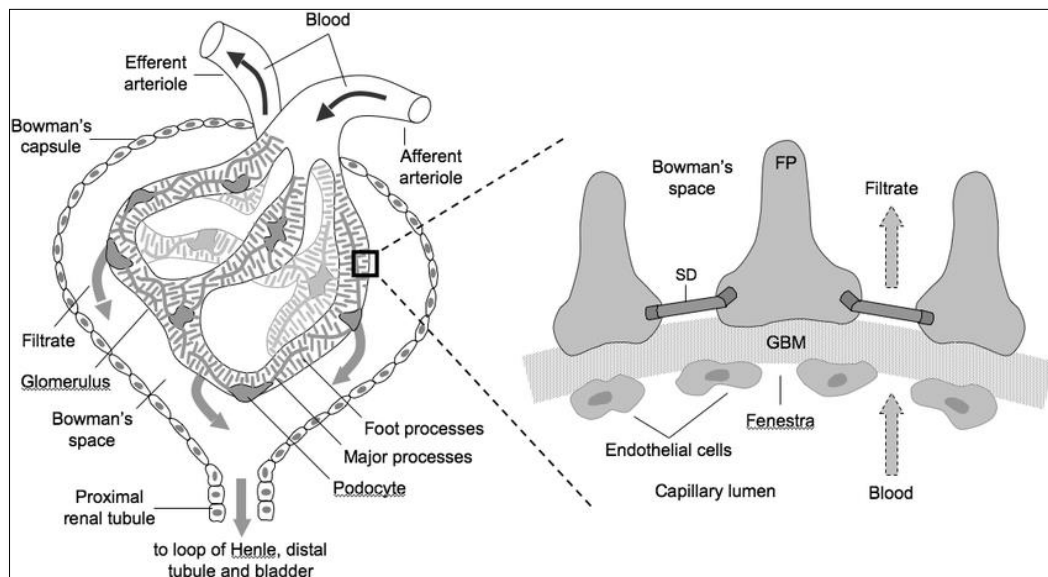
Cal matitzar, que aquells casos en els que hi hagi una alta sospita de Síndrome nefròtica d'origen genètic, com és un debut molt precoç (<3mesos) o independentment de l'edat, si pacient debuta amb manifestacions extrarenals que són altament suggestives d'un quadre sindròmic relacionat amb la síndrome nefròtica d'origen genètic, l'estudi genètic serà la tècnica diagnòstica inicial a realitzar. En el següent

apartat, s'exposa una taula amb les mutacions de proteïnes podocitàries conegudes en la Síndrome nefròtica d'origen genètic.

Pel contrari, en els adults si que es recomana realitzar en la valoració inicial una biòpsia renal per orientar millor el tractament des del seu inici, excepte en pacients diabètics en els que no es sospiti una etiologia diferent a la nefropatia diabètica. En la població adulta, la glomerulonefritis membranosa és la glomerulopatia primària que causa síndrome nefròtica amb més freqüència, representant el 25% dels casos (Medawar W, 1990).

### 2.3. Patogènia

La barrera de filtració glomerular està formada per 3 components: endoteli, membrana basal glomerular (MBG) i els podòcits que estan units entre ells pel diafragma. (Arévalo M.A. 2008).



Altintas MM. Et.al. Current Chemical Biology, 2008

L'endoteli és una capa discontinua, amb poros i fenestracions de 70-100nm de diàmetre constituït principalment per la podocalixilina, una sialo-proteïna polianiónica que li confereix a la seva superfície una càrrega negativa. Permet el pas de molècules de baix pes molecular i alguna macromolècula.

La membrana basal està constituïda per tres capes: làmina rara interna, làmina densa i làmina rara externa. Aquesta permet el pas de l'aigua, petits soluts, ions i proteïnes de tamany inferior a 70 KDa i impedeix el pas de macromol·lècules de forma mecànica i elèctrica. Està constituïda estructuralment per proteïnes segregades per les cèl·lules endotelials i epitelials: col·làgen tipus IV, laminina, entactina i proteoglicans d'heparan sultat.

Les cèl·lules epitelials o podòcits són cèl·lules molt diferenciades que no es divideixen. Expressen una sèrie de proteïnes específiques indispensables pel manteniment de la barrera de filtració, dels processos pediculars i del diafragma de filtració. S'encarreguen de sintetitzar la membrana basal glomerular i formar els poros de filtració.

La patogènia exacta de la síndrome nefròtica és desconeguda. Clàssicament, la immunitat adaptativa va ser la primera que es va relacionar amb el mecanisme immunològic de la síndrome nefròtica. Específicament, alteracions a nivell de la immunitat cel·lular tipus T (Shalhoub RJ, 1974), donada l'associació amb processos limfoproliferatius (Limfoma No Hodgkin), atòpics, la susceptibilitat per infeccions bacterianes, la remissió espontània després de la infecció per xarampió i la bona resposta a tractaments immunosupressors (corticoides, ciclofosfamida, micofenolat o els anticalcineurínics). Actualment, es postula que tant la immunitat cel·lular tipus B com d'altres components de la immunitat innata, també tenen un paper rellevant en el mecanisme immunològic de la síndrome nefròtica idiopàtica.

Es sospita que en la SNI, hi ha un factor circulant que altera la permeabilitat de la barrera de filtració desencadenant la proteïnúria. Per ara, no s'ha aconseguit aïllar aquest factor o factors responsables. Aquesta teoria es fonamenta en varies observacions clíniques i experimentals:

- Resolució de la proteïnúria en un fill de mare amb esclerosi focal i segmentària, després dels 4 primers dies de vida (Kemper MJ et.al 2001).



- La inducció de proteïnúria en rates al entrar en contacte amb plasma de pacients amb esclerosi focal i segmentària (McCarthy et.al 2010).

- La recidiva de la proteïnúria en pacients amb esclerosi focal i segmentària després del trasplantament renal, inclús sense evidència de lesió renal. Alguns d'aquests pacients, es beneficien de plasmafèresis i immunoabsorció prèvies. (Fine RN et.al. 2007).

-La resolució de proteïnúria en un pacient receptor d'injert de donant exitus en el curs de recaiguda per síndrome nefròtica (Gallon L, et.al. 2012).

Varies citocines i molècules han estat proposades com a factors circulants, com es descriurà més endavant (veure apartat de biomarcadors).

En la Síndrome nefròtica d'origen genètic, la proteïnúria ve donada per defectes estructurals dels podòcits o de les proteïnes que constitueixen la pròpia membrana basal. Les indicacions per a la realització d'estudi genètic són: l'edat de presentació precoç (<1any), corticoresistència o antecedents familiars de síndrome nefròtica corticoresistent (Niaudet P. 2004; Ha T.S. et.al. 2017).

A la següent taula s'enumeren les mutacions de gens que codifiquen per proteïnes podocitàries descrites:

**Table 1.** Genetic causes of nephrotic syndrome categorized according to the location of mutated proteins in podocytes

Gene	Protein	Inheritance	Locus	Phenotypes
<b>Slit diaphragm and adaptor proteins</b>				
<i>NPHS1</i>	nephrin	AR	19q13.1	CNS, SRNS (NPHS1)
<i>NPHS2</i>	podocin	AR	1q25-q31	CNS, SRNS (NPHS2)
<i>PLCE1</i>	phospholipase C, $\epsilon$ 1	AR	10q23	DMS, SRNS (NPHS3)
<i>CD2AP</i>	CD2-associated protein	AD/AR	6p12.3	SRNS (FSGS3)
<i>FAT1</i>	FAT1	AR	4q35.2	NS, Ciliopathy
<b>Cytoskeleton components</b>				
<i>ACTN4</i>	$\alpha$ -actinin-4	AD	19q13	Late onset SRNS (FSGS1)
<i>INF2</i>	inverted formin-2	AD		SRNS (FSGS5), Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy
<i>MYH9</i>	myosin, heavy chain 9	AD	22q12.3-13.1	Macrothrombocytopenia with sensorineural deafness, Epstein syndrome, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome
<i>MYO1E</i>	myosin IE	AR	15q22.2	Childhood-onset SRNS (FSGS6)
<i>ARHGDI1</i>	rho GDP-dissociation inhibitor (GDI) a1	AR	17q25.3	Childhood-onset SRNS (NPHS8), seizures, cortical blindness
<i>ARHGAP24</i>	Arhgap24 (RhoGAP)	AD	4q22.1	Adolescent-onset FSGS
<i>ANLN</i>	Anillin	AD	7p14.2	(FSGS8)
<b>GBM and basal membrane proteins and related components</b>				
<i>LAMB2</i>	laminin subunit $\beta$ 2	AR	3p21	Pierson syndrome DMS, FSGS (NPHS5)
<i>ITGB4</i>	Integrin- $\beta$ 4	AR	17q25.1	Epidermolysis bullosa, Aneudotic cases presenting with NS and FSGS
<i>ITGA3</i>	Integrin- $\beta$ 3	AR		Epidermolysis bullosa, Interstitial lung disease, SRNS/FSGS
<i>CD151</i>	Tetraspanin	AR	11p15.5	Epidermolysis bullosa, Sensorineural deafness, ESRD
<i>EXT1</i>	glycosyltransferase	AR	8q24.11	SRNS
<i>COL4A3,4</i>	collagen (IV) $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4	AD/AR	2q36-q37	Alport syndrome, FSGS
<i>COL4A5</i>	collagen (IV) $\alpha$ 5	XD	Xq22.3	Alport syndrome, FSGS
<b>Apical membrane proteins</b>				
<i>TRPC6</i>	transient receptor potential channel 6	AD	11q21-q22	SRNS (FSGS2)
<i>EMP2</i>	Epithelial membrane protein 2	AD	16p13.2	Childhood SRNS/SSNS (MCD) (NPHS10)
<b>Nuclear proteins</b>				
<i>WT1</i>	Wilms' tumor protein	AD/AR	11p13	SRNS (NPHS4), Denys-Drash syndrome, Frasier syndrome, WAGR syndrome
<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription factor 1- $\beta$	AD	9q34.1	Nail-patella syndrome, NS
<i>SMARCAL1</i>	HepA-related protein	AR	2q35	Schimke immuno-osseous dysplasia
<i>PAX2</i>	Paired box gene 2	AD	10q24.3-q25.1	Adult-onset FSGS (FSGS7), Renal coloboma syndrome
<i>MAFB</i>	A transcription factor	AD	20q11.2-q13.1	carpo-tarsal osteolysis progressive ESRD
<i>LMNA</i>	Lamins A and C	XD	1q22	familial partial lipodystrophy, FSGS
<i>NXF5</i>	Nuclear RNA export factor 5	XR	Xq21	SRNS/FSGS cardiac conduction disorder
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	AD	10p14	HDR syndrome (hypoparathyroidism, sensorineural deafness, renal abnormalities)
<i>NUP93</i>	Nucleoporin 93kD	N/A	16q13	SRNS
<i>NUP107</i>	Nucleoporin 107kD	N/A	12q15	Early childhood-onset SRNS/FSGS
<b>Mitochondrial proteins</b>				
<i>COQ2</i>	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase	AR	4q21-q22	Early-onset SRNS, CoQ10 deficiency
<i>COQ6</i>	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	AR	14q24.3	NS with sensorineural deafness, CoQ10 deficiency
<i>PDS2</i>	decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2	AR	6q21	Leigh syndrome, CoQ10 deficiency, FSGS
<i>MTTL1</i>	Mitochondrially encoded tRNA leucine 1 (UUA/G)	Maternal	mtDNA	Mitochondrial diabetes, deafness with FSGS, MELAS syndrome
<i>ADCK4</i>	aarF domain containing kinase 4	AR	19q13.1	Childhood-onset SRNS (NPHS9), CoQ10 deficiency
<b>Lysosomal proteins</b>				
<i>SCARB2</i>	Scavenger receptor class B, member 2 (LIMP II)	AR	4q13-q21	Action myoclonus-renal failure syndrome, lysosomal storage disease
<i>NEU1</i>	Sialidase 1			
	N-Acetyl- $\alpha$ -Neuraminidase	AR	6p21.33	Nephrosialidosis, SRNS
<b>Other intracellular proteins</b>				
<i>APOL1</i>	apolipoprotein L1	AR	22q12.3	FSGS in African-Americans (FSGS4)
<i>PTPRO</i>	tyrosine phosphatase receptor-type O (GLEPP1)	AR	12p12.3	SRNS (NPHS6)
<i>CRB2</i>	Crumbs homolog 2	AR	9q33.3	Early-onset familial SRNS (FSGS9)
<i>DGKE</i>	diacylglycerol kinase- $\epsilon$	AR	17q22	Atypical hemolytic uremic syndrome, membranoproliferative lesions (NPHS7)
<i>ZMPSTE24</i>	zinc metallo-proteinase	AR	1q34	mandibuloacral dysplasia, FSGS
<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase 2	AR	16p13.2	CDG syndrome, FSGS
<i>ALG1</i>	$\beta$ 1,4 mannosyltransferase	AR	16p13.3	CDG syndrome, congenital NS
<i>CUBN</i>	Cubilin	AR	10p13	Childhood-onset SRNS megaloblastic anemia
<i>TTC21B</i>	IFT139 (a component of intraflagellar transport-A)	AR	2q24.3	Nephronophthisis (NPHP12), FSGS
<i>WDR73</i>	WD repeat domain 73	AR	15q25.2	Galloway-Mowat syndrome, SRNS/FSGS

## 2.4. Presentació clínica

Les manifestacions clínico-analítiques característiques de la SN són comunes en tots els pacients independentment de la seva etiologia i són: proteïnúria en rang nefròtic, hipoalbuminèmia i edemes. A més a més, els pacients presenten dislipèmia, major risc trombòtic i un increment de les infeccions bacterianes.

Altres signes menys freqüents que es poden objectivar són: hipertensió arterial (20%), hematúria (25%), insuficiència renal (3%). A continuació s'exposen les diferents manifestacions clíniques i la seva fisiopatologia:

### **Proteinúria i hipoalbuminèmia**

La proteïnúria és d'origen glomerular i d'alt grau:  $>40\text{mg}/\text{m}^2/\text{h}$  en nens i  $>3.5\text{g}/1.73\text{m}^2/24\text{h}$  en adults. És una proteïnúria no selectiva, l'albumina és la principal proteïna aïllada però també es detecten altres proteïnes com les immunoglobulines, transferrina, transportador de Vitamina D i transportador de les hormones tiroidees.

S'objectiva una hipoproteinèmia ( $<6\text{g}/\text{dl}$ ) i una hipoalbuminèmia ( $<2.5\text{g}/\text{dl}$ ) associades.

### **Edemes**

Els edemes són la presentació clínica més rellevant, es caracteritzen per ser tous, simètrics i varien segons el grau de severitat del quadre, des de lleus edemes periorbitaris o en parts acres fins a vessament pleural, ascites i anasarca. (Eddy A, et.al. 2003).

S'han proposat varies teories per explicar la fisiopatologia de l'edema. Clàssicament, es defensava la "*Teoria Underfill*" que justificava els edemes per l'activació de l'eix renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) secundari a la hipovolèmia produïda per la reducció de la pressió oncòtica del plasma amb conseqüent moviment del fluid intravascular a l'espai extra-vascular. Aquesta teoria, ha estat criticada, atès que molts pacients amb síndrome nefròtica presenten una pressió intravascular normal o

augmentada i l'activitat de la renina no està augmentada (Dorhout Mees EJ, et.al 1984).

La teoria que es proposa darrerament és la "*Teoria del Overfill*" que suggereix que el defecte primari és a nivell del túbul renal que condiciona la retenció de sodi i amb aquesta l'expansió del volum intravascular i conseqüentment la transsudació d'aigua a nivell extravascular. La causa del defecte renal intrínsec en la reabsorció del sodi és desconeguda però es postula que té lloc a nivell del tub col·lector cortical (Ichiwaka I, 1983).

### **Dislipèmia**

La dislipèmia és característica dels pacients amb Síndrome nefròtica i es correlaciona amb el grau de proteïnúria. És deguda a un augment de la síntesis hepàtica de lipoproteïnes (augment de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa i acil-coenzima A) en resposta a la disminució de la pressió oncòtica plasmàtica, disminució del catabolisme de lipoproteïnes secundari a un descens de l'activitat de lipoproteïna lipasa i una disminució de l'activitat del receptor LDL (Thabet, 1993). En els pacients amb SN, es troba un augment del colesterol total i de la fracció LDL, essent la fracció HDL normal. Els pacients amb una hipoalbuminèmia severa també tenen hipertrigliceridèmia i augment de VLDL, associats.

Les complicacions que poden desenvolupar durant el brot de SN són les següents:

- Infeccions

Degut a la pèrdua urinària d'immunoglobulina G i d'altres components del complement (Factor B i properdina) i a l'alteració dels limfòcits T i B, els pacients amb SN presenten un major risc d'infeccions bacterianes com peritonitis, sèpsia, meningitis, pneumònia i cel·lulitis. Les principals bacteries responsables d'aquestes són: les bacteries encapsulades (principalment *Streptococcus Pneumoniae*) i bacils gram negatius. La

infecció per varicel·la durant un brot pot ser potencialment greu pel grau d'immunosupressió que presenten degut a la pròpia malaltia i al tractament que reben, pel que precisen tractament precoç amb Aciclovir endovenós.

#### - Tromboembolismes

Els pacients amb SN presenten un major risc de trombosi vascular secundària a l'associació d'hipovolèmia, un desequilibri en l'activitat de molècules procoagulants (fibrinògen i factors de coagulació V, VII, VIII, IX, XX i XIII) i anticoagulants (anti-trombina III) i tendència a la trombocitosis. La incidència de complicació tromboembòlica és major en adults que en nens (25% vs 3%), i els pacients amb glomerulopatia membranosa són els que presenten major risc de complicacions tromboembòliques (Kerlin, 2012). Les trombosis venoses són més freqüents que les arterials. Els vasos sanguinis més freqüentment implicats en població pediàtrica són les venes profundes de les extremitats inferiors i la vena cava inferior.

## **2.5. Tractament**

Els corticoides són el tractament de primera línia en la SNI des de la dècada del 1950, millorant el pronòstic d'aquests pacients amb la reducció de la morbimortalitat (Eddy et.al. 2003). En els nens, donada l'alta prevalença de síndrome nefròtica de canvis mínims, si no hi han factors atípics s'inicia corticoteràpia sense fer biòpsia renal, atès que la corticosensibilitat s'ha objectivat com el millor indicador pronòstic. Un 80-90% dels nens que debuten amb Síndrome nefròtic entren en remissió amb el tractament inicial amb corticoteràpia.

El mecanisme d'acció dels corticoides en la SN és encara desconegut però es creu que tenen un efecte immunomodulador actuant a nivell de la producció de citoquines promovent l'expressió de les citoquines amb efecte anti-inflamatori i suprimint les pro-inflamatòries. També s'ha objectivat que tenen un efecte estabilitzador del citoesquelet dels podòcits i que estan implicats en la supressió de limfòcits T (Mallory et.al. 2017).

En el debut, les guies KDIGO recomanen en els pacients pediàtrics iniciar Prednisona 60mg/m<sup>2</sup>/dia a dosis única al matí (dosi màxima 60mg) durant 4-6 setmanes, seguit de 40mg/m<sup>2</sup>/dies alterns 4-6 setmanes més i posteriorment fer una pauta de descens progressiu. Es recomana fer un tractament inicial mínim de 12 setmanes, per evitar recidives posteriors (Eknoyan G. et.al. 2012, 2020).

En tots els pacients adults es realitza una biòpsia renal en el debut de la SN, en els casos amb NCM i GFS primàries, s'inicia també tractament amb corticoteràpia a altes dosis: 1mg/kg/d o 2mg/kg/48h fins 2 setmanes després d'entrar en remissió, iniciant reducció progressiva fins completar 16 setmanes (Eknoyan G. et.al. 2012, 2020).

Concomitantment, es realitza tractament de suport amb profilaxis gàstrica amb inhibidors de bomba de protons i profilaxis de l'osteoporosi secundària a la corticoteràpia amb suplementes de vitamina D i calci (Gulati S. et.al. 2005). De la mateixa manera, en els pacients amb un alt risc trombòtic s'inicia profilaxis amb àcid acetil salicílic associat o no a anticoagulació amb heparina de baix pes molecular (Lin R. 2020).

Es recomana durant el brot en els pacients, una dieta normoproteica i hiposòdica amb restricció moderada de líquids.

Els pacients amb resistència als corticoides, els corticodepenents o els que recauen freqüentment precisen d'altres tractaments immunosupressors pel control del SN.

En el cas dels pacients corticoresistents, segons la histologia renal es realitzarà un maneig o un altre però, en els pacients pediàtrics, fins a saber el resultat s'utilitza la Ciclosporina com a fàrmac de primera línia. D'altra banda, en els pacients amb corticodependència o freqüents brots es sol associar al tractament immunosupressors com: agents alquilants (Ciclofosfamida, Clorambucil o Levamisol), Micofenolat, anticalcineurínics (Ciclosporina o Tacrolimus) o Rituximab (Eknoyan G. et.al. 2020).

## 2.7. Pronòstic

La síndrome nefròtica és una malaltia heterogènia amb un ampli espectre de patrons histològics i cursos evolutius. La major part de pacients que debuten en edat pediàtrica assoleixen la remissió completa de la malaltia abans de l'edat adulta. Es considera SN resolt després de 7-10 anys sense presentar cap recaiguda. El 25% dels pacients pediàtrics presentaran recaigudes en època adulta.

Els pacients amb corticoresistència presenten un mal pronòstic a llarg termini, amb un risc de desenvolupar malaltia renal crònica del 30-50% als 5 anys del diagnòstic.

## 2.8. Biomarcadors en estudi

Un dels principals reptes de la Nefrologia actual és la troballa de biomarcadors que permetin caracteritzar des del diagnòstic inicial els diferents patrons anatomo-patològics causants de la Síndrome Nefròtica de forma no invasiva i, d'aquesta manera, poder oferir tractaments més dirigits i millorar l'orientació inicial en cada cas.

Els avenços en el coneixement de la patogènia de la Síndrome Nefròtica així com en el desenvolupament de les tècniques de proteòmica, han permès identificar una sèrie de molècules que podrien tenir un paper rellevant com a biomarcadors en aquesta patologia. Les dades actuals, però, són encara molt preliminars. A continuació, s'exposen les molècules que presenten una major avaluació científico-clínica d'acord als diferents patrons histològics causants de la Síndrome nefròtica.

<b>Nefropatia canvis mínims</b>	<b>Glomeruloesclerosi focal i segmentària</b>	<b>Nefropatia membranosa</b>
- Hemopexina	- suPAR	- PLA2R
- CD80 (B7.1)	- Complex CD40-CD40L	- THSD7A
- IL-13	- Activació epitel·li parietal	- NELL-1
- RR sIL-2	- CLCF-1	

## **Nefropatia per canvis mínims:**

### Hemopexina

La hemopexina (Hx) és una B1-glicoproteïna plasmàtica de síntesi hepàtica que té com a funció principal el transport i l'eliminació de l'hemo lliure. S'ha vist, però, que també presenta altres funcions com d'antioxidant i de proteasa a nivell renal. Per primer cop, va ser relacionada amb la nefropatia per canvis mínims en models experimentals en rates com a possible inductor de proteïnúria per la seva acció com a proteasa (Bakker et.al. 1988, Cheung et.al.2000). S'han descrit varies isoformes de Hx circulants, la forma inactiva és la que es troba en individus sans i, en certes circumstàncies, pot activar-se i adquirir activitat proteasa, capaç d'induir lesions a nivell de la membrana basal glomerular, alterant el seu citoesquelet amb la reducció de la capa aniònica i de les sialoglicoproteïnes, tant en models in vitro com en in vivo en rates (Lennon et.al. 2008). Pacients amb nefropatia amb canvis mínims en brot presenten nivells d'Hx en plasma i en orina disminuïts però la Hx que presenten té una major activitat proteasa (Bakker et.al. 2005), es desconeix per ara quins són els elements primaris que desencadenen l'activació de la Hx i el significat clínic d'aquesta a nivell de diagnòstic i seguiment dels pacients amb nefropatia per canvis mínims, pel que es necessiten més estudis en aquest camp.

### CD80 (B 7.1)

El CD80 o B7.1 és una proteïna transmembrana que s'expressa de forma habitual a les superfícies dels limfòcits B i altres cèl·lules presentadores d'antigen (CPA). Reiser et.al.2004, van ser els primers que van descriure la capacitat dels podòcits d'expressar CD80, actuant com a CPA, mitjançant la co-estimulació dels limfòcits T (mitjançant CD-28 i CTLA-4) i amb aquesta la seva activació.

Els podòcits en estat basal no expressen aquesta proteïna i, d'acord amb models experimentals, es creu que la seva expressió pot ser induïda per estrés oxidatiu o per



l'estimulació amb liposacàrid per mitjà de receptors *Toll like*. L'expressió del CD80 a nivell podocitari s'ha demostrat per immunofluorescència en les biòpsies renals i s'ha detectat també aquesta molècula a nivell urinari (uCD80). S'han descrit, nivells augmentats de uCD80 en pacients amb Nefropatia per Canvis Mínims en major proporció respecte altres glomerulopaties i s'han relacionat amb l'activitat de la malaltia, disminuint en els casos de remissió (Garin et.al. 2009; Cara et.al. 2014). També s'ha correlacionat el uCD80 amb el pronòstic a llarg termini dels pacients, nivells majors de uCD80 preveuen una millor resposta a la corticoteràpia i una menor davallada de la funció renal a llarg termini en pacients amb síndrome nefròtica idiopàtica (Ling et.al. 2018).

