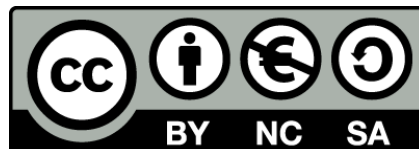




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Apolipoproteïnes-A en la glomeruloesclerosi focal i segmentària

Natàlia Puig Gay



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

APOLIPOPROTEÏNES-A EN LA GLOMERULOESCLEROSIS FOCAL I SEGMENTARIA

Tesi presentada per
Natàlia Puig Gay

Tesi realitzada al grup de Fisiopatologia Renal del CIBBIM-Nanomedicina del Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón sota la direcció del doctor Joan López Hellín i la tutoria del doctor Josep M. Grinyó.

Dr. Joan López Hellín

Dr. Josep M. Grinyó

Natalia Puig Gay

Barcelona, 2018

Als meus pares Jordi i Angela,

germans Llorenç i Joan;

Al Pedro i a la petita Paula.

ÍNDEX

RESUM	9
ABREVIATURES	12
INTRODUCCIÓ	13
1. El ronyó i la nefrona	16
1.2. Composició i Estructura de la Nefrona	17
1.3. Funcions: Filtració, Reabsorció i Secreció.....	20
1.3.1. Filtració Glomerular	21
1.3.1.1. Endoteli capil·lar	21
1.3.1.2. Podòcits	21
1.3.1.3. Membrana glomerular basal	22
1.3.2. Reabsorció i secreció tubular.....	23
2. Síndrome nefròtica (SN).....	24
3. Glomeruloesclerosi Segmentaria i Focal (GESF)	26
3.1. Breu història: GESF i malaltia de canvis mínims	26
3.2. Definició i clínica de GESF.....	28
3.3. Diagnòstic	30
3.4. Patogènesi de GESF.....	37
3.4.1. Causa inicial del dany podocitari en GESF primària o idiopàtica....	39
3.4.2. Causa inicial del dany podocitari en GESF secundària	57
3.5. Tractament.....	62
4. Lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)	68
4.1. Apolipoproteïna A-I	72
4.1.1. Biosíntesi i secreció	72
4.1.2. Estructura	73
4.1.3. Variants genètiques d'ApoA-I.....	75
4.2. Apolipoproteïna A-II	75
HIPÒTESI I OBJECTIUS	76

Hipòtesi.....	78
Objectius.....	79
MATERIALS, MÈTODES I PACIENTS.....	80
1. Pacients.....	82
2. Obtenció i processat de mostres biològiques.....	83
2.1. Plasma.....	83
2.2. Orina.....	83
2.3. DNA.....	85
2.4. Biòpsies.....	88
3. Anàlisi de proteïnes.....	88
3.1. SDS-PAGE d'una dimensió o western-blot (WB).....	88
3.2. Electroforesis bidimensional (2D).....	93
3.2.1. Primera dimensió: Isoelectroenfoc (IEF).....	94
3.2.2. Segona dimensió: SDS-PAGE.....	96
3.2.3. Tinció de proteïnes amb coomassie col·loïdal.....	98
3.3. Electroforesis nativa (Blue Native-PAGE).....	100
3.4. Anàlisi i processat d'imatges.....	103
3.4.1. Anàlisi i processat dels gels no desnaturalitzants.....	103
3.4.2. Anàlisi i processat dels gels bidimensionals.....	103
3.5. Anàlisi de proteïnes en nefelometre.....	105
4. Caracterització de les modificacions de ApoA-Ib.....	105
4.1. Anàlisi genètic.....	106
4.1.1. Reacció en cadena de la polimerasa.....	106
4.1.2. Electroforesis en gels d'agarosa.....	109
4.1.3. Purificació, Seqüenciació i anàlisi de mutacions.....	110
4.1.4. Nomenclatura de les variants de seqüència.....	110
4.1.5. Eines <i>in silico</i>	111

4.2. Anàlisi de modificacions post-traduccionals (PTM) de ApoA-Ib	111
4.2.1. Anàlisi amb PNGase.....	111
4.2.2. Anàlisi amb ProQ Emerald.....	112
4.2.3. Anàlisi Proteòmica.....	112
5. Anàlisi de les biopsies de ronyó humà.....	114
6. Experiment in vivo.....	117
6.1. Cromatografia d'afinitat	117
6.2. Elisa Apo-AI	120
6.3. Assaig en gàbies metabòliques - Cerca pacient inductor de proteïnúria	121
6.4. Anàlisi de proteïnúria en rates.....	122
7. Anàlisi estadística	123
ANNEX MATERIALS I MÈTODES.....	122
1. Composició dels <i>buffers</i> utilitzats	125
RESULTATS.....	125
1. Validació de les proteïnes diferencials trobades per 2D-PAGE a orina: ApoA-Ib i ZAG.....	128
1.1. Disseny experimental i pacients.....	128
1.2. Validació de ZAG.....	131
1.3. Validació de ApoA-Ib	132
1.4. Determinació d'ApoA-Ib per mètodes automatitzats.....	139
2. Capacitat pronostica i predictora de recidiva d'ApoA-Ib	142
3. Validació i optimització com a biomarcadors de les proteïnes diferencials trobades per 2D-PAGE a plasma: ApoA-II	145
4 Relació d'ApoA-Ib i ApoA-II en orina	149
5. Caracterització de les modificacions de ApoA-Ib.....	151
5.1. Determinació de variants genètiques	152
5.2. Determinació de modificacions post-traduccionals.....	154

Índex

6. Implicació de ApoA-Ib en les recidives de GESF / malaltia de GESF	161
6.1. ApoA-Ib i les subpoblacions de HDL	161
6.2. ApoA-Ib en biopsies de ronyó	166
6.3. ApoA-Ib in vivo	170
DISCUSSIÓ.....	172
CONCLUSIONS.....	200
BIBLIOGRAFIA	203

RESUM

La Glomeruloesclerosi Segmentària i Focal (GESF) és una malaltia renal associada a síndrome nefròtica corticoresistent, el resultat final de la qual és una lesió glomerular que produeix elevada proteïnúria¹. Segons les causes de la malaltia existeixen varies formes de GESF: les secundàries, d'origen conegut, tals com les mutacions en els gens de proteïnes podocitàries o per hiperfiltració glomerular i la primària o idiopàtica, d'origen desconegut, en la qual es centra aquesta tesis. Tot i la causa desconeguda d'aquesta tipus de GESF varis estudis han arribat a la conclusió que està causada per un o diversos factors plasmàtics encara desconeguts que s'originen fora del ronyó²⁻⁴.

Un dels principals problemes de GESF és la manca de resposta al tractament amb esteroides, amb progressió freqüent cap a insuficiència renal, diàlisi i finalment el trasplantament renal, que entre el 30-50% dels casos recidiva fins i tot hores després de rebre el trasplantament⁵. Això sumat a la dificultat del diagnòstic basat en les característiques clíniques, es a dir, augment de proteïnúria, el qual pot venir per altres causes i detecció de la glomeruloesclerosi segmentària a la biòpsia renal, les quals no solen aparèixer fins al cap d'un mes de l'aparició de proteïnúria⁶, fa que sigui necessari buscar proteïnes útils coma biomarcador que permetin un ràpid diagnòstic així com un pronòstic de la recidiva de GESF

Per tot això es va dissenyar un estudi en el qual mitjançant tècniques proteòmiques es pretenia detectar els potencials inductors de la malaltia a més de molècules que poguessin servir com a marcadors pronòstics de recidiva. Hem trobat específicament associades a GESF idiopàtic unes formes d'apolipoproteïnes de HDL: una d'apolipoproteïna A-II monomèrica (ApoA-IIm) en el plasma dels pacients idiopàtics⁷ i una d'apolipoproteïna A-I (ApoA-Ib) a l'orina dels pacients trasplantats amb recaiguda de GESF⁸.

De l'estudi d'un total de 119 pacients utilitzats en la validació d'ApoA-Ib hem pogut demostrar que ApoA-Ib és un bon biomarcador de recidiva post-trasplantament de GESF amb una sensibilitat i una especificitat del 92.8% i el 98.1% respectivament, un segon estudi va permetre confirmar la utilitat de ApoA-Ib com a biomarcador amb sensibilitat del 93.3%, especificitat del 89.1% , a més de poder ser utilitzat com a biomarcador negatiu (valor predictiu negatiu del 99% en el primer grup i del 97.6% en el segon grup) es a dir l'absència d'ApoA-Ib permet excloure el diagnòstic de recidiva amb una elevada confiança, fins i tot en presència de proteïnúria severa, complementant el diagnòstic clàssic basat en evidències histològiques en la biòpsia renal, sobretot en els casos primerencs on les lesions encara no s'han desenvolupat i que per tant el diagnòstic no es clar, a més, té com avantatge que és un biomarcador no invasiu que permet fer mesures fàcils i repetides amb un resultat qualitatiu. També sembla que ApoA-Ib podria ser de gran utilitat en la predicció de la recidiva post-trasplantament de GESF.

Hem pogut determinar que ApoA-Ib és en realitat una forma d'apolipoproteïna A-I amb una maduració incompleta i que presenta una part del pro-pèptid unit a ella, donant-li així més pes molecular i un punt isoelèctric més bàsic del que s'esperaria per a l'ApoA-I estàndard. Aquesta forma anòmala d'ApoA-I altera la proporció de les subfraccions de HDL.

El paper d'aquesta forma anormal d'apolipoproteïna A-I en la patogènia del GESF no ha pogut ser evidenciada, encara que s'ha demostrat la seva associació gairebé exclusiva amb les recidives de GESF.

ABREVIATURES

2D-PAGE	Electroforesis en gel d'acrilamida bidimensional
AA	Aminoàcid
ABCA-1	Transportador ATP Binding Cassette A1
AD	Herència autosòmica dominant
ADH	Hormona antidiürètica
AIAT	α -1 antitripsina
AMBP	Precursor α -1-microglobulina/bikunina
ANOVA	Anàlisi de la variància
ApoA-I	Apolipoproteïna A-I
ApoA-Ib	Apolipoproteïna A-Ib
ApoA-II	Apolipoproteïna A-II
ApoA-II m	Apolipoproteïna A-II monomèrica
ApoL1	Apolipoproteïna L-1
AR	Herència autosòmica recessiva
AT1	Receptor tipus 1 de l'angiotensina II
BCA	Assaig àcid bicinconínic
BSA	Albúmina sèrica bovina
CETP	Proteïna transferidora d'esters de colesterol
CLCF-1	Factor de citoquines cardiotrofina 1
CsA	Ciclosporina A
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamina tetra-acetat de sodi
ELISA	Assaig immunosorbent enzim associat
FK-506	Tacrolimus
GESF	Glomeruloesclerosi segmentaria i focal
GESF-FAM	Glomeruloesclerosi segmentaria i focal familiar (d'origen genètic)
GESF-NR	Glomeruloesclerosi segmentaria i focal no recidivant
GESF-R	Glomeruloesclerosi segmentaria i focal recidivant
GFR	Taxa de filtració glomerular
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
HEMO	Hemopexina
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
IEF	Isoelectroenfoc
Ig	Immunoglobulines
IHQ	Immunohistoquímica
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
LCAT	Lecitina:colesterol acil-trasferasa
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida-ionització per electroesprai-masses/masses
LC-MS/MS	Cromatografia líquida - espectrometria de masses
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LTQ-Orbitrap	Trampa iònica – espectròmetre de masses Orbitrap®
MALDI-TOF	Desorció / ionització làser assistida per matriu – Temps de vol
nTx	no trasplantats
PAGE	Electroforesi en gel d'acrilamida
Palb	Permeabilitat a l'albúmina
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PLTP	Proteïna transferidora de fosfolípids
P-noGESF	Proteïnúries no relacionades amb Glomeruloesclerosi segmentaria i focal
Post-Tx	Post-trasplantament
Pre-Tx	Pre-trasplantament
PTM	Modificacions post-traduccionals

Abreviatures

PTPro	Receptor tipus O proteïna tirosina fosfatasa
RET4	Proteïna d'unió al retinol
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SN	Síndrome nefròtica
SNPs	Polimorfisme; Single nucleotide Polimorphism
SuPAR	Receptor soluble de la uroquinasa
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TTHY	Transtiretina
Tx	Transplantament
uPAR	Receptor de la uroquinasa
UPLC	Cromatografia líquida d'ultra elevada eficàcia
VIH	Virus immunodeficiència humana
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat
VPN	Valor predictiu negatiu
VPP	Valor predictiu positiu
WB	Western-Blot
ZAG	Zinc α -2glicoproteïna

INTRODUCCIÓ

1. El Ronyó i la nefrona

El ronyó és un òrgan indispensable per mantenir l'homeòstasi corporal mitjançant la filtració de la sang i la formació d'orina.

Entre les seves funcions trobem que és l'encarregat de regular el volum extracel·lular controlant l'excreció de sodi i aigua. Mitjançant la producció d'orina controla l'osmolaritat del medi extracel·lular, regula la concentració plasmàtica de varis ions com potassi, calci, sodi, clorur i fosfat, i s'encarrega del manteniment del pH, mitjançant l'excreció de ions d'hidrogen cap a la orina i conservant els ions bicarbonat. També està implicat en la producció d'hormones com la eritropoetina que estimula la producció de glòbuls vermells, la renina que intervé en la regulació de la pressió arterial i el calcitrol que és la forma activa de la vitamina D i ajuda a regular la homeòstasi del calci. Però la funció amb que més es relaciona el ronyó és l'excreció de productes de rebuig derivats del metabolisme (creatinina, urea i àcid úric) i substàncies nocives (fàrmacs i compostos tòxics per l'organisme)⁹.

La Nefrona és la unitat estructural i funcional encarregada de realitzar les funcions del ronyó i es localitza en el còrtex renal. Una persona adulta té de 1.5 a 2 milions de nefrones^{10,11}(Figura1).

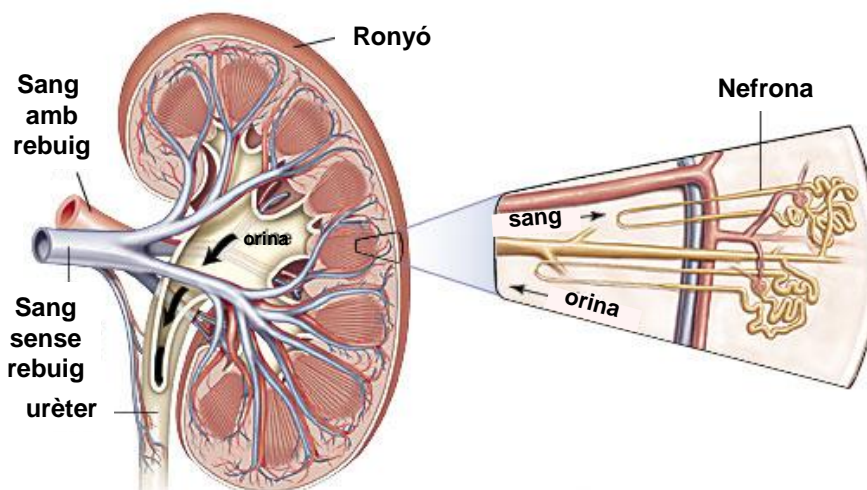


Figura 1. Anatomia del ronyó. En la imatge s'hi pot observar l'estructura així com la unitat funciona principal, la nefrona. (© 2006 *Encyclopædia Britannica, Inc*)

1.2. Composició i Estructura de la Nefrona

Cada nefrona està composta d'un glomèrul i un sistema tubular. El glomèrul és un cabdell de capil·lars que es troba embolcallat per la capsula de Bowman, la qual està composta per un epitel·li extern o parietal i un epitel·li intern o visceral, quedant entre ambdues capes una cavitat estreta denominada espai urinari o de Bowman que està en continuïtat amb la llum del túbul proximal. El conjunt compost per la càpsula i els capil·lars és el que s'anomena corpuscle glomerular. Aquest té un pol vascular, on les arterioles aferents i eferents continuen amb els capil·lars glomerulars, i un pol urinari on es continua amb la llum del túbul contornejat proximal.