Calen més estudis per valorar el paper del CD80 a nivell de la patogènia de la nefropatia per canvis mínims i estandaritzar el punt de tall de uCD80 per l'ús d'aquest en la pràctica clínica diària.

### Interleucina 13

La interleucina 13 (IL-13), ha estat implicada en varis estudis experimentals en la patogènia de la nefropatia per canvis mínims. Yap et.al. 1999, van objectivar que l'expressió genètica de IL-13 estava augmentada en limfòcits T CD4+ i CD8+ en nens en recaiguda amb síndrome nefròtic corticosensible en comparació en l'estat de remissió. Posteriorment, es va desenvolupar un model de ratolí transgènic per IL-13 (Lai et.al. 2007) que desenvolupava Síndrome nefròtica (proteïnúria, hipoalbuminèmia i hipercolesterolèmia) amb lesions histològiques idèntiques a nefropatia per canvis mínims i que mostraven una sobreexpressió podocitària de IL-13R, IL-4R i CD80 i una expressió disminuïda de nefrina, podocina i dextroglicans, respecte el grup control. El possible vincle entre IL-13 com a inductor de CD80 en els podòcits en models experimentals de nefropatia per canvis mínims suposa un camp d'estudi per aprofundir en la patogènia d'aquesta entitat i valorar la seva utilitat en la pràctica clínica.

L'atòpia ha estat relacionada en els pacients amb SN, molts pacients presenten nivells IgE elevats (Maher et.al.2009). Es desconeix el paper que juga aquesta associació en la fisiopatologia de la Síndrome nefròtica. S'ha evidenciat, però, que la IL-13 té un rol important per la producció de IgE i IgG4 en els pacients amb síndrome nefròtica, a diferència dels pacients asmàtics en els que és dependent de IL-4 (Kimata et.al. 1995).

#### Receptor soluble de la interleucina-2, glicoproteïna-P i ABCB1

Des del 1985, que es va descriure el receptor soluble de la interleucina-2 (RR sIL-2) (Rubin et.al. 1985), aquest ha tingut un paper important no només en la Síndrome nefròtica primària sinó en múltiples malalties inflamatòries i immunològiques. El RR sIL-2 es genera per la ruptura proteolítica de la subunitat alpha del receptor IL-2 dels limfòcits T, es desconeix la seva funció exacta però es pensa que podria augmentar la capacitat de captació de IL-2 pel seu receptor, donant lloc a l'activació i l'expansió clonal dels limfòcits T (Segarra-Medrano et.al. 2012). S'han detectat nivells de RR sIL-2 augmentats en pacients amb Síndrome nefròtica respecte grup de controls sans i que es relacionen amb l'activitat de la malaltia, disminuint en remissió (Lama et.al. 2002). Posteriorment, s'ha descrit una major elevació de RR sIL-2 en pacients amb nefropatia per canvis mínims corticorresistents i amb recaigudes freqüents, es postula que podria ser per l'augment de l'expressió del gen ABCB1 o MDR1 atès que s'ha objectivat una correlació positiva entre l'expressió de ABCB1 i RR sIL-2 en aquests pacients (Youssef et.al. 2011). El gen ABCB1, prèviament conegut com a MDR1, està localitzat en el cromosoma 21, regió 7p i sintetitza la glicoproteïna-P, una proteïna transportadora de membrana responsable del flux cel·lular de tòxics d'un determinat pes molecular. La Glicoproteïna-P s'encarrega de protegir a les cèl·lules dels fàrmacs i a desenvolupar resistències contra aquests. Quan hi ha un augment de l'expressió limfocitària de glicoproteïna-P, els corticoides no poden assolir el citoplasma intracel·lular i conseqüentment empitjora la seva resposta.

Es precisen un major nombre d'estudis per valorar la sensibilitat i especificitat de RR sLL-2 en la Síndrome nefròtica i estudiar si podria aportar algun valor la seva determinació conjuntament amb la de glicoproteïna-P o ABCB1 per facilitar el diagnòstic i el pronòstic d'aquests pacients.

### **Glomeruloesclerosi focal i segmentària (GFS)**

#### suPAR

El receptor soluble de la urokinasa (suPAR) havia estat proposat inicialment com un factor circulant responsable de la patogènia de la GFS primària (Wei et.al. 2011). El suPAR és la forma soluble del receptor de la uroquinasa, que és una glicoproteïna de membrana ancorada en la superfície de diferents cèl·lules (monòcits, neutròfils, limfòcits T, cèl·lules endotelials, fibroblasts, cèl·lules múscul llis, cèl·lules tumorals) i que s'allibera durant l'estimulació inflammatòria a diferents fluids corporals (sang, saliva, orina, líquid cefaloraquídi), en context d'infeccions bacterianes i víriques, càncer, malalties reumatològiques i aterosclerosi, reflectint l'activació del sistema immune (Edsfelt et.al. 2012). A nivell renal la seva funció és desconeguda però basat en models experimentals animals, el suPAR podria actuar activant la via de la  $\beta 3$  integrina podocitària i amb aquesta l'activació dels podòcits produint canvis en la seva estructura i funció que afectarien a la permeabilitat de la membrana basal glomerular, donant lloc a la proteïnúria. Wei et.al. 2014, van descriure que dos terços dels pacients amb GFS presentaven nivells de suPAR en sèrum augmentats respecte pacients amb altres causes de SN i que els pacients amb GFS recurrent en el post-transplant eren els que presentaven uns nivells més augmentats. Posteriorment, múltiples estudis han detectat resultats heterogenis en quant als nivells de suPAR en els pacients amb GFS i nivells de suPAR alts en pacients amb altres causes de Síndrome nefròtica i en controls sans, fet que descarta el seu ús pel diagnòstic diferencial inicial en la pràctica

clínica diària. Així mateix, el suPAR s'ha vist que està influenciat per l'edat, la taxa de filtrat glomerular, la inflamació i la malaltia cardiovascular.

Paral·lelament, extensos estudis epidemiològics han identificat al suPAR com un factor de risc independent de dany orgànic subclínic, malaltia cardiovascular, càncer i diabetis (Sehesdet et.al. 2011).

#### Complex CD40-CD40L

El complex CD40-CD40L pertany a la família dels TNF i s'ha vist que juga un paper rellevant en la immunitat adaptativa amb acció pro-inflamatoria (Hassan et.al. 2017). Hi ha una fracció soluble del CD40L que es pot detectar en el sèrum (sCD40L). El CD40 s'expressa principalment en els limfòcits B, monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques i el CD40L en els limfòcits T i plaquetes, però també s'ha detectat expressió d'aquests en altres cèl·lules com les cèl·lules endotelials, de múscul llis, mesangials, tubulars i més recentment en podòcits (Rigothier et.al. 2016). El bloqueig del complex CD40-CD40L té efecte protector de dany renal en models animals de malaltia proteïnúria crònica (Karaitis et.al. 2003) i també podria tenir un paper rellevant en la prevenció del rebuig de l'empelt en malalts amb glomerulopatia focal i segmentària (Delville et.al. 2014). Els nivells de sCD40L s'han detectat augmentats en pacients amb síndrome nefròtica corticodepenent i corticoresistent, i en especial en el subtipus histològic de glomeruloesclerosi focal i segmentària, respecte els controls sans (Doublier et.al. 2017). Encara es desconeix quin és el paper exacte que juga aquest complex en la patogènia de la síndrome nefròtica.

#### Activació de l'epitel·li parietal

Les cèl·lules epitelials parietals (PECs) en condicions normals es troben situades a l'interior de la capsula de Bowman, formant una capa de cèl·lules epitelials plana, en continuïtat amb les cèl·lules epitelials tubulars al pol urinari i amb els podòcits al pol vascular. Les PECs i els podòcits durant la glomerulogènesi s'originen d'un progenitor

mesenquimal comú i posteriorment es diferencien en fenotips diferents. Varis estudis han suggerit que les PECs juguen un paper important en el procés de repoblació de podòcits (Lim et.al. 2016). Quan les PECs s'activen, canvien de morfologia, formant un citoplasma més gran i un nucli rodó, i migren des de la capsula de Bowman fins a l'interior del glomèrul on sintetitzen matriu contribuint a l'esclerosi mesangial (Smeets et.al. 2011). Les PECs activades són reconegudes per immunohistoquímica amb l'expressió de marcadors "de novo" com el CD44 i el CD9 (Pinto et.al. 2017). Les PECs han estat implicades en la patogènia de varies glomerulopaties entre les que es troben la glomerulonefritis ràpidament progressiva i la GFS (Sicking et.al. 2012). L'activació de les PECs en la síndrome nefròtica idiopàtica, sembla ser exclusiva de les formes de GFS, pel que pot ser una eina potencial per a la diferenciació precoç de GFS de la nefropatia de canvis mínims (Smeets et.al. 2014) i la detecció precoç de la recidiva de GFS en l'ingert renal (Fatima et.al. 2012).

#### CLCF-1

La Cardiotropine-like cytokine (CLCF-1) és una citoquina que forma part de la família de la IL-6 i és secretada a nivell circulatori en forma de complex amb dos proteïnes: cytokine receptor-like factor-1 (CRLF1) o el receptor soluble alpha pel factor ciliar neurotròpic (sCNTF R $\alpha$ ). El sCNTF R $\alpha$  està implicat en activitats reguladores a nivell neuronal, així com en altres cèl·lules, com els adipòcits, cèl·lules musculars, osteòcits o cèl·lules retinianes (Pasquin et. al. 2015). A nivell renal, estudis in vitro demostren la implicació de CLCF-1 i CRLF1 en la nefrogènesi (Schmidt-Ott et.al. 2005). En models experimentals, CLCF-1 augmenta la permeabilitat glomerular de l'albumina de la mateixa manera que el sèrum de pacients amb glomeruloesclerosi focal i segmentària recurrent, així com activa la via de senyalització de JAK2/STAT3. Per contra, l'heterodímer CLCF1-CRLF1 bloqueja l'efecte de CLCF-1 i del sèrum de pacients amb GFS, tenint d'aquesta manera una funció protectora (Sharma et.al. 2015). Es precisen

més treballs que estudiïn la funció d'aquestes citoquines i la implicació en la patogènia de la GFS.

### **Nefropatia membranosa**

#### Receptor tipus M de fosfolipasa 2

La Nefropatia membranosa és la forma primària de síndrome nefròtica idiopàtica més freqüent en l'adult. Està causada pel dipòsit d'immunocomplexes en l'espai subepitelial entre la membrana basal i el podòcit. El receptor tipus M de la fosfolipasa A2 (PLA2R) és el primer antigen podocitari que s'ha identificat en els malalts amb NM idiopàtica. El PLA2R és una glicoproteïna transmembrana tipus I que forma part de la superfamília de lectines tipus C similar al receptor de manosa (Beck et.al. 2009), s'encarrega de transmetre senyals intracel·lulars després de la unió amb varies fosfolipases A solubles (Zvaritch et.al. 1999). S'han identificat anticossos anti-PLA2R de tipus IgG4 que es consideren específics de la NM primària. S'han aïllat aquests anticossos en un 60-70% dels pacients amb NM primària i s'ha vist que estan relacionats amb l'activitat clínica de la malaltia sent un bon marcador de resposta al tractament en aquests malalts (Hoxha et.al. 2011). El paper que juguen els anticossos anti-PLA2R en la patogènia de NM és encara desconegut.

#### THSD7A

El "Thrombospondin type-1 domain-containing 7A" (THSD7A) ha estat el segon autoantigen podocitari implicat recentment en la nefropatia membranosa primària de l'adult (Tomas NM et.al. 2014). El THSD7A és la forma soluble d'una N-glicoproteïna associada a membrana, que és expressada pel podòcit. Models experimentals han demostrat que la infusió en rates d'anticossos anti-THSD7A procedents de malalts amb NM, dóna lloc a proteïnúria i l'aparició de lesions histo-morfològiques característiques del patró de NM (Tomas NM.et.al. 2016). La prevalença d'anticossos anti-THSD7A en pacients amb NM oscil·la entre 1-10%, segons els estudis, sent major

en aquells pacients amb anti-PLA2R negatius (Ren S.et.al. 2018). No s'ha trobat correlació entre els anticossos anti-THSD7A amb el grau de proteïnúria o la resposta clínica al tractament (Hoxha et.al. 2016). Algun estudi ha relacionat la presència d'anti-THSD7A en NM amb major risc de recurrència en el post-transplant (Tomas NM. et.al. 2016), així com major risc de desenvolupament de càncer (Hoxha E. et.al. 2016).

#### NELL-1

Aquest és un nou antigen identificat en 16% pacients amb NM primària negatius per PLA2R i THSD7A (Sethi et.al. 2020). NELL-1 codifica per una proteïna de 90 KDa, "Neural epidermal growth factor-like 1", que és coneguda per estar altament expressada en osteoblasts. A nivell renal, NELL-1 es troba principalment en els túbuls i en menor proporció a nivell glomerular i s'expressa a nivell histopatològic amb positivitat per IgG1. La relació entre NELL-1 i el càncer encara està pendent per determinar (Sethi et.al. 2020).

### **2.9. Paper de la lesió endotelial en la SNI**

La implicació de la disfunció endotelial en la síndrome nefròtica va ser descrita al 1995 per Stroes et. al. per primer cop, els qual van detectar una alteració de la vasodilatació de l'endoteli en pacients amb proteïnúria en rang nefròtic. Estudis posteriors han corroborat aquest dany endotelial en pacients amb síndrome nefròtica, establint una correlació amb l'augment de risc cardiovascular que presenten (Zhang et.al. 2012).

La disfunció endotelial correspon a una fase primerenca de l'aterosclerosi deguda a alteracions de molècules vasoactives (Rubanyi, 1993). Estudis in vitro han detectat que l'exposició de LDL oxidat a les cèl·lules endotelials produeix l'alliberament de varies molècules d'adhesió tals com VCAM, ICAM, selectines i factor de Von Willebrand (Ross R. 1998).

Varis estudis han evidenciat una disfunció endotelial en pacients amb síndrome nefròtica. En adults amb síndrome nefròtica s'ha detectat una alteració de la dilatació mediada per fluxe de l'arteria braquial, trobant-se disminuïda (Watts et.al.2001) i una elevació de trombomodulina i altres marcadors de lesió endotelial com ICAM, VCAM, P-selectina i L-selectina (Malyszko et.al. 2002). En nens amb SN en fase de brot, s'ha detectat una elevació de marcadors de lesió endotelial tals com el factor de Von Willebrand (FvW), l'activador tisular del plasminògen (t-PA), l'inhibidor de l'activador del plasminògen 1 (PAI-1) i la forma soluble de la trombomodulina (sTM) (Tkaczyk et.al. 2007; Sharma et.al. 2014) i es relacionen amb l'activitat de la malaltia, mantenint-se elevats en pacients amb síndrome nefròtic corticoresistent i disminuint en aquells que assoleixen la remissió.

La causa de la disfunció endotelial en els pacients amb SN és, per ara, desconeguda. La dislipèmia ha estat proposada per alguns estudis com a probable desencadenant del dany endotelial (Watts et.al.2001), s'ha objectivat que els nivells de marcadors endotelials es correlacionen de forma positiva amb LDL i colesterol (Sharma et.al.2014).

## **2.10. Resposta inflamatòria en la SNI**

Malgrat que la fisiopatologia de la síndrome nefròtica sigui encara desconeguda, hi ha evidències de que la resposta inflamatòria hi pugui tenir un paper rellevant. La resposta a fàrmacs moduladors del sistema immune (corticoides i immunosupressors) i l'evidència de que la proteïnúria indueix la secreció de citocines pro inflamatòries que afavoreixen el reclutament de leucòcits i conseqüentment la inflamació renal en aquests pacients, recolzen aquesta hipòtesi (Camici M. 2007).

La resposta de fase aguda inflamatòria està estimulada per l'alliberament de citocines pels monòcits activats, macròfags o cèl·lules endotelials, entre les quals hi ha IL-1, IL-6



i el factor de necrosi tumoral (TNF $\alpha$ ). Aquestes citocines proinflamàtories són inductores d'una reacció multisistèmica, estimulant la secreció de proteïnes reactants de fase aguda pels hepatòcits. (Van Deventer, 1990).

Varis estudis experimentals, s'han centrat en l'anàlisi del nivell sèric dels principals mediadors implicats en la resposta inflamatòria en els malalts amb síndrome nefròtica, obtenint resultats discordants (Shimoyama H. 2004; Bustos C. 1994; Printza N. 2008; Neuhaus T. 1995; Kanai T. 2010; Suranyi M.G. 1993; Cho M. 2003; Daniel V. 1997; Rizk M.K. 2005). En alguns, s'han descrit una elevació dels nivells de IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$  (Bustos C. 1994; Suranyi M.G. 1993; Rizk M.K. 2005) però en d'altres els nivells d'aquestes mol·lècules no van ser superiors als dels controls sans (Shimoyama H. 2004; Kanai T. 2010; Cho M. 2003; Daniel V. 1997). Tots els estudis coincideixen en detectar nivells de citocines baixos en pacients amb síndrome nefròtica en remissió, comparables als dels controls sans, excepte en un estudi en el que es descriuen nivells de IFN $\gamma$  i IL-4 més elevats en aquests pacients (Neuhaus T. 1995). Els resultats dispars obtinguts, podrien explicar-se per les diferents metodologies i tècniques utilitzades per la mesura dels nivells de citocines (Araya C.E. 2006).

Fins ara, no s'ha realitzat un estudi integrat sobre l'activació de la resposta inflamatòria en la fase aguda en pacients amb síndrome nefròtica i valorar si aquesta es modifica segons la presentació histològica, presentació clínica o l'evolució a llarg termini.

### 3. HIPÒTESIS

La patogènia de la Síndrome nefròtica primària és desconeguda. S'ha postulat que un factor circulant de permeabilitat vascular podria ser el responsable d'aquesta afectació glomerular (Gentili A. 1954) però la recerca que s'ha fet fins al moment no ha estat concloent. Es creu que la lesió primària té lloc al podòcit i s'associa, en grau variable, a una disfunció endotelial.

El suPAR és un dels potencials factors circulants que havia estat implicat en la patogènia de la GFS en un inici (Wei et.al. 2011), però que estudis posteriors han demostrat que no és específic de cap patró histopatològic determinat (Kronbischler A. 2016; Meijers B. 2014; Spinale JM. 2015). Paral·lelament, el suPAR ha estat descrit com a marcador de dany cardiovascular i aterosclerosi (Sehesdet et.al. 2011), fet que podria explicar el perquè els nivells de suPAR estan elevats en alguns pacients amb SNI.

Així mateix, valorant la resta potencials biomarcadors estudiats fins el moment, s'objectiva que una gran part d'aquests estan també implicats en l'activació de la resposta inflamatòria, fet que podria tenir un paper rellevant en la valoració inicial i el maneig d'aquests pacients.

A l'espera de trobar biomarcadors indirectes característics de cada patró histopatològic, la biòpsia segueix sent l'eina per fer el diagnòstic diferencial dels pacients amb SNI. Els patrons histopatològics més prevalents en el SNI són la NCM i GFS. En alguns casos, la seva diferenciació histològica és un repte per la distribució segmentària de les lesions. L'activació de les PECs, com s'ha descrit anteriorment, podria ser una eina que augmenti la sensibilitat en el diagnòstic d'aquests pacients (Sicking et.al. 2012).

Amb tot el que s'ha comentat prèviament sorgeixen les següents hipòtesis:

- El suPAR, podria ser un marcador de disfunció endotelial en comptes d'un marcador específic de GFS i així explicar la seva presència en pacients amb diferents patrons histològics.
- L'activació de la resposta inflamatòria podria tenir un paper rellevant en la patogènia de la síndrome nefròtica i podria explicar les diferències clinicoanalítiques i de pronòstic entre els pacients.
- L'activació de les PECs podria ser un predictor precoç d'una possible evolució a GFS en malalts amb SNI i histologia renal normal.

## **4. OBJECTIUS**

A partir de les hipòtesis prèvies s'han plantejat quatre objectius generals compostos per varis objectius específics, com s'especifica a continuació:

### **4.1. Primer objectiu**

Analitzar els nivells de suPAR plasmàtics en el debut dels pacients amb Síndrome nefròtica Idiopàtica entre els diferents patrons histològics (NCM, GSF i NM) i els controls sans.

Dins d'aquest objectiu, es componen els següents objectius específics:

- Estudiar la relació dels nivells de suPAR amb els marcadors de disfunció endotelial (Factor de Von Willebrand, E-selectina, SCD-138 i V-CAM) .
- Comparar el grup de pacients amb nivells de suPAR majors en amb la resta, per veure si presenten característiques clínico-analítiques i de resposta al tractament diferencials.

### **4.2. Segon objectiu**

Analitzar l'estat d'activació de la resposta inflamatòria en els malalts amb Síndrome nefròtica idiopàtica i si aquesta s'associa a variables clíniques, analítiques o histopatològiques diferencials entre els pacients.

Dins d'aquest objectiu, es componen els següents objectius específics:

-Analitzar les característiques clíniques, bioquímiques i histopatològiques dels pacients amb SNI associats als nivells sèrics de les proteïnes relacionades amb la inflamació (Hx, Hgl, IL-6, suPAR, TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$ ).

- Analitzar si l'activació de la resposta inflamatòria en els malalts amb NCM i GFS s'associa amb la corticore sistència.

#### **4.3. Tercer objectiu**

- Recerca d'endotips de pacients amb GFS idiopàtica, integrant variables inflamatòries i immunològiques mitjançant l'anàlisi de cluster.
- Analitzar l'associació entre aquests endotips i la resposta a la corticoteràpia.

#### **4.4. Quart objectiu**

Analitzar si l'expressió de CD44 de l'epitel·li parietal en pacients amb síndrome nefròtic secundari a NCM amb patró histològic normal, es correlaciona amb la presentació clínica, la resposta al tractament amb corticoides i l'evolució a llarg termini.

## **5. MÈTODES**

Amb la finalitat de respondre els objectius plantejats, s'han dut a terme quatre estudis. Tots els estudis es van realitzar seguint els paràmetres establerts per la declaració de Helsinki i els protocols dels estudis van ser aprovats pels comitès d'ètica dels respectius centres participants.

A continuació es detalla la metodologia utilitzada en cada estudi per poder respondre cada objectiu plantejat prèviament.

### **5.1. Mètodes estudi 1**

#### **5.1.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi**

Estudi observacional i transversal en el que s'han inclòs pacients diagnosticats de SNI secundària a NCM, GFS o NM per biòpsia renal del 2012 al 2018 en dos hospitals de tercer nivell.

Els criteris d'inclusió van ser: 1.-Debut de SNI i recollida de les mostres previ inici de qualsevol tipus de tractament (corticoesteroids, immunosupressors, antagonistes del receptor II de l'angiotensina, antagonistes del receptor de l'aldosterona i estatines). 2.- Disposar de diagnòstic histològic de NCM, GFS o NM. 3.- Absència de causes secundàries causants de la SN: consum de drogues d'abús i processos limfoproliferatius en malalts amb NCM; reducció de la massa renal, obesitat mòrbida, nefropatia associada a VIH, abús d'heroïna o cocaïna, infecció per parvovirus B-19, consum d'analgèsics, bifosfonats o interferó, reflux vesico-ureteral o apnea obstructiva del son en pacients amb GFS. 4.- Descartar SN d'origen genètic a tots els pacients que van presentar corticore resistència i eren menors de 35 anys, aquest es va realitzar utilitzant un panell genètic prèviament validat (Bullich G.et.al., 2018).

Es va incloure paral·lelament un grup control sa emparellat en edat i sexe d'una base de dades de 450 voluntaris de donants de sang.

De tots els pacients inclosos i del grup control es van recollir dades epidemiològiques, clíniques i bioquímiques i es van determinar els nivells en sèrum de suPAR i de varis marcadors d'activació endotel·lial (Factor de Von Willebrand, Syndecan, V-CAM i E-selectina).

### **5.1.2. Determinacions bioquímiques**

Les mesures de creatinina sèrica es van realitzar mitjançant assaig enzimàtic, traçable a l'espectrometria de masses amb dil·lució isotòpica (IDMS) (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Germany). La taxa de filtrat glomerular (TFG) estimada es va calcular mitjançant la fórmula CKD-EPI en adults i l'equació de Schwartz modificada en nens (Schwartz GJ. 2009). Les mesures de suPAR i dels marcadors endotelials es van realitzar mitjançant kits ELISA comercials: Human uPARQuantikineVR ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), syndecan-1 (Abcam, Cambridge, UK), VWF (antibodies-online GmbH, Aachen, Germany), VCAM-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) i E-selectin (Abcam, Cambridge, UK). La reproductibilitat de les mesures de suPAR va ser estudiada mitjançant l'anàlisi dels coeficients de variació del suPAR en 3 o més mostres obtingudes durant el brot nefròtic abans de l'inici del tractament en 11 pacients.

Per a la determinació dels nivells d'albúmina i colesterol total es van utilitzar els procediments estàndards de laboratori.

Considerant les complicacions vasculars, la trombosis venosa profunda de les extremitats inferiors va ser diagnosticada segons criteris clínics i confirmada posteriorment amb ecografia-doppler i la trombosis de vena renal es va diagnosticar per ecografia-doppler amb la sospita clínica i posteriorment es va confirmar per angiografia per tomografia computaritzada.

### **5.1.3. Estudi anatomopatològic**

Les mostres de teixit renal van ser tenyides amb hematoxilina-eosina, àcid periòdic-restactiu de Schiff i tricròmic de Masson per a l'anàlisi morfològic. La immunofluorescència es va realitzar utilitzant anticossos contra IgA, IgG, IgM, C3, fibrinogen i cadenes lleugeres i les tincions tenyides van ser posteriorment processades per a l'anàlisi de microscòpia electrònica. Les lesions de GFS van ser classificades d'acord els criteris d'Agati (D'Agati et.al., 2004). Totes les biòpsies van ser analitzades pel mateix equip de patòlegs i reconfirmat el seu diagnòstic histopatològic inicial.

### **5.1.4. Anàlisi estadístic**

Les variables quantitatives s'han expressat com a mitjanes  $\pm$  desviacions estàndard i les variables qualitatives com a proporcions. Es van comparar les diferències en les proporcions utilitzant els  $\chi^2$  test o la prova exacta de Fisher. Les diferències entre dues mitjanes van ser analitzades mitjançant la prova t de Student per les dades independents. Les diferències entre més de dues mitjanes van ser analitzades mitjançant l'anàlisi de variança. La correlació entre variables quantitatives va ser analitzada utilitzant el coeficient de correlació de Pearson. Per identificar les variables independents associades amb els nivells de suPAR i aquelles associades amb les diferents molècules endotelials, es va dur a terme un anàlisi de regressió única introduint les variables depenents després d'una transformació logarítmica. Totes les variables amb valors de p inferiors a 0.05 en l'anàlisi de regressió única van ser introduïdes en un anàlisi de regressió lineal múltiple. Es va considerar com estadísticament significatiu, tot valor de p <0.05. Els càlculs estadístics es van realitzar utilitzant el software SPSS 20.0.



## **5.2. Mètodes estudi 2**

### **5.2.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi**

Estudi observacional de tall transversal en el que es van incloure pacients amb SNI secundari a NCM, GFS o NM, diagnosticats entre el 2012 y 2019 en els serveis de Nefrologia de tres hospitals terciaris.

Els criteris d'inclusió dels pacients a l'estudi van ser: 1.-Debut de SNI i recollida de les mostres previ inici de qualsevol tipus de tractament (corticoesteroids, immunosupressors, antagonistes del receptor II de l'angiotensina, antagonistes del receptor de l'aldosterona i estatines). 2.- Disposar de diagnòstic histològic de NCM, GFS o NM. 3.- Absència de causes secundàries causants de la SN: consum de drogues d'abús i processos limfoproliferatius en malalts amb NCM; reducció de la massa renal, obesitat mòrbida, nefropatia associada a VIH, abús d'heroïna o cocaïna, infecció per parvovirus B-19, consum d'analgèsics, bifosfonats o interferó, reflux vesico-ureteral o apnea obstructiva del son en pacients amb GFS. 4.- Descartar SN d'origen genètic a tots els pacients que van presentar corticore resistència i eren menors de 35 anys, aquest es va realitzar utilitzant un panell genètic prèviament validat (Bullich G.et.al., 2018).

Tant el diagnòstic de la SN, com els criteris de resposta al tractament per classificar els malalts en corticosensibles com corticore sistents es van realitzar d'acord a les recomanacions indicades a les guies KDIGO (Eknoyan G. et.al. 2012).

Els pacients van ser comparats amb un grup control de 50 individus sans, emparellats en edat i sexe, seleccionats d'una base de dades electrònica en la que s'inclouen dades demogràfiques i es disposa d'un biobanc amb mostres de sèrum obtingudes de 450 donant de sang de voluntaris sans.

### **5.2.2. Determinacions bioquímiques**

La creatinina sèrica es va medir mitjançant un mètode compensat IDMS traçable (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Germany). La taxa de filtrat glomerular (TFG) estimada es va calcular mitjançant la fórmula CKD-EPI en adults i l'equació de Schwartz modificada en nens (Schwartz GJ. 2009). Les determinacions de Hx es van realitzar mitjançant nefelometria (Coulter Biotek, Berlin, Germany). El nivell de Hgl, IL-6, suPAR i sLL1R es van mesurar mitjançant ELISA (Quantikine R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA). El nivell de TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$ , es van mesurar utilitzant el sistema MILLIPIX<sup>®</sup> MAP (catalogue number HCYTOMAG-60K Millipore Corporation, Missouri, USA). Per analitzar la reproductibilitat de les mesures, en una mostra de 30 malalts, es van realitzar tres o més determinacions durant la fase de brot nefròtic previ a l'inici del tractament, apreciand-se coeficients de variació inferiors als 13% entre elles, per a totes les molècules estudiades.

### **5.2.3. Estudi anatomopatològic**

Les biòpsies van ser tenyides amb hematoxilina-eosina, PAS-meteanamina y tricròmic de Masson per l'anàlisi morfològic i es van realitzar estudis d'immunofluorescència amb anticossos en front a IgA, IgG, IgM, C3, fibrinògen i cadenes lleugeres i processades per estudi amb microscòpia electrònica. Totes les biòpsies van ser analitzades pel mateix equip de patòlegs i reconfirmat el seu diagnòstic histopatològic inicial.

### **5.2.4. Anàlisi estadístic**

Les variables quantitatives s'expressen com la mitjana  $\pm$  una desviació estàndard i les qualitatives com a proporció. Les comparacions de mitjanes entre grups per les dades independents es van realitzar mitjançant la prova de T de Student en el cas de dos mitjanes o l'anàlisi de varianza, amb la correcció de Bonferroni, en el cas de més de dos mitjanes. La comparació entre variables categòriques es va realitzar mitjançant la

prova de Khi-quadrat. L'associació entre variables quantitatives es va analitzar mitjançant el coeficient de correlació de Pearson. Després de classificar als malalts amb NCM o GFS en funció de la resposta al tractament amb corticosteroides, es va realitzar, en primer lloc, un anàlisi univariat per analitzar les diferències entre ambdós grups i, en segon lloc, amb les variables quantitatives en les que es van apreciar diferències significatives en funció de la resposta al tractament, es va realitzar un anàlisi mitjançant corbes ROC, utilitzant l'índex de Youden per a la selecció del valor de referència òptim (Youden W.J.et. al. 1950). Finalment, es va realitzar un anàlisi de regressió logística pas a pas amb la introducció manual de variables, per identificar les variables independentment associades amb la resposta al tractament amb corticoesteroids. Per comparar els models logístics obtinguts, es van calcular l'índex de milloria de la discriminació (IDI) i l'índex de milloria de la reclassificació (NRI) (Pencina JM. et.al. 2008). Es va considerar significatiu tot valor de  $p < 0.05$ . Els càlculs estadístics es van realitzar utilitzant el programa SPSS versió 20.0.

### **5.3. Mètodes estudi 3**

#### **5.3.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi**

Estudi observacional que inclou pacients amb SNI secundària a GFS diagnosticats per biòpsia renal entre el 2012 i el 2019 de 5 hospitals terciaris de referència.

Els criteris d'inclusió per a l'estudi van ser: 1.- Pacients amb SN en brot secundari a GFS, confirmat per biòpsia renal. 2.- Absència d'etiologies secundàries seguint un estudi protocol·litzat: reducció de la massa renal, obesitat mòrbida, nefropatia associada a VIH, abús d'heroïna o cocaïna, infecció per parvovirus B-19, consum d'analgèsics, bifosfonats o interferó, reflux vesico-ureteral o apnea obstructiva del son. 3.- Absència d'història familiar de nefropatia i 4.- Absència d'inici de tractaments amb

corticosteroides, immunosupressors, bloquejadors del receptor de la angiotensina II o estatines en el moment de la presa de mostres de sang i d'orina.

Els pacients amb glomerulopatia esclerosant van ser exclosos.

La definició de SNI així com els criteris de seguiment de resposta al tractament s'ha realitzat d'acord les recomanacions de les guies KDIGO 2012 (Eknoyan G. et.al. 2012).

### **5.3.2. Determinacions bioquímiques**

Els nivells de creatinina sèrica es van mesurar pel mètode compensat de IDMS-traçablem (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Germany). La taxa de filtrat glomerular (TFG) estimada es va calcular mitjançant la fórmula CKD-EPI en adults i l'equació de Schwartz modificada en nens (Schwartz GJ. 2009). Les determinacions de Hx i Hgl es van realitzar mitjançant nefelometria (Coulter Biotek, Berlin, Germany). El CD80 urinari es va mesurar mitjançant ELISA (Human CD80 ELISA Kit (B7-1) (ab256392), Cambridge, UK). Els nivells sèrics de IL-6 i suPAR van ser mesurats per ELISA (Quantikine R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA). El nivell de TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$ , IL-17, IL-12 i IL-23, van ser mesurats utilitzant el MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP system (catalog number HCYTOMAG-60K Millipore Corporation, Missouri, USA). Els subtipus de cèl·lules T helper i T reguladores van ser analitzats de mostres de sang perifèrica. Les cèl·lules van ser incubades amb anticossos monoclonals conjugats amb diferents fluorocroms, a la dilució i concentració corresponents, i van ser analitzats per citometria de fluxe (FACSCanto, Becton Dickinson, San Jose, Ca, USA) utilitzant els següents anticossos monoclonals: anti CD3, anti CD4, anti CXCR3, anti CCR4, anti CCR6, anti CD25, anti hCD127, anti FoxP3 i anti CD45RO (FACSCanto, Becton Dickinson, San Jose, Ca, USA).

Els subtipus de cèl·lules T helper i T reguladores van ser definits d'acord amb els patrons de tinció per citometria de flux multicanal (Duhén et.al. 2012; Mahnke, Y. et al. 2013).

Th1	CD3+ CD4+ CXCR3+ CCR6-
Th2	CD3+ CD4+ CXCR4+ CCR6-
Th17	CD3+ CD4+ CXCR4+ CCR6+
Th1-17	CD3+ CD4+ CXCR3+ CCR6+
T regs	CD4+ CD25+ hCD127- CD45RO+ CCR4+ Foxp3+

### 5.3.3. Estudi anatomopatològic

Les biòpsies van ser tenyides amb hematoxilina-eosina, PAS-meteanamina y tricròmic de Masson per l'anàlisi morfològic i es van realitzar estudis d'immunofluorescència amb anticossos en front a IgA, IgG, IgM, C3, fibrinògen i cadenes lleugeres i processades per estudi amb microscòpia electrònica. Totes les biòpsies van ser analitzades pel mateix equip de patòlegs i reconfirmat el seu diagnòstic histopatològic inicial.

### 5.3.4. Anàlisi estadístic

Les variables quantitatives s'han expressat com a mitjanes  $\pm$  desviació estàndard. Per a les variables dicotòmiques, es va realitzar un test de Khi-quadrat per determinar la diferència entre grups. La distribució de les dades va ser testada per la normalitat utilitzant el test de Kolmogorov-Smirnov o el test de Shapiro-Wilk. L'anàlisi de variances es va utilitzar per avaluar la variabilitat significativa entre més de dos grups i la prova T-student de dues cues no aparellada per a les comparacions entre grups. Es va considerar significació estadística tota  $p < 0.05$ , ajustada per la correcció de Bonferroni per a comparacions múltiples. Es van analitzar 23 variables diferents relacionades amb la resposta inflamatòria, nivells d'interleuquines i polarització de les cèl·lules T helper.

Es va realitzar un anàlisi per components principals incloent totes les variables i vam retenir els components significatius amb un valor propi  $\geq 1$ .

Per l'anàlisi de clúster, les variables contínues van ser estandarditzades utilitzant els z scores. Es va realitzar una rotació ortogonal amb la normalització de Kaiser i únicament les variables amb càrregues superiors a 0.4 es van conservar. Posteriorment, els pacients es van distribuir en grups utilitzant l'algoritme K-means basat en la relació de correlació i l'anàlisi mixta dels components principals. El nombre òptim de clústers va ser determinat pel paquet programari de NbClust in R. La imputació dels valors que faltaven es va realitzar amb el mètode k-Nearest Neighbour i la regressió iterativa robusta utilitzant el programari VIM. Es van descartar aquells pacients amb >10% amb falta de dades. Després de classificar els pacients d'acord a la seva resposta al tractament amb corticosteroides, es va realitzar un anàlisi univariat per analitzar les diferències entre els dos grups. Els valors de tall de les variables quantitatives associades amb la resposta al tractament van ser calculades amb les corbes ROC, utilitzant l'índex de Youden per seleccionar el valor òptim. La relació entre la resposta als corticosteroides i el tipus de clúster es va analitzar mitjançant el test de Khi-quadrat.

## **5.4. Mètodes estudi 4**

### **5.4.1. Selecció de pacients i disseny de l'estudi**

Estudi de cohort retrospectiu multicèntric. S'han inclòs pacients pediàtrics i adults amb SNI secundari a NCM diagnosticats per biòpsia renal entre el 2003 i 2019 en quatre hospitals de tercer nivell de referència.

Els criteris d'inclusió per a l'estudi van ser: 1.- Pacients amb SNI secundaria a NCM confirmada per biòpsia renal. 2.- Absència d'etiologies secundàries seguint un estudi protocol·litzat: consum de drogues d'abús i processos limfoproliferatius. 3.- Absència

d'història familiar de nefropatia i 4.-Absència d'inici de tractaments amb corticosteroides, immunosupressors, bloquejadors del receptor de la angiotensina II o estatines en el moment de la presa de mostres de sang i d'orina en el debut de la SNI. Es van recollir dades demogràfiques, clíniques i bioquímiques del moment del diagnòstic del SNI i del moment actual. Es van recollir les indicacions per la pràctica de biòpsia renal, el tractament de primera línia utilitzat incloent la dosi i el temps de durada de la corticoteràpia, la resposta al tractament amb corticoides, el temps de seguiment des del diagnòstic i l'evolució de la funció renal durant aquest període. Es van revisar els arxius dels departaments d'anatomia patològica o biobancs de cada centre participant, per conèixer la disponibilitat de blocs de parafina de les biòpsies renals per als estudis immunohistoquímics.

La definició de SNI així com els criteris de seguiment de resposta al tractament, es van realitzar d'acord les recomanacions de les guies KDIGO 2012 (Eknoyan G. et.al. 2012). Es van enregistrar els pacients que van evolucionar a malaltia renal crònica moderada o severa (estadis 3-5) definida per  $TFG < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$  durant més de 3 mesos, d'acord les definicions de les guies KDIGO (Eknoyan G. et.al. 2013).

#### **5.4.2. Determinacions bioquímiques**

Els nivells de creatinina sèrica es van mesurar pel mètode compensat de IDMS-traçablem (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Germany). La taxa de filtrat glomerular (TFG) estimada es va calcular mitjançant la fórmula CKD-EPI en adults i l'equació de Schwartz modificada en nens (Schwartz GJ. 2009). En els pacients pediàtrics la proteïnúria es va enregistrar en Q proteïna/creatinina (mg/mg) i en adults es va enregistrar com a gr/24h.

### **5.4.3. Estudi anatomopatològic**

Totes les biòpsies renals es van centralitzar al mateix centre (Hospital Arnau de Vilanova) i van ser analitzades pel mateix equip d'anatomo-patòlegs i reconfirmat el seu diagnòstic histopatològic inicial. Les biòpsies renals van ser tenyides amb hematoxilina i eosina, PAS i tricròmic de Masson per l'anàlisi morfològic i els estudis d'immunofluorescència es van dur a terme amb anticossos envers IgA, IgG, IgM, C3, fibrinògen i cadenes lleugeres i van ser processat per a l'estudi de microscòpia electrònica.

Dels blocs de teixit renal inclosos en parafina i fixats amb formalina (FFPE) es van prendre mostres amb seccions de 3µm de gruix, assecats durant 1h a 65° abans del procediment de pre-tractament de desparaffinització, rehidratació i recuperació d'epítops en el Mòdul de Pre-Tractament, PT-LINK (Agilent Technologies-DAKO, Santa Clara, United States) a 95°C durant 20 min a 50x Tris/EDTA buffer, pH 9. Abans de tenyir les seccions, es va fixar peroxidasa endògena. L'anticòs utilitzat pel marcatge de CD44 va ser (dilució 1:100, clone 156-3C11, ABCAM, Cambridge, UK). Després de la incubació amb l'anticò primari, la reacció es va visualitzar amb EnVision™ FLEX Detection Kit (Agilent Technologies-DAKO, Santa Clara, United States) utilitzant cromogen de diaminobenzidina com a substrat. Les seccions es van contratenyir amb hematoxilina. També es van analitzar controls negatius que no incloessin cap anticòs primari.

### **5.4.4. Anàlisi estadístic**

Les variables quantitatives es van expressar com a mitjanes  $\pm 1$  desviació estàndar i les variables qualitatives es van expressar com a proporcions. Les diferències entre les dues mitjanes es van analitzar mitjançant el test T-Student per a les dades independents. Les comparacions entre les proporcions es van realitzar mitjançant el



test de Khi-quadrat o el test exacte de Fischer. Es va realitzar un anàlisi de regressió logística per estudiar l'associació entre la tinció per CD44 de les PECs i la resposta a la corticoteràpia. Es van realitzar anàlisis de riscos proporcionals De Kaplan-Meier i Cox per avaluar l'associació entre la tinció C44 i l'evolució a malaltia renal crònica moderada/severa. Un valor de  $p < 0.05$  va ser considerat com a estadísticament significatiu. Els càlculs estadístics es van dur a terme utilitzar el software SPSS 20.0.

## **6. RESULTATS**

Els resultats que s'exposen a continuació estan agrupats en funció de cada estudi que respon a un dels objectius plantejats prèviament.

### **6.1. Estudi 1**

#### **6.1.1. Característiques de la població estudiada**

El grup d'estudi consta de 152 pacients amb SNI secundària a GFS (n=49; 32%), NCM (n=57; 38%) o NM (n=46; 30%). La taula 1 resumeix les característiques demogràfiques, clíniques i bioquímiques dels pacients inclosos a l'estudi i dels 50 controls sans seleccionats. No es van observar diferències en edat i sexe entre els diferents grups. Tampoc es van trobar diferències significatives amb la TFG entre els diferents grups, excepte en els pacients amb NCM que presentaven TFG majors respecte aquells amb GFS. 16 pacients (10.5%) van desenvolupar trombosi venosa independentment del diagnòstic histològic. Considerant les característiques bioquímiques, els pacients amb NCM van presentar majors nivells d'albumina que aquells amb GFS i NM, mentre que els pacients amb NM van presentar uns nivells de proteïnúria significativament majors que la resta de dos grups de pacients.

En comparació amb el grup control, els pacients amb GFS van presentar majors nivells de FvW, els pacients amb NCM i GFS majors nivells de suPAR i tots els grups de malalts nivells significativament majors de VCAM-1, E-selectina i Syndecan-1. Els nivells de suPAR i marcadors endotelials van ser molt variables segons el grup; no obstant això, es van trobar diferències significatives per a tots ells, excepte per FvW. En particular, els nivells de VCAM-1 van ser majors en els pacients amb GFS respecte aquells amb NCM i els nivells de E-selectina van ser majors en els pacients amb GFS respecte els altres dos grups. Els nivells de Syndecan-1 van ser menors en pacients amb NM en comparació amb els altres dos grups i els nivells de suPAR van ser menors en els pacients amb NM en comparació amb aquells amb GFS.

Taula 1

	GFS (N=49)	NCM (N=57)	NM (N=46)	Controls (N=50)	p1	p2	p3	p4	p5	p6
<b>Característiques demogràfiques</b>										
Edat (anys), <i>mitjana (IQ 25-75)</i>	50.3 (14-65)	48.4 (13-61)	45.5 (29-79)	46.4 (16-78)	0.600	0.300	0.500	0.400	0.600	0.800
Sexe masculí, No. (%)	38 (22.4)	54 (94.7)	16 (34.8)	27 (54)	0.879			0.691		
<b>Característiques clíniques</b>										
Trombosi venosa, No. (%)	6 (12.2)	4 (7.0)	6 (13.0)	0 (0.0)	0.070	0.070	0.070	-	-	-
TFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ), <i>mean (SD)</i>	90.5 (24.7)	102.5 (16.4)	94.4 (15.5)	94.1 (16.7)	<b>0.049</b>	1.000	0.590	1.000	0.320	1.000
<b>Característiques bioquímiques</b>										
Proteïnúria (g/dL), <i>mitjana (SD)</i>	7.4 (3.2)	6.4 (3.0)	8.0 (3.3)	0.0 (0.0)	<b>0.000</b>	<b>0.005</b>	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>	0.376	<b>0.000</b>
Albúmina (g/dL), <i>mitjana (SD)</i>	2.3 (0.4)	2.6 (0.6)	2.2 (0.5)	4.4 (0.2)	<b>0.002</b>	0.317	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Colesterol (mg/dL), <i>mitjana (SD)</i>	339.2 (140.4)	305.0 (52.6)	336.3 (22.6)	159 (38.8)	<b>0.025</b>	0.853	<b>0.043</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
suPAR (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	4347.5 (1734.0)	3905.3 (1547.3)	3726.7 (1467.2)	3160.1 (1234.0)	0.130	<b>0.046</b>	0.500	<b>0.000</b>	<b>0.011</b>	0.067
FvW (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	175.4 (79.3)	180.4 (45.7)	185.8 (43.3)	50.8 (31.6)	0.800	0.270	1.000	<b>0.001</b>	0.069	0.404
VCAM-1 (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	173.5 (135.4)	118.4 (98.3)	159.0 (133.9)	36.0 (16.4)	<b>0.009</b>	0.509	0.560	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
E-selectina (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	47.5 (13.0)	33.8 (15.4)	33.2 (15.4)	16.6 (11.7)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.835	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Syndecan-1 (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	198 (21.5)	197.8 (34.1)	176.3 (25.2)	38.9 (15.7)	0.960	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

p1: GFS vs.NCM; p2: GFS vs. NM; p3: NCM vs. NM; p4: GFS vs. controls; p5: NCM vs. controls; p6: NM vs. controls.

GFS: Glomeruloesclerosi focal i segmentària; NCM: nefropatia per canvis mínims; NM: nefropatia membranosa; TFG: taxa de filtrat glomerular; suPAR: receptor soluble de la urokinasa; FvW: factor de Von Willebrand; VCAM-1: molécula de citoadhesió vascular-1

Quan es van comparar els pacients que van presentar com a complicació una trombosi venosa profunda de la resta, es van objectivar diferències significatives a nivells de l'albumina sèrica, FvW i VCAM-1: els pacients amb trombosi venosa profunda van presentar uns nivells d'albumina inferiors i uns nivells sèrics de FvW i VCAM-1 majors que els pacients sense trombosi venosa profunda, veure la següent taula.

**Taula 2**

	<b>Trombosi venosa (N=16)</b>	<b>No trombosi venosa (N=136)</b>	<b>P</b>
<b>Característiques demogràfiques</b>			
Edat (anys), <i>mitjana (SD)</i>	49.1 (21.7)	48.1 (21.7)	0.864
Sexe, No. (%)			
Masculí	7 (43.7)	101 (74.3)	0.314
Femení	9 (56.3)	35 (25.7)	
<b>Característiques clíniques</b>			
TFG (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ), <i>mitjana (SD)</i>	87.2 (21.4)	94.7 (24.7)	0.248
<b>Característiques bioquímiques</b>			
Proteïnúria (g/dL), <i>mitjana (SD)</i>	8.1 (2.5)	7.1 (3.3)	0.236
Albumina (g/dL), <i>mitjana (SD)</i>	2.0 (0.3)	2.4 (0.6)	<b>0.003</b>
Colesterol (mg/dL), <i>mitjana (SD)</i>	332.3 (64.7)	324.6 (89.7)	0.740
suPAR (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	4192.7 (1672.2)	3970.4 (1592.8)	0.600
FvW (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	238.9 (84.8)	173.5 (50.0)	<b>0.000</b>
VCAM-1 (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	206.0 (142.6)	141.7 (120.3)	<b>0.049</b>
E-selectina (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	42.5 (15.1)	37.5 (16.0)	0.235
Syndecan-1 (ng/mL), <i>mitjana (SD)</i>	202.9 (37.2)	190 (28.3)	0.098

TFG: taxa de filtrat glomerular; suPAR: receptor soluble de la urokinasa; FvW: factor de Von Willebrand; VCAM-1: molécula de citoadhesió vascular-1

### 6.1.2. Relació entre les variables demogràfiques, clíniques i bioquímiques

A continuació en la Taula 3 es resumeixen les correlacions entre edat, TFG i nivells de totes les variables bioquímiques estudiades. Els nivells de suPAR es van correlacionar de forma positiva amb l'edat i el nivell sèric de tots els marcadors d'activació endotelial excepte E-selectina i de forma negativa amb la TFG. Les mol·lècules endotelials van mostrar una correlació positiva entre elles, excepte E-selectina i FvW i van presentar una correlació negativa amb l'albumina sèrica.

### Taula 3

Matriu de correlació entre les variables dels pacients amb SNI

	Edat	suPAR	FvW	VCAM-1	E-selectina	Syndecan-1	Colesterol	Albúmina	TFG
<b>suPAR</b>	0.31**								
<b>FvW</b>	0.05	0.39**							
<b>VCAM-1</b>	0.26**	0.43**	0.38**						
<b>E-selectina</b>	0.12	0.03	0.05	0.24**					
<b>Syndecan-1</b>	0.08	0.29**	0.29**	0.33**	0.33**				
<b>Colesterol</b>	0.11	-0.23	0.103	0.11	0.18*	0.12			
<b>Albúmina</b>	0.12	0.04	-0.23**	-0.25**	-0.39**	-0.09	-0.34**		
<b>TFG</b>	-0.17*	-0.39**	-0.11	-0.13	-0.08	-0.07	0.18	-0.16	
<b>Proteïnúria</b>	-0.02	0.08	-0.12	0.001	0.11	-0.11	0.23**	-0.41	-0.13

\*p<0.05; \*\*p<0.01

TFG: taxa de filtrat glomerular; suPAR: receptor soluble de la urokinasa; FvW: factor de Von Willebrand; VCAM-1: molécula de citoadhesión vascular-1

La taula 4 mostra els resultats de l'anàlisi multivariat dels factors demogràfics, clínics i bioquímics que poden predir potencialment dels nivells sèrics de marcadors endotelials i suPAR, només les variables amb una aportació significativa a cada model. Tots els models van trobar de forma significativa associació entre els nivells sèrics de totes les mol·lecules analitzades i almenys dos factors, incloent Syndecan-1, E-selectina, proteïnúria i nivells de suPAR; entre E-selectina i VCAM-1 i l'edat, l'albúmina sèrica i GFS=1; i entre FvW i edat, albúmina sèrics i TFG. El model de regressió múltiple també va mostrar una associació entre els nivells de suPAR i TFG, edat i FvW, Syndecan-1 i VCAM-1, explicant 37.6% de la variabilitat en els nivells de suPAR circulants.