Les cèl·lules de la capa visceral s'anomenen podòcits i tenen una estructura amb nombroses prolongacions primàries radials que es ramifiquen donant lloc a les prolongacions podocitàries secundàries conegudes com pedicels. Aquests s'integren amb els podòcits adjacents mantenint una separació entre ells mitjançant espais intracel·lulars estrets que permetran la

sortida del filtrat plasmàtic dels capil·lars glomerulars i la seva entrada en el espai capsular, les quals s'anomenen fenedures de filtració (figura 2¹²). Entre els podòcits i els capil·lars es troba la membrana glomerular basal, la qual és essencial pel correcte funcionament del filtrat glomerular. Els podòcits juntament amb els capil·lars i la membrana glomerular basal constitueixen la barrera de filtració glomerular. Els espais que queden entre els capil·lars glomerulars estan ocupats per un teixit connectiu denominat mesangi, les funcions principals del qual són mantenir l'estructura i funció de la barrera de filtració glomerular i eliminar residus de filtració. El mesangi està compost per les cèl·lules mesangials i la matriu extracel·lular. Les cèl·lules mesangials emeten nombrosos pseudòpodes, a l'interior dels quals es localitzen filaments d'actina i miosina units a la membrana, fet que els dona la capacitat contràctil. Aquestes cèl·lules són les encarregades de produir els compostos de la matriu mesangial (col·lagen, proteoglicans, fibronectina) (Figura 3).

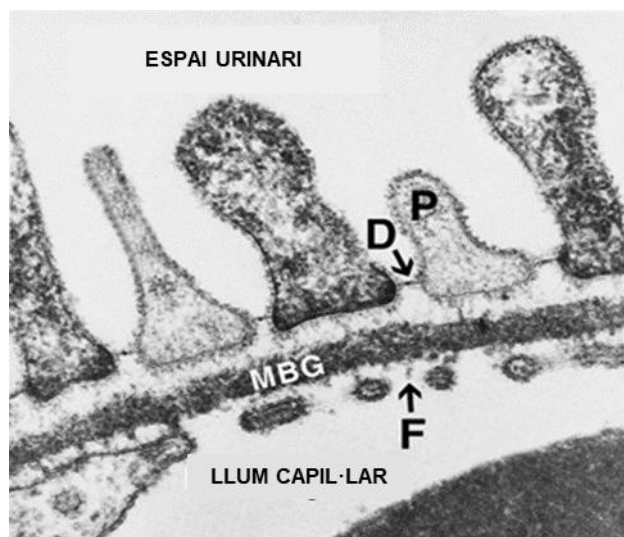


Figura 2. Estructura de la membrana de filtració. S'observa l'endoteli fenestrat (F), la membrana glomerular basal (MGB) i l'epiteli visceral, format per podòcits (P) que deixen veure el diafragma (D) entre els pedicels.

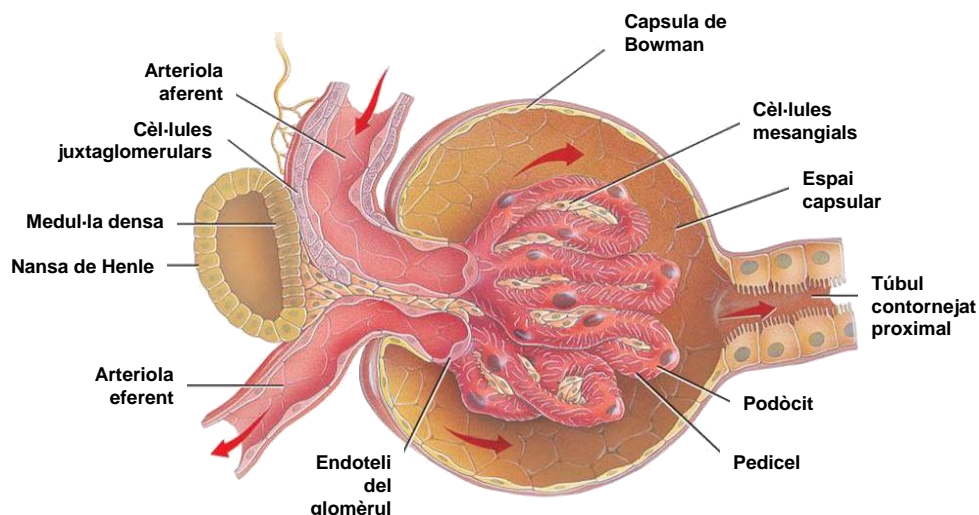


Figura 3. Estructura glomerular (© John Wiley & Sons, Inc)

El sistema tubular renal es l'encarregat de reabsorbir totes les substàncies útils que s'han filtrat a nivell glomerular, com són els ions de sodi i potassi, glucosa, aminoàcids i aigua, així com d'excretar algunes altres de nocives com l'àcid úric (Figura 4).

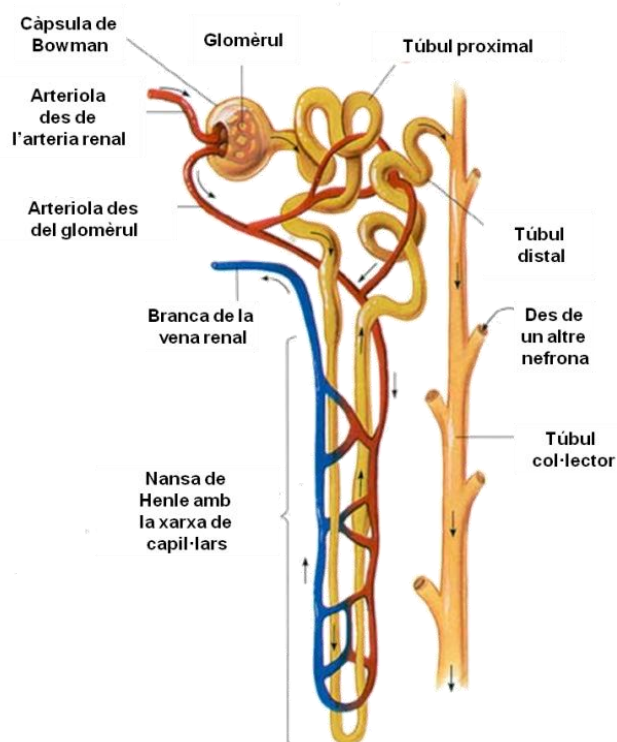


Figura 4. Representació de la nefrona, on s'observa el glomèrul, i el sistema tubular. (© Addison Wesley Longman, Inc)

El glomèrul renal continua amb el túbul proximal mitjançant el seu pol urinari. Aquest sistema està constituït per cinc regions; el túbul contornejat proximal, la nansa de Henle, que està dividida en tres segments diferents, la branca descendent, la branca ascendent prima i la branca ascendent gruixuda, aquesta última es continua amb el túbul distal que en lloc de contactar amb l'arteriola aferent provoca que les cèl·lules de la seva paret es transformin donant lloc a la màcula densa, que va a formar part del aparell juxtaglomerular, el qual es l'encarregat de regular el funcionament de la nefrona ja que es el responsable de la síntesis de la renina. A partir d'aquesta regió el túbul distal es fa més tortuós formant el túbul contornejat distal, que s'uneix a un conducte col·lector per mitjà del túbul col·lector. Els espais que queden entre els túbuls renals estan ocupats per vasos sanguinis i limfàtics, a més de teixit connectiu laxa.

1.3. Funcions: Filtració, Reabsorció i Secreció

La formació de la orina està determinada per la coordinació de tres processos diferents, la filtració, la reabsorció i la secreció, que tenen lloc al llarg de la nefrona. En el glomèrul es porta a terme el primer pas de la filtració del plasma sanguini en direcció a la capsula de Bowman generant l'ultrafiltrat. La reabsorció cap a la sang de determinats components que s'han filtrat útils per l'organisme té lloc des del lumen dels túbuls, i la secreció d'aquelles substàncies que no han sigut filtrades però que han de ser excretades succeeix des de la sang al interior del túbul.

1.3.1. Filtració Glomerular

En condicions normals el volum de fluid filtrat pels capil·lars glomerulars a la càpsula de Bowman per unitat de temps, es a dir, el filtrat glomerular és d'uns 120 ml/min. Aquest pas de filtració es duu a terme gràcies a la barrera de filtració glomerular, la qual esta constituïda per tres capes que interaccionen entre si: l'endoteli capil·lar, la membrana glomerular basal i els podòcits¹³. Aquesta barrera pràcticament no permet el pas de molècules majors de 70KDa, impedit així que aquestes arribin a la capsula de Bowman i a la llum tubular. En canvi, les proteïnes de baix pes molecular si passen sense restricció a traves de la barrera de filtració glomerular, però d'aquestes només una petita part arriben a la orina final, ja que son reabsorbides el túbul renal proximal. Així doncs un primer símptoma d'alteracions a nivell de filtració glomerular és la presencia de proteïnes de pes molecular intermig-alt a la orina¹⁴.

1.3.1.1. Endoteli capil·lar

Està compost per cèl·lules planes que presenten obertures o fenestracions en la seva paret, les quals estan plenes de glicocàlix, una malla hidratada composta principalment de proteoglicans. El glicocàlix i els constituents del plasma adsorbits conformen la capa endotel·lial superficial. Encara que tradicionalment es considera que es totalment permeable, noves dades apunten a que l'epiteli fenestrat pot tenir un paper mes important en la retenció d'albúmina i altres macromolècules del que es creia fins ara¹³.

1.3.1.2. Podòcits

Són cèl·lules epitelials polaritzades altament diferenciades. Consten d'un voluminós cos cel·lular amb unes llargues prolongacions podocitaries que es

ramifiquen donant lloc als processos podocitaris secundaris o pedicels. Les prolongacions de podòcits adjacents s'intercalen entre si donant lloc a la formació dels pors de filtració.

L'estructura podocitaria esta formada per un citoesquelet molt desenvolupat responsable de la forma cel·lular i el manteniment dels processos podocitaris. El cos cel·lular del podòcit esta compost principalment per microtúbuls i filaments intermedis, mentre que els pedicels es caracteritzen per la presència de filaments d'actina que s'estenen al llarg del seu eix longitudinal. Així doncs, el citoesquelet que forma part del podòcits és el responsable de les unions entre ells i de la interacció d'aquests podòcits amb la membrana glomerular basal¹⁵. El despreniment dels podòcits de la membrana glomerular basal te com a conseqüència la glomeruloesclerosis.

1.3.1.3. Membrana glomerular basal

Situada entre la capa de podòcits i la de les cèl·lules endotel·lials, té un paper fonamental en la filtració glomerular. Es tracta d'una membrana formada per tres capes sense porus. La central anomenada lamina densa és la més gruixuda i es troba entre dos capes mes fines anomenades lamina rara interna, la més pròxima al lumen (adjacent a l'endoteli), i la lamina rara externa, més propera al espai urinari (adjacent als podòcits). La lamina densa esta composta per una malla de fibres de col·lagen de tipus IV i V a més de glicoproteïnes com laminina, que filtren selectivament molècules entre les fibres basant-se en la mida. Les capes de làmina rara contenen fibronectina i sulfat de heparàn, una molècula polianiónica que pot actuar com una barrera de càrrega contra grans molècules carregades negativament tals com algunes proteïnes¹⁶.

1.3.2. Reabsorció i secreció tubular

El sistema de túbuls renals s'encarreguen de processos fonamentals per a la formació de l'orina, com son la reabsorció de substàncies necessàries per l'organisme, entre elles les proteïnes filtrades de baix pes molecular, i la secreció de substàncies que han de ser eliminades.

A les cèl·lules del túbul proximal és on es capten, el 67% de l'aigua, el clorur i el sodi, així com pràcticament el 100% del bicarbonat, els sucres, aminoàcids i pèptids que es troben en el ultrafiltrat. La porció descendent de la nansa de Henle és pràcticament impermeable al clorur de sodi (NaCl) i molt permeable a l'aigua, augmentant la osmolaritat del fluid tubular. La branca ascendent és més permeable al NaCl i és completament impermeable a l'aigua, el qual determina que el líquid que flueix per la nansa ascendent es faci progressivament menys hipertònic. La part gruixuda de la branca ascendent de la nansa de Henle és impermeable a l'aigua i conté un transportador de Na⁺, K⁺ i Cl⁻ en el seu interior. La reabsorció de soluts sense aigua fa que el líquid que surt de la nansa ascendent gruixuda sigui hipotònic respecte el plasma. El túbul contornejat distal és impermeable a l'aigua; l'osmolaritat del fluid tubular disminueix encara més, fent-se hipoosmòtica respecte el plasma. El sistema de túbuls col·lectors és la part més important de la nefrona a la hora d'ajustar l'excreció d'aigua, Na⁺, K⁺ i H⁺. La permeabilitat de l'aigua dels túbuls col·lectors està regulada per la hormona antidiürètica (ADH). En els túbuls col·lectors corticals es produeix quantitativament la major sortida d'aigua, mentre que en els túbuls medul·lars i papil·lars, la osmolaritat del interstici es va fent progressivament major, el que determina una reabsorció addicional d'aigua fins a arribar a una osmolaritat màxima¹⁷.

Pel que fa a les proteïnes filtrades, aquestes son recuperades al lumen del túbul proximal per procés d'endocitosis mitjançant receptors específics. Concretament el complex format per la megalina i la cubulina que s'expressa en la regió luminal de les cèl·lules epitel·lials del túbul. L'endocitosi es produeix quan hi ha una unió del lligand al complex, el qual provoca la internalització de ambdós en forma de vesícules. La megalina es capaç d'unir multitud de lligands, com venen a ser vitamines, enzims i inhibidors d'enzims, hormones, toxines, lipoproteïnes, albúmina, hemoglobina, etc. En el cas de la cubulina, aquesta comparteix alguns lligands amb la megalina, però també presenta lligands específics com son la transferrina o l'apolipoproteïna A-I ¹⁴.

2. Síndrome nefròtica (SN)

La síndrome nefròtica és la conseqüència clínica d'una pèrdua massiva de proteïnes en la orina (proteïnúria), que té el seu origen en un augment de la permeabilitat de la paret del capil·lar glomerular. Freqüentment es causada per una lesió funcional o estructural en els podòcits¹⁸.

Una àmplia gamma de malalties glomerulars primàries i malalties secundàries poden causar la síndrome nefròtica, però la majoria dels casos de síndrome nefròtica semblen ser causats per malalties renals primàries, entre les quals, la nefropatia membranosa i la glomeruloesclerosi segmentària i focal (GESF) representen aproximadament un terç dels casos de síndrome nefròtica primària; La malaltia de canvis mínims i la nefropatia per IgA (amb menys freqüència) són causants d'aproximadament un 25% dels casos de síndrome nefròtica primària. Com a causes secundàries s'han identificat nombrosos factors, entre els quals trobem la hepatitis B o C, amiloïdosis, lupus i VIH, però

la causa més comú de la síndrome nefròtica secundària és la diabetis mellitus o el que es coneix com nefropatia diabètica^{19,20}.

La SN en nens es caracteritza per una proteïnúria de més de 40mg de proteïna en l'orina per metre quadrat de superfície corporal i per hora, hipoalbuminèmia (<2,5g d'albumina per decilitre), hipercolesterolèmia (>200mg de colesterol total per decilitre) i edema, mentre que en adults es defineix per un nivell de proteïnes en orina superior a 3,5g/dia i un nivell d'albumina sèrica inferior a 3,5g/dl¹.