## Taula 4

Model de regressió múltiple per predir els nivells de suPAR i els biomarcadors.

Variables dependents	Predictors independents	$\beta$	t	Sig.	R <sup>2</sup>
Log suPAR	TFG	-0.005	-5.2	0.000	0.376
	Edat	0.003	2.37	0.019	
	FvW	0.001	2.372	0.019	
	Syndecan-1	0.002	2.106	0.037	
	VCAM-1	0.001	3.212	0.002	
Log FvW	TFG	-0.24	-3.04	0.003	0.100
	Albúmina	-0.29	-3.65	0.001	
	Edat	0.19	1.99	0.048	
Log VCAM-1	GFS=1	0.18	2.16	0.032	0.100
	Albúmina	-0.15	-1.98	0.049	
	Edat	0.24	2.9	0.005	
Log E-selectina	GFS=1	0.39	5.8	0.000	0.190
	Albúmina	-0.43	-5.6	0.000	
	Edat	0.16	2.3	0.027	
Log Syndecan-1	E-selectina	0.329	4.48	0.000	0.210
	Proteïnúria	-0.149	-1.99	0.048	
	suPAR	0.213	2.67	0.008	

TFG: taxa de filtrat glomerular; suPAR: receptor soluble de la urokinasa; FvW: factor de Von Willebrand; VCAM-1: molécula de citoadhesió vascular-1; GFS: glomeruloesclerosi focal i segmentària

## 6.2. Estudi 2

### 6.2.1. Característiques de la població estudiada

El grup d'estudi va ser de 101 pacients, es van classificar en tres grups segons els seu patró histològic: 44 NCM, 33 GFS i 24 NM, d'aquests 20% eren pediàtrics i 80% tenien >18 anys. Inicialment, es van reclutar 133 pacients (53 NCM, 46 GFS i 34 NM), dels quals 32 es van excloure per les següents raons: 18 pacients havien rebut tractament previ amb corticoids, immunosupressors, antagonistes del receptor de l'angiotensina II, antagonistes de l'aldosterona o estatines, 5 pacients no van donar el seu consentiment per escrit, 5 pacients es van perdre durant el seguiment i 4 pacients van ser exclosos perquè eren portadors de mutacions patogèniques en gens que codifiquen per proteïnes de la barrera de filtració glomerular (NPHS2 n:1, col·làgen IV $\alpha$ 3 n:2 i LMB1X n:1).

Es va incloure també un grup control de 50 individus sans.

La taula 5 es resumeixen les característiques demogràfiques, clíniques i bioquímiques dels pacients inclosos a l'estudi i del grup control. No es van observar diferències en edat, sexe, TFG, albúmina sèrica o proteïnúria entre els tres grups de malalts. Els pacients amb GFS van presentar nivells de PCR majors respecte els malalts amb NM. Els nivells d'IL-6 van ser significativament majors en pacients amb NCM en comparació amb aquells amb NM. Els nivells de Hx, Hgl i TNF $\alpha$  van ser majors en els malalts amb NCM i GFS en comparació amb els malalts amb NM, sense objectivar diferències significatives entre els dos primers grups. En els tres grups de malalts amb SNI, els nivells de Hx, Hgl, TNF $\alpha$  i IL-6 van ser significativament majors que en els controls sans. Els nivells de suPAR van ser inferiors en controls sans en comparació amb els pacients amb NCM i GFS. Els nivells de sIL1R i IFN $\gamma$  van ser similars en els tres grups de malalts i no van mostrar diferències significatives al comparar-los amb el grup control.

**Taula 5**

	<b>NCM</b> (N=44)	<b>GFS</b> (N=33)	<b>NM</b> (N=24)	<b>Controls</b> (N=50)	<b>p1</b>	<b>p2</b>	<b>p3</b>	<b>p4</b>	<b>p5</b>	<b>p6</b>
<b>Característiques demogràfiques</b>										
Edat (anys), <i>mitjana (IQ 25-75)</i>	41.7 (15-67)	41.58 (17-70)	45.1 (22-75)	46.4 (16-75)	1	1	1	0.59	0.73	0.65
Sexe masculí, <i>N (%)</i> <i>mitjana (SD)</i>	27 (61.3)	18 (54.5)	13 (54.1)	27 (54)	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
<b>Característiques clíniques</b>										
Creatinina, (mg/dl) <i>mitjana (SD)</i>	0.97 (0.3)	1.78 (1.8)	1.32 (0.5)	0.7 (0.3)	<b>0.02</b>	0.61	0.754	0.58	<b>0.023</b>	<b>0.046</b>
TFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ) <i>mitjana (SD)</i>	96.3 (22.7)	86.3 (24.4)	85.42 (17.4)	94.1 (16.7)	0.27	0.227	1.000	0.45	0.06	0.07
<b>Característiques bioquímiques</b>										
Proteinúria (g/dL), <i>mitjana (SD)</i>	7.4 (3.2)	6.4 (3.0)	8.0 (3.3)	0.01 (0.1)	0.76	0.87	0.69	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Albúmina (g/dL), <i>mitjana (SD)</i>	2.3 (0.5)	2.5 (0.7)	2.5 (0.6)	4.4 (0.2)	0.504	0.688	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
PCR (mg/dL), <i>mitjana (SD)</i>	0.8 (0.6)	0.5 (0.5)	0.2 (0.1)	0.1 (0.03)	0.47	0.29	<b>0.04</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
sIL1R (pg/mL), <i>mitjana (SD)</i>	1894 (710)	2437 (1375)	1772 (808)	1559 (926)	0.200	1.000	0.126	0.39	0.19	0.34
IL-6 (pg/mL), <i>mitjana (SD)</i>	7.2 [0.9-10.3]	6.9 [0.4-9.8]	1.8 [0.6-2.1]	0 [0-1.6]	1.000	<b>0.031</b>	0.043	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Hx (mg/dl), <i>mitjana (SD)</i>	745 (479)	662 (556)	263 (128)	102 (38)	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.004</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Haptoglobina (mg/dl), <i>mitjana (SD)</i>	268.9 (128.6)	228.5 (121.1)	154 (41.2)	98 (51)	0.384	<b>0.000</b>	<b>0.043</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
TNFα (pg/ml), <i>mitjana (SD)</i>	7.8 (4.3)	8.4 (3.2)	4.7 (3.6)	4.62 (1.2)	1.000	<b>0.005</b>	<b>0.001</b>	<b>0.008</b>	<b>0.007</b>	<b>0.034</b>
IFNγ (pg/ml), <i>mitjana (SD)</i>	15.8 (8.8)	15.1 (9.1)	13.8 (7.2)	16.7 (5.1)	1.000	1.000	1.000	0.66	0.65	0.64
suPAR (ng/ml), <i>mitjana (SD)</i>	3915 (1216)	4135 (1522)	3236 (1055)	3160 (1234)	1.000	0.303	0.097	<b>0.028</b>	<b>0.041</b>	0.38

p1: NCM vs GFS; p2: NCM vs NM; p3: GFS vs NM; p4: NCM vs control; p5: GFS vs control; p6: NM vs control

TFG: taxa filtrat glomerular; PCR: proteïna C reactiva; sIL1R: receptor soluble de la IL1; Hx: hemopexina; TNFα: factor de necrosi tumoral

Alpha; IFNγ: interferó gamma; suPAR: receptor soluble de la urokinasa.



En la figura 1 de l'annex es mostra la distribució de les diferents mol·lècules analitzades en els pacients amb SNI i en el grup control.

Analitzant les associacions entre les variables estudiades, es van objectivar diferències segons el tipus de patró histopatològic, tal i com mostra en les següents taules.

En els pacients amb NCM, els nivells de Hx, Hgl, IL-6 i suPAR van estar significativament associats entre ells. Els nivells de PCR van estar associats amb Hx, Hgl i IL-6. Els nivells de sIL1R van estar associats amb la TFG i els nivells de TNF $\alpha$  i suPAR van associar-se amb la proteinúria. Els nivells de IFN $\gamma$  no van mostrar associacions amb cap de les variables analitzades. (Veure taula 6)

En els malalts amb GFS, els nivells de Hx, Hgl, PCR i IL-6 es van associar entre ells. Els nivells de Hx estaven també associats de forma positiva amb suPAR i de forma negativa amb IFN $\gamma$ . Els nivells de sIL1R estaven associats amb la TFG. Els nivells de TNF $\alpha$  no van presentar associacions amb cap de les variables analitzades (Veure taula 7).

En els malalts amb NM, els nivells de Hx i Hgl estaven associats entre ells però no amb els nivells de IL-6 o suPAR. Els nivells de Hgl estaven associats amb els de TNF $\alpha$ . Els nivells de sIL1R estaven associats amb la TFG i amb els nivells de suPAR. El IFN $\gamma$  no va mostrar associació significativa amb cap de les variables analitzades (Veure taula 8).

## Taula 6

Matriu de correlacions entre les variables dels pacients amb NCM. .\*p<0.05; \*\*p<0.01

	Edat	creatinina	TFG	Albúmina	Proteinúria	suPAR	Hgl	Hx	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL1R	IL6
<b>Creatinina</b>	0.32											
<b>TFG</b>	-0.84**	-0.76**										
<b>Albúmina</b>	0.01	-0.03	0.06									
<b>Proteinúria</b>	0.07	0.02	-0.01	0.33								
<b>suPAR</b>	0.38*	0.22	-0.38*	-0.26	0.38*							
<b>Hgl</b>	0.05	0.08	-0.06	-0.39*	0.25	0.40*						
<b>Hx</b>	-0.09	-0.01	0.07	-0.42*	0.33	0.49**	0.82**					
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0.07	-0.01	-0.037	-0.19	0.40*	-0.26	0.02	0.09				
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	-0.07	-0.04	0.018	-0.10	-0.35	-0.18	-0.11	0.05	0.18			
<b>siL1R</b>	0.38	0.49**	-0.54	0.14	-0.09	0.27	0.19	0.09	-0.10	-0.01		
<b>IL6</b>	-0.35	-0.28	0.46	0.07	0.15	-0.09	0.45*	0.49**	0.10	-0.01	-0.33	
<b>PCR</b>	0.09	0.07	0.04	-0.16	0.19	0.13	0.36*	0.35*	0.17	0.04	0.28	0.41*

\*p<0.05; \*\*p<0.01

TFG: taxa filtrat glomerular; PCR: proteïna C reactiva; siL1R: receptor soluble de la IL1; Hx: hemopexina; Hgl: haptoglobina; TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral Alpha; IFN $\gamma$ : interferó gamma; suPAR: receptor soluble de la urokinasa.

## Taula 7

Matriu de correlacions entre les variables dels pacients amb GFS. .\*p<0.05; \*\*p<0.01

	Edat	Creatinina	TFG	Albúmina	Proteinúria	suPAR	Hgl	Hx	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	siL1R	IL6
<b>Creatinina</b>	-0.11											
<b>TFG</b>	-0.53**	-0.61**										
<b>Albúmina</b>	-0.06	0.29	-0.21									
<b>Proteinúria</b>	0.02	-0.16	0.26	-0.23								
<b>suPAR</b>	-0.04	0.36	-0.21	-0.26	0.18							
<b>Hgl</b>	0.26	-0.09	-0.10	-0.40*	0.21	0.31						
<b>Hx</b>	0.27	-0.19	0.01	-0.43*	0.27	0.43*	0.86**					
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-0.05	-0.01	-0.06	-0.20	0.03	0.08	0.07	-0.03				
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	0.12	-0.08	-0.10	-0.13	-0.09	-0.09	-0.36	-0.38*	-0.15			
<b>siL1R</b>	0.23	0.58**	-0.54*	0.024	-0.17	-0.11	-0.02	-0.21	0.35	0.28		
<b>IL6</b>	0.15	-0.16	0.03	-0.27	0.11	0.35	0.70**	0.79**	-0.13	-0.39*	-0.16	
<b>PCR</b>	0.12	0.04	0.07	-0.29	0.16	0.12	0.34*	0.39*	0.09	-0.08	0.14	0.40*

\*p<0.05; \*\*p<0.01

TFG: taxa filtrat glomerular; PCR: proteïna C reactiva; siL1R: receptor soluble de la IL1; Hx: hemopexina; Hgl: haptoglobina; TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral Alpha; IFN $\gamma$ : interferó gamma; suPAR: receptor soluble de la urokinasa.

## Taula 8

Matriu de correlacions entre les variables dels pacients amb NM. . \*p<0.05; \*\*p<0.01

	Edat	Creatinina	TFG	Albúmina	Proteinúria	suPAR	Hgl	Hx	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	sIL1R	IL6
<b>Creatinina</b>	0.19											
<b>TFG</b>	-0.57**	-0.87**										
<b>Albúmina</b>	-0.04	0.24	-0.31									
<b>Proteinúria</b>	0.33	-0.11	-0.12	-0.34								
<b>suPAR</b>	0.38	0.39	-0.42	-0.16	-0.06							
<b>Hgl</b>	-0.11	-0.19	0.20	-0.19	0.39	0.05						
<b>Hx</b>	-0.22	-0.16	0.38	-0.23	0.11	0.16	0.47*					
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-0.03	-0.18	0.17	-0.42*	0.24	0.53*	0.57**	0.29				
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	0.25	-0.07	-0.07	-0.15	0.09	0.08	0.33	0.03	-0.03			
<b>sIL1R</b>	0.36	0.35	-0.55*	-0.42*	-0.07	0.55*	-0.04	-0.39	0.11	0.11		
<b>IL6</b>	0.29	0.05	-0.23	-0.37	-0.09	0.11	-0.26	-0.38	-0.02	-0.22	0.16	
<b>PCR</b>	0.09	0.03	-0.04	-0.14	-0.06	0.03	0.12	0.13	0.05	0.06	0.09	0.11

\*p<0.05; \*\*p<0.01

TFG: taxa filtrat glomerular; PCR: proteïna C reactiva; sIL1R: receptor soluble de la IL1; Hx: hemopexina; Hgl: haptoglobina; TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral Alpha; IFN $\gamma$ : interferó gamma; suPAR: receptor soluble de la urokinasa.

6.2.2. **Variables associades a la resposta de corticosteroides en pacients amb NCM i GFS**

De tots els pacients 27 (35%) van presentar corticoresistència. En l'anàlisi univariat, les variables associades a corticoresistència van ser: el patró histopatològic (GFS: 17/33 (51.5%) vs NCM 10/44 (22.7%),  $p=0.008$ ) i els nivells d'albumina, IL-6, Hx i Hgl. Els nivells de PCR, TNF $\alpha$ , suPAR, IFN $\gamma$  i sIL1R no es van associar a corticoresistència. A continuació s'exposa la taula comparativa entre els pacients amb NCM i GFS segons la seva resposta als corticoides.

**Taula 9**

<b>Variables</b>	<b>Corticosenibles n=50</b>	<b>Corticoresistents n=27</b>	<b>p</b>
<b>Edat (anys)</b>	39.8 $\pm$ 19.2	45.3 $\pm$ 18.2	0.22
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	1.35 $\pm$ 1.5	1.10 $\pm$ 0.4	0.40
<b>TFG (ml/min/1.73 m<sup>2</sup>)</b>	92.8 $\pm$ 23.9	87.3 $\pm$ 24	0.46
<b>Proteinúria (g/d)</b>	10.1 $\pm$ 3.8	11.2 $\pm$ 2.7	0.78
<b>Albumina (gr/dl)</b>	2.6 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 0.5	<b>0.003</b>
<b>sIL1R (pg/ml)</b>	2122.9 $\pm$ 1110	2133.9 $\pm$ 976.9	0.97
<b>IL6 (pg/ml)</b>	5.6 [0.6 – 9.1]	9.4 [0.3 – 23.5]	<b>0.03</b>
<b>Hx (mg/ml)</b>	54.9 $\pm$ 47.4	106.1 $\pm$ 41.7	<b>0.000</b>
<b>Hgl (mg/dl)</b>	208.7 $\pm$ 101.1	344.1 $\pm$ 127.8	<b>0.000</b>
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	7.8 $\pm$ 3.4	8.7 $\pm$ 4.8	0.35
<b>IFN<math>\gamma</math> (pg/ml)</b>	16.2 $\pm$ 9.1	13.9 $\pm$ 8.4	0.31
<b>SuPAR (ng/ml)</b>	3856.9 $\pm$ 1312.1	4536.3 $\pm$ 1455.1	0.10
<b>PCR (mg/dl)</b>	0.82 ( 0.71)	0.96 ( 0.64)	0.49

TFG: taxa filtrat glomerular; PCR: proteïna C reactiva; sIL1R: receptor soluble de la IL1; Hx: hemopexina; Hgl: haptoglobina; TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral Alpha; IFN $\gamma$ : interferó gamma; suPAR: receptor soluble de la urokinasa.

Utilitzant les corbes ROC, els valors amb millor combinació de sensibilitat i especificitat per predir la corticoresistència, segons l'índex de Youden, van ser nivells de Hx  $\geq 112.5$  pg/ml, nivells de Hgl  $\geq 257.9$  mg/dl i nivells de IL-6  $\geq 11.6$  pg/mL. El model de regressió logística final obtingut després d'una selecció directa de variables, va incloure la GFS així com els nivells de Hx, Hgl i IL-6 com a predictors independents de corticoresistència. Quan es va afegir el subtipus de GFS en els models logístics, els tres biomarcadors van presentar una significació estadística similar com predictors de corticoresistència. La següent taula resumeix l'àrea sota la corba, l'IDI i el NRI dels models de regressió logística obtinguts per cada mol·lècula. Atès que l'associació entre els nivells de Hx, Hgl i IL-6 i la resistència als esteroides no era lineal, els nivells d'aquestes tres molècules es van introduir en els models logístics després de classificar-los en dues categories d'acord amb els valors dels punts de tall prèviament obtinguts en les corbes de ROC.

**Taula 10**

Models de regressió logística per predir la corticoresistència, l'IDI i el NRI utilitzant la Hx, Hgl i IL-6 a més de les variables histopatològiques

Variables	B	S.E.	OR (95% CI)	Sig.	AUC	P	IDI	P	NRI TOTAL	p	NRI R	p	NRI S	P
Model amb patró histològic														
GFS(1)	1.4	.5	4.2 (1.5 – 11.5)	.005	0.68 (0.06)	0.000								
Model amb patró histològic + nivells de Hx														
GFS(1)	2.1	.9	8.2 (1.3 – 50.3)	.022	0.78* (0.06)	0.000	0.17 ± 0.05	0.02	44.7 ± 0.2	0.033	40.7 ± 0.18	0.03	4 ± 0.09	0.8
Hemopexina	1.5	.6	7 (1.5 – 32.5)	.012										
Model amb patró histològic + nivells de Hgl														
GFS (1)	1.8	.8	6.2 (1.2 – 34.1)	.036	0.76* (0.57)	0.000	0.16 ± 0.06	0.03	43.1 ± 0.2	0.038	37.5 ± 0.19	0.04	6 ± 0.10	0.54
Haptoglobina	1.5	.6	4.2 (1.3 – 14)	.023										
Model amb patró histològic + nivells de IL-6														
GFS(1)	1.8	.7	6.3 (1.6 – 25.4)	.009	0.73* (0.58)	0.000	0.15 ± 0.03	0.04	51.6 ± 0.2	0.009	29.6 ± 0.17	0.08	22 ± 0.09	0.02
IL6	1.4	.6	4.1 (1.2 – 13.7)	.024										

GFS: glomeruloesclerosi focal i segmentària; IDI: Index de milloria en la discriminació i NRI: Index de milloria en la reclassificació

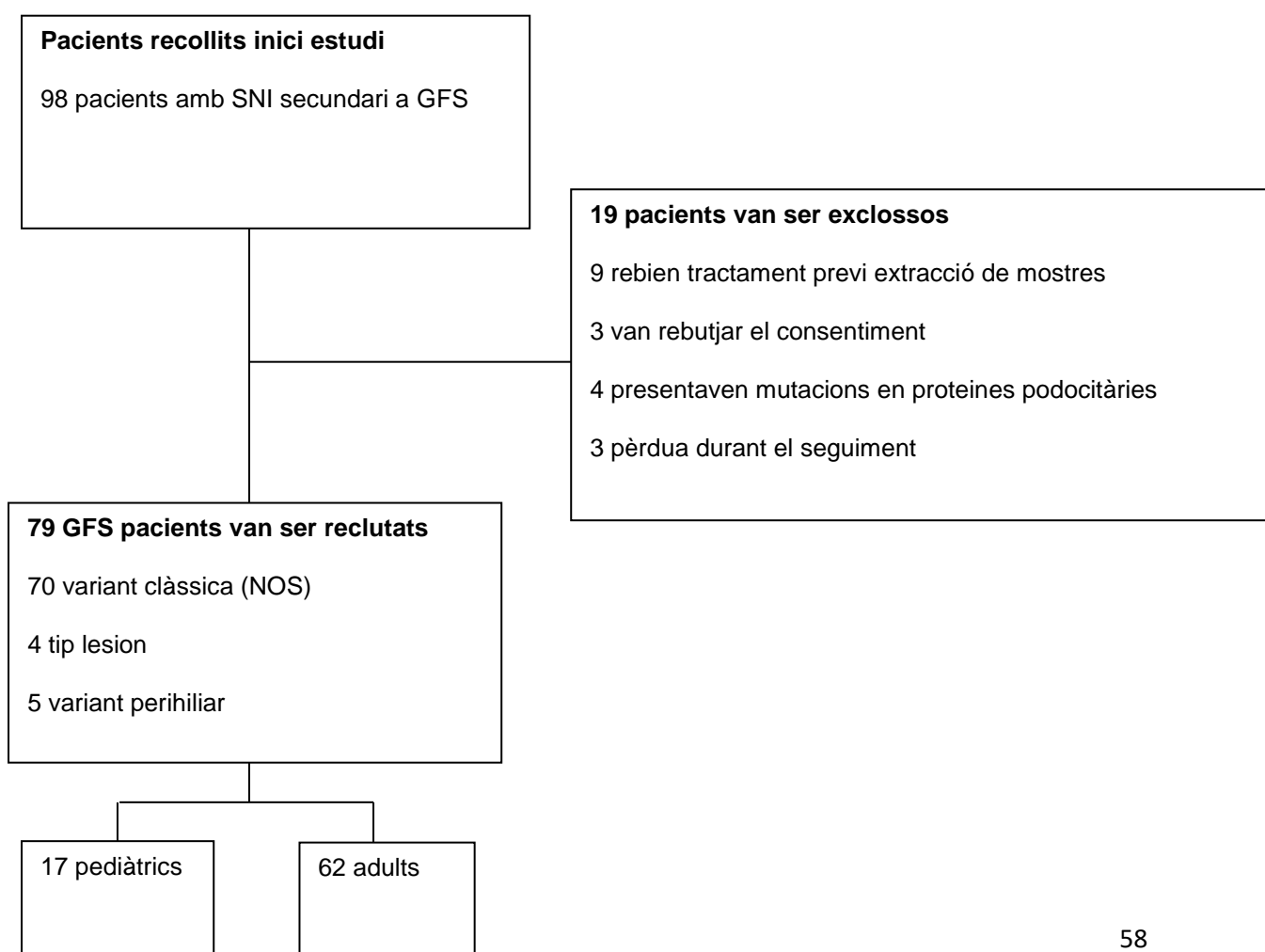
### 6.3. Estudi 3

#### 6.3.1. Diagrama de flux per a la selecció dels pacients

Inicialment es van recollir 98 pacients que complien els criteris d'inclusió mencionats prèviament, però 19 pacients (19.4%) van ser exclosos per les següents raons: 9 pacients (9.2%) van rebre tractament amb corticosteroids, immunosupressors, antagonistes del receptor de l'angiotensina II o l'aldosterona o estatines; 3 pacients (3%) no van donar el consentiment informat; 3 pacients (3%) van ser perduts durant el seguiment i 4 pacients (4%) eren portadors de mutacions patogèniques en gens codificadors per proteïnes de la membrana de filtració glomerular (NPHS2 n: 1, collagen IV $\alpha$ 3 n: 2 and LMB1X n: 1).

El grup d'estudi final va ser de 79 pacients, d'aquests 17 (21.5%) eren pediàtrics i 62 (71.5 %) eren adults (>18 anys).