Així doncs, la principal manifestació clínica de la SN és la proteïnúria, la qual acaba produint la resta de manifestacions clíniques. Les proteïnes que es perden a la orina són sobretot de pes molecular intermedi (entre 40 i 150 KDa), entre les quals s'inclouen: albumina (representa entre un 70-80% de les proteïnes en la orina en la SN), IgG, transferrina, ceruloplasmina i glicoproteïna α_1 -àcida. També es perden petites quantitats de proteïnes de mida superior, com son les subfraccions més petites de HDL. Aquestes proteïnes en arribar al túbul competeixen entre elles i contra les de petit pes molecular (que de forma normal passen a la llum tubular però son recaptades pel complex cubilina/megalina) per a la reabsorció mitjançant les cèl·lules epitelials del túbul proximal¹⁴.

Altres manifestacions clíniques de la SN són com ja hem comentat la hipoalbuminèmia, la causa de la qual és la pèrdua urinària d'albumina, de tal manera que sobrepassa la compensació hepàtica (la síntesis per part del fetge és insuficient per compensar el baix nivell de proteïnes en sang), reduint els nivells plasmàtics d'aquesta proteïna per sota dels 2.5g/dl. També s'observa

edema, que apareix com a resultat de la disminució de la pressió oncòtica del plasma produïda per la hipoalbuminèmia. Aquesta disminució de pressió oncòtica produeix la sortida de líquid cap al interstici cel·lular i la disminució del volum circulant²¹. Finalment també s'observa la dislipèmia, que en la SN es caracteritza per un augment del colesterol total, hipertrigliceridèmia amb augment de les VLDL i una reducció dels nivells de HDL²².

3. Glomeruloesclerosis Segmentaria i Focal (GESF)

3.1. Breu història: GESF i malaltia de canvis mínims

La Glomeruloesclerosis Segmentaria i Focal (GESF) és una malaltia renal definida per un conjunt de lesions glomerulars associades a una considerable pèrdua de proteïnes en l'orina i resistència al tractament amb esteroides (síndrome nefròtica corticoresistent). Es considerada com un grup d'entitats clíniques que produeix el mateix resultat final, una lesió glomerular que dona lloc a una elevada proteïnúria¹. Entre les diverses formes de GESF, la més freqüent és la forma primària o idiopàtica, causada per un o diversos factors circulants desconeguts que s'originen fora del ronyó²⁻⁴. GESF idiopàtica generalment es caracteritza per la manca de resposta al tractament i la progressió freqüent cap a la insuficiència renal terminal, que requereix diàlisi o trasplantament renal. Una de les característiques més frustrants de GESF idiopàtica és l'alta taxa de recidives després del trasplantament renal, explicada per la producció persistent del factor(s) circulant(s) que causa la malaltia fora del ronyó.

La glomeruloesclerosi focal i segmentaria va ser descrita per primera vegada en biòpsies de ronyó d'adults amb síndrome nefròtica (SN) per Fahr l'any 1925²³. Es descrivia com una cicatrització del glomèrul, però que afectava únicament a alguns glomèruls, i només es trobava esclerosada una part d'aquests glomèruls. L'any 1957 en una sèrie d'autòpsies realitzades pel patòleg Arnold Rich en pacients amb síndrome nefròtica, va observar que no en tots els casos catalogats com a lesió de canvis mínims, una altre SN sense esclerosi glomerular i en general responent a esteroides, es presentava el mateix patró histològic, sinó que en alguns casos es produïa un engruiximent de la membrana glomerular basal i s'observaven dipòsits hialins. Aquestes lesions al llarg del temps provocaven una destrucció de l'arquitectura normal del glomèrul²⁴. A aquest estudi en van seguir d'altres on també s'observava aquesta lesió glomerular i es plantejaven la hipòtesis de que GESF podria tractar-se d'una malaltia independent més que una variació o un estat tardà de la lesió de canvis mínims²⁵⁻²⁷.

Avui en dia encara existeix certa controvèrsia en si GESF i la lesió de canvis mínims són malalties diferents o la mateixa en diferents estadis. Mentre que en algunes publicacions es citen aquestes malalties com a entitats separades^{28,29}, defensant que la malaltia de canvis mínims s'associa clàssicament a un aspecte normal dels glomèruls i a la capacitat de resposta als corticosteroides, i que malgrat solapar-se a altres variants histològiques com seria la GESF, aquesta última es menys corticosensible i que per tant desenvolupa lesions esclerosants secundàries al llarg del temps. Existeix també un altre punt de vista al respecte, que defensa que GESF idiopàtica i la malaltia de canvis mínims són dues manifestacions de la mateixa malaltia,

doncs en ambdós casos s'observa l'esborrament dels pedicels dels podòcits. Es proposa que la malaltia de canvis mínims correspondria a una etapa primerenca, on no s'observa lesió, i GESF seria una fase més tardana on si s'observen les típiques lesions escleròtiques i segmentaries en els glomèruls³⁰.

3.2. Definició i clínica de GESF

El terme GESF s'utilitza per descriure tant la lesió que succeeix de forma secundària en la malaltia renal crònica, com per la malaltia glomerular clínica associada a la SN i al dany podocitari³¹. Com el propi nom indica, histològicament es caracteritza per una esclerosi glomerular focal, només en alguns glomèruls, i per una distribució segmentaria, que només afecta una porció del glomèrul (en cas contrari es tractaria d'una lesió difusa global), la lesió renal es caracteritza per la obstrucció dels capil·lars, la presència de dipòsits amorfes (hialinòsis) i per un engruiximent de la matriu mesangial; ocasionalment es poden observar per immunofluorescència dipòsits d'immunoglobulines (Ig) M, i en observar la biòpsia per microscòpia electrònica es pot observar l'esborrament de podòcits²³.

En la majoria de casos la GESF es presenta com una SN resistent a corticosteroides que freqüentment acaba en insuficiència renal terminal. Així doncs, la característica clínica més clara en malalts de GESF és la proteïnúria, la qual acaba donant lloc a la SN. Un 75-90% dels infants i un 50-60% del adults presenten aquesta proteïnúria en rang nefròtic (>3g/24h)³²⁻³⁴. Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior corresponent a la SN, aquesta es caracteritza per proteïnúria, hipoalbuminèmia, hepercolesterolèmia i edema, i en adults per proteïnúria i hipoalbuminèmia. Aquesta albúmina sèrica es un

dels millor marcadors per diferenciar entre GESF primàries i GESF secundaries, doncs pacients amb GESF secundaria normalment presenten nivells d'albumina sèrica normals o lleugerament baixos, mentre que els pacients amb GESF primària solen presentar una elevada hipoalbuminèmia³⁵.

Un altre característica important de la proteïnúria pel que fa a la malaltia de GESF és la seva capacitat pronostica de l'evolució de la malaltia, així doncs pacients que en el moment de presentació tenen uns rangs de proteïnúria de entre 3 i 3.5g/dia, la seva progressió a insuficiència renal terminal sol ser de entre 6 i 8 anys³⁶, mentre que la proteïnúria massiva (>14g/dia) en el moment de presentació te un pitjor pronòstic, arribant a la insuficiència renal terminal abans dels 6 anys. D'altra banda, aquells que presenten proteïnúria en rang no nefròtic, solen tenir una supervivència renal als 10 anys del 80%^{36,37}.

La incidència de GESF ha anat en augment durant varies dècades. Avui en dia és la causa subjacent de la síndrome nefròtica en el 40% dels adults i en el 20% dels infants, i és la lesió glomerular primària més freqüent que desemboca a un estat renal terminal en els Estats Units^{38,39}. Gairebé entre un 7 i un 15% de tots els nens afectats per síndrome nefròtica idiopàtica són diagnosticats de GESF després de la biòpsia renal. Sense tractament, aquests pacients podrien desenvolupar proteïnúria progressiva i una taxa de filtració glomerular reduïda, i al voltant del 30% d'ells podrien desenvolupar la malaltia renal en etapa terminal en vint anys⁴⁰. En el cas d'Espanya, GESF es responsable de la síndrome nefròtica en el nen amb un freqüència inferior al 10%, però que augmenta a mesura que augmenta l'edat i arriba a ser d'un 20% en adolescents i adults. No s'observen diferències entre sexe⁴¹.

Hi ha diferents formes de classificar els pacients de GESF, una primera es basa en les lesions observades en la biòpsia, i es poden diferenciar cinc variants morfològiques^{1,31,42-45}: GESF clàssica, forma col·lapsant, lesió tip, forma cel·lular i forma perihil·liar; un altre classificació es basa en els factors etiològics causants de GESF, el qual permet classificar els pacients en dos grans grups: GESF idiopàtica o GESF secundària⁴⁶.

3.3. Diagnòstic

El diagnòstic de GESF es basa en un diagnòstic d'exclusió, doncs el terme glomeruloesclerosi focal i segmentaria fa referència a un patró histològic característic de fins a sis etiologies subjacents diferents que comparteixen la mateixa lesió podocitària, així doncs, la lesió histològica observada en pacients GESF només representa un patró de lesió i no proporciona una visió real de la patogènia^{47,48}.

Davant un possible cas de GESF s'ha de realitzar una història clínica acurada (història familiar, pes al naixement, índex de massa corporal i medicació) i un examen clínic (albúmina sèrica, proteïnúria, serologies víriques, entre d'altres), a més de la histologia renal. La manera com s'ha presentat la malaltia (aparició sobtada de la síndrome nefròtica o canvis graduals més subtils) i les condicions mèdiques associades (infeccions, obesitat, hipertensió, VIH, etc.) ajudaran a distingir entre una GESF primària o idiopàtica i una GESF secundària. En els casos en que GESF es presenta de manera primerenca en la vida, es sol realitzar una avaluació genètica, ja que en aquests casos hi ha moltes probabilitats de presentar alguna mutació causant de la malaltia en els gens del podòcit. Quan es tracta de pacients adolescents/adults tot i que la realització d'una avaluació genètica pot descartar la presència de mutacions en

alguns gens podocitaris, el fet d'obtenir resultats negatius no és garantia de no patir una GESF familiar ja que pot ser que siguin pacients amb mutacions en regions no codificants dels gens candidats o mutacions en gens encara no descrits com a possibles causants de GESF⁴⁹.

La biòpsia renal amb el posterior examen histològic és imprescindible en el diagnòstic, l'avaluació pronòstica i l'orientació terapèutica de la malaltia renal, sobretot quan les dades clíniques no són prou clares per establir tal diagnòstic, tot i que no sempre els resultats obtinguts en realitzar una biòpsia són concloents, doncs no totes les mostres de biòpsia presenten suficients glomèruls per realitzar el diagnòstic de GESF, o a causa de la naturalesa focal de la malaltia, els glomèruls trobats no estan afectats, i per tant, tot i que una biòpsia positiva permetria diagnosticar la GESF, una biòpsia negativa de GESF no permet descartar totalment la malaltia; A això se li ha de sumar el cert risc que comporta pel pacient la realització d'una biòpsia^{50,51}, ja que malgrat que actualment la biòpsia es sol realitzar per punció percutània amb l'ajut de l'ecògraf en temps real, permetent així reduir la llista de casos on esta contraindicada, al ser una tècnica invasiva, sempre existeix un cert risc pel pacient, per aquest motiu la seva indicació ha de ser estudiada en cada cas. Així doncs pacients amb problemes de coagulació, amb un sol ronyó, amb obesitat mòrbida, infecció urinària, entre altres, no serien bons candidats per a la biòpsia⁵². A més també es sol evitar la seva realització en infants a no ser que presentin un diagnòstic clínic de corticorresistència. Les principals complicacions amb que ens trobem en realitzar una biòpsia són l'hemorràgia i les infeccions⁵³.

A partir de la observació de diferents histologies en les biòpsies de pacients GESF va sorgir, la Classificació de Columbia, la qual és una proposta de classificació de variants morfològiques de GESF segons la histologia observada en la biòpsia, ideada per un grup de patòlegs renals basant-se en la seva experiència col·lectiva i evidències observades en la literatura.^{1,31,42-45}. Tot i que és una classificació bastant utilitzada, hi ha certes discrepàncies sobre la gravetat/clínica de la malaltia i la seva associació a la classificació de Columbia³⁰. Les formes o variants morfològiques de GESF determinades segons la biòpsia en la classificació de Columbia són 5:

FORMA COL·LAPSANT: La variant col·lapsant de GESF és una lesió renal normalment associada a pacients de GESF idiopàtica (sense causa coneguda) i diferents factors secundaris (als anys 80 s'associava sobretot a VIH)⁵⁴. És la més agressiva de les variants de GESF, amb elevada prevalença en afroamericans. Clínicament es la que té un pitjor pronòstic, amb baixa taxa de resposta a glucocorticoides, marcada proteïnúria, insuficiència renal progressiva i ràpida evolució a l'etapa terminal de la malaltia renal^{1,55,56}. Histològicament es caracteritza per un col·lapse capil·lar del glomèrul amb hipertrofia i hiperplàsia dels podòcits. Les parets del capil·lar presenten retracció i col·lapse, i les lesions poden ser segmentàries o globals (Figura 5).

LESIÓ TIP: Variant que sol trobar-se en GESF primària, en general es presenta amb una aguda síndrome nefròtica inicial. És la forma amb millor pronòstic, amb una elevada taxa de resposta als glucocorticoides i menor risc de progressió^{32,57}. Lesió segmentària que implica la part del glomèrul més pròxima al túbul proximal, ja sigui amb adhesió a la sortida tubular o confluència de podòcits i cèl·lules epitelials a la part més pròxima del túbul. En

comparació amb altres variants, presenta una menor atròfia tubular i fibrosi intersticial. En general, elevada retracció dels podòcits¹ (Figura 6).

FORMA CEL·LULAR: Variant menys comú de GESF⁵⁸. Es creu que és l'estat més primerenc en una lesió escleròtica. Clínicament s'observa en el pacient amb síndrome nefròtica. Histològicament s'observa hipercel·lularitat endocapil·lar, incloent cèl·lules endotel·lials, macròfags i cèl·lules escumoses, i una severa retracció podocitària. També es pot observar hiperplàsia de les cèl·lules epitelials glomerulars¹ (Figura 7).

FORMA PERIHIL·LIAR: Forma molt freqüent de les GESF secundàries, es creu que està provocada per una resposta adaptativa a l'augment de la pressió capil·lar en el glomèrul³². Aquesta variant perihil·liar amb presència de glomerulomegàlia s'ha trobat en biòpsies de GESF secundària relacionades amb la obesitat⁵⁹, culturisme⁶⁰, oligomeganefronia (hipoplàsia renal congènita)⁶¹, presència d'un sol ronyó⁶², baixa quantitat de nefrones degut a naixement prematur⁶³, hipertensió sistèmica⁶⁴ i anèmia falciforme⁶⁵. En la biòpsia s'observa hialinòsis perihil·liar que afecta la major part del glomèrul i lesions segmentàries, en alguns casos els glomèruls es troben engrandits i la retracció del podòcit és focal i poc marcada. Aquest tipus de lesió es troba al pol vascular del glomèrul. I la majoria de vegades s'observa hipertrofia glomerular. (Figura 8).

FORMA CLÀSSICA: Present en GESF primària i secundària (incloent formes genètiques). És el subtipus més comú, i es presenta tant amb síndrome nefròtica com amb proteïnúria subnefròtica. En aquest variant observem lesions escleròtiques segmentàries que poden afectar a qualsevol part del glomèrul

Introducció

(prèviament s'han de descartar les anteriors variants). Podem trobar lesions

hialines, hipercel·lularitat mesangial, hipertrofia i hiperplàsia de podòcits o glomerulomegàlia. Les altres variants poden evolucionar a aquesta forma de GESF¹ (Figura 9).

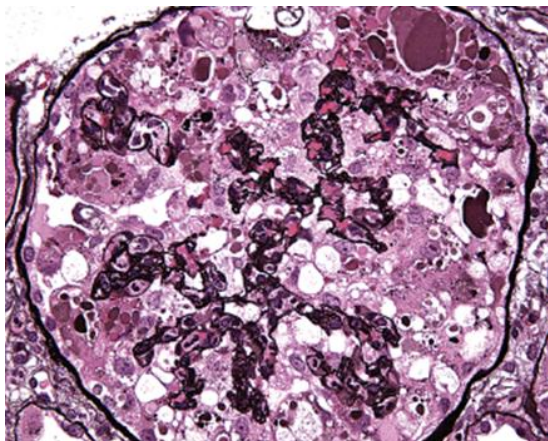


Figura 5. GESF col·lapsant. Col·lapse global dels capil·lars glomerulars acompanyada d'hiperplàsia i inflamació de les cèl·lules epitelials, moltes de les quals contenen gotes de proteïna citoplasmàtica i vacuoles. La proliferació epitelial glomerular ocupa tot l'espai urinari. (Tinció de Jones, metenamina-plata-àcid periòdic Schiff; 400x)⁵⁶

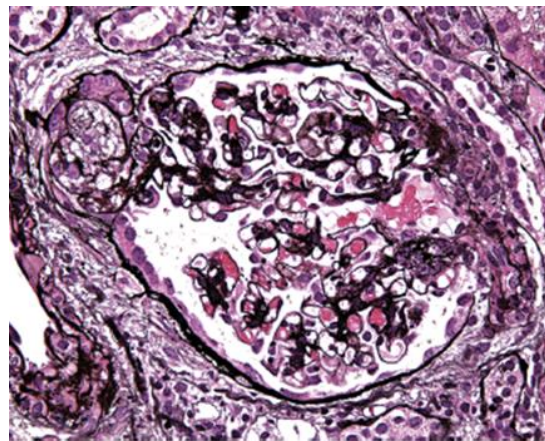


Figura 6. GESF "tip lesion". Acumulació segmentària endocapil·lar de cèl·lules escumoses a l'origen del túbul proximal. La resta del glomèrul es manté normal (Tinció de Jones, metenamina-plata-àcid periòdic Schiff; 400x)⁵⁶

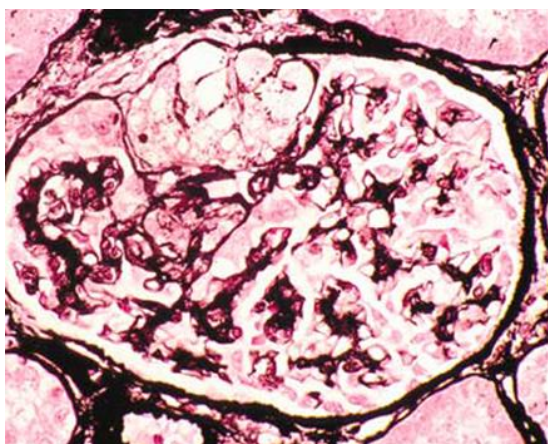


Figura 7. GESF cel·lular. Esclerosi segmentària i oclusió de la llum dels capil·lars glomerulars per cèl·lules escumoses, hipercel·lularitat. Petita adhesió a la càpsula de Bowman. (Tinció de Jones, metenamina-plata-àcid periòdic Schiff; 400x)⁵⁸

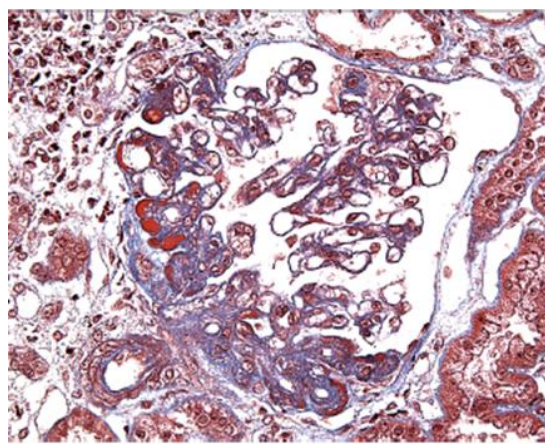


Figura 8. GESF perihiliar. S'observa acumulació de matriu i hialinosis al pol vascular del glomèrul (regió perihiliar). (Tinció tricròmic de Masson; 400x)⁵⁶

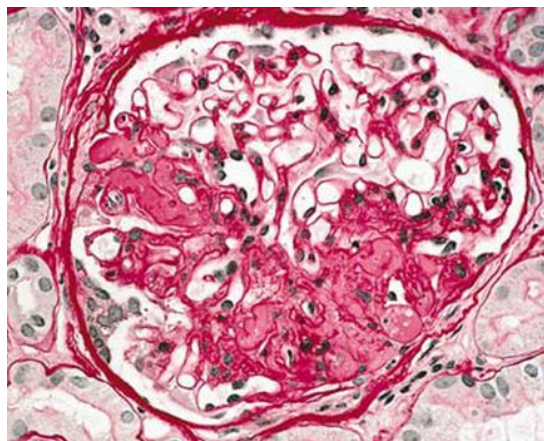


Figura 9. GESF clàssica. Esclerosi segmentària a la llum dels capil·lars per acumulació de dipòsits hialins (Tinció de àcid periòdic Schiff; 400x)⁵⁸

Pel que fa al diagnòstic de GESF després del trasplantament, hi ha dos presentacions clíniques: una recidiva primerenca, la qual es la més freqüent i es caracteritza per proteïnúria massiva entre unes hores i uns dies després del trasplantament, o la recidiva tardana, que pot trigar en aparèixer de mesos a anys després del trasplantament, i que sol ser menys freqüent, a més de estar associada a altres factors com per exemple el canvi de teràpia o la toxicitat dels anticalcineurínics⁶⁶⁻⁶⁸. En pacients amb recurrència primerenca, la proteïnúria precedeix al desenvolupament de lesions histològiques³⁰, així la biòpsia primerenca pot mostrar glomèruls normals mitjançant l'observació amb microscòpia òptica, i un procés d'esborrament podocitaris difús en analitzar-la per microscòpia electrònica, dificultant el ràpid diagnòstic de la recidiva de GESF, doncs les lesions glomerulars es desenvolupen en una mitjana entre 10 i 18 dies després del trasplantament³⁰. Pel que fa a la recidiva tardana, la lesió histològica és encara més lenta, i en la majoria de casos es difícil distingir entre toxicitat per anticalcineurínics o la recidiva de GESF, ja que ambdues

complicacions produeixen esclerosi glomerular segmentària associada amb fibrosi intersticial i atròfia tubular⁶⁶.

3.4. Patogènesis de GESF

Malgrat que el patró histològic trobat en biòpsies renals de pacients GESF pot ser de gran utilitat en el diagnòstic i el pronòstic de GESF, clàssicament GESF ha estat classificada pels clínics en dos grans grups segons els factors etiològics, els qual presenten mecanismes fisiopatològics comuns en el desenvolupament de l'esclerosi glomerular⁴⁶.

- GESF primària o idiopàtica: Causes desconegudes
- GESF secundària:
 - Causada per hiperfiltració glomerular; infeccions víriques, drogues o medicaments
 - Causada per mutacions en proteïnes dels podòcits (rep el nom de GESF familiar, genètica o hereditària).

El desenvolupament de GESF segueix un patró molt uniforme basat en una lesió inicial dels podòcits (segons cada tipus etiològic de GESF està explicat en els apartats 3.4.1 i 3.4.2), així com la destrucció de l'arquitectura glomerular, que comporta a una disminució de la funció renal, que a la llarga donarà lloc a la insuficiència renal⁶⁹.

El dany inicial dels podòcits produeix una reorganització del seu citoesquelet caracteritzada per l'atenuació del cos cel·lular i l'esborrament podocitari, les quals són l'evidència més primerenca de GESF⁷⁰, i que es possible observar amb el microscopi electrònic setmanes o mesos abans del

desenvolupament de les lesions visibles mitjançant el microscopi òptic. Si els podòcits no es recuperen d'aquesta lesió inicial, la mort cel·lular resultant condueix a una reducció en el nombre de podòcits, que es desprenen de la membrana glomerular basal, quedant exposades àrees sense recobrir d'aquesta membrana. Possiblement a causa de la pèrdua de suport estructural, els capil·lars s'expandeixen acostant-se a la capsula de Bowman, on s'estableix una adhesió entre les cèl·lules que recobreixen la capsula de Bowman (cèl·lules epitelials parietals) i les zones descobertes de la membrana glomerular basal (figura 10B). Les cèl·lules epitelials parietals dipositen matriu en l'adhesió formada amb la membrana glomerular basal donant lloc a una zona fibrosa. Algunes cèl·lules epitelials parietals migren a través d'aquesta adhesió fibrosa fins a la membrana basal del glomèrul on el dipòsit de fibres de col·lagen permet l'expansió mesangial reduint el lumen capil·lar. Els capil·lars afectats per aquesta adhesió lliuren el seu filtrat a d'interstici en lloc de lliurar-lo a l'espai de Bowman. Aquesta filtració incorrecta a través de capil·lars que no tenen podòcits condueix a la progressió de la lesió segmentària, degeneració tubular i fibrosi intersticial⁷¹ (figura 10C).

El fet que el podòcit sigui una cèl·lula terminalment diferenciada amb capacitat proliferativa limitada en resposta a la lesió, fa que l'única manera de compensar la pèrdua inicial de podòcits sigui mitjançant la hipertrofia dels podòcits laterals, fent així que augmenti la vulnerabilitat d'aquests davant noves agressions, d'aquesta manera s'inicia un cercle viciós que explica el caràcter progressiu de la degeneració del glomèrul i finalment la insuficiència renal²³

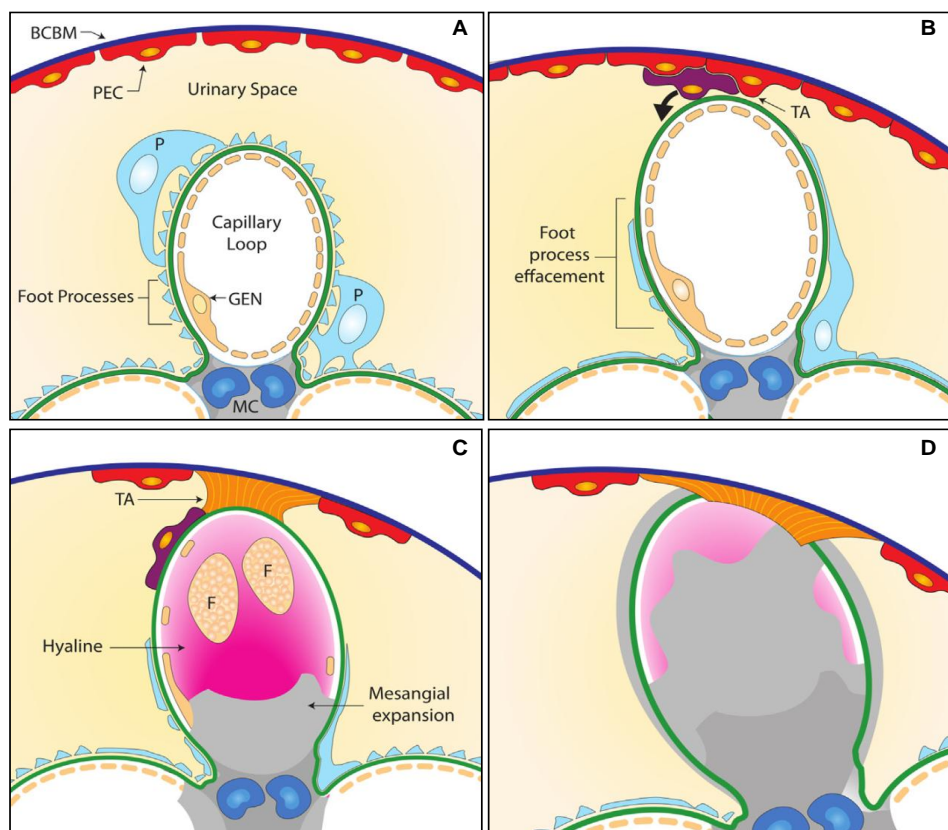


Figura 10. Evolució de la lesió glomerular de GESF⁴⁶. A) Capil·lar normal on s'observa la membrana glomerular basal amb l'epitel·li endotelial fenestrat (GEN) i recobert pel podòcit (P) i la capsula de Bowman (BCBM) està recoberta per cèl·lules epitelials parietals (PEC). Cèl·lules mesangials (MC). B) Esborrament dels podòcits. Adhesió cel·lular entre les cèl·lules epitelials parietals i la capsula de Bowman desproveïda de podòcits (TA). C) Les cèl·lules epitelials parietals dipositen matriu produint un adhesió fibrosa (TA). Algunes cèl·lules epitelials parietals migren cap a la base del capil·lar glomerular on la deposició de col·lagen fibril·lar condueix a l'expansió mesangial reduint lumen capil·lar. La hialinosis (proteïnes plasmàtiques atrapades) i les cèl·lules escumoses (F) destrueixen la llum capil·lar. D) Capil·lar completament esclerosat.

3.4.1. Causa inicial del dany podocitari en GESF primària o idiopàtica

Actualment la millor manera de definir la GESF idiopàtica és sabent què no és, és a dir, descartant les mutacions en gens del podòcit i altres causes de GESF com hiperfiltració glomerular, infecció vírica, drogues, etc.. La GESF primària compren aproximadament el 40% de les síndromes nefròtiques idiopàtiques, i un 80% dels casos de GESF^{1,48,72}.

Tot i desconèixer la causa inicial del dany podocitari en la GESF primària o idiopàtica, hi ha molts indicis de l'existència d'un o varis factors circulants permeabilitzadors que es creu podrien ser els responsables d'aquesta lesió inicial.

Moltes són les evidències de l'existència d'aquest factor circulant, les qual s'enumeren a continuació:

- En més d'un 30% dels pacients GESF idiopàtics reapareix la proteïnúria després de ser trasplantats, la qual pot arribar a recórrer hores després del trasplantament⁷³.
- El tractament amb plasmafèresis disminueix la proteïnúria⁷⁴⁻⁷⁶, i també, en alguns casos la immunoabsorció de proteïnes plasmàtiques és efectiva⁷⁷.
- El plasma de pacients GESF provoca un augment de la permeabilitat a l'albumina en glomèruls aïllats de rata², així com indueix l'esborrament podocitari i provoca proteïnúria en ser injectat a rates^{1,78,79}.
- Les dones amb GESF primària embarassades donen a llum nadons amb proteïnúria transitòria⁸⁰.
- S'ha publicat el cas d'un pacient amb GESF idiopàtica que en ser trasplantat i malgrat els tractaments amb plasmafèresis va fer una recidiva de la malaltia. Es va decidir retrasplantar l'empelt a un altre receptor amb nefropatia diabètica, i com s'observa a la figura 11, en aquest segon receptor l'empelt recuperava la seva taxa de filtració glomerular normal i disminuïa la proteïnúria⁸¹.