**Figura 1**



### 6.3.2. Característiques clíniques i bioquímiques dels pacients

Les principals característiques clíniques i bioquímiques del grup d'estudi estan resumides a la següent taula:

**Taula 11**

<b>Variables</b>	<b>Pacients GFS n=79</b>
Edat [mitjana (SD)]. anys	37 (16.7)
Sexe: masculí. n (%)	37 (46.8)
Corticoresistència. n (%)	42 (53.2)
Creatinina [mitjana (SD)]. mg/dl	1.13 (0.4)
TFG [mitjana (SD)]. ml/min/1.73m <sup>2</sup>	89.9 (19.3)
Proteïnúria [mitjana (SD)]. g/dl	11.1 (3.7)
Albúmina [mitjana (SD)]. g/dl	2.4 (0.7)
Th1 [mitjana (SD)]. %	24.4 (5)
TNF $\alpha$ [mitjana (SD)]. pg/ml	11.2 (8.4)
IFN $\gamma$ [mitjana (SD)]. pg/ml	15.5 (9.4)
IL12 [mitjana (SD)]. pg/ml	639.3 (203)
Th2 [mitjana (SD)]. %	39.1 (12.6)
IL4 [mitjana (SD)]. pg/ml	5.1 (4.5)
IL5 [mitjana (SD)]. pg/ml	4.8 (2.9)
IL13 [mitjana (SD)]. pg/ml	5.6 (4.8)
IgE [mitjana (SD)]. g/dL	85.1 (73.9)
Th17 [mitjana (SD)]. %	11.1 (13.1)
Th1 Th17 [mitjana (SD)]. %	7.9 (5.3)
Treg [mitjana (SD)]. %	2.2 (1.1)
IL17 [mitjana (SD)]. pg/ml	17.1 (19.2)



IL23 [mitjana (SD)]. pg/ml	39.2 (16)
sIL1R [mitjana (SD)]. pg/ml	2361.6 (1220.1)
IL6 [mitjana (SD)]. pg/ml	10.1 (15.4)
Hemopexina [mitjana (SD)]. mg/ml	184.1 (172.7)
Haptoglobina [mitjana (SD)]. mg/dl	210.8 (159.1)
suPAR [mitjana (SD)]. ng/ml	3580.3 (1320.1)
uCD80 [mitjana (SD)]. ng/mg creat	47.7 (44.6)

TFG: taxa filtrat glomerularsIL1R: receptor soluble de la IL1; TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral Alpha; IFN $\gamma$ : interferó gamma; Treg: limfòcits T reguladors; suPAR: receptor soluble de la urokinasa; uCD80: excreció urinària de CD80

### 6.3.3. Anàlisi de components principals (PCA)

L'anàlisi de components principals (PCA) va identificar cinc components principals els quals representaven 73.1% de la variabilitat total. La **Taula 12** resumeix els resultats de la PCA i el percentatge de variabilitat que reprenten cadascun dels components I la **Taula 13** resumeix les variables incloses en cara component en la matriu de component rotada. Les variables amb scores inferiors a 0.4 no van ser representades.

**Taula 12**

Component	Valors inicials			Extracció de sumes de càrregues quadrades			Rotació de sumes de càrregues quadrades		
	Total	% de variança	Acumulatiu %	Total	% de variança	Acumulatiu %	Total	% de variança	Acumulatiu %
1	6.152	30.762	30.762	6.152	30.762	30.762	4.746	23.729	23.7
2	3.792	18.962	49.724	3.792	18.962	49.724	3.616	18.080	41.8
3	2.185	10.923	60.647	2.185	10.923	60.647	3.473	17.364	59.1
4	1.357	6.785	67.432	1.357	6.785	67.432	1.438	7.190	66.3
5	1.139	5.694	73.126	1.139	5.694	73.126	1.353	6.763	73.1

El component 1 inclou el percentatge de limfocits Th2 I els nivells de IL-4, IL-13 i IgE.

El component 2 inclou el percentatge de limfòcits Th17, els nivells ciculants de IL-17,

IL-23 i IL-12 i el percentatge de limfocits T reguladors. El component 3 inclou els nivells de TNF- $\alpha$ , IL-6, Hx, sIL-1R i Hgl. El component 4 inclou IFN- $\gamma$  i el component 5 inclou suPAR.

**Taula 13**

	Component				
	1	2	3	4	5
TH2	.923				
IL4	.908				
IL13	.852				
IgE	.749				
TH17	-.639	.785			
IL23		.774			
IL12		.753			
Tregs		-.670			
IL17		.651			
TH1		-.532			
IL6			.818		
Hemopexina			.800		
sIL1R			.765		
TNF $\alpha$			.748		
Haptoglobina			.720		
IFN $\gamma$				.809	
suPAR					.867

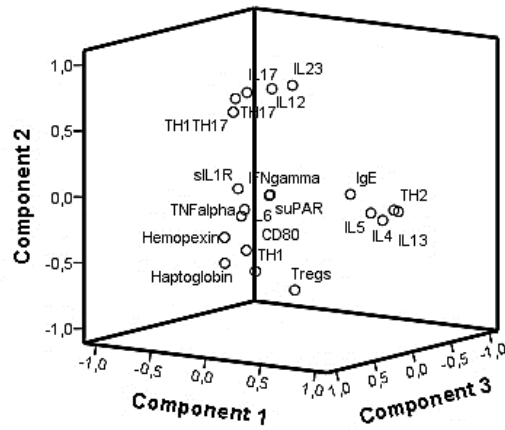
sIL1R: receptor soluble de la IL1; TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral Alpha;

IFN $\gamma$ : interferó gamma; Treg: limfòcits T reguladors; suPAR: receptor soluble

de la urokinasa; uCD80: excreció urinària de CD80

La següent figura mostra la representació gràfica de dispersió i trama tridimensional de la distribució de totes aquestes variables pels primers tres PCA que representen el 59.1% de tota la variabilitat:

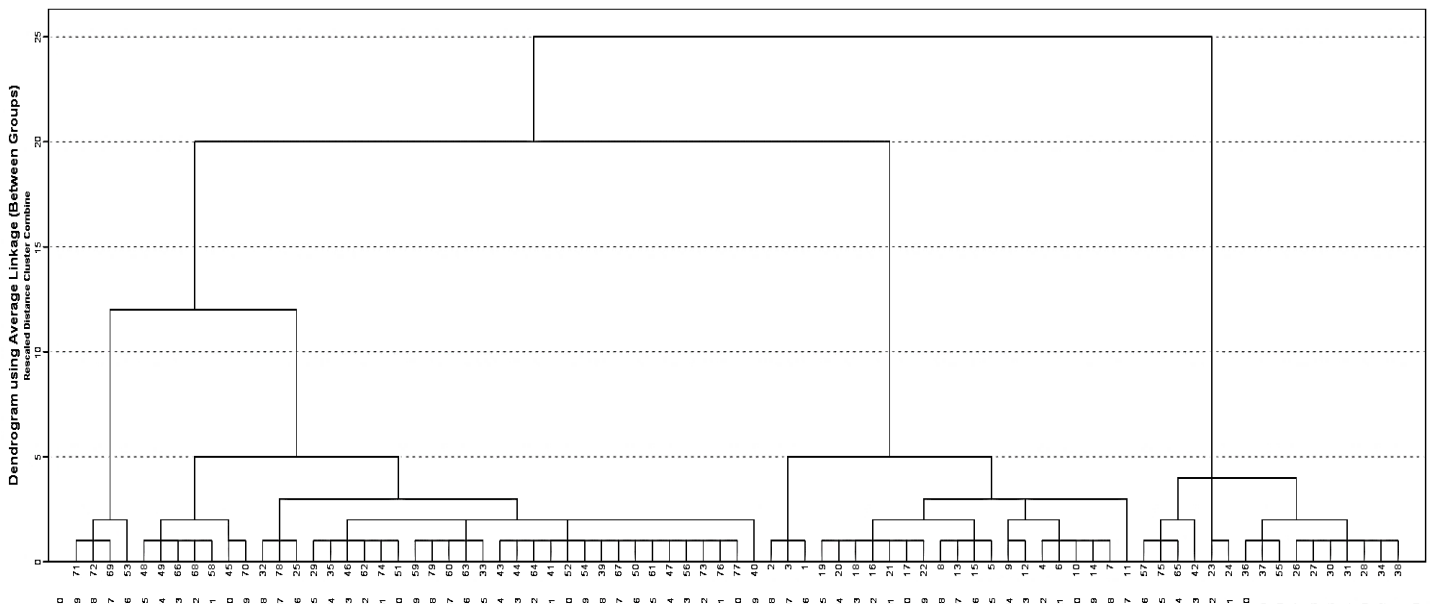
**Figura 2**



**6.3.4. Anàlisi per cluster**

La següent figura representa el dendrograma de classificació dels pacients, mostrant l'existència de tres clusters diferenciats.

**Taula 14**



En quant a la comparació de les variables demogràfiques i clínicoanalítiques entre els pacients dels tres clústers. No es van observar diferències en edat, sexe, funció renal, albúmina o proteïnúria entre els tres clusters. El cluster 1 va incloure 22 pacients

(27.8%) i es va caracteritzar per un augment significatiu de limfòcits Th17 i de nivells circulants de IL-17, IL-12 i IL-23 així com un percentatge limfòcits T reguladors significativament més baix en respecte al cluster 2 i 3. El cluster 2 va incloure 16 pacients (20.3%) i es va caracteritzar per un percentatge de limfocits Th2 i uns nivells de IL-4, IL-5, IL-13 i IgE significativament majors que els clusters 1 i 3. El cluster 3 va incloure 41 pacients (51.9%) i es va caracteritzar per una absència de polarització de les subpoblacions de limfòcits T helper I uns nivells de TNF- $\alpha$ , IL-6, hemopexina, haptoglobina, suPAR i CD80 significativament majors que els del cluster 1 i 2. La següent taula mostra la distribució de les variables bioquímiques analitzades en cada un d'aquests tres clústers.

**Taula 14.** p1: diferències CL1 i CL3; p2: CL1 i CL3; p3: CL2 i CL3)

	Cluster 1 n=22	Cluster 2 n=16	Cluster 3 n=41	p1	p2	p3
<b>Característiques clíniques</b>						
Edat [mitjana (SD)]. Anys	37.3 (12.3)	43.2 (20.2)	36.3 (14.9)	0.755	1	0.404
Corticoresistència. n (%)	16 (72.7)	4 (25)	22 (53.7)	0.018	0.140	0.018
<b>Característiques bioquímiques</b>						
Creatinina [mitjana (SD)]. mg/dl	1.1 (0.4)	1.2 (0.4)	1.1 (0.4)	1	1	1
TFG [mitjana (SD)]. ml/min/1.73m2	86.5 (18.3)	88.6 (16)	92.2 (21)	1	0.818	1
Proteïnúria [mitjana (SD)]. g/dl	10.6 (2.9)	12.8 (4.6)	10.7 (3.6)	0.207	1	0.155
Albúmina [mitjana (SD)]. g/dl	2.5 (0.5)	2.5 (1.1)	2.4 (0.6)	1	1	1
Th1 [mitjana (SD)]. %	22.4 (2.6)	22.7 (1.9)	26.1 (6.2)	1	<b>0.015</b>	0.063
TNF $\alpha$ [mitjana (SD)]. pg/ml	6.4 (2.5)	6.8 (5.5)	15.4 (9.2)	1	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
IFN $\gamma$ [mitjana (SD)]. pg/ml	14.9 (10.5)	14.2 (10.8)	16.3 (8.2)	1	1	1
IL12 [mitjana (SD)]. pg/ml	810.8 (134.5)	517.1 (143.2)	593.8 (197.3)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.403
Th2 [mitjana (SD)]. %	33 (4.4)	62.4 (5.4)	33.4 (3.9)	<b>0.000</b>	1	<b>0.000</b>
IL4 [mitjana (SD)]. pg/ml	3.9 (1.9)	11.1 (4.7)	3.5 (3.4)	<b>0.000</b>	1	<b>0.000</b>
IL5 [mitjana (SD)]. pg/ml	3.9 (2.3)	7.4 (3.9)	4.2 (2)	<b>0.000</b>	1	<b>0.000</b>
IL13 [mitjana (SD)]. pg/ml	4.9 (2.8)	11.3 (6.8)	3.7 (2.5)	<b>0.000</b>	0.710	<b>0.000</b>
IgE [mitjana (SD)]. mg/ml	47.5 (5.1)	162.2 (35)	75.2 (83.2)	<b>0.000</b>	0.292	<b>0.000</b>
Th17 [mitjana (SD)]. %	31.2 (6.6)	3.7 (2.3)	3.2 (1.5)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1
Th1 Th17 [mitjana (SD)]. %	12.9 (6)	4.7 (2.8)	6.4 (3.7)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.506
Treg [mitjana (SD)]. %	0.9 (0.5)	2.7 (0.8)	2.7 (0.9)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1
IL17 [mitjana (SD)]. pg/ml	43.8 (14.6)	4.4 (3.2)	7.7 (7.7)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.737
IL23 [mitjana (SD)]. pg/ml	53.5 (15.9)	33.2 (11.6)	33.9 (12.7)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1
sIL1R [mitjana (SD)]. pg/ml	2316.5 (1033.3)	2233.1 (746.2)	2414.9 (1403.8)	1	1	1
IL6 [mitjana (SD)]. pg/ml	3.2 (1.8)	3.8 (4.9)	16.3 (19.2)	1	<b>0.002</b>	<b>0.011</b>
Hemopexina [mitjana (SD)]. mg/ml	51.4 (28.9)	123.3 (156.2)	278.9 (167.9)	0.374	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>
Haptoglobina [mitjana (SD)]. mg/dl	81.4 (49.4)	135.1 (83.5)	309.8 (154.7)	0.543	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
suPAR [mitjana (SD)]. ng/ml	3592.5 (1348.9)	3225.1 (1121.6)	3712.3 (1379.5)	1	1	0.647
uCD80 [mitjana (SD)]. ng/mg creat	34.2 (21)	25.4 (20.9)	63.6 (54.1)	1	<b>0.029</b>	<b>0.008</b>

### 6.3.5. Variables associades a la resposta amb corticoides

**Taula 15**

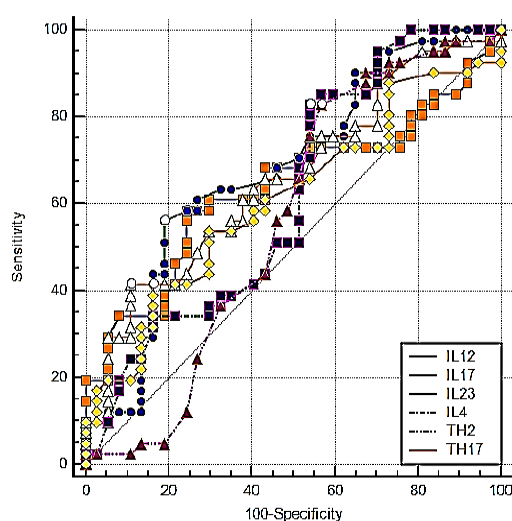
	Corticosenibles n=37	Corticoresistents n=42	P
Edat [mitjana (SD)]. Anys	35.1 (16.1)	38.7 (17.1)	0.34
Sexe:home. n (%)	21 (56.8)	16 (43.2)	0.09
Creatinina [mitjana (SD)]. mg/dl	1.1 (0.3)	1.2 (0.5)	0.12
TFG [mitjana (SD)]. ml/min/1.73m2	93.4 (19.8)	86.8 (18.5)	0.13
Proteïnúria [mitjana (SD)]. g/dl	11.5 (4.4)	10.7 (2.9)	0.34
Albúmina [mitjana (SD)]. g/dl	2.4 (0.8)	2.4 (0.6)	0,85
Th1 [mitjana (SD)]. %	25.3 (5.1)	23.6 (4.9)	0.13
TNF $\alpha$ [mitjana (SD)]. pg/ml	11.6 (10.4)	10.7 (6.2)	0.62
IFN $\gamma$ [mitjana (SD)]. pg/ml	16.8 (9.6)	14.4 (9.3)	0.28
IL12 [mitjana (SD)]. pg/ml	591.9 (160.8)	682.1 (228.3)	<b>0.046</b>
Th2 [mitjana (SD)]. %	42.2 (15)	36.5 (9.3)	<b>0.043</b>
IL4 [mitjana (SD)]. pg/ml	6.7 (5.7)	3.8 (2.5)	<b>0.007</b>
IL13 [mitjana (SD)]. pg/ml	6.5 (6)	4.8 (3.1)	0.12
IL5 [mitjana (SD)]. pg/ml	5.2 (3.5)	4.4 (2.1)	0.13
IgE [mitjana (SD)]. mg/ml	97.2 (78.6)	74.5 (68.7)	0.16
Th17 [mitjana (SD)]. %	7.9 (10.4)	13.9 (14.7)	0.18
Th1 Th17 [mitjana (SD)]. %	6.7 (3.8)	8.9 (6.3)	0.07
Treg [mitjana (SD)]. %	2.4 (0.9)	1.9 (1.2)	0.06
IL17 [mitjana (SD)]. pg/ml	11.9 (17)	21.6 (20.1)	<b>0.023</b>
IL23 [mitjana (SD)]. pg/ml	34.4 (13.8)	43.4 (16.8)	<b>0.043</b>
sIL1R [mitjana (SD)]. pg/ml	2284.8 (1371.5)	2433.5 (1076.3)	0.63
IL6 [mitjana (SD)]. pg/ml	9.7 (20.8)	10.5 (8.5)	0.83
Hemopexina [mitjana (SD)]. mg/ml	163.9 (174.3)	201.9 (171.4)	0.18
Haptoglobina [mitjana (SD)]. mg/dl	209.8 (168.5)	211.7 (152.3)	0.37
suPAR [mitjana (SD)]. ng/ml	3731.9 (1297)	3446.7 (1341.3)	0.34
uCD80 [mitjana (SD)]. ng/mg creat	40.4 (37.9)	54.1 (49.3)	0.17

Del total de pacients, 42(53.1%) van presentar corticore sistència. La taula 15 resumeix la característiques dels pacients segons la seva resposta als corticoides.

No hi van haver diferències en edat, sexe, funció renal, proteïnúria o albúmina sèrica entre els malalts corticosensibles i els corticore sistents. Els pacients amb corticore sistència van presentar nivells més elevats de IL-12, IL-17 i IL-23 i nivells inferiors de cèl·lules Th2 i IL-4 que els pacients amb corticosensibilitat.

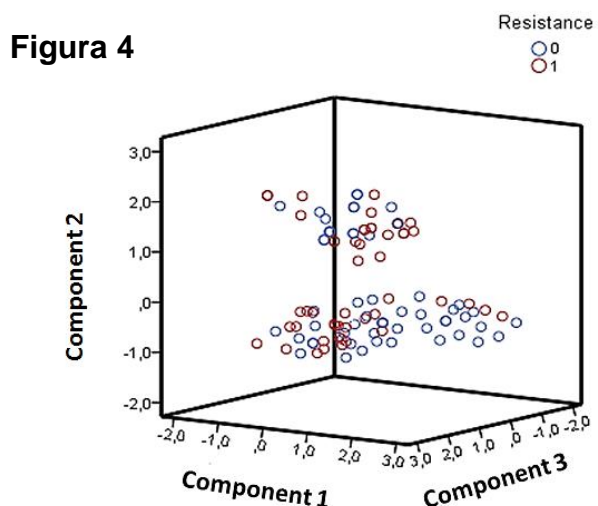
La següent figura mostra els resultats de les corbes ROC realitzades per analitzar la capacitat de cadascuna d'aquestes variables per predir la corticore sistència, incloent l'àrea sota la corba (AUC) i els seus valors de Youden associats.

**Figura 3**



Variable	AUC	SE	95% CI	Cut-off value	Sensitivity ( 95%CI)	Specificity ( 95% CI)
IL12 pg/mL	0.638	0.0641	0.522 to 0.744	> 698	58.5 (42.1 - 73.7 )	75.6 ( 58.8 - 88.2 )
IL23 pg/mL	0.658	0.0619	0.542 to 0.762	>49	40.5 (25.6 - 56.7 )	89.1 (74.6 – 97)
IL4 pg/mL	0.619	0.0654	0.502 to 0.726	≤4.9	83.3 (68.6 – 93)	45.9 (29.5 - 63.1 )
IL17 pg/mL	0.681	0.0617	0.566 to 0.782	>9.2	57.1 ( 41.0 - 72.3)	81 (64.8 - 92)
TH2 ( %)	0.562	0.0690	0.445 to 0.674	≤38	83.3 ( 68.6 – 93)	43.2 (27.1 - 60.5 )
TH17(%)	0.612	0.0644	0.495 to 0.720	>9.35	40.5 (25.6 - 56.7 )	83.8 ( 68.0 - 93.8 )

La prevalença de corticore sistència va ser significativament inferior en el cluster 2 (4/16, 25%) respecte el cluster 1 (16/26, 72.7%) i el cluster 3 (22/41, 53.7%) ( $p$  0.018). En el següent gràfic tridimensional es representa la distribució dels pacients segons els seus factors score pels primers tres PCA, diferenciant els casos segons la seva resposta als corticoides. Els pacients amb major scores pel component 1 (patró Th2), van mostrar inferior freqüència de corticore sistència.



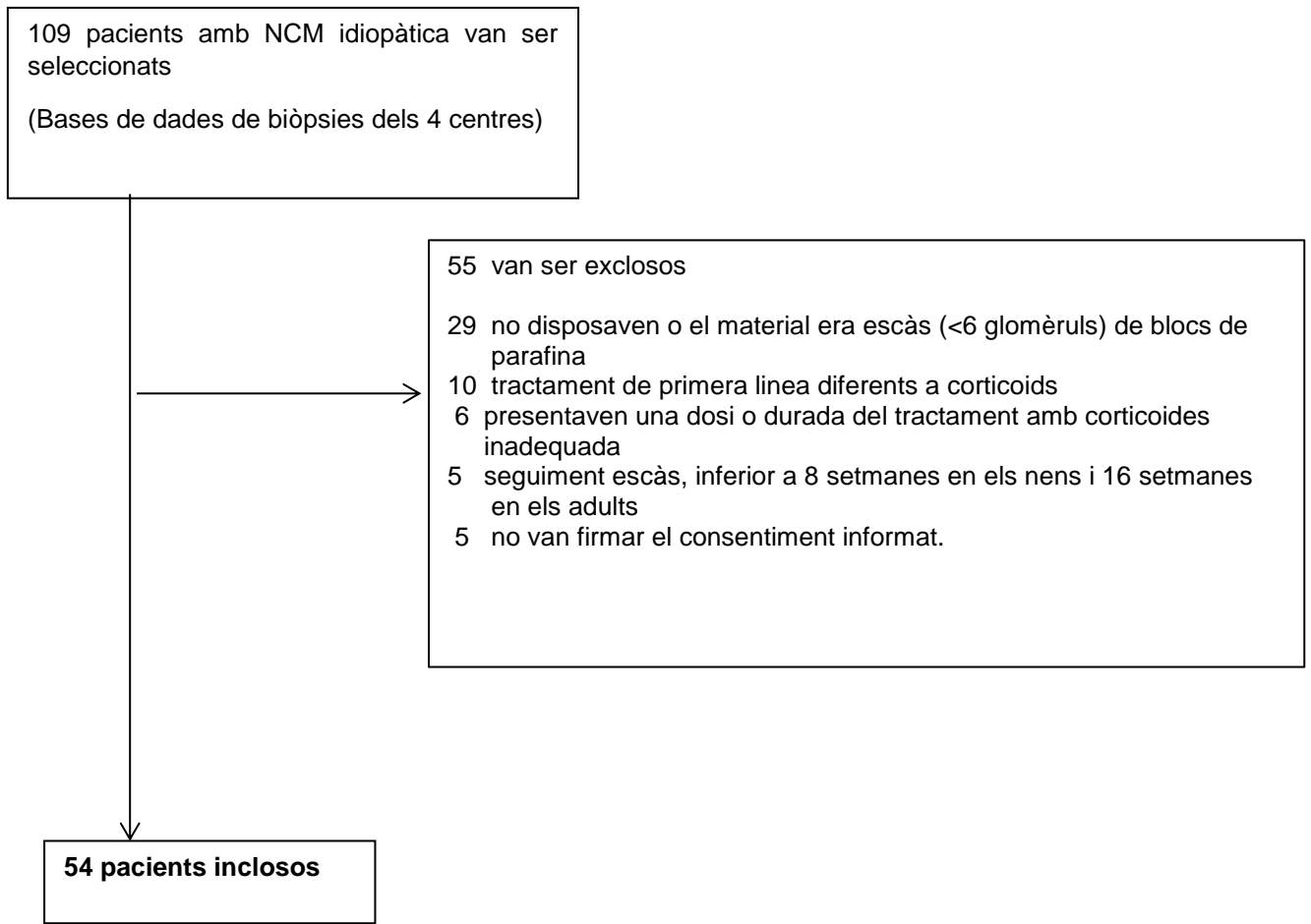
#### 6.4. Estudi 4

##### 6.4.1. Selecció i característiques clíniques, bioquímiques i histològiques dels pacients

Es van seleccionar inicialment a 109 pacients, d'aquests 55 van ser exclosos per una de les següents raons: 29 pacients (53%) no disposaven o el material era escàs (<6 glomèruls) de blocs de parafina per a la realització de l'estudi immunohistoquímic, 10 (18%) van rebre un tractament de primera linea diferents als corticoides, 6 (11%) presentaven una dosi o durada del tractament amb corticoides inadequada, 5 (9%) tenien un seguiment escàs, inferior a 8 setmanes en els nens i 16 setmanes en els adults i 5 (9%) no van firmar el consentiment informat. Tal i com es representa en la següent figura:



**Figura 5**



El grup final d'estudi va ser de 54 pacients, la mitjana de seguiment després del diagnòstic de SN va ser de  $68.3 \pm 37.9$  mesos (max:144 mesos, min:24 mesos). En el moment del diagnòstic del SN, 35 (65%) eren <18 anys i 19 pacients (35%) eren adults. En els pacients pediàtrics les indicacions per a la realització de la biòpsia renal van ser: 12 pacients la corticoresistència i a la resta, 23 pacients, per corticodependència o freqüents brots amb falta de resposta als immunosupressors. En els pacients adults, la biòpsia renal va ser indicada com a procediment diagnòstic rutinari en el debut de la SN. La següent taula resumeix les principals característiques clínico-analítiques i l'evolució de la funció renal de la cohort d'estudi després de classificar-la d'acord a la presència/absència de tinció CD44 positiva de les PECs. 19 pacients (35.2%) van mostrar una tinció CD44 positiva per les PECs, i 17 d'aquests van presentar presència de cèl·lules CD44 positives a nivell intraglomerular.