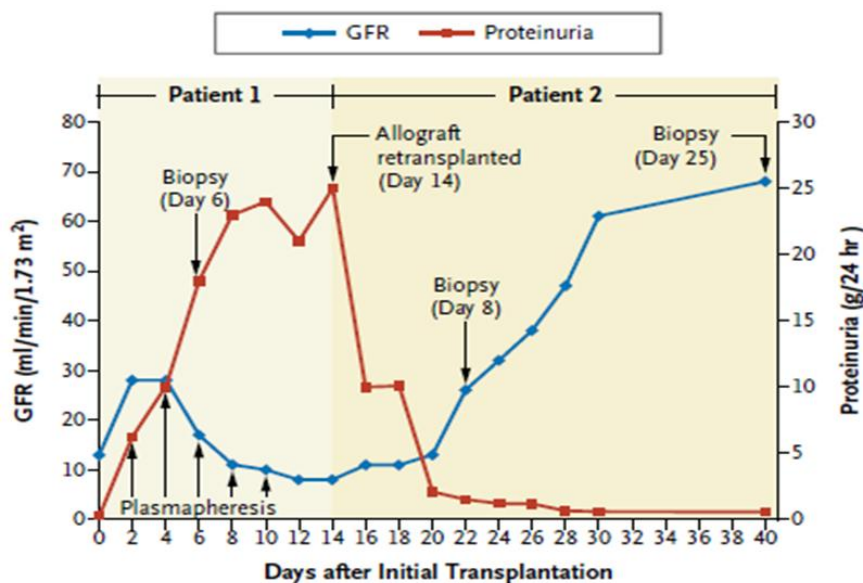


Figura 11. Taxa de filtració glomerular (GFR) i proteïnúria en el receptor inicial del trasplantament i en el segon receptor de l'empelt retrasplantat.

Al llarg dels anys s'han proposat varis candidats a factors permeabilitzadors, no només amb l'objectiu de buscar un tractament per a GESF, si no també per trobar un biomarcador útil pel diagnòstic tant de GESF idiopàtica com de la seva recidiva, doncs no hi ha manera de preveure si un pacient amb GESF idiopàtica farà o no una recidiva després del trasplantament, així com tampoc es possible distingir fàcilment una recidiva postTx d'una proteïnúria no relacionada amb la recidiva, això sumat a que el diagnòstic de GESF per biòpsia no es senzill, doncs com ja s'ha comentat anteriorment no sempre s'obté una mostra histològica amb suficients glomèruls per realitzar el diagnòstic de GESF, o a causa de la naturalesa focal de la malaltia, els glomèruls trobats no estan afectats, a més de que comporta cert risc pel pacient^{50,51} fan que sigui difícil la determinació d'una recidiva, així com la decisió d'aplicar de manera general a tots els pacients mesures terapèutiques agressives i d'eficàcia poc contrastada per evitar la recidiva.

Sharma et al.⁸² van realitzar un seguit d'experiments a partir del plasma descartat en les plasmafèresis de pacients GESF recidivants per tal de determinar les característiques del factor permeabilitzador. Per a aquesta comprovació observaven quina fracció d'aquests plasmes produïa un augment de la permeabilitat a l'albumina (Palb) en glomèruls de rata *in vitro*, extraient les següents conclusions:

1. El factor permeabilitzador és una proteïna o està lligat a una proteïna.
 - a. El tractament per calor era capaç d'inactivar l'acció del factor permeabilitzador.
 - b. La seva acció s'eliminava amb presència de proteases.
 - c. El component actiu podria ser fraccionat per precipitació amb sulfat d'amoni, que és una tècnica comuna per a la purificació de proteïnes
2. El factor està present en el sobrenedant obtingut després de la precipitació de la fracció de quilomicrons, i també en el sobrenedant obtingut de la precipitació de lípids total.

Pel que fa a la mida, hi ha més controvèrsia. En un primer moment, mitjançant cromatografia d'exclusió per pes, es va trobar que el factor permeabilitzador estava present en la fracció de 50-100KDa². De la mateixa manera, els resultats obtinguts en estudis posteriors pel mateix grup mostraven que la substància activa no passa a través d'una membrana de 14 kDa, però no es retinguda per una de 50 kDa, el que indicaria que la seva massa molecular està entre 14 i 50 kDa⁸². Aquesta aparent discrepància pot ser deguda a la degradació de la substància activa durant la purificació o l'agregació de les molècules en el plasma total. L'assaig *in vivo* injectant la fracció <50KDa de

plasma de pacients GESF recidivants a rata sembla que dona proves convincents de que és aquesta fracció la que conté el factor permeabilitzador, doncs van observar que aquesta fracció era capaç de produir proteïnúria a les rates^{79,82}, confirmant que la seva massa molecular està entre 14 i 50 kDa.

Al llarg del temps s'han proposat molts possibles factors tant causants com biomarcadors de GESF idiopàtica i les seves recidives^{48,83}, com són anticossos del receptor tipus O de la proteïna tirosina fosfatasa (PTPro)⁸⁴, Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 (CLCF-1)³, proteases actives⁸⁵, anticossos anti-CD40⁸⁶, receptor tipus 1 de l'angiotensina II⁸⁷, receptor soluble de la plasminogen uroquinasa (suPAR)^{88,89} i Apolipoproteïna A-I⁸, entre d'altres. A continuació és troben més detallats els que sembla podrien tenir més rellevància, i dels quals s'ha discutit més recentment, així com el factor estudiat en aquesta tesi doctoral (ApoA-I):

- CLCF-1: Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1
- Anticossos anti-CD40
- SuPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor
- ApoA-Ib: Apolipoproteïna A-Ib
- ZAG: Zinc alpha 2-glycoprotein

CLCF-1

Degut al fet que es creu que el factor permeabilitzador podria interactuar amb els sucres del glicocàlix⁹⁰, es va utilitzar una columna d'afinitat de galactosa per a l'estudi dels sèrums de pacients GESF respecte controls, i es va observar que hi havia una proteïna membre de la família de la interleucina-6 (CLCF-1) la concentració de la qual era 100 vegades superior en sèrum de pacients GESF respecte la observada en controls. En estudiar el seu paper in

vitro (cultius podocitaris) van observar que el CLCF-1 imitava els efectes del plasma GESF pel que fa a la permeabilitat a l'albumina, a més de disminuir l'expressió de nefrina (proteïna expressada exclusivament en els podòcits i que té un paper important en la filtració glomerular)³. Recentment s'ha vist que la incubació de podòcits murins amb CLCF-1 altera el citoesquelet d'actina d'una manera dependent del temps i la concentració, alterant així la seva funció⁹¹. A més, s'ha comprovat que la forma monomèrica recombinant de CLCF-1 humana produeix un augment de la permeabilitat a l'albumina en glomèruls aïllats de rata⁹², així com albuminúria en ratolins després de la infusió aguda i crònica⁹¹.

Sumat a tot el descrit anteriorment, McCarthy et al.³, va observar que l'aplicació de galactosa bloquejava l'augment de la permeabilitat a l'albumina que induïa el plasma de pacients GESF. Encara que hi ha publicacions de casos que descriuen que pacients GESF que rebien galactosa oral mostraven una reducció en la permeabilitat de l'albumina, a més de una estabilització de la funció renal^{93,94}, el seu efecte terapèutic segueix sent controvertit, doncs en un estudi pilot amb nens afectats per GESF, en ser tractats amb galactosa demostrava una disminució de la permeabilitat glomerular in vitro, però no hi havia diferències significatives en la proteïnúria abans i després del tractament⁹⁵.

En conjunt, la identificació de CLCF-1 com un potencial factor de permeabilització és molt prometedora, així com la utilitat de la galactosa com a tractament. No obstant això, el seu paper fisiopatològic necessita ser validat per diferents grups de recerca i en cohorts de pacients ben caracteritzats, on a més d'incloure pacients GESF i controls sans, s'incloguin com a controls altres tipus

de malalties glomerulars podent demostrar així que l'elevada concentració trobada en pacients GESF és específic només d'aquest tipus de pacients.

ANTICOSSOS ANTI-CD40

La proteïna co-estimuladora CD40 és un membre de la superfamília de receptors de TNF (factor de necrosis tumoral). CD40 és una molècula important en la immunitat i la inflamació. S'expressa en diversos teixits, especialment en la superfície de cèl·lules presentadores d'antigen (APC), macròfags / monòcits, i cèl·lules dendrítiques. CD40 també s'expressa en cèl·lules endotel·lials i epitelials⁹⁶.

El seu descobriment va ser mitjançant un panell d'autoanticossos on es van avaluar anticossos patògens en la recurrència de la GEFS després del trasplantament renal. Per a tal efecte van utilitzar plasma de 20 pacients GESF, dels quals 10 van recidivar durant el primer any i 10 no van donar signes de recidiva. Els perfils d'IgG dels plasmes de GEFS recurrents i no recurrents van variar significativament i mitjançant una posterior validació van observar que els autoanticossos contra CD40 eren els anticossos que mostraven més correlació amb la recidiva^{72,86}.

El CD40 va ser detectat en glomèruls de pacients GESF recidivants, però aquests anticossos anti-CD40 no eren capaços de detectar la CD40 humana, a més les regions reactives d'aquests anti-CD40 eren diferents entre GESF recidivants i GESF no recidivants. I malgrat que els anticossos del plasma de GESF recidivants no reconeguessin la CD40 humana, els autoanticossos CD40 purificats a partir de plasma de pacients GEFS recidivants si que alteraven el citoesquelet d'actina dels podòcits humans in vitro.

En aquesta publicació, també es suggereix que el suPAR també podria estar implicat en la recidiva. Van demostrar que la injecció d'anticossos anti-CD40 en ratolins no era suficient per produir albuminúria, però que si s'administraven juntament amb suPAR recombinant els ratolins desenvolupaven albuminúria. A més de que un anticòs contra suPAR era capaç d'inhibir l'efecte produït per la coadministració de CD40 i suPAR⁸⁶.

La mida dels anticossos IgG és aproximadament d'uns 150KDa, per tant el fet que l'anticòs anti-CD40 tingui un elevat pes molecular contradiu el fet que el factor permeabilitzador hauria de tenir un pes molecular inferior a 50KDa⁸².

suPAR

El suPAR és un dels factors més estudiats en els últims anys, va ser descrit com a factor permeabilitzador en GESF primària per Wei et al.^{88,89}.

La seva forma no soluble (uPAR) està present en diferents tipus de superfícies cel·lulars, incloses les cèl·lules endotel·lials, mesangials i els podòcits. Aquest receptor està unit a les superfícies cel·lulars mitjançant un anclatge glicosilfosfatidilinositol. Varis enzims són capaços de trencar aquesta unió a la membrana de tal manera que uPAR passi a la circulació en forma soluble (suPAR)⁹⁷. El suPAR és una proteïna circulant amb un pes molecular que varia entre 35 i 60 KDa depenent del grau de glicosilació i escissió proteolítica⁹⁸. Es troba en baixes concentracions en la sang humana en condicions fisiològiques i és conegut per participar en el tràfic de neutròfils i la mobilització de cèl·lules mare^{97,99}.

Hi ha evidències de que suPAR podria tenir un paper important en la GESF idiopàtica, doncs en l'estudi dut a terme per Wei et al.⁸⁹ els pacients

GESF idiopàtics presenten alts nivells de suPAR en plasma, mentre que controls i pacients amb altres malalties glomerulars no presenten el suPAR elevat. A més van observar que nivells alts de suPAR abans del trasplantament correlacionaven amb un major risc de recidiva de GESF després del trasplantament. Mitjançant experiments *in vivo* amb ratolins van demostrar que l'augment de la concentració de suPAR donava lloc al dipòsit d'aquest en el glomèrul, a l'activació de la $\beta 3$ integrina, l'albuminúria i l'esborrament podocitari⁸⁹, es a dir trobaven signes de GESF. Posteriorment, el mateix autor va fer un anàlisi retrospectiu de dos cohorts independents de pacients amb biòpsia confirmada de GESF (una de nord-americans provinent d'assajos clínics i una altre d'europes provinent del consorci Europeu PodoNet). En ambdues cohorts es va mesurar els nivells de suPAR en el moment del diagnòstic i després del tractament, conclouent que els nivells de suPAR eren significativament elevats en pacients GESF en un 84.3% (cohort d'assajos clínics) i un 55.3% (cohort PodoNet), en comparació al 6% dels controls¹⁰⁰. Tots aquest estudis duts a terme per Wei et al. evidencien que suPAR podria ser el factor permeabilitzador circulant causant de GESF i la seva recidiva, a més de ser útil com a biomarcador diagnòstic de GESF.

Però existeix una gran controvèrsia pel que fa al suPAR com a factor causant de GESF i com a possible biomarcador de la malaltia. Primer de tot perquè suPAR no es específic de GESF, si no que s'ha demostrat que nivells elevats de suPAR també es relacionen amb altres malalties, com són càncer, malalties hepàtiques i arteriosclerosi, a més de la infecció per VIH¹⁰¹⁻¹⁰⁷, a més s'utilitza com a marcador inespecífic de gravetat i pronòstic en els pacients de cures intensives¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Per tant, els nivells de suPAR no poden ser utilitzats

com un marcador d'una malaltia específica, doncs un augment de la concentració suPAR en plasma prediu un resultat advers en moltes malalties diferents.

En segon lloc s'han realitzat altres estudis on aquesta relació entre suPAR i GESF no esta tant clara. Com és en l'estudi realitzat per Maas et al.^{111,112}, on trobava una correlació inversa entre suPAR i la taxa de filtració glomerular en un petit grup de pacients amb GESF primària i secundària, i pacients amb malaltia de canvis mínims, a més, la concentració de suPAR en sèrum no permetia diferenciar entre els respectius grups de pacients. En comparar pacients amb GESF primària i controls amb taxes de filtració glomerular equivalents el suPAR tampoc es veu augmentat¹¹³. I en estudis realitzats amb cohorts de pacients del Japó i l'Índia, la correlació entre nivells elevats de suPAR en pacients GEFS en comparació amb altres malalties glomerulars també va fracassar, a més de re-confirmar la correlació negativa entre la taxa de filtració glomerular i suPAR^{114,115}. Altres estudis també han arribat a les mateixes conclusions, descartant que suPAR sigui un bon biomarcador de GESF idiopàtica, o que per si sol pugui ser el factor permeabilitzador¹¹⁶⁻¹¹⁸

Pel que fa a la detecció de la recidiva descrita per Wei et al., també han sorgit estudis que contradiuen el esmentat anteriorment, com és el cas de Palacios et al.¹¹⁹ que va observar que en tots els candidats a trasplantament es trobaven els nivells elevats de suPAR respecte els controls i que no hi havia diferències pel que fa als nivells de suPAR en plasma entre els pacients GESF que recidivaven i els que no recidivaven.

Tots aquests estudis fan pensar que es possible que suPAR estigui involucrat en la GESF primària, però molt probablement no sigui l'únic, si no que formi part d'un conjunt de múltiples factors que acaben convergint en una mateixa via, i al final provoquin el desenvolupament de GESF idiopàtica.

APOA-1b i ZAG

L'ApoA-1b i ZAG van sorgir de la necessitat de trobar un biomarcador en sang i/o orina, pronòstic o diagnòstic de la recidiva de GESF, el qual es important per dur a terme les mesures terapèutiques necessàries que permetin disminuir el risc o l'agressivitat de la recidiva⁸.

Per tal de trobar aquests biomarcadors de recidiva es va procedir mitjançant electroforesis bidimensional a la comparació proteòmica de pacients GESF idiopàtics que havien fet una recidiva post-Tx (GESF-R) i de pacients GESF idiopàtics que no havien fet recidiva post-Tx (GESF-NR), de tal manera que les proteïnes diferencials trobades entre aquests dos grups serien possibles biomarcadors de recidiva.

Per a la identificació diferencial de proteïnes es van utilitzar un pool d'orines i un de plasmes de dos grups de pacients diagnosticats histològicament de GESF idiopàtica (excloent els casos amb base genètica o historia familiar de GESF), els quals havien rebut un trasplantament de ronyó. Un dels grups estava format per pacients GESF-R (8 pacients) i l'altre per GESF-NR (27 pacients). La recidiva era diagnosticada mitjançant valors de proteïnúria >3g/dia o valors <3g/dia però amb histologia de GESF durant el primer any després del trasplantament (taula 1).

Paràmetre	GESF-R	GESF-NR	Significança estadística
Edat (anys)	41.9 ± 4.14	45.51 ± 2.13	NS
Homes/Dones	5/3	13/14	NS
Hematòcrit (%)	33.0 ± 3.65	41.15 ± 0.86	p<0.005
Albúmina (g/dl)	3.21 ± 0.18	4.29 ± 0.07	p<0.0001
Proteïnes plasmàtiques (g/dl)	5.51 ± 0.41	7.34 ± 0.09	p<0.0001
Colesterol (mg/dl)	196.1 ± 20.73	172.7 ± 6.47	NS
HDL (mg/dl)	43.0 ± 4.51	52.17 ± 3.77	NS
Triglicèrids (mg/dl)	214.4 ± 38.18	124 ± 9.9	p<0.005
Creatinina (mg/dl)	1.87 ± 0.35	1.27 ± 0.08	p<0.05
Proteïnúria (g/24h)	11.49 ± 5.22	0.12 ± 0.01	p<0.005

Taula 1. Estadística clínica del grup de pacients test, utilitzats per a la identificació de proteïnes diferencials útils com a biomarcadors de recidiva de GESF post-Tx. Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard; Anàlisi estadística: t-Student

Les diferències observades en els paràmetres clínics eren les esperades en comparar aquests dos tipus de pacients, donat que en el cas del pacients recidivants la malaltia de GESF segueix activa, mentre que en els pacients no recidivants existeix un remissió de la malaltia, i per tant el ronyó trasplantat funciona amb normalitat. Els mapes proteòmics dels pools de plasma i orina GESF-R i GESF-NR es poden observar a la figura 12. Per tal de detectar les proteïnes diferencials entre els diferents mapes proteòmics es va utilitzar el *software* PD-Quest (Bio-Rad Laboratories).

En la primera comparació dels pools de plasma no s'observaven proteïnes diferencials entre els grups GESF-NR i GESF-R. Pel contrari si que es van observar grans diferències en comparar els mapes proteòmics d'orina (figura 12 i 13).

Per tal de detectar proteïnes provinents del ronyó o del plasma modificades en el ronyó es va eliminar del mapa proteòmic d'orina, mitjançant el *software* anteriorment esmentat, les taques que també estaven presents en el mapa proteòmic de plasma. D'aquesta manera descartàvem les proteïnes

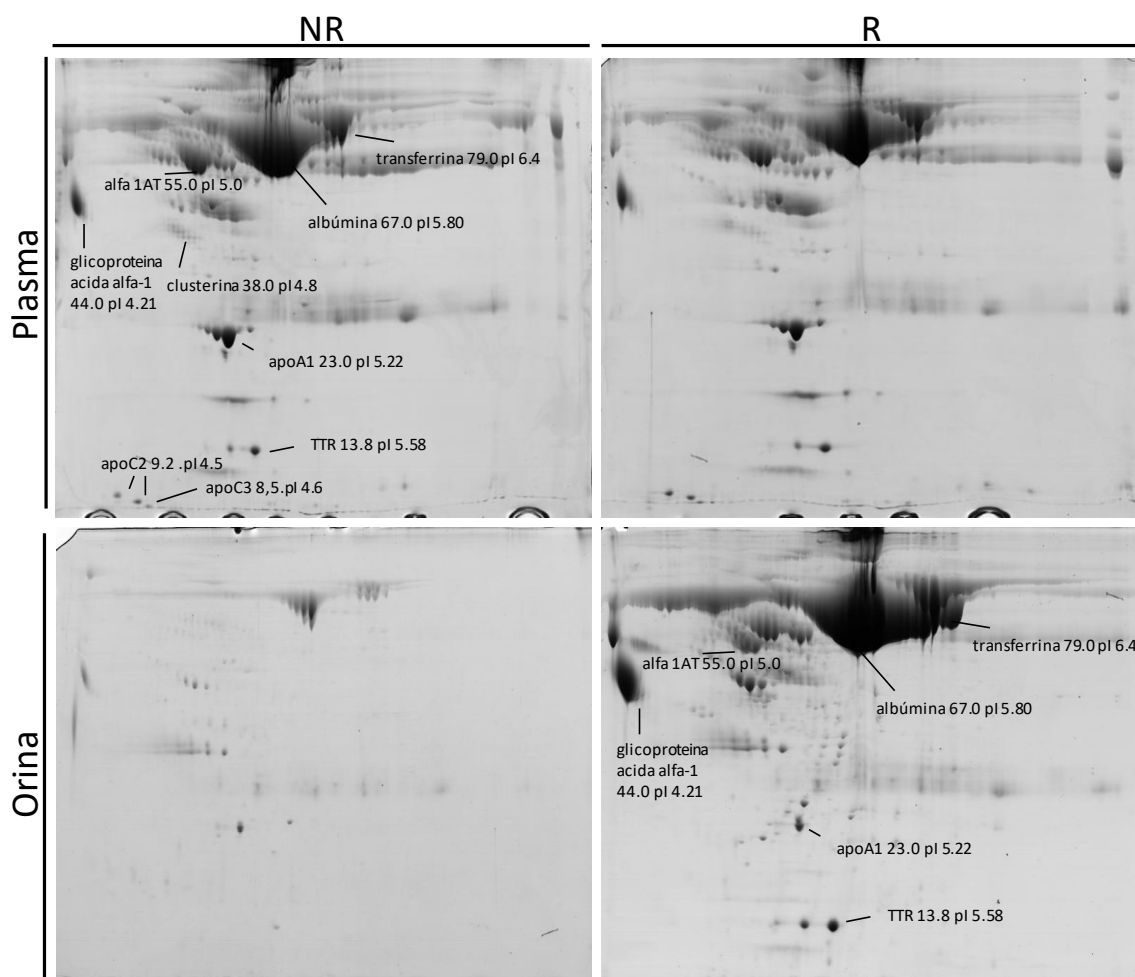


Figura 12. Electroforesis bidimensional del pool de mostres de plasma i orina de pacients GESF trasplantats no recidivants (GESF-NR) i recidivants (GESF-R). En el primer mapa proteòmic pacients GESF-NR (plasma, NR) i l'últim GESF-R (orina, R) es mostren diferents taques de referència amb el nom de la proteïna corresponent, la massa (kDa) i el punt isoelèctric.

que venien filtrades directament de la sang a través de la barrera de filtració glomerular danyada.

Després d'excloure les proteïnes filtrades de sang, mitjançant el *software* PD-Quest es van analitzar quines eren les taques diferencials entre els mapes proteòmics dels pools d'orina GESF-R i GESF-NR. En aquest anàlisi es van detectar 41 taques diferencials, les quals es poden observar en la figura 13A, corresponent al mapa proteòmic obtingut a partir del pool d'orines de pacients GESF-R. D'aquestes taques, per espectrometria de masses es van poder identificar 7 proteïnes, les quals corresponien a 33 d'aquestes taques diferencials: la proteïna d'unió a retinol (RET4), la α -1-antitripsina (A1AT), el precursor α -1-microglobulina/bikunina (AMBP), la hemopexina (HEMO), la transtiretina (TTHY), la zinc- α -2-glicoproteïna (ZAG) i l'Apolipoproteïna A-I (ApoA-I) (Taula 2). De les 7 proteïnes identificades, cinc (RET4, A1AT, AMBP, HEMO i TTHY) ja havien estat prèviament associades a proteïnúria inespecífica o dany renal¹²⁰⁻¹²², quedant com a candidats a biomarcadors específics de recidiva de GESF la ZAG i l'ApoA-I.

Com es pot observar a la figura 13A només es va trobar una taca diferencial corresponent a ZAG, mentre que en el cas d'ApoA-I es van trobar 6 taques diferencials. En la figura 13B i C podem observar més detalladament les taques diferencials entre GESF-NR i GESF-R corresponents a ApoA-I, a més també trobem marcat com a referència la taca SSP3217, la qual no és una taca diferencial entre GESF-R i GESF-NR, si no que correspon a l'ApoA-I estàndard provinent de plasma. Entre totes les taques identificades com a ApoA-I per espectrometria de masses, una presentava una elevada intensitat respecte les altres, la SSP3304, tal com es pot observar en la figura 13 B, la qual té un pes molecular més alt que la ApoA-I estàndard (SSP3217).

Tant la ZAG com l'ApoA-I van ser les proteïnes escollides per a una posterior verificació mitjançant un mètode alternatiu al 2D-PAGE.

La verificació de ZAG va consistir en la seva detecció de forma individualitzada de cada un dels pacients inclosos en el pool d'orina de pacients GESF-R i de pacients GESF-NR. La detecció es va realitzar mitjançant western blot (carregant 20µg de proteïna per pou). Es van detectar bandes corresponents a ZAG en ambdós grups, GESF-R i GESF-NR. Una posterior quantificació de la intensitat de les bandes observades amb el *software* Quantity One (Bio-Rad Laboratories), va mostrar que els pacients GESF-R tenien significativament ($p < 0.0001$) més ZAG que els pacients GESF-NR.

En la verificació d'ApoA-I per western blot de forma individualitzada es va observar que tots els pacients GESF-R presentaven la banda corresponent a ApoA-I amb un pes molecular aparentment superior a la observada a la trobada a plasma, i aquesta banda estava absent en els pacients GESF-NR. (Figura 14). Aquests resultats coincidien amb els observats en l'anàlisi proteòmic per 2D-PAGE, on es va visualitzar una taca corresponent a ApoA-I (SSP3304) amb un pes molecular més elevat que l'ApoA-I estàndard. La nomenclatura designada per aquesta ApoA-I trobada en orina d'un pes molecular més elevat va ser ApoA-Ib.

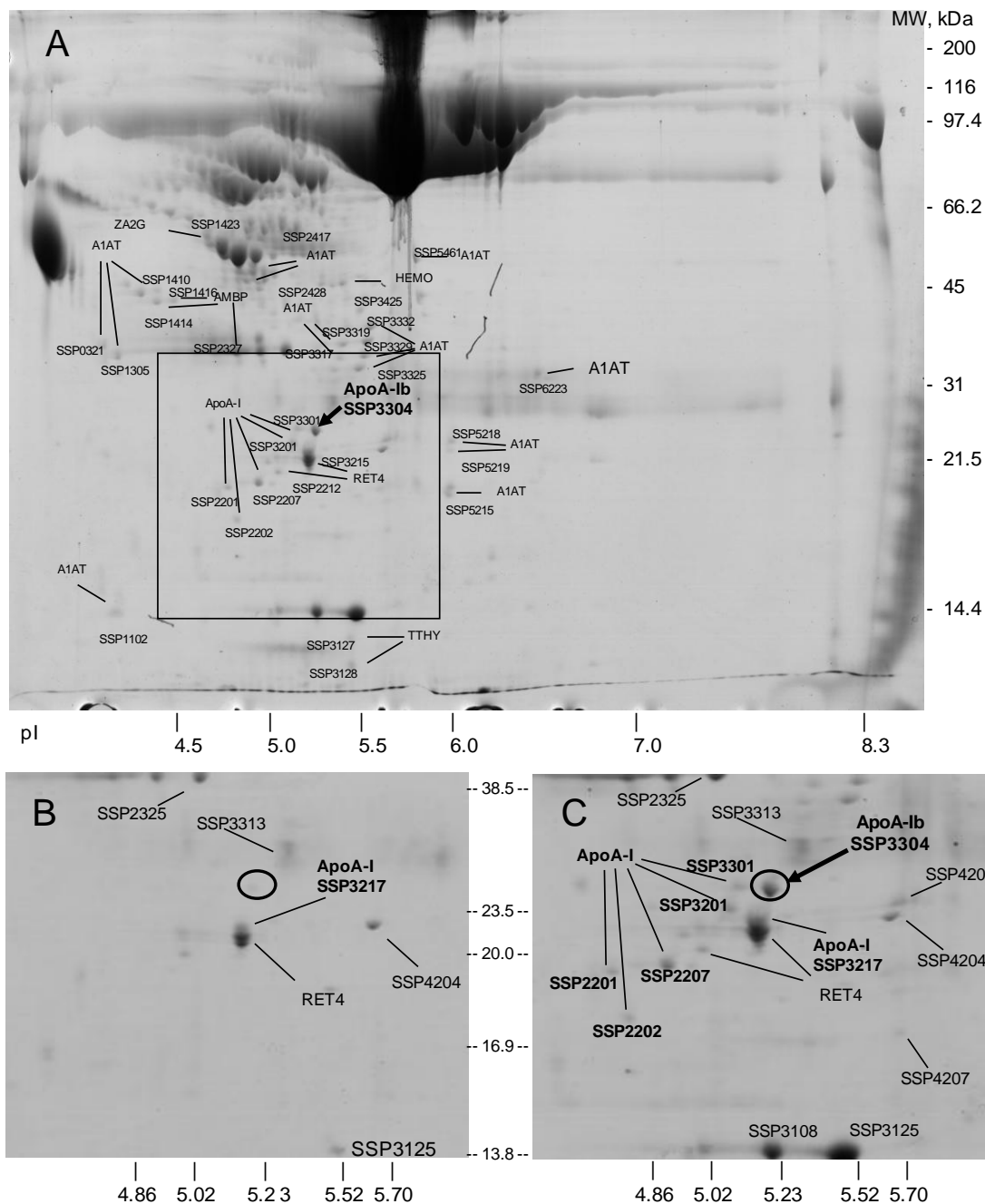


Figura 13. Electroforesis bidimensional del pool d'orines dels diferents grups d'estudi.
A. Electroforesis bidimensional del pool de mostres d'orina de pacients GESF trasplantats i amb recidiva (GESF-R). Es mostren les diferents taques identificades, amb els números de referència generats pel software d'anàlisi proteòmic: A1AT, AMBP, HEMO, TTHY, RET4, ZAG, ApoA-I. El quadre fa referència a la zona magnificada de la imatge B i C, on es mostren les formes diferencials d'ApoA-I trobades (SSP 2207, 3201, 3301, 3304, 2201 i 2202). **B. Orina de pacients GESF no recidivants (GESF-NR)** **C. Orina de pacients GESF recidivants (GESF-R).** La taca SSP3304, anomenada ApoA-Ib (encerclada) és la més intensa de les ApoA-I diferencials trobades, amb un pes molecular aparentment més elevat que la ApoA-I estàndard trobada en plasma (SSP3217). Estan etiquetades també les taques no diferencials per tal de facilitar la comparació entre les dues imatges.

Id. UniProt	pl Teòric	Massa Teòrica (KDa)	Nomenclatura taca (SSP)	Puntuació	Peptide match	% de cobertura	% intensitat	LC-MS/MS
A1AT_Humana	5.37	44324	0321	86	12	31	28	
			1305	80	10	27	35	
			1410	82	13	33	52	
			1414	92	9	27	50	
			1416	64	8	22	27	
			2417	143	20	33	81	
			2428	207	30	53	60	
			3317	183	18	39	83	
			3319	206	23	50	71	
			3325	142	23	44	65	
			3329	117	21	39	52	
			3332	186	25	50	53	
			5215	78	13	27	54	
			5218	130	18	26	65	
			5219	149	16	26	72	
			5461	160	22	51	57	
			6323	132	16	26	62	
			1102				70	MS/MS pèptid 1641.8
AMBP_Humana	5.95	39886	1414				33	MS/MS pèptid 1213.6
			1416				50	MS/MS pèptid 1213.6
			2327	86	11	30	53	
APOA1_Humana	5.27	28079	2207	212	23	52	46	
			3201	209	23	57	50	
			3301	90	10	32	43	
			3304	177	19	49	61	
			2201	125	15	40	43	
			2202	106	13	36	40	
HEMO_Humana	6.43	49295	3425	129	16	36	60	
RET4_Humana	5.27	20958	3215	123	9	58	92	
			2212				81	MS/MS pèptid 2693.3
TTHY_Humana	5.31	13761	3127	100	6	44	82	
			3128	128	9	57	91	
ZAG_Humana	5.58	32145	1432	205	24	55	52	

Taula 2. Identificació per espectrometria de masses de les taques diferencials trobades en pacients GESF R, respecte pacients GESF NR.