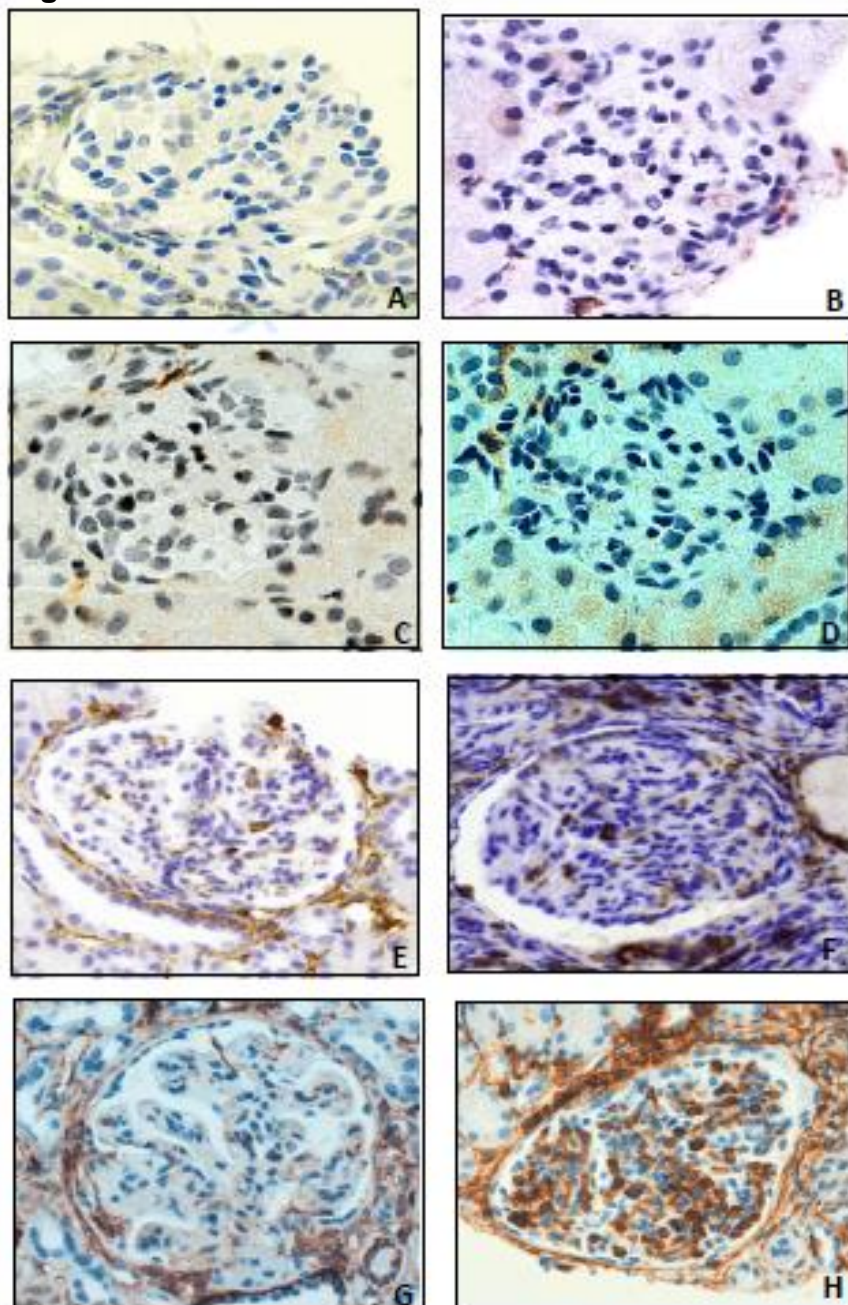
**Taula 16**

	<b>Tots n=54</b>	<b>CD44 + n=19</b>	<b>CD44 – n=35</b>	<b>p</b>
Edat (anys) mitjana (SD)	21.9 (17)	14.5 (5)	21.5 (13)	<b>0.006</b>
Sexe (masculí) n(%)	22(40.7)	19 ( 47.4)	13 (37.1)	0.33
Creatinina (mg/dL) mitjana (SD)	0.63(0.48)	0.64(0.5)	0.65 (0.4)	0.98
TFG (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ) mitjana (SD)	141(27.8)	135(26)	144(27.8)	0.27
Albumina (g/dL) mitjana (SD)	2.09 (0.52)	2.1 (0.56)	2.08 (0.50)	0.89
Colesterol (mg/dL) mitjana (SD)	373 (141)	401 (130)	358 (146)	0.26
Q proteïna/creatinina(mg/mg) mediana [IQR] n: 35	12 [8.4 -19]	11.5 [9-17.5]	12 [8-25]	0.91
Proteïnúria adults (g/24h) mediana [IQR] n: 19	11 [9-15]	13 [9-16]	10.5 [8.2-12]	0.54
Hipertensió (%)	1 (1.9)	1 (5.3)	0	0.35
Microhematuria n(%)	2 (3.7)	1 (5.3)	1 (2.9)	0.58
Seguiment (mesos) mean (SD)	68.3 (38)	79.1 (39)	62.5 (29.3)	0.12
Re-biòpsia n(%)	18 (33.3%)	12 (63.1)	6 (17.1)	<b>0.000</b>
Corticoresistència n(%)	18 (33.3)	11 (57.8)	7 (20)	<b>0.006</b>
Malaltia renal crònica n(%)	15 (27.8%)	9 (47.3)	6 (17.1)	<b>0.021</b>

La figura 6 mostra imatges representatives de les biòpsies amb tinció CD44 negativa (A, B, C i D) i positiva (E, F, G i H).

Quan es comparen amb els pacients amb tinció CD44 negativa, els pacients amb tinció CD44 positiva van presentar una edat menor, una major prevalença de corticoresistència, major freqüència de re-biòpsia i major incidència de malaltia renal crònica moderada/severa, sense presentar diferències significatives en la resta de variables clínico-analítiques.

**Figura 6**



#### **6.4.2. Variables associades a la resposta als corticoides**

De tota a cohort estudiada, 18 pacients (33.3%) van presentar corticoresistència. La següent taula resumeix les característiques dels pacients.

**Taula 17**

	<b>Corticosenibles n=36</b>	<b>Corticoresistents n=18</b>	<b>p</b>
<b>Característiques clíniques</b>			
Edat [mitjana (SD)] anys	23.3 (14.7)	17.3 (9.4)	0.057
Creatinina sèrica [mitjana (SD)]. mg/dL	0.62 (0.5)	0.60 (0.5)	0.827
TFG, [mitjana (SD)]. ml/min/1.73m <sup>2</sup>	138.1 (27.6)	146.2 (26.8)	0.863
Albúmina [mitjana (SD)]. g/dl	2.08 (0.5)	2.2 (0.5)	0.520
Q proteïna/creatinina nens (mg/mg) mediana [IQR]	11.5 [8.6-26.5]	13 [8-19]	0.96
Proteinúria adults (g/24h) (mg/mg) mediana [IQR]	9.5 [8- 13.5]	10.6 [9 - 12.2]	0.34
Colesterol [mitjana (SD)]. mg/dl	384.6 (147.4)	339.4 (120.6)	0.352
<b>Característiques histopatològiques</b>			
CD44+ PECs, n (%)	8 (22.2)	11 (61.1)	<b>0.006</b>
CD44+ PECs migració, n (%)	8 (22.2)	9 (50)	<b>0.040</b>

No es van objectivar diferències en l'edat, la funció renal inicial, l'albúmina, el colesterol o la proteinúria entre els pacients corticosensibles i corticoresistents. Els pacients corticoresistents van presentar una major prevalença de tinció CD44 positiva respecte a la resta (11/18 (61.1%) vs 8/36 (22.2%); p 0.006) i una major proporció de cèl·lules CD44 positives a nivell intraglomerular (9/18 (50%) vs 8/36 (22.2%); p 0.040). La OR per a la corticoresistència associada amb la tinció CD44 positiva va ser de 5.5 (95% CI 1.6 – 18), p: 0.007) amb una AUC de 0.69 (95% CI: 0.54- 0.85, p: 0.021).

### 6.4.3. Variables associades amb l'evolució de malaltia renal crònica moderada/severa

Durant el seguiment dels pacients, 15 (27.8%) van desenvolupar malaltia renal crònica moderada o severa (Estadis G3a-G5). La següent taula resumeix les característiques d'aquests pacients segons l'evolució de la seva funció renal.

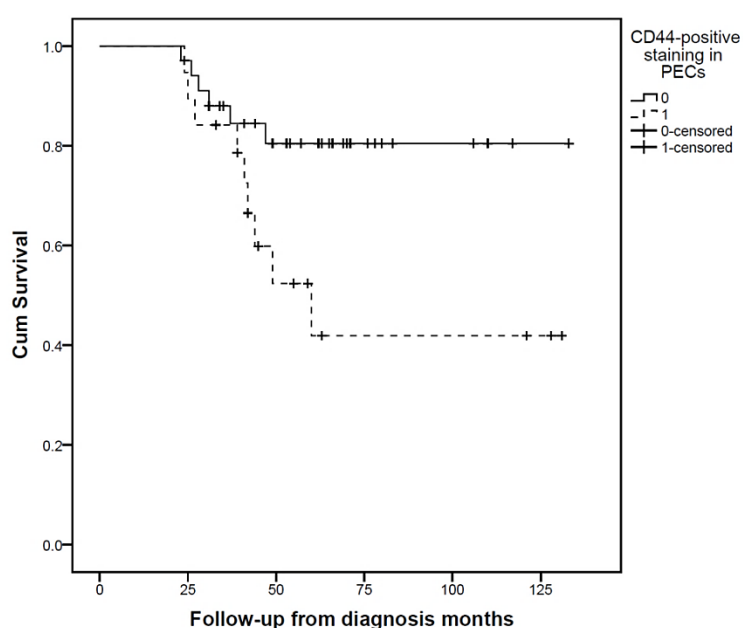
**Taula 18**

	Malaltia crònica n=15	renal	No malaltia renal crònica n=39	p
<b>Característiques clíniques</b>				
Edat [mitjana (SD)]. Anys	19.6 (9.1)		22.1 (14.9)	0.054
Creatinina sèrica [mitjana (SD)]. mg/dl	0.75 (0.5)		0.56 (0.5)	<b>0.003</b>
TFG inicial [mitjana (SD)]. ml/min/1.73m <sup>2</sup>	144.4 (18.5)		139.4 (30.8)	0.052
Albúmina [mitjana (SD)]. g/dl	2.3 (0.4)		2.1 (0.5)	0.907
Q proteïna/creatinina nens (mg/mg) mediana [IQR]	10.5 [8.1- 18]		13 [8.5- 20]	0.51
Proteïnúria adults (g/24h) (mg/mg) mediana [IQR]	11 [9.5- 13.5]		10.5 [8- 12.5]	0.48
Colesterol [mitjana (SD)]. mg/dl	340 (124)		378 (143)	0.822
Corticoresistència n (%)	10 (66.7)		8 (20.5)	<b>0.002</b>
<b>Característiques histopatològiques</b>				
CD44+ PECs, n (%)	10 (66.7)		9 (23)	<b>0.001</b>
CD44+ PECs migració, n (%)	10 (66.7)		7 (17.9)	<b>0.001</b>

No es van observar diferències en quant a l'edat, els nivells d'albúmina, colesterol o proteïnúria entre ambdós grups. Els pacients que van evolucionar a malaltia renal crònica, van presentar majors nivells de creatinina. En referent a les característiques histopatològiques, els malalts que van evolucionar a malaltia renal crònica van

presentar major prevalença de tinció CD44 PECs positiva (66.7% vs 23%; p 0.001) i de migració d'aquestes a nivell intraglomerular (66.7% vs 17.9%; p 0.001). En l'anàlisi de Kaplan-Meier, la mitjana de supervivència de la funció renal va ser més significativa en els pacients amb tinció CD44 negativa que en els CD44 positiva (mean survival 113.5 (95% CI: 99.3-127 mesos vs 78.7 (95% CI: 55.5–102, p: 0.02), tal i com s'objectiva en la següent figura.

**Figura 7**



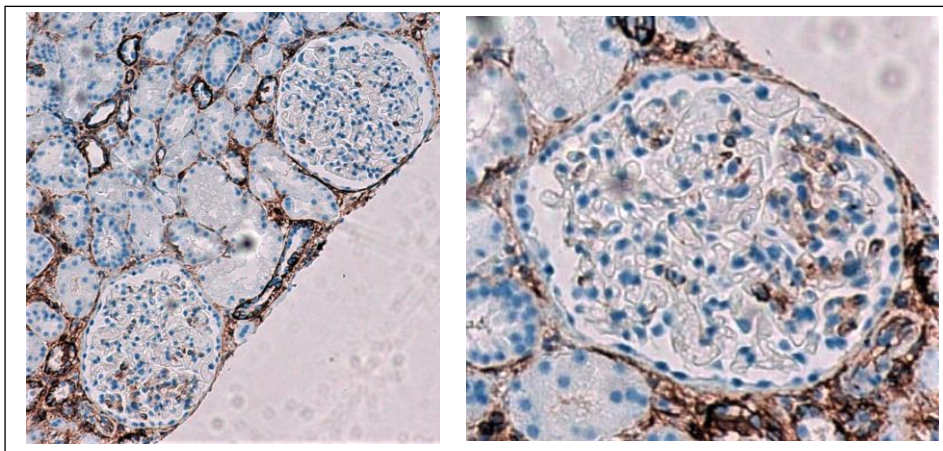
En l'anàlisi de regressió de Cox, el risc relatiu de desenvolupar malaltia renal crònica moderada/severa va significativament major en pacients amb tinció CD44 positiva (RR: 3.01 (95% CI 1.07 – 8.5), p:0.037).

#### **6.4.4. Re-biòpsies**

18/54 pacients (33.3%) van precisar una re-biòpsia durant el seu seguiment per resistència al tractament o empitjorament de la funció renal després d'una mediana de 31 mesos [ P<sub>25</sub> 12 – P<sub>75</sub> 43] des de la primera biòpsia. 12 d'aquests pacients (66.6%), van presentar una tinció CD44 positiva en la seva primera biòpsia renal. En 10/12

(83.3%) rebiòpsies de pacients amb tinció CD44 positiva, es van objectivar lesions de GFS en comparació amb els pacients amb tinció CD44 negativa que es va detectar en 1/6 (16.7%) ( $p$  0.026). 8 dels 15 pacients que van evolucionar a malaltia renal crònica moderada/severa, van precisar un trasplant renal (53.3%). Dos d'aquests pacients, van desenvolupar proteinúria durant el primer mes post-trasplant i esvan rebiopsiar, en els dos casos la biòpsia va mostrar absència de lesions morfològiques a la microscopia òptica però tinció CD44 de les PECs. Els dos pacients van ser tractats amb plasmafèresi, ciclosporina intravenosa i polsos de corticoides. En les biòpsies de control que es van fer als 3 mesos, es van objectivar lesions de GFS en ambdós casos. La següent figura mostra una imatge representativa de re-biòpsia precoç en el post-trasplant d'una pacient, mostrant tinció CD44 positiva per PECs i migració a nivell intraglomerular.

**Figura 8**



## 7. DISCUSSIÓ

### 7.1. Estudi 1

El primer estudi que es va realitzar per analitzar el primer objectiu va ser un estudi transversal en el que es va objectivar que els pacients amb SNI secundària a NCM, GFS i NM inclosos, presentaven nivells augmentats de marcadors endotelials com FvW, VCAM-1, Syndecan-1 i E-selectina. A més a més, els nivells circulants de suPAR van ser associats de forma significativa i independent als nivells de la majoria de molècules endotelials.

Tot i que els malalts dels tres grups de malalts es van associar amb els nivells sèrics de suPAR en l'anàlisi univariat, en l'anàlisi multivariat els nivells de suPAR no es van relacionar amb el patró histopatològic de la SNI. En línia amb els estudis previs publicats, es va observar que els pacients amb SNI presentaven un augment dels nivells circulants de marcadors endotelials (Tkaczyk M.et.al., 2008; Malysvko J. et.al. 2002) fet que podria estar en relació amb l'estat d'activació i/o disfunció endotelial associat amb la mateixa síndrome nefròtica. En el nostre estudi però, els nivells sèrics de les diferents molècules endotelials van mostrar una elevada variabilitat interindividual entre els pacients dels tres subgrups analitzats, oscil·lant entre valors molt baixos comparables als del grup control sa a valors molt alts. Aquesta variabilitat suggereix que només un subgrup de pacients amb SNI tenen nivells elevats de marcadors endotelials.

L'anàlisi multivariat de les variables potencialment associades als nivells de les molècules endotelials estudiades, van revelar associacions entre cadascuna de les molècules endotelials i les característiques demogràfiques, clíniques i/o bioquímiques dels pacients. Això, però, explicaria només una petita part de la variabilitat, fet que



suggereix que la major part de variables associades a aquesta, no estaven incloses en el nostre anàlisi.

Les dades del nostre estudi indiquen que els tres subtipus de malalties glomerulars estudiades, mostren un increment dels nivells de molècules endotelials, exceptuant FvW. Tot i que en l'anàlisi descriptiu VCAM-1 i E-selectina es trobaven significativament més elevats en pacients amb GFS; en l'anàlisi multivariat, després d'ajustar les variables per l'edat, nivell d'albumina i la TFG, el patró histopatològic no va contribuir significativament a explicar els nivells circulants de les dues molècules prèviament mencionades.

Els nivells augmentats de marcadors endotelials en la SNI s'han associat amb la presència de disfunció endotelial estimada per una reducció de la vasodilatació arterial mediada per flux i un increment del risc d'esdeveniments trombòtics (Tkaczyk M.et.al., 2008). D'acord amb aquestes observacions, els nostres resultats van mostrar que els pacients amb trombosi venosa en el moment del diagnòstic de SNI presentaven nivells d'albumina inferiors i nivells de FvW i VCAM-1 superiors als pacients sense trombosi venosa (Smith NL. et. al. 2011; Koster T. et.al. 1995). S'ha de tenir en compte però, que la mesura dels nivells de molècules endotelials es va realitzar de forma concomitant amb el diagnòstic de l'esdeveniment trombòtic i per això s'ha d'interpretar amb prudència la seva significació clínica. En relació amb això, les dades disponibles no permeten determinar si l'augment dels marcadors endotelials és un factor de risc per desenvolupar trombosi venosa o és una mera conseqüència de la complicació trombòtica. A més a més, no podem descartar la presència de trombosis venoses subclíniques en el grup de pacients sense trombosi.

Des de que es va identificar el suPAR com un potencial biomarcador de la GFS, s'han realitzat múltiples estudis per analitzar la seva significació clínica i patogènica en la SNI (Wei C. Et.al. 2011; Kronbichler A. et.al. 2016; Meijer B. et.al. 2014; Segarra A.

et.al. 2014). En la majoria dels estudis realitzats, la distribució dels nivells de suPAR s'objectiva una alta variabilitat interindividual, associada principalment amb l'edat, la TFG i certs marcadors inflamatoris (Wei C. Et.al. 2011; Kronbichler A. et.al. 2016), de forma similar als resultats del nostre estudi. En el nostre model multivariat, s'objectiva que els nivells de FvW, Syndecan-1 i VCAM-1 es van associar de forma independent als nivells de suPAR; fet que suggereix que els nivells de suPAR i de les molècules endotelials estudiades es troben augmentats en pacients amb SNI independentment de la seva etiologia. Tot i que la significació clínica i patogènica de l'associació entre el suPAR i la resta de marcadors endotelials és desconeguda fins el moment, podria reflectir el mateix que s'observa en pacients sense SNI en els que el suPAR s'ha identificat com una molècula clau de disfunció endotelial amb capacitat predictiva per esdeveniments cardiovasculars (Sehestedt T. et.al. 2011).

#### **7.1.1. Limitacions de l'estudi**

La principal limitació del nostre estudi va ser el seu disseny transversal fet que va impedir la determinació dels nivells de molècules endotelials i de suPAR abans del diagnòstic de la trombosi venosa. Per això, no podem determinar que l'augment de molècules endotelials que s'han aïllat en els pacients eren un factor de risc o bé conseqüència de la trombosi venosa. També cal tenir en compte que al incloure els pacients amb diagnòstic histopatològic, la mostra de pacients pediàtrics és inferior i no és del tot representativa atès que en aquest grup de pacients la biòpsia renal no es practica de forma rutinària sinó només en aquells casos d'edat de debut o forma de presentació atípica i/o corticoresistència, tal i com s'ha especificat prèviament. D'altra banda, tot i que el nostre estudi revela diferències significatives en els nivells de suPAR i de la majoria de molècules endotelials entre els diferents grups histopatològics, l'elevada variabilitat interindividual de la majoria d'aquests marcadors, en especial del suPAR, suggereix que és probable que aquests resultats estiguin influenciats pel perfil del pacient.

## 7.2. Estudi 2

El segon estudi que es va realitzar per respondre al segon objectiu, també va ser un estudi transversal en el que es van mesurar els nivells sèrics de les principals citocines implicades en l'estimulació de la resposta inflamatòria aguda i els nivells de Hx, Hgl, suPAR i PCR com a proteïnes representants de resposta de fase aguda en pacients amb SNI en el moment del seu diagnòstic. Els resultats d'aquest estudi aporten les següents dades. En primer lloc, s'objectiva que els pacients amb SNI secundari a NCM, GFS i NCM presenten nivells sèrics de IL-6, TNF $\alpha$ , Hx, Hgl i PCR significativament augmentats respecte el grup control sa; i nivells de sIL-1R i IFN $\gamma$  similar al grup control sa. Els pacients amb NCM i GFS van presentar nivells augmentats de suPAR respecte el grup control sa. Els nostres resultats difereixen en l'únic estudi publicat en relació als nivells de Hx en SNI, en el que no es va objectivar un increment dels nivells sèrics de Hx en els pacients amb SNI (Baker W.W. et.al. 2015). Així mateix, els nostres resultats també són discordants en la relació amb els nivells de TNF $\alpha$ , alguns estudis previs han descrit un increment de TNF $\alpha$  en pacients amb síndrome nefròtica activa (Bustos C.et.al. 1994; Suranyi et.al. 1994; Cho et.al. 2003; Rizk et.al.2005), mentre que altres no han trobat diferències en relació amb els controls sans (Shimoyama et.al. 2004; Neuhaus et.al. 1995; Daniel V. et.al. 1991). Els resultats obtinguts en relació als nivells de IL-6 també difereixen d'algun previ (Su H.et.al. 2007). Les diferències observades entre els diferents estudis poden ser parcialment explicades per la interferència de variables externes relacionades amb l'exposició farmacològica en el moment de la presa de mostres, la inclusió dels pacients en diferents estadis d'activitat, els diferents criteris de classificació histopatològica o a aspectes tècnics relacionats amb els procediments de mesura.

Cal tenir en compte, que la resposta inflamatòria sistèmica està desencadenada per la producció de citoquines proinflamatòries i està cronològicament organitzada (Van Deventer et.al. 1990). En primer lloc, es sintetitzen IL-1 i TNF $\alpha$  les quals estimulen en

un segon nivell la producció IL-6. Posteriorment, té lloc la síntesis de proteïnes de fase aguda a nivell hepàtic per l'estímul de les citocines prèvies. Alguns reactants de fase aguda (Hgl, Hx, suPAR o PCR) són més sensibles a l'estimulació per IL-1, en canvi d'altres com el fibrinògen o l'alpha-1antitripsina són més sensibles a l'estimulació per IL-6. Per tant, el perfil de citocines i proteïnes de fase aguda circulants observades depenen tant de la persistència de l'estímul inflamatori com període de temps entre l'estímul inflamatori i la presa de mostres per a la realització de les mesures. Tot i que els nivells circulatoris de la majoria de proteïnes estudiades estaven augmentats, els nivells del IL-6, TNF $\alpha$ , Hx, Hgl, suPAR i PCR van mostrar una elevada variabilitat interindividual entre els tres grups de pacients amb SNI estudiats, fet que indica que només un subgrup de pacients amb SNI presenta nivells elevats d'aquestes molècules inflamatòries. Quan es van analitzar les variables associades amb els nivells de Hx, Hgl, TNF $\alpha$ , suPAR i IL-6, es va veure que presenten una associació significativa entre ells i que els nivells d'aquests eren independentment de l'edat, el sexe, la TFG o la severitat de la síndrome nefròtica catalogada segons els nivells d'albumina sèrica i grau de proteïnúria. Es van observar diferències significatives dels nivells de proteïnes inflamatòries entre els diferents subgrups de pacients amb SNI. Els nivells de Hx, Hgl, TNF $\alpha$  i IL-6 van ser similars en pacients amb NCM i GFS i en ambdós grups van ser significativament majors que en els pacients amb NM. Aquestes dades indiquen, que en el moment del diagnòstic, l'activació de la resposta inflamatòria és major en SNI secundària a NCM o GFS que en la NM, ja sigui degut a que presentin un mecanisme patogènic diferent i/o en relació a possibles desencadenants no necessàriament relacionats amb la seva patogènesi. La variabilitat interindividual dels nivells de Hx, Hgl, TNF- $\alpha$  i IL-6 en pacients amb NCM o GFS, no va estar relacionada amb la severitat de la proteïnúria, fet que descarta un vincle patogènic entre l'activació de la resposta inflamatòria aguda i la patogènia d'ambdues malalties. D'altra banda, però, no pot excloure's que l'activació de la resposta inflamatòria aguda pugui tenir un paper precipitant o patogènic en un determinat subgrup de pacients. Una de les dades més

rellevants del segon estudi, és l'evidència que en pacients amb NCM o GFS hi ha una associació significativa entre els nivells augmentats de Hx, Hgl i IL-6 amb la corticoresistència, sense ser una relació lineal. El patró histopatològic de la malaltia glomerular és el millor predictor de corticoresistència i dóna una probabilitat de corticoresistència del 51.5% en pacients amb GFS i del 22.7% en pacients amb NCM. Quan s'afegeixen els nivells de Hx, Hgl i IL-6 al patró histopatològic en els models logístics, augmenta la capacitat predictiva amb un augment del IDI i NRI i d'aquesta manera augmenta la predicció de corticoresistència en els pacients que realment ho són. L'associació entre els nivells de Hx i la corticoresistència no havia estat prèviament descrita; en canvi, dos estudis previs ja havien descrit l'associació entre corticoresistència i nivells augmentats de Hgl (Wen Q.et.al. 2012; Yang J.et.al. 2015) i IL-6 (El Hussiny M.A.B. et.al. 2018). Donades les associacions significatives objectivades entre els nivells de Hx, Hgl i IL-6, el seu paper com a biomarcadors associats a corticoresistència podrien ser estar relacionats amb la intensitat, persistència o disregulació de la resposta inflamatòria en fase aguda. Tot i així, també es va observar corticoresistència en pacients amb nivells normals o baixos de Hx, Hgl i IL-6, fet que indica que els nivells elevats d'aquestes molècules només estan associades a corticoresistència en un determinat grup de pacients, en la resta de casos la corticoresistència no es relaciona amb l'activació de la resposta inflamatòria.