Així doncs tant ZAG com ApoA-Ib sembla que podrien ser almenys uns bons biomarcadors de la recidiva, però son necessari més estudis de validació tant per determinar la validesa d'aquests biomarcadors com per saber si podrien tenir alguna implicació en el desenvolupament de la malaltia de GESF primària.

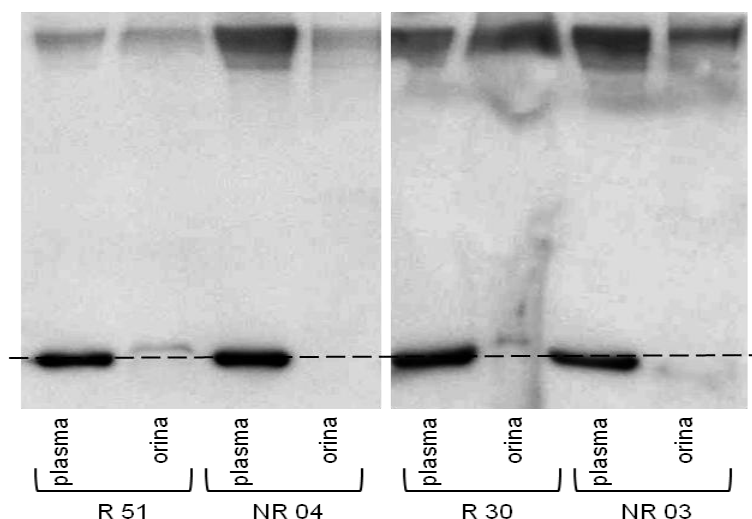


Figura 14. Western blot de verificació de 2 pacients inclosos en el pool de GESF R (R 24 i R30) i 2 pacients inclosos al pool de GESF NR (NR 04, NR 03), on podem observar la ApoA-Ib en les orines dels pacients R , amb un pes molecular superior al observat en les mostres de plasma.

Relacionada amb l'ApoA-I, també es va trobar la proteïna ApoA-II en un estudi previ del grup, on l'objectiu principal era buscar el factor plasmàtic causant de la glomeruloesclerosi focal i segmentaria¹²³. En aquesta ocasió la proteïna trobada no tenia un pes molecular diferent, si no que en comparar el contingut proteic del plasma mitjançant 2D-PAGE, dels grups GESF familiar i GESF idiopàtica, es va observar que la proteïna ApoA-II apareixia en la seva forma dimèrica en ambdós grups estudiats, però a més, el grup de GESF idiopàtics apareixia també la forma monomèrica d'aquesta proteïna. El qual era

curios, doncs en ambdós casos el 2D-PAGE s'havia fet en condicions de reducció. D'aquesta proteïna i de la seva troballa se'n parlarà més detingudament a la secció de resultats, apartat 3.

3.4.2. Causa inicial del dany podocitari en GESF secundària

En el cas de la GESF secundària el dany inicial al podòcit pot ser degut a varies causes:

1. GESF genètica/familiar/hereditària: Causada per mutacions en proteïnes dels podòcits
2. GESF adaptativa: Causada per hiperfiltració glomerular.
3. GESF induïda per drogues/medicaments.
4. GESF associada a virus .

GESF FAMILIAR

Les formes familiars de GESF afecten tant a l'estructura com a la funció del podòcit glomerular. Aquestes formes familiars es poden classificar en dos grups: formes recessives les quals solen aparèixer de manera primerenca i formes autosòmiques dominants que apareixen més tardanament. En general, les formes recessives de GESF són causades per mutacions de pèrdua de funció i es solen presentar durant la infantesa i solen ser més agressives, mentre que la majoria de les formes dominants de GESF són causades per mutacions de guany de funció i es caracteritzen per ser més tardanes i de progressió lenta¹²⁴. A la taula 3, trobem llistats alguns d'aquests gens causants de GESF, però cada dia el nombre de gens va augmentant.

ZONA AFFECTADA	GEN	HERÈNCIA	PROTEÏNA	FENOTIP
Membrana de filtració	NPHS1 ¹²⁵	AR	Nefrina	Síndrome nefròtica congènit
	NPHS2 ¹²⁶	AR	Podocina	SN corticorresistent, GESF congènits, infantil
	PLCE1 ¹²⁷	AR	Fosfolipasa C -ε1	Esclerosis mesangial difusa, GESF d'inici primerenc
	CD2AP ¹²⁸	AD	proteïna associada a CD2 (CD2AP)	GEFS, model de ratolí deficient en CD2AP desenvolupa proteïnúria severa
	TRPC6 ¹²⁹	AD	TRPC6	GESF en adults
Citosquelet d'actina	ACTN4 ¹³⁰	AD	α-actina 4	GESF en adults
	INF2 ¹³¹	AD	Formina invertida 2	GESF en adults
	MYO1E ¹³²	AR	Miosina 1E	Síndrome nefròtica corticorresistent en l'infant
	ARHGAP24 ¹³³	AD	Arhgap24 (RhoGAP)	GESF en adolescents
	ARHGDIA ¹³⁴	AR	Arhgdia	Síndrome nefròtica corticorresistent en l'infant
Nucli	WT1 ¹³⁵	AD	Tumor de Wilms	Síndrome de Frasier o Denys-Drash o Síndrome nefròtica aïllat
Altres	APOL1 ^{136,137}	AR	Apolipoproteïna L1	Elevat risc de GESF o d'insuficiència renal en estat terminal en població Afroamericana

Taula 3. Algunes de les causes genètiques de GESF i Síndrome nefròtica corticorresistent; AR: Herència autosòmica recessiva; AD: Herència autosòmica dominant .

De tots els gens implicats en GESF, n'hi ha un que no afecta directament el podòcit, si no que es tracta d'un parell de variants genètiques denominades G1 i G2, presents en el gen *APOL1*. Aquests 2 al·lels són comuns en les persones d'ascendència africana, i es caracteritzen per augmentar el risc de desenvolupar GESF, hipertensió associada a malaltia renal i la nefropatia per VIH^{136,137}. La variant G1 consisteix en una parell de mutacions de canvi de sentit que afecten als aminoàcids p.S342G i p.I384M i que gairebé sempre s'hereten de forma conjunta; G2 en canvi consisteix en la deleció de 6 parells de bases que afecta a dos aminoàcids pròxims a la regió C-terminal de la

proteïna (p.N388/Y389). Els individus homozigots o heterozigots per aquests al·lels tenen entre 7 i 10 vegades més risc de desenvolupar GEFS o hipertensió associada a la insuficiència renal. I aquells individus que presenten les dos variants genètiques de *APOL1* tenen 30 vegades més risc de desenvolupar la GESF associada a VIH^{136,138,139}.

La forma no modificada de la proteïna ApoL-1, confereix una immunitat innata contra el *trypanosoma brucei brucei* el paràsit causant de la malaltia de la son, però hi ha dos subespècies, el *T.brucei rhodensis* i el *T.brucei gambiense* que són resistents a la lisis per ApoL-1. Les variants G1 i G2 de *APOL1* mostren una major activitat lítica contra la malaltia de la son provocada per *T.b.rhodensis*, el qual molt possiblement dona pressió selectiva cap aquests al·lels, el que explicaria l'alta prevalença d'aquestes variants en la població d'ascendència africana¹³⁶. El mecanisme pel qual les variants G1 i G2 de *APOL1* actuen sobre els podòcits per causar la glomeruloesclerosi focal i segmentària encara no s'ha pogut determinar^{48,124,140}.

GESF ADAPTATIVA

Es creu que és el resultat a adaptacions estructurals i funcionals causades per vasodilatació intrarenal, augment de la pressió als capil·lars glomerulars i increment de la filtració plasmàtica¹⁴¹. Aquesta resposta adaptativa pot ser iniciada per la reducció en el nombre de nefrones funcionals o per mecanismes que produeixen un estrès hemodinàmic sobre una població normal de nefrones i com a conseqüència un augment de la taxa de filtració glomerular. En el primer cas doncs les causes poden ser l'agenèsia renal unilateral, la nefropatia de reflux o simplement una baixa dotació de nefrones a causa un baix pes al

naixement^{63,142}, en el segon cas l'augment de taxa de filtració glomerular està associada a cardiopaties congènites cianòtiques¹⁴³, anèmia falciforme¹⁴⁴, obesitat¹⁴⁵, abús d'andrògens⁶⁰, apnea del son¹⁴⁶ i la dieta rica en proteïnes¹⁴⁷.

La GESF adaptativa normalment s'associa a nivells normals d'albumina en plasma, malgrat la proteïnúria en rang nefròtic. Les biòpsies mostren glomèruls engrandits, esclerosis perihil·liar i esborrament podocitari parcial^{42,43}.

GESF INDUÏDA PER DROGUES/MEDICAMENTS

Una de les primeres drogues associades a GESF va ser l'heroïna, però amb el pas dels anys i degut a l'augment de la puresa d'aquesta droga, la nefropatia produïda per l'heroïna ha disminuït considerablement, el que demostrava que el causant de la malaltia no era directament l'heroïna en si, sinó els adulterants amb que es preparava^{31,148}.

Tot i així, al llarg del temps, molts medicaments s'han relacionat amb l'aparició de GESF. Un és el pamidronat i altres bifosfonats, utilitzats per reduir la reabsorció òssia en pacients amb mieloma i càncers metastàsics¹⁴⁹. Alguns pacients que rebien aquest medicament desenvolupaven síndrome nefròtica i lesions del tipus GESF, les quals remetien quan es deixava de donar el medicament. Altres teràpies com l'ús d'interferó, també s'han relacionat amb GESF¹⁵⁰. L'efecte del interferó sobre els podòcits en aquest cas es creu que és un efecte directe degut a que els podòcits presenten receptors per el interferó α i β , a més d'expressar antígens en resposta al interferó γ .

Pel que fa als ronyons trasplantats, els inhibidors de calcineurina tenen un efecte directe sobre el citosquelet d'actina dels podòcits^{1,151}. En alguns estudis, s'ha pogut associar l'aparició de GESF *de novo* a l'ús de la ciclosporina¹⁵², i es

creu que aquestes lesions per l'ús dels anticalcineurínics són degudes a la isquèmia aguda produïda per la vasoconstricció severa¹⁵³⁻¹⁵⁵. A més de totes les drogues mencionades fins ara, també trobem el sirolimus (o rapamicina) el qual és un inhibidor de mTOR (diana de rapamicina en cèl·lules de mamífer), que també pot induir la formació de GESF mitjançant la reducció de l'expressió de proteïnes podocitàries, inclosa la nefrina, així com modificar el citoesquelet del podòcit¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Altres medicaments de la família de les antraciclins com són l'adriamicina i la daunomicina també s'han associat a GESF¹⁵⁹, i fins i tot en el cas de l'adriamicina és molt utilitzada en la creació de models murins de glomeruloesclerosi^{48,160-162}.

GESF ASSOCIADA A VIRUS

Els virus poden actuar sobre el podòcits ja sigui per infecció directa o per l'alliberament de citoquines inflamatòries que interactuen amb els receptors dels podòcits. El virus més estudiat és el VIH-1, el qual està fortament associat al desenvolupament de GESF, sobretot de la variant col·lapsant¹⁶³⁻¹⁶⁵. S'ha observat que el virus infecta directament podòcits i cèl·lules epitelials tubulars, gràcies a les proteïnes estructurals Nef i Vpr¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Nef és un factor de virulència que promou la desdiferenciació i proliferació de podòcits, a més de la desregulació del citoesquelet d'actina¹⁶⁹. Mentre que la proteïna Vpr, la qual és necessària per l'entrada nuclear del complex de preintegració del VIH-1, causa la parada del cicle cel·lular de les cèl·lules epitelials tubulars i l'apoptosi^{170,171}.

S'ha observat que de tots els pacients infectats per VIH, els Afroamericans són més susceptibles a desenvolupar la GESF col·lapsant,

mentre que els Caucàsics solen desenvolupar la glomeruloesclerosi mesangioproliferativa o la malaltia de canvis mínims^{138,164}. Aquestes diferències venen donades per la presència de dos al·lels de risc, G1 i G2 del gen *APOL1*, els quals, com s'ha comentat anteriorment, solen estar més freqüentment expressats en la població Afroamericana^{172,173}.

Un altre virus capaç d'infectar els podòcits i les cèl·lules tubulars, donant lloc a la GESF col·lapsant és el Parvovirus B19¹⁷⁴. També s'han trobat pacients que presentaven GESF en ser infectats pel virus Epstein-Barr, el citomegalovirus o pel virus del simi 40 (sv40)^{1,175,176}.

3.5. Tractament

El principal objectiu del tractament és promoure la remissió completa o almenys parcial de la proteïnúria, el qual permetrà conservar la funció renal durant un període de temps més llarg. D'aquí la raó de que el tractament depengui del grau de proteïnúria, de tal manera que en pacients GESF amb proteïnúria subnefròtica s'opta per un tractament més conservador sense l'ús de immunosupressors, mentre que el tractament amb immunosupressors és el tractament per excel·lència en els casos de pacients amb síndrome nefròtica¹⁷⁷.

En cas de les GESF secundaries, al saber-ne el causant, el tractament es basa en resoldre la causa subjacent de la lesió. A més de la reducció de la pressió sistèmica i intraglomerular mitjançant inhibidors del sistema renina-angiotensina (IECAS i ARAII). Malgrat que el seu benefici en quant a la proteïnúria i a l'evolució renal són molt variables, són molt emprats degut al baix risc que comporta la seva administració^{32,178}.

El tractament en la GESF primària es basa en l'ús de immunosupressors, que a més de les propietats immunosupressives sistèmiques, s'ha observat que en alguns casos exerceixen efectes directes sobre els podòcits. Són per exemple el cas dels inhibidors de la calcineurina, els quals s'ha observat que estableixen el citoesquelet d'actina¹⁵¹ o el rituximab que té un efecte antiproteïnúric directe prevenint la disrupció del citoesquelet d'actina¹⁷⁹.

Les guies KDIGO recomanen iniciar el tractament amb dosis elevades (1mg/Kg/dia) de prednisona, la resposta a aquest glucocorticoide en adults pot trigar fins a 16 setmanes, i és en el moment en que s'observa la remissió quan es va reduint paulatinament l'administració de la prednisona fins a la completa supressió del tractament^{1,32}. S'entén com a remissió completa la disminució de la proteïnúria a valors inferiors de 300 mg/g i com a remissió parcial una disminució del 50% de la proteïnúria, amb valors d'aquesta entre 300 i 3500 mg/g, a més d'una funció renal preservada o millorada en ambdós casos¹⁸⁰.

El tractament amb prednisona presenta certs inconvenients, com són els efectes adversos, doncs a llarg termini la majoria dels malalts acaba recidivant i desenvolupant corticodependència, definida com 2 recidives durant la reducció del tractament o en un termini màxim de 2 setmanes després de completar la teràpia esteroide, o corticoresistència, es a dir persistència de la proteïnúria de rang nefròtic malgrat la prednisona durant almenys 4 mesos. Per aquest motiu s'aconsella l'ús de inhibidors de la calcineurina, ja sigui ciclosporina o tacrolimus, malgrat el potencial risc de nefrotoxicitat.