Les principals fortaleeses del nostre estudi són la inclusió d'una àmplia mostra de pacients que han estat estudiats en el moment del diagnòstic de la SNI abans d'iniciar cap tractament que pogués interferir amb aquests i que s'ha realitzat un anàlisi complet de la resposta inflamatòria. Així mateix, es van fer mesures repetides de les molècules analitzades, fet que garanteix la reproductibilitat dels valors obtinguts.

### **7.2.1. Limitacions de l'estudi**

El nostre estudi també té limitacions, en primer lloc les nostres dades no tenen validació externa pel que els resultats obtinguts només es poden considerar vàlids pel grup de pacients inclosos a l'estudi. En segon lloc, els criteris per a la realització d'un estudi genètic es varen basar en l'edat del pacient i la resposta a la corticoteràpia i aquest estudi es va realitzar amb els gens coneguts i implicats en la SN descrits fins ara. D'aquesta manera, no podem descartar que en un futur amb l'augment del coneixement dels gens implicats en les malalties glomerulars, s'evidenciïn que alguns dels pacients que han estat inclosos en l'estudi siguin portadors de mutacions que eren desconegudes quan es va dur a terme l'estudi. I en tercer lloc, cal tenir en compte que al incloure els pacients amb diagnòstic histopatològic, la mostra de pacients pediàtrics és inferior i no és del tot representativa atès que en aquest grup de pacients la biòpsia renal no es practica de forma rutinària sinó només en aquells casos d'edat de debut o forma de presentació atípica i/o corticoresistència, tal i com s'ha especificat prèviament.

### **7.3. Estudi 3**

Els resultats del tercer estudi realitzat indiquen que la resposta inflamatòria i la polarització de subtipus de cèl·lules Th no és comuna en tots els pacients amb GFS en el moment del seu diagnòstic. De les 23 variables analitzades, els pacients del grup d'estudi van ser classificats en 3 clusters amb patrons ben diferenciats. El cluster 1 es va caracteritzar per un predomini de resposta de cèl·lules Th17 amb nivells elevats de IL-17 i IL-23 i un percentatge menor de cèl·lules Treg. El Cluster 2 va presentar un patró predominantment Th2 amb nivells augmentats de IL-4, IL-5, IL-13 i IgE. El cluster 3 va incloure pacients que no presentaven polarització de les cèl·lules T i, en canvi, tenien nivells augmentats de proteïnes i mediadors de la resposta inflamatòria aguda.

Els tres grups de clústers, van presentar diferències en els perfils immunològics i inflamatoris però no en el perfil clínic de la SNI en el moment del seu diagnòstic en terme de distribució d'edat, sexe, nivells d'albumina sèrica, TFG i proteïnúria.

A més a més, els nostres resultats indiquen que tot i que es van observar lleugeres diferències significatives en determinades variables entre el grup de pacients corticosensibles i els corticorestants, totes aquestes molècules van presentar una baixa sensibilitat i especificitat per discriminar entre els dos grups de pacients. Els pacients del Cluster 2 van presentar una prevalença significativament menor de corticorestència respecte als pacients del Cluster 1 i 3.

El paper dels limfòcits en la patogènia de la SNI ha estat el centre de múltiples investigacions (Shalhoub R.J. Et.al. 1974; Mac Carthy ET.et.al. 2010; Wang et.al. 2013; Colucci M. Et.al. 2018; Segarra A.et.al. 2012). La majoria d'estudis que s'han fet, s'han centrat en l'estudi dels malalts amb NCM i s'han descrit diferents tipus de polarització de resposta de cèl·lules Th. Alguns estudis no han trobat diferències entre els ratio Th1/Th2 (Kemper et.al. 2001) i d'altres han trobat un predomini de la resposta Th2 (Lennon R.et.al. 2008; Gallon L. Et.al 2012) i fins i tot s'ha evidenciat que la IL-13, relacionada amb la resposta Th2, és capaç d'induir lesions podocitàries en models experimentals (Lai et.al. 2007). Els resultats amb la nostra cohort de pacients amb GFS mostren que el 20% d'aquests presenten una resposta predominantment Th2 (cluster 2) i tot i no ser el grup més prevalent, van presentar una freqüència significativament inferior a desenvolupar corticorestència respecte als altres dos clústers. Els nostres resultats concorden amb estudis publicats prèviament en els que s'havia descrit una associació entre la resposta Th2 (Kemper M.J. et.al. 2001) i la resposta als corticostereoides i podria relacionar-se amb l'efecte inhibitori dels corticoides en la transcripció dels gens de IL-4, IL-5 i IL-13 (Lyngbæk S.et.al. 2013).

Estudis recents posen de manifest el possible paper d'un desequilibri de les cèl·lules Th17 i Tregs en la patogènia de la SNI (Kuzelova K. et.al. 1997; Gutteridge JM. Et.al. 1995; Baker WW et.al. 2005). Les cèl·lules Th17 indueixen lesions inflammatòries i immunològiques amb la producció de citoquines tals com IL-17, IL-22 i TNF- $\alpha$ . Les cèl·lules Tregs tenen un paper anti-inflamatori suprimint l'activació del sistema immune amb l'alliberament de IL-10 i TGF- $\beta$ 1 (Nakayama M.et.al. 2002). Les cèl·lules Th17 i les seves citoquines relacionades s'han vist augmentats en pacients amb SNI en comparació amb controls sans (Shao et.al. 2009; Araya C. et.al. 2009). La IL-17 s'ha trobat augmentada en biòpsies renals de pacients amb GFS en comparació amb els altres patrons histopatològics i també s'ha relacionat de forma positiva amb l'índex de glomeruloesclerosi. S'ha plantejat la hipòtesi de que aquesta citocina promogui el dany renal per mitjà d'alteracions en la fosforilació de la nefrina i donant lloc a l'apoptosi dels podòcits (Shao et.al. 2009). En la nostra cohort, el 30% de malalts (cluster 1) van presentar un predomini de patró de resposta Th17.

El tercer cluster va ser el més nombrós, incloent el 50% de la cohort de pacients i es va caracteritzar per un increment dels nivells de IL-6, TNF $\alpha$ , Hx, Hgl i suPAR; fet que indica una activació de la resposta inflammatòria de fase aguda sense estar associada a ningun tipus de polarització de subpoblacions de cèl·lules Th. La IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , són les principals citocines que són alliberades pels monòcits en resposta a infeccions o lesions tissulars. Aquestes citocines, causen un efecte a nivell sistèmic amb l'estimulació de reactants de fase aguda sintetitzats a nivell hepàtic (Immenschuh S. et.al. 1995). Els Cluster 1 i el 3 van ser els dos clusters que es van associar amb un augment de l'activació de la resposta inflammatòria, ja fos mediada per cèl·lules Th17 o per la via de IL1/IL6 i aquests pacients van presentar una taxa de corticoresistència similars entre ells i majors que els pacients del cluster 2. Aquests resultats estan d'acord amb els que s'havien descrit en estudis previs en els que els nivells de IL-6, Hx



i Hgl s'havien associat a corticoresistència (Yang J.et.al. 2015; El Hussiny M.et.al. 2018).

Els grups de clusters identificats en el nostre estudi, indiquen que existeix una resposta immune i/o inflamatòria predominant en els malalts amb SNI, però el seu significat patogènic encara es desconeix. Tot i que hi ha estudis experimentals que indiquen que tant la IL-17 com la IL-13 poden induir lesió podocitària, no hi ha evidència suficient que recolzi que aquestes citoquines estiguin directament implicades en la lesió podocitària en malalties renals en humans (Lai et.al. 2007; Liu Y. et.al. 2015). A més a més, en les condicions clíniques associades a un increment de nivells de IL-17, com les espondiloartropaties, o en aquelles que presenten un augment dels nivells de IL-13, rinosinusitis crònica, asma o poliposi nasal, no s'han descrit una major incidència de GFS.

La principal fortalesa del nostre estudi és la inclusió d'una àmplia mostra homogènia de pacients que van ser estudiats en el moment del diagnòstic de SNI, sense interferències terapèutiques, utilitzant una anàlisi multidimensional de marcadors de resposta inflamatòria i immune. Quan s'interpreten els resultats del nostre estudi, però, cal tenir en consideració el procés de diferenciació dels limfòcits Th0 "naive" fins a limfòcits Th madurs, que té lloc a nivell local en els òrgans limfàtics i està conduïda per les senyals donades per les cèl·lules presentadores d'antigens (Araya C.et.al.2009; Wang et.al. 2013; Colucci M. et.al. 2018). La IL-12 estimula la diferenciació de les cèl·lules Th0 a Th1, les quals produeixen IL-2 i IFN- $\gamma$ ; IL-4, IL-13 i IL-2 estimulen la diferenciació de cèl·lules Th0 a Th2, les quals produeixen IL4, IL-13 i IL-5; i IL-6, TGF- $\beta$  i IL-21, indueixen la diferenciació a cèl·lules Th17 les quals produeixen IL-17, IL-22, IL-6 i TNF- $\alpha$ , exercint un potent efecte antiinflamatori (Shao et.al. 2009; Araya C.et.al. 2009). Les interleucines tals com IL-17, IL-13 i IL-4 s'agrupen en el mateix cluster que les cèl·lules que s'encarreguen de sintetitzar-les.

### **7.3.1. Limitacions de l'estudi**

Donat que els nivells d'interleucines es van mesurar a nivell sanguini, no es poden considerar representatius del que succeeix a nivell local en els òrgans limfàtics; fet que explicaria la falta d'associació entre IL-12 i IFN-  $\gamma$  amb les cèl·lules Th1 i la falta d'associació entre cèl·lules Th17 i IL-6. També cal tenir en compte que al incloure els pacients amb diagnòstic histopatològic, la mostra de pacients pediàtrics és inferior i no és del tot representativa atès que en aquest grup de pacients la biòpsia renal no es practica de forma rutinària sinó només en aquells casos d'edat de debut o forma de presentació atípica i/o corticoresistència, tal i com s'ha especificat prèviament.

### **7.4. Estudi 4**

El quart estudi mostra que els pacients amb SNI secundari a NCM que presenten tinció per CD44 positiva de les PECs, s'associen a un major risc de corticoresistència, pitjor evolució renal a llarg termini i pot ser considerada una senyal precoç d'una GFS subjacent.

La CD44 és una molécula d'adhesió de superfície cel·lular implicada en les interaccions entre cèl·lules i cèl·lula-matriu. L'àcid hialurònic és un dels lligands principals de la CD44 de la mateixa manera que altres components de la matriu extracel·lular (Goodison S.et.al. 1999). S'han descrit en models experimentals i en biòpsies humanes de pacients amb GFS i glomerulonefritis ràpidament progressiva l'activació de les PECs amb l'expressió "de novo" de la CD44 (Smeets B.et.al. 2011 i 2014 i Fatima H.et.al. 2012). Les raons per les quals les cèl·lules parietals s'activen no són del tot conegudes i el més probable és que siguin diferents segons el tipus de malaltia. En el cas de la GFS, s'ha proposat que l'activació de les cèl·lules parietals pugui ser deguda del seu contacte directe amb productes filtrats pel plasma en les regions glomerulars on consegüentment a la pèrdua de podocits, les parets capil·lars

queden descobertes, perden la seva filtració selectiva, s'expandeixen i entren en contacte amb cèl·lules parietals formant sinèquies. Després de la seva activació, les cèl·lules parietals adquireixen la capacitat migratòria i de síntesi de matriu extracel·lular. A través de les sinèquies, poden migrar a nivell intraglomerular on produeixen la matriu extracel·lular que contribueix a la formació de lesions d'esclerosi segmentària, probablement en un intent de reparar el dany glomerular (Smeets B.et.al. 2011). Aquest mecanisme podria explicar la presència de cèl·lules CD44+ a nivell intraglomerular (Smeets B.et.al. 2014). D'acord amb aquesta hipòtesi, l'expressió de CD44 per les PECs podria ser un senyal indirecte de la reducció dels podòcits per sota d'un dintell crític i conseqüentment, podria ser un senyal precoç d'una GFS subjacent. Donant suport a això, la tinció positiva per CD44 de les PECs s'ha presentat com un potencial marcador per distingir la NCM de la GFS precoç com es va descriure en un estudi recent en el que el 25% de les biòpsies etiquetades inicialment com NCM, van presentar petites lesions escleròtiques amb marcadors de les PECs (CD44, claudina-1, i LKIV69) que no havien estat detectats amb procediments de tinció estàndards (Smeets B.et.al. 2014). Aquestes dades, estan plenament d'acord amb les observades en el nostre grup de pacients que van ser re-biopsiats atès que la majoria presentaven tincions per CD44 positives en la biòpsia inicial i van desenvolupar GFS posteriorment. Així com també aquestes dades concorden amb el que vam observar en els dos pacients post-trasplantats, que van patir una recurrència precoç de la proteïnúria i en les seves biòpsies no es van objectivar lesions morfològiques en la microscòpia òptica però si que van presentar PECs amb tinció CD44 positiva i posteriorment es va confirmar que van desenvolupar una GFS, com altres estudis previs havien descrit (Fatima H.et.al. 2012). Com la corticoresistència és més prevalent en la GFS que en la NCM (Eddy A, et.al. 2003, Rivera Hernandez F. 2011), podria explicar perquè els pacients amb tinció CD44 positiva s'han associat a major corticoresistència en el nostre estudi. No obstant això, l'AUC per predir la resistència als esteroïdes associada amb l'expressió de CD44 és feble i aquesta relació, sent purament morfològica, només

indica que la resistència als esteroides s'associa amb una major pèrdua de podòcits, que és la conseqüència final de la lesió renal. A més, cal tenir en compte que, fins i tot seleccionant biòpsies amb un mínim de 6 glomèruls, donat que les primeres lesions de GFS solen ser focals, alguns dels pacients classificats com a negatius podrien ser uns falsos negatius i expressar CD44 en altres zones que no s'observen en la biòpsia, especialment en les mostres amb un baix nombre de glomèruls.

A més del seu paper potencial per diferenciar entre MCD de la GFS precoç, un estudi recent ha demostrat una associació significativa entre la tinció positiva de PECs CD44 i l'evolució renal en pacients pediàtrics amb GFS (Smeets B.et.al. 2014). Els nostres resultats indiquen la mateixa relació en els pacients que inicialment s'havien catalogat com NCM i després van desenvolupar malaltia renal crònica moderada/severa, presentaven una major prevalença de PECs amb tinció CD44 positiva i de migració d'aquestes a nivell intraglomerular.

#### **7.4.1. Limitacions de l'estudi**

L'anàlisi de les variables associades a la corticoresistència en els pacients amb NCM en aquest estudi multicèntric retrospectiu, ha de fer front a dues limitacions importants, la baixa prevalença de corticoresistència (en general, es parla del 10% de nens i 20% d'adults amb SN) i de les diferències en la definició de corticoresistència entre els centres fet que pot representar diferents dosis i temps d'exposició a corticoides. Una de les majors fortaleces del nostre estudi és la inclusió d'una cohort de pacients amb NCM utilitzant uns criteris explícits i homogenis per a la definició de corticoresistència. Aquests criteris ens han limitat el tamany de la mostra atès que ens han obligat a descartar pacients en els que la informació sobre el tipus i durada de tractament no era fiable per definir la corticoresistència de forma adequada. Tot i que el tamany de la mostra és limitat, els pacients corticoresistents estan representats de forma àmplia atès que el grup d'estudi inclou un gran nombre de pacients pediàtrics en els que només es realitza la biòpsia en determinats casos, entre ells la corticoresistència. Això

també explica que la prevalença de corticoresistència en els pacients pediàtrics sigui major que en els adults, el que presentaven un percentatge similar de corticoresistència a la resta d'estudis (Rivera Hernandez F. 2011). Per aquesta raó la prevalença de corticoresistència observada en la nostra cohort d'estudi no és representativa de la resta de cohort amb NCM (Eddy A, et.al. 2003).

## **8. CONCLUSIONS**

Les conclusions s'agrupen segons cada objectiu plantejat.

### **8.1. Conclusions objectiu 1**

Els nivells de suPAR dels pacients amb síndrome nefròtica idiopàtica secundària a NCM, GFS i NM, són independents de la malaltia renal primària i s'associen de forma significativa amb l'edat, la TFG i els nivells de varis marcadors endotelials estudiats, tals com FvW, Syndecan-1 i VCAM-1. Els nivells d'aquestes molècules endotelials, exceptuant el syndecan-1, s'han associat amb l'edat i els nivells d'albumina, tot i que la variabilitat explicada per les característiques demogràfiques i bioquímiques, és petita. Per això, es precisen més estudis per poder identificar els mecanismes moleculars subjacents a l'augment de suPAR i d'alguns marcadors d'activació endotelial que es dona en alguns pacients amb Síndrome nefròtica. Finalment, ateses les associacions entre el suPAR i les molècules endotelials amb el risc d'esdeveniments vasculars reportats per altres autors, creiem que s'han de realitzar futurs estudis prospectius per investigar el paper potencial d'aquestes molècules com a biomarcadors de la malaltia vascular en pacients amb síndrome nefròtica d'evolució crònica.

### **8.2. Conclusions objectiu 2**

L'activació de la resposta inflamatòria aguda en els pacients amb SNI és complexa, heterogènica i no està relacionada amb la severitat de la malaltia en el moment del diagnòstic. Hi ha un grup de pacients que presenten nivells augmentats de TNF $\alpha$ , IL-6, Hx, Hgl, PCR i suPAR amb nivells normals de sIL1R i IFN $\gamma$ , mentre que altres pacients amb nivells de proteïnúria i d'albumina sèrica similars, no mostren evidència d'activació de la resposta inflamatòria.

L'activació de la resposta inflamatòria és més prevalent en pacients amb NCM o GFS que en pacients amb NM. En els pacients amb NCM i GFS, els nivells augmentats de

Hx, Hgl o IL6 es van associar independentment amb la corticoresistència i van millorar el valor predictiu donat pel patró de GFS.

Donada la potencial rellevància d'aquests resultats, creiem que és necessari dur a terme estudis que defineixin amb major detall el paper de l'activació de la resposta inflamatòria en la patogènia de la SNI secundària NCM i GFS, així com estudis de validació externs per analitzar el seu valor clínic com a potencials predictors de corticoresistència.

### **8.3. Conclusions objectiu 3**

S'han objectivat 3 grups de clusters en els pacients amb GFS que presenten diferents patrons immunològics i inflamatoris. L'elevada dispersió en la distribució de les subpoblacions de cèl·lules Th i dels nivells de les proteïnes inflamatòries i d'interleucines analitzades, pot ser una de les raons que permetin explicar la disparitat de resultats entre els diferents estudis publicats fins ara. Els pacients amb un patró de resposta Th2 predominant van presentar una millor taxa de resposta als corticosteroides mentre que els pacients amb respostes Th17 i IL1/IL6, es van associar a una major prevalença de corticoresistència.

### **8.4. Conclusions objectiu 4**

Els pacients amb NCM diagnosticats per microscopia òptica que presenten activació de les PECs, definida per la tinció CD44+, s'associen a una major prevalença de corticoresistència, un major risc de deteriorament de la funció renal i es pot considerar un senyal precoç de GFS. Cal fer més recerca per explicar la seva implicació en la patogènia de la NCM i la GFS i poder definir el seu paper potencial en la pràctica clínica.

## **8.5. Conclusions finals**

La recerca de biomarcadors que permetin caracteritzar des del debut de la SNI es subtipus de patró histopatològic subjacent continua sent un repte.

Tots els potencials biomarcadors analitzats en els nostres estudis (suPAR, marcadors de lesió endotelial, Hx, Hgl, marcadors inflamatoris i marcadors d'activació parietal) semblen tenir un paper rellevant en la predicció diagnòstica i pronòstica d'alguns pacients amb SNI però calen més estudis que validin els resultats i que permetin establir quins biomarcadors són més específics en cada malaltia renal.

La implicació dels sistemes immune, inflamatori i endotelial en la patogènia de la SNI és cada cop més evident, però encara està per definir el grau d'implicació de cadascun, si estan interrelacionats i quins són els desencadenants propiament de cada subtipus de SNI.

La clau per poder avançar en el diagnòstic i tractament dels pacients amb SNI és continuar amb la recerca de la patogènia de la malaltia. La identificació en un futur de biomarcadors del SNI, permetrà no només diagnosticar als pacients de forma més precoç i menys invasiva, sinó també estratificar-los millor des del seu inici i poder oferirlos tractaments més personalitzats en cada cas.



## 9. AGRAÏMENTS

L'elaboració d'aquesta tesi doctoral no hagués estat possible sense moltes persones.

En primer lloc, vull agrair al director de la tesi el Dr. Alfons Segarra per ajudar a introduir-me en la recerca de la Síndrome Nefròtica, amb les seves valuoses aportacions, revisions i el seu suport durant aquests anys. És tot un orgull haver après de tu.

També agrair a la Dra. Marina Muñoz, Dra. Gema Ariceta i Dr. Álvaro Madrid que han estat els meus principals mestres en la formació i estimació per aquesta magnífica subespecialitat: la Nefrologia Pediàtrica.

Als meus companys de l'Hospital de Vic, que feu apreciar cada dia més la nostra feina, és un plaer treballar plegats i seguir enriquirme amb vosaltres.

A tot l'equip d'anatomia patològica de l'IRBD de Lleida, en especial a l'Anabel i la Maria per la seva disponibilitat i ajuda. Al tutor de la tesi, el Juan Bertran, per la seva accessibilitat i posar tots els tràmits fàcils.

A les meves amigues, en especial a les companyes de professió. La meva carrera mèdica no seria el mateix sense vosaltres i, en especial, a tu Alba que tot i deixar-nos massa aviat sempre seràs un exemple de valentia i un model a seguir.

I, per suposat, a la meva família. Als meus pares i sogres que són un gran suport i ens fan el dia a dia molt fàcil. I als meus dos puntals: l'Edu i l'Oriol, que són el motor de tot. Gràcies Edu pel teu suport incondicional, sempre fent fàcil allò que no ho sembla tant i seguir caminant al meu costat.

## 10. REFERÈNCIES

1. Alshami A, Roshang A, Cataplan M, Jobsis JJ, Kwok T, Polderman N et.al. Indications for kidney biopsy in idiopathic childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(10):1897-1905.
2. Altintas MM, Ulgen KO, Palmer-Toy D, Shih VE, Kompala DS and Reiser J. Emerging Roles for Metabolic Engineering - Understanding Primitive and Complex Metabolic Models and Their Relevance to Healthy and Diseased Kidney Podocytes. *Current Chemical Biology*, 2008, 2, 69-83.
3. Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, Garin E. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009; 24(9)1691-1698.
4. Arévalo Gómez MA. El riñón normal. Anatomía e histología. En: Hernando Avendaño L, ed. *Nefrología Clínica*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 3-10.
5. Bakker WW, Baller JF, Van Luijk WH. A kallikrein-like molecule and plasma vasoactivity in minimal change disease. Increased turnover in relapse versus remission. *Contrib Nephrol.* 1988;67:31-4.
6. Bakker WW, Van Dael C, Pierik LJ, Van Wijk J, Nauta J, Borghuis T. et.al. Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse. *Pediatr Nephrol* 2005 ; 20: 1410-5.
7. Ballarín J, Arce Y, Da Silva I, Diaz M. *Nefropatía por Cambios Mínimos*. Nefrología al día. 2018.
8. Beck LH, Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2009;361:11–2.
9. Bullich G, Domingo-Gallego A, Vargas I, Ruiz P, Lorente-Grandoso L, Furlano M et.al. A kidney-disease gene panel allows a comprehensive genetic diagnosis of cystic and glomerular inherited kidney diseases. *Kidney Int.* 2018 94: 363-3.

10. Bustos C, Gonzalez E, Muley R, Alonso JL, Egido J. Increase of tumour necrosis factor  $\alpha$  synthesis and gene expression in peripheral blood mononuclear cells of children with idiopathic nephrotic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation* (1994) 24, 799-805.
11. Camici M. The Nephrotic Syndrome Is an Immunoinflammatory Disorder. *Med Hypotheses* 2007;68(4):900-5.
12. Cara-Fuentes G, Johnson RJ, Reiser J, Garin E. CD80 and suPAR in patients with minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis: diagnostic and pathogenic significance: response. *Pediatr Nephrol* 29:1467–1468 (2014).
13. Cheung PK, Klok PA, Baller JF, Bakker WW. Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney International*, Vol. 57 2000: 1512–1520.
14. Cho M. H. et.al. Interleukin-8 and Tumor Necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. *Am J Nephrol* 2003;23:260-266.
15. Chun M, Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic adults: presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants. *J Am Soc Nephrol* 2004 Aug;15(8):2169-77
16. Colucci M., Corpetti G., Emma F., Vivarelli M. Immunology of idiopathic nephrotic síndrome. *Pediatr Nephrol*. 2018. 33:573–584.
17. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jenette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis off J Natl Kidney Found* 2004; 43:368–382.
18. Daniel V, Trautman Y, Konrad M, Nayir A, Schärer K. T-lymphocyte populations, cytokines and other growth factors in serum and urine of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Nephrol*. 1997 May;47(5):289-97.
19. Delville, M., Sigdel, T. K., Wei, C., Li, J., Hsieh, S.-C., Fornoni, A. Sarwal, M. M. (2014). A circulating antibody panel for pretransplant prediction of FSGS

- recurrence after kidney transplantation. *Sci Transl Med.* 2014 Oct 1; 6(256): 256ra136.
20. Dorhout Mees EJ, Geers AB, Koomans HA. Blood volume and sodium retention in the nephrotic syndrome: a controversial pathophysiological concept. *Nephron* 1984; 36:201-11.
  21. Doublier S., Zennaro C. , Musante L. Spatola T, Candiano G, Bruschi M. et.al. Soluble CD40 ligand directly alters glomerular permeability and may act as a circulating permeability factor in FSGS. *PLoS ONE* 12(11): e0188045.
  22. Duhén, T, Duhén R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood* 119: 4430–4440, 2012.
  23. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *The Lancet* 2003; 362:629-39.
  24. Edsfedt A, Nitulescu M, Grufman H, Grönber C, Persson A. Nilsson M. et.al. Soluble Urokinase plasminogen activator receptor is associated with inflammation in the vulnerable human atherosclerotic plaque. *Stroke.* 2012.vol 43:12.
  25. Eknoyan G, Lameire N. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney International Supplements.* 2012. 2, 141.
  26. Eknoyan G, Lameire N. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* 2013. Vol 3:1.
  27. Eknoyan G, Lameire N. KDIGO Clinical Practice Guideline on glomerular diseases. Public review draft. June 2020.
  28. El Hussiny MAB. Mohamed FZ, El-Lateaf LA, Barakat A., Magdy M and El-eshmawy AA. Effect of IL6 C-174G polymorphism on response to steroid therapy in Egyptian children with nephrotic syndrome *ejpmr*, 2018, 5(4), 146-152.

29. Fatima H, Moeller MJ, Smeets B, Yang HC, D'agati VD, Alpers CE et.al. Parietal Epithelial Cell Activation Marker in Early Recurrence of FSGS in the Transplant. Clin J Am Soc Nephrol 7: 1852–1858, November 2012.
30. Fine RN. Recurrence of nephrotic syndrome/focal segmental glomerulosclerosis following renal transplantation in children. Pediatr Nephrol 22:496-502.
31. Gallon L, Leventhal J, Skaro A, Kanwar Y, Alvarado A. Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation. N Engl J Med 26 (366):1648-1640, 2012.
32. Garin EH, Diaz LN, Mu W, Wasserfall C, Araya C, Segal M. et.al. Urinary CD80 excretion increases in idiopathic minimal-change disease. J Am Soc Nephrol 20:260–266(2009).
33. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol (2000) 14:872–878.
34. Gentili A, Tangheroni W, Gelli G. Proteinuria caused by transfusion of blood from nephrotic to non-nephrotic individuals]. Minerva Med. 1954 Sep 15; 45(74):603-8.
35. Goodison S, Urquidi V, Tarin D: CD44 cell adhesion molecules. Mol Pathol 1999, 52:189e196.
36. Gulati S, Sharma RK, Gulati K, Singh U, Srivastava A. Longitudinal follow-up of bone mineral density in children with nephrotic syndrome and the role of calcium and vitamin D supplements. Nephrol Dial Transplant. 2005 Aug;20(8):1598-603.
37. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995 ; 41:1819–1828.
38. Habbib R. Nephrotic syndrome in the 1st year of life. Pediatr Nephrol 7(4):347-353,1993.
39. Hassan, G. S., Merhi, Y., & Mourad, W. CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases. Immunobiology.2012. 217(5), 521–532.

40. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A<sub>2</sub>-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2526-32.
41. Hoxha E, Beck LH Jr, Wiech T, Tomas NM, Probst C, Mindford S. et al. An indirect immunofluorescence method facilitates detection of thrombospondin type 1 domain-containing 7A-specific antibodies in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016;28:520–531.
42. Hoxha E, Wiech T, Stahl PR, Zahner G., Tomas NM, Meyer-Schwesinger C. et al. A mechanism for cancer-associated membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2016;374:1995–1996.
43. Hull R. P., Goldsmith R.J. Nephrotic syndrome in adults. *BMJ*. 2008 May 24; 336(7654): 1185–1189.
44. Ichikawa I, Rennker HG, Hoyer JR, Badr KF, Schor N, Troy JL. et al. Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1983;71:91-103.
45. Immenschuh S, Song DX, Satoh H, Muller-Eberhard U. The type II hemopexin interleukin-6 response element predominates the transcriptional regulation of the hemopexin acute phase responsiveness. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Feb 6;207(1):202-8.
46. Kairaitis L., Wang Y., Zheng L, Tay YC, Wang Y, Harris D. Blockade of CD40-CD40 ligand protects against renal injury in chronic proteinuric renal disease. *Kidney International*, Vol. 64 (2003), pp. 1265–1272.
47. Kanai T, Shiraishi H, Yamagata T, Ito T, Odaka J, Saito T. et.al. Th2 cells predominate in idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol* (2010) 14:578-583.
48. Kaneko K. Pathogenesis in childhood idiopathic nephrotic syndrome: an update of patchwork. *Curr Pediatr Rev* 2009;5:56.

49. Kemper MJ, Wolf G, Müller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child, *N Engl J Med*. 2001, 344:386-387.
50. Kerlin B, Ayoob R, Smoyer E. Epidemiology and Pathophysiology of Nephrotic Syndrome–Associated Thromboembolic Disease, *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Mar; 7(3): 513–520.
51. Kimata H, Fujimoto M, Furusho K. Involvement of interleukin (IL)-13, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome. *Eur J Immunol* 25: 1497–1501, 1995.
52. Koster T, Blann AD, Briët E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet Lond Engl* 1995; 345: 152–155.
53. Kronbichler A, Saleem MA, Meijers B, Shin J. Soluble urokinase receptors in focal segmental glomerulosclerosis: a review on the scientific point of view. *J Immunol Res* 2016; 2016: 1.
54. Kuzelova K, Mrhalova M, Hrkal Z. Kinetics of heme interaction with heme-binding proteins: the effect of heme aggregation state. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1336:497–501.
55. Lai KW, Wei CL, Tan LK, Tan PH, Chiang G, Lee C. et.al. Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1476–1485.
56. Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2002;39:958-65.
57. Lennon, Singh A, Welsh GI, Coward RJ, Satchell S, Ni L. et.al. Hemopexin Induces Nephrin-Dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov; 19(11): 2140–2149.
58. Lim BJ, Yang JW, Do WS, Fogo AB. Pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *J Pathol Transl Med*. 2016. 50:405-410.

59. Lin R, Mc Donald G, Jolly T, Batten A, Chacko B. A systematic review of prophylactic anticoagulation in Nephrotic Syndrome. *Clinical Research*. Vol.5. Issue 4. P435-447. 2020.
60. Ling C, Liu X, Shen Y, Chen Z, Fan J, Jiang Y.et.al. Urinary CD80 excretion is a predictor of good outcome in children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*.(2018).
61. Liu Y, Su L, Lin Q, Han Y, You P, Fan P. Induction of C-Mip by IL-17 plays an important role in adriamycin-induced podocyte damage. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:1274-1290.
62. Lyngbæk S, Sehestedt T, Marott JL, Hansen TW, Olsen MH, Andersen O. et al. CRP and suPAR are differently related to anthropometry and subclinical organ damage. *Int J Cardiol* 2013;167:781–785.
63. Maas RJ, Deegens JK, Smeets B, Moeller MJ, Wetzels JF. Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12:768–776.
64. Maher, Shimada M, Lee PY, Johnson RJ, Garin E. Idiopathic Nephrotic Syndrome and Atopy: Is There a Common Link? *Am J Kidney Dis*. 2009 November ; 54(5): 945–953.
65. Mahnke, Y. Beddall M, Roederer M. OMIP-017: Human CD4+ helper T-cell subsets including follicular helper cells. *Cytometry A* 83: 439–440, 2013.
66. Mallory L. Downie, Claire Gallibois, Rulan S. Parekh & Damien G. Noone. Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management, *Paediatr Int Child Health*. 2017 Nov;37(4):248-258.
67. Malyszko J, Malyszko JJ, Mysliwiec M: Markers of endothelial cell injury and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in nephrotic syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 1–7.



68. Medawar W, Green A, Campbell E, Carmody M, Donohoe J, Doyle G. et al. Clinical and histopathologic findings in adults with the nephrotic syndrome. *Ir J Med Sci.* 1990; 159:137-140.
69. Meijers B, Maas RJH, Sprangers B, Claes K, Posen R, Bammens B. et al. The soluble urokinase receptor is not a clinical marker for focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2014; 85: 636–640.
70. McCarthy ET, Sharma M, Savin V. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:2115-2121.
71. Nakayama M, Katafuchi R, Yanase T, Ikeda K, Tanaka H, Fujimi S. et al. Steroid responsiveness and frequency of relapse in adult-onset minimal change nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 503- 512.
72. Neuhaus T. J. Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol* 1995; 100:475-479.
73. Niaudet P. Genetic forms of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2004 Dec;19(12):1313-8.
74. [No authors listed] (1978) Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int* 13:159–165.
75. Passini A, Benetti E, Conti G, Ghio L, Lepore M, Massella L. et al. The Italian Society for Pediatric Nephrology (SINePe) consensus document on the management of nephrotic syndrome in children: Part I - Diagnosis and treatment of the first episode and the first relapse. *Ital J Pediatr.* 2017; 43: 41.
76. Pasquin, S., Sharma, M., & Gauchat, J.-F. Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2015. 26(5), 507–515.

77. Pencina MJ, D'Agostino RB, D'Agostino RB, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a newmarker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statistics in Medicine* 2008; 27:157-172.
78. Pinto B, Araújo S, Alves E, Araújo E, Simoes AC, Veloso S. Is CD44 in glomerular parietal epithelial cells a pathological marker of renal function deterioration in primary focal segmental glomerulosclerosis? *Pediatr Nephrol.* 2017, Vol. 32, Issue 11, pp 2165–2169.
79. Prince T, Reid-Adam J. Nephrotic Syndrome. *Pediatrics in Review* March 2015, 36 (3) 117-126.
80. Printza N, Papachristou F, Tzimouli V, Taparkou A, Kanakoudi-Tsakalidou F. IL-18 is correlated with type-2 immune response in children with steroid sensitive nephrotic syndrome. *Cytokine* 44 (2008) 262-268.
81. Reiser J, Von Gersdoff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L. et.al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 113:1390–1397(2004).
82. Ren S, Wu C, Zhang Y, Wang AY, Li G, Wang L. et.al. An update on clinical significance of use of THSD7A in diagnosing idiopathic membranous nephropathy: a systematic review and meta-analysis of THSD7A in IMN. *Ren Fail.* 2018; 40(1): 306–313.
83. Rigother, C., Daculsi, R., Lepreux, S., Auguste, P., Villeneuve, J., Dewitte, A., Ripoche, J. CD154 Induces Matrix Metalloproteinase-9 Secretion in Human Podocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2016,117(12), 2737–2747.
84. Rizk M. K, El Nawawy A, Abdel Kareem E, Amer ES, El Gezairy D. et.al. Serum interleukins and urinary microglobulin in children with idiopathic nephrotic syndrome. *East Mediterr Health J.* 2005 Sep-Nov;11(5-6):993-1002.
85. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1998;340:115—26.

86. Rubanyi GM: The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 22(Suppl 4):S1–S14, 1993.
87. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R. et al. Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol* 1985, 135(5):3172–3177.
88. Ruth EM, Kemper MJ, Leumann EP, Laube JF, Neuhaus TJ. Children with steroid-sensitive nephrotic syndrome come of age: longterm outcome. *J Pediatr*. 2005;147:202–207.
89. Schmidt-Ott, K. M. Novel Regulators of Kidney Development from the Tips of the Ureteric Bud. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):1993-2002.
90. Segarra A, Jatem E, Quiles MT, Arbos MA, Ostos H, Ostos E, et al. Value of soluble urokinase receptor serum levels in the differential diagnosis between idiopathic and secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Nefrol Publicacion of Soc Espanola Nefrol* 2014; 34:53–61.
91. Segarra A., Carnicer C., Arbos M.A., Quiles M. T., Agraz I., Ostos E. Biological markers of nephrotic síndrome: a few steps forwars in the long way. *Nefrologia*. 2012;32(5):558-72.
92. Segarra A, Carnicer C, Arbós MA, Quiles MT, Agraz I, Ostos E. Biomarcadores en el síndrome nefrótico: algunos pasos más en el camino. *Nefrologia* 2012; 32(5):558-72.
93. Sehestedt T, Lyngbæk S, Eugen-Olsen J, Jeppesen J, Andersen O, Hansen TW. et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with sub-clinical organ damage and cardiovascular events. *Atherosclerosis* 2011; 216: 237–243.
94. Sethi S, Debiec H, Madden B, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2020;97:163–174.
95. Smith NL, Rice KM, Bovill EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B. et al. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood* 2011; 117:6007–6011.

96. Sehestedt, Lyngbæk S, Jeppesen SJ, Andersen O, Hansen TW, Linneberg A. et.al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with subclinical organ damage and cardiovascular events. *Atherosclerosis* 216 (2011) 237-243.
97. Sethi S, Debiec H, Madden B, Charlesworth M.C, Morelle J, Gross L.A. et.al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney International*. 2020.
98. Shalhoub RJ, Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function, *Lancet* 1974;7:556-560.
99. Sharma, M., Zhou, J., Gauchat, J.-F., Sharma, R., McCarthy, E. T., Srivastava, T., & Savin, V. J. Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier. *Translational Research*, 2015, 166(4), 384–398.
100. Shao, Yang XQ, Zhao XD, Li Q, Yuan Y, Xie YY. et.al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome *Pediatr Nephrol*. 2009; 24:1683-1690.
101. Shimoyama H, Najima M, Naka H, Maruhashi Y, Akazawa H, Ueda T. et.al. Up-regulation of interleukin-2 mRNA in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* (2004) 19:1115-1121.
102. Sicking EM, Fuss A, Uhlig S, Jirak P, Dijkman H, Wetzels J. et.al. Subtotal ablation of parietal epithelial cells induces crescent formation. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 629–640.
103. Smeets B, Kuppe C, Sicking EM, Fuss A, Jirak P, Van Kuppevelt TH. et.al. Parietal Epithelial Cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 22: 1262-1274, 2011.
104. Smeets B, Stucker F, Wetzels J, Brocheriou I, Ronco P, Gröne HJ, D'agati V. et. al. Detection of activated parietal epithelial cells on the glomerular tuft

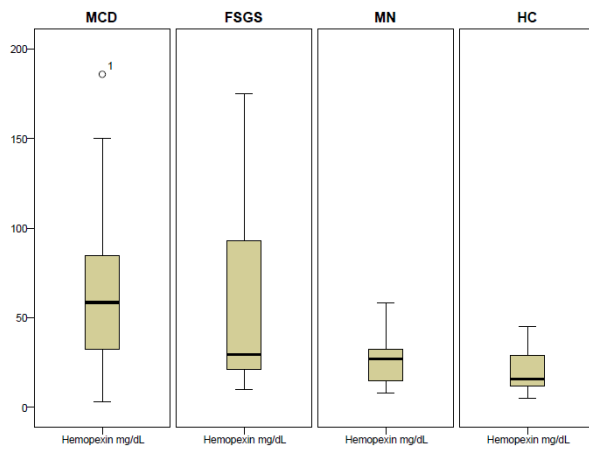
- distinguishes early focal segmental glomerulosclerosis from Minimal change disease. *Am J Pathol.* 2014,vol 184, No 12.
105. Spinale JM, Mariani LH, Kapoor S, Zhang J, Weyant R, Song PX. et al. A reassessment of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in glomerular disease. *Kidney Int* 2015; 87: 564–574.
  106. Stone H, Magella B, Bennet MR. The Search for biomarkers to aid in diagnosis, differentiation, and prognosis of childhood idiopathic nephritic syndrome. *Front Pediatr.* 2019; 7: 404.
  107. Suranyi M.G, Guash A, Hall BM, Myers BD. Elevated levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis.* 1993 Mar;21(3):251-9.
  108. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4: 1832-43.
  109. Takahashi S, Wada N, Murakami H, Funaki S, Inagaki T, Harada K, et al. Triggers of relapse in steroid-dependent and frequently relapsing nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:232–236.
  110. Tkaczyk M, Czupryniak A, Owczarek, Lucamowich J, Nowicki M. Markers of endothelial dysfunction in children with idiopathic nephrotic Syndrome. *Am J Nephrol* 2008; 28: 197–202.
  111. Thabet MA, Salcedo JR, Chan JC. Hyperlipidemia in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1993;7(5):559–66.
  112. Tomas NM, Beck LH, Jr, Meyer-Schwesinger C, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2014;371:2277–2287.
  113. Tomas NM. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *J Clin Invest* 2016 Jul 1;126(7):2519-32.

114. Van Deventer SJ, Büller HR, Ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 1990; 76: 2520-2526.
115. Wang, L Q, Wang L, Li C, Yang H, Wang X, Tao H. The role of Th17/IL-17 in the pathogenesis of primary nephrotic syndrome in children. *Kidney Blood Press Res* 2013; 37:332-345.
116. Watts GF, Herrmann S, Dogra GK, Playford DA, Best JD, Thomas MA, et al. Vascular function of the peripheral circulation in patients with nephrosis. *Kidney Int* 2001;60(1):182–9.
117. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 2011;17:952-60.
118. Wen Q, Huang LT, Luo N, et al. Proteomic profiling identifies haptoglobin as a potential serum biomarker for steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 2012;36:105-113.
119. Yang J, Zhang BL. Value of determination of haptoglobin and alpha1-antitrypsin in predicting response to glucocorticoid therapy in children with primary nephrotic syndrome. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2015 Mar;17(3):227-31.
120. Youden, W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950 3: 32-35.
121. Zvaritch E, Lambeau G, Lazdunski M. Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 1996;271:250-7.
122. Minimal change nephrotic syndrome in children: deaths during the first 5 to 15 years' observation. Report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Pediatrics*. 1984;73:497–501.

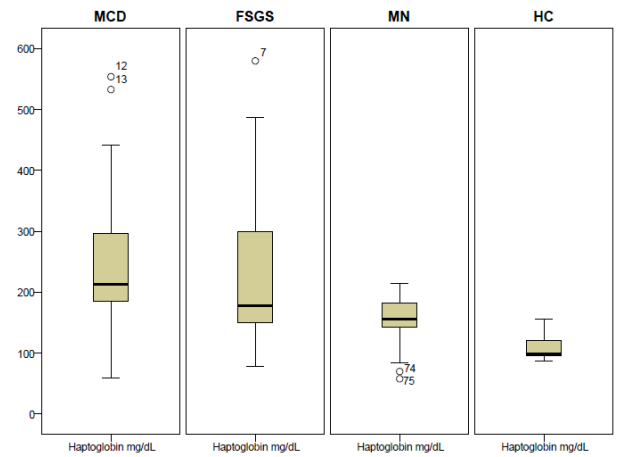
## 11. ANNEX

**Figura 1:** Diagrames boxplot dels nivells sèrics d'Hemopexina, Haptoglobina i altres marcadors inflamatoris en els 3 subgrups de malalts i el grup control. Es representen els valors extrems.

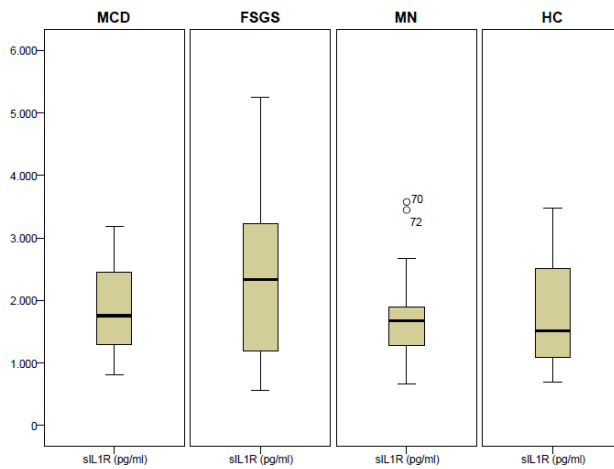
### A. Hemopexina



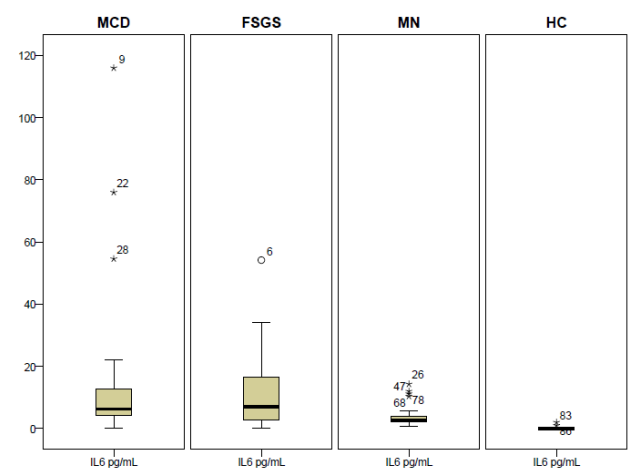
### B. Haptoglobina



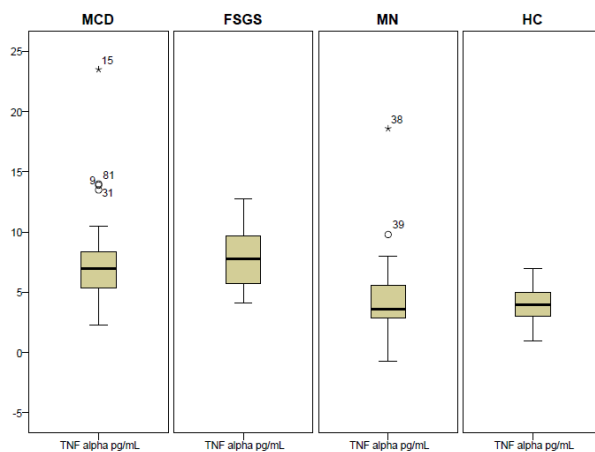
### C. sIL1R



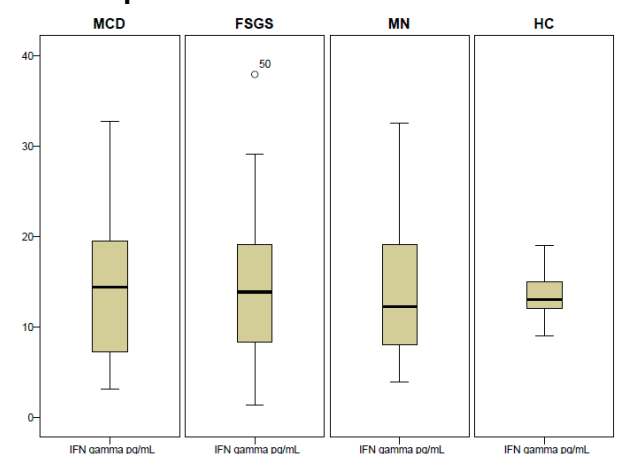
### D. IL6



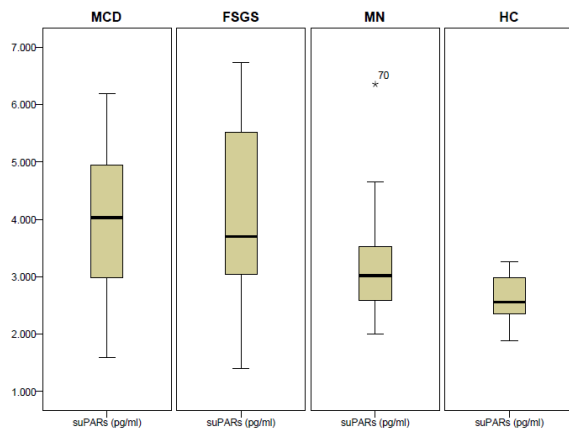
### E. TNF $\alpha$



### F. IFN $\gamma$



### G. suPAR



### H. PCR