La ciclosporina (CsA) no només exerceix una acció immunosupressora, sinó també té un efecte antiproteïnúric propi. S'ha demostrat que l'efecte

antiproteinúric de la CsA ve donat pel bloqueig de la desfosforilació produïda per la calcineurina de la sinaptopodina, el qual permet la organització de l'actina, conferint així certa estabilització del citoesquelet d'actina dels podòcits¹⁵¹. A més s'ha observat que la CsA, tot i poder ser un dels causants de GESF de novo¹⁵², juntament amb esteroides tenen més bons resultats en quant a la preservació de la funció renal respecte la prednisona per si sola^{181,182}.

Pel que fa al tacrolimus (FK-506), l'acció com anticalcineurinic és similar a la de la CsA, pel que es pot fer servir com inhibidor alternatiu a la CsA. En un estudi de Segarra et al.¹⁸³ un 68% dels pacients adults GESF corticorresistents tractats amb una teràpia combinada de tacrolimus i esteroides van registrar una disminució de la proteïnúria, i d'aquests un 58% van fer una remissió completa. Altres estudis amb resultats similars van ser els de Duncan et al¹⁸⁴ i Westhoff et al¹⁸⁵.

En un estudi realitzat per Choudhry S et al¹⁸⁶ on es comparava l'ús de tacrolimus respecte CsA, en ambdós casos amb combinació amb esteroides amb dosis baixes, es va observar que tant tacrolimus com CsA tenien una eficàcia similar en induir la remissió en pacients amb GESF corticorresistents. Determinant però que la teràpia amb tacrolimus era una alternativa prometedora a CsA, a la vista del menor risc de recaigudes i d'efectes secundaris.

En resum, els inhibidors de la calcineurina (tant la ciclosporina com el tacrolimus) són medicaments importants i eficaços en el tractament de GESF i de les seves recidives. La necessitat de tractament a llarg termini amb aquests

inhibidors però és un desavantatge important a causa dels possibles efectes secundaris. Per tant, la vigilància de les biòpsies renals és important, durant aquets tipus de teràpies.

L'ús de glucocorticoides i inhibidors de la calcineurina tenen èxit en aproximadament el 50% dels pacients. Però no són les úniques teràpies existents, tant per disminuir la proteïnúria com per prevenir les recidives de GESF s'han provat altres tractaments, com per exemple:

- **Plasmafèresi:** la plasmafèresi s'ha utilitzat com a tractament de primera línia per la GESF i la recidiva de GESF després del trasplantament durant gairebé 20 anys^{74,76,181,187-189}. Quan es revisen els resultats de la literatura més recent, és evident que la plasmafèresi és una teràpia útil ja que és segura amb efectes secundaris mínims i no es registren esdeveniments adversos greus. Segons informes publicats, la plasmafèresi sembla ser moderadament efectiva com a profilaxis contra la recurrència de GESF abans del trasplantament renal i com a tractament de la recurrència després del trasplantament, amb una taxa de resposta aproximadament del 60%^{190,191}. En general, els pacients més joves poden ser més sensibles a la teràpia amb plasmafèresi. A més, es pot utilitzar com a única modalitat terapèutica amb bons resultats¹⁹¹. Tanmateix, és important reconèixer que, en la majoria de casos, es necessita l'administració de modalitats de tractament addicionals per aconseguir la remissió o una reducció significativa de la proteïnúria, ja que aproximadament un 40% de les persones

afectades no responen a la teràpia amb plasmafèresis com a única intervenció terapèutica¹⁹⁰.

Hi ha un tipus específic de teràpia d'afèresis, l'afèresis de LDL amb una columna d'absorció específica per a aquestes partícules lipídiques, que s'ha utilitzat per tractar la hipercolesterolèmia familiar, i que ha estat efectiva en una petita sèrie de pacients amb GESF¹⁹²⁻¹⁹⁴.

- Agents alquilants: Les dades disponibles actuals no són compatibles amb l'ús general d'agents alquilants en el tractament de GESF en adults¹⁸⁰. En estudis realitzats amb pacients glucoresistents que utilitzaven el micofenolat mofetil (MMF), es van obtenir una resposta baixa al tractament en un 15-20% dels casos. En un altre estudi més recent on es comparava l'ús del MMF + dexametasona respecte la CsA, es va observar que després d'un any de tractament no hi havia diferències significatives de remissió entre ambdós tractaments³².
- Anticòs monoclonal contra les cèl·lules B (rituximab): L'ús del rituximab avui en dia encara és força controvertit doncs així com hi ha informes de casos on sembla que el seu ús podria ser útil per a la recidiva de GESF^{195,196}, també es troben dades que demostren el contrari, on el rituximab semblat ser ineficaç per aquesta recidiva¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.
- Sirolimus o rapamicina: no es un inhibidor de la calcineurina, però té un efecte immunosupresor semblant. S'ha descrit en casos anecdòtics per ser efectius en el tractament de GESF; Tanmateix,

aquest fàrmac pot afectar la integritat del podòcit i predisposa als pacients a lesions glomerulars, per això actualment no es recomana²⁰⁰.

- Galactosa: La galactosa té una gran afinitat pels factors permeabilitzadors i teòricament podria abolir l'activitat permeabilitzadora del plasma⁹⁰. El 2009 es va publicar un primer cas d'un pacient que en rebre galactosa oral com a tractament d'últim recurs, va experimentar una remissió de la síndrome nefròtica⁹³, a partir d'aquí diversos estudis han sorgit donant en alguns casos bons resultats^{94,95,201}. Un punt important d'aquest tractament amb galactosa és l'absència d'efectes secundaris, malgrat tot són necessaris estudis amb cohorts de pacients més grans.
- Una aproximació terapèutica molt emprada es la de Canaud²⁰², que consisteix en l'ús concomitant d'altres dosis d'esteroides, ciclosporina i plasmafèresi.

Malgrat els tractaments aproximadament un 55% dels pacients amb GESF primària amb insuficiència renal en estadi final que són sotmesos a un trasplantament, pateixen un recidiva de la malaltia en l'empelt. Els factors de risc d'aquesta recidiva són^{1,190}:

- Edat i sexe: S'ha observat en diferents estudis que existeix una relació inversa entre l'edat del pacient i la probabilitat de recurrència, determinant així que com més jove és l'acceptor de l'empelt més probabilitats té de patir una recidiva de la

malaltia^{66,203,204}; Pel que fa al sexe hi ha dades que demostren una major incidència en les dones^{205,206}.

- Ètnia: Diversos estudis demostren que els afroamericans presenten una menor incidència de la recidiva respecte altres races/ètnies, com els caucàsics, els hispans i els asiàtics^{203,207,208}.
- La ràpida evolució a la insuficiència renal (menys de 3 anys) del ronyó natiu, elevada proteïnúria abans del trasplantament, i la pèrdua anterior d'empelts per recidiva són també factors que augmenten el risc de recidiva¹.

En aquests casos el tractament post-trasplantament es basa en intensificar la immunosupressió. Com ja s'ha dit anteriorment s'ha observat que la plasmafèresis i la immunoabsorció de proteïnes poden reduir notablement l'excreció urinària de proteïnes i induir una remissió completa en alguns casos, però generalment no aconsegueixen una remissió sostinguda, d'aquí el seu ús combinat amb les altres teràpies existents ja comentades.

4. Lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)

Aquesta tesi es troba centrada en l'estudi de les Apolipoproteïnes A-I i A-II, i la seva relació amb la malaltia de GESF. Tenint en compte que ambdues proteïnes són, entre d'altres, components principals de les HDL, és necessari entendre que són, de que estan compostes i quina és la biosíntesi d'aquestes lipoproteïnes.

Les HDL són les lipoproteïnes més petites i denses de tot el grup de lipoproteïnes (la seva mida oscil·la entre 7 i 13nm), això ve donat pel fet que

contenen una gran proporció de proteïnes (aproximadament el 50%)²⁰⁹. Segons la seva densitat es poden classificar en dos subpoblacions majoritàries²¹⁰, HDL₂ amb una densitat de entre 1.063 i 1.125 g/ml i les HDL₃ la densitat de la qual esta entre 1.125 i 1.210 g/ml. A més també es possible una subclassificació d'aquestes dos gran poblacions mitjançant l'ús d'electroforesis nativa, es a dir, mitjançant mètodes no desnaturalitzants, el qual ens permetrà obtenir les següents subfraccions segons el diàmetre: HDL_{3c} (7.6nm), HDL_{3b} (8 nm), HDL_{3a} (8.4nm), HDL_{2a} (9.2nm) i HDL_{2b} (10.6nm)²¹¹. Un altre mètode de classificació es basa en la presència o absència de les ApoA-I i ApoA-II, doncs són les dues proteïnes més abundants de les HDL, sent ApoA-I majoritària, així doncs trobarem els següents grups, LpA-I, HDL que només contenen ApoA-I, LpA-II únicament ApoA-II i LpAI:All, conté ambdós tipus de proteïnes²¹².

Les principals proteïnes que formen les HDL són ApoA-I, ApoA-II, Apolipoproteïna E, Apolipoproteïna C, Apolipoproteïna A-IV, sent les majoritàries la ApoA-I i la apoA-II, a més també trobem enzims associats al metabolisme de les HDL com són la proteïna transferidora de èsters de colesterol (CETP), proteïna transferidora de fosfolípids (PLTP) i la lecitina:colesterol acil-transferasa (LCAT). En aquesta tesi ens centrarem en l'ApoA-I i l'ApoA-II, les quals són les proteïnes trobades en realitzar l'estudi proteòmic del plasma i la orina de pacients GESF respecte diferents tipus de controls, i es postulen com a possibles biomarcadors de la malaltia de GESF i la seva recidiva.

La biosíntesi de les HDL és un procés on es suma la síntesi i secreció de les proteïnes que conformen les HDL, l'adquisició del component lipídic (fosfolípids i colesterol) i per últim la maduració de la partícula de HDL²¹³.

Les HDL es produeixen al fetge i a l'intestí en forma de petites partícules discoïdals riques en proteïna (pobres en lípids) i es van organitzant en el plasma a partir de components de la degradació d'altres lipoproteïnes. La funció més coneguda de les HDL és el transport revers de colesterol, consistent en el flux de colesterol des de les cèl·lules dels teixits perifèrics fins al fetge on serà eliminat per les vies biliars. Aquest flux es pot dividir en tres etapes: el flux de colesterol, l'esterificació del colesterol i la captació d'aquests èsters de colesterol per part del fetge²¹³.

La primera etapa es pot donar de manera inespecífica i passiva o de manera específica i activa, en l'últim cas mitjançant el transportador ABCA1 (ATP-binding cassette transporter), que facilita el transport actiu de colesterol lliure i fosfolípids des de l'interior cel·lular cap a les HDL naixents. En la segona part del transport revers, les HDL naixents extreuen el colesterol de les membranes cel·lulars i el converteixen en èsters de colesterol mitjançant la LCAT associada, que és prèviament activada per l'ApoA-I. L'augment de colesterol esterificat en el nucli de les HDL anirà incrementant la mida i arrodonint la forma de les HDL, fins que finalment en la última etapa, aquest contingut de èsters de colesterol serà alliberat al fetge per a la seva degradació (Figura 15)²¹⁴.

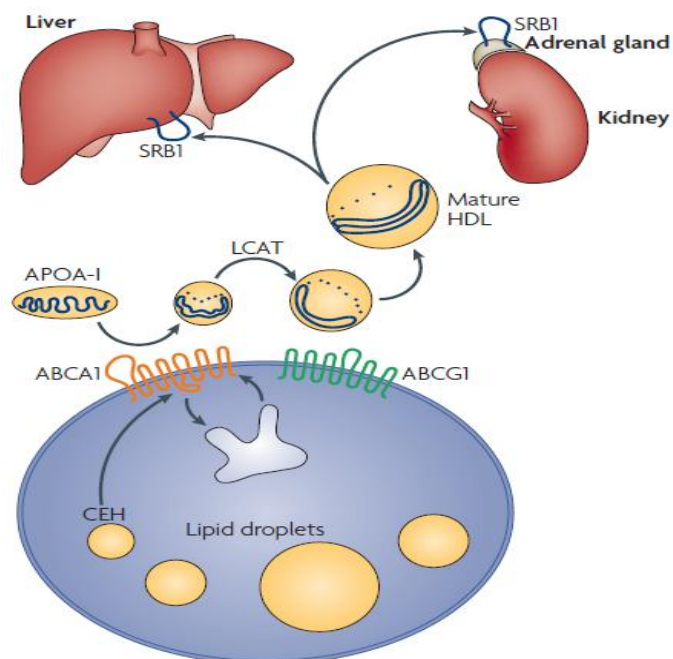


Figura 15. Flux i transport revers de colesterol. ABCA₁ facilita el flux de fosfolípids i colesterol cap a ApoA-I per tal de generar les HDL naixents. La LCAT, utilitza els fosfolípids i colesterol d'aquestes HDL per esterificar el colesterol, donant lloc a partícules de HDL globulars. Aquestes últimes serviran com a acceptors de colesterol adicional extret de les cèl·lules mitjançant l'ajuda del transportador ABCG₁ (més expressat en macròfags). Les HDL passen a la circulació i els esters de colesterol són extrets selectivament per SRB1 (scavenger receptor B1) situat principalment al fegatí. Els hepatòcits excretaran el colesterol cap a la bilis.

A més també existeix una transferència no específica de colesterol entre diversos tipus de lipoproteïnes, en un procés que és catalitzat per la proteïna transferidora d'èsters de colesterol (CETP). El resultat final de la seva acció depèn de la concentració de les diferents lipoproteïnes i del seu temps de vida mitjana, i consisteix en la transferència de colesterol de HDL a LDL i VLDL, i de triglicèrids de VLDL a HDL²¹³.

4.1. Apolipoproteïna A-I

L'ApoA-I és el principal component proteic de les HDL, constituint fins a un 70% d'aquestes. També es pot trobar en petites concentracions en quilomicrons, però no en les lipoproteïnes de baixa i molt baixa densitat (LDL i VLDL) les quals estan compostes per la apolipoproteïna B-100. Per tant no es d'estranyar que les principals funcions de les partícules de HDL siguin dutes a terme per l'ApoA-I, com per exemple la unió a lípids, el flux de colesterol dels teixits perifèrics cap al fetge per a la seva secreció, a més de la ja esmenada activació de la lecitina:colesterol acil-transferasa (LCAT)^{215,216}.

4.1.1. Biosíntesis i secreció

La proteïna ApoA-I es sintetitza al fetge i a l'intestí, a partir del gen *APOA1* que es troba en la regió q23 del cromosoma 11, en forma de pre-pro-teïna²¹⁵. El segment pre, format per un total de 18 aminoàcids (aa) constitueix el pèptid senyal, i dirigeix la proteïna al reticle, on s'escindeix aquesta pre-seqüència mitjançant la peptidasa senyal, el hexapèptid (6aa) que constitueix la pro-seqüència, s'elimina un cop la proteïna ja ha estat secretada per la cèl·lula, mitjançant la metaloproteasa BMP-1²¹⁷, s'ha vist que la seva presència es essencial per a la síntesi i secreció efectives de l'apoA-I, però que la seva posterior escissió és un important requisit per a l'efectiva interconversió de subfraccions HDL, es a dir per a la seva maduració^{218,219}. Al final del procés, la proteïna madura està composta per un total de 243aa, que li confereixen un pes molecular de 28.1KDa²²⁰.

En l'intestí ApoA-I és sintetitzada de forma minoritària, i es secreta formant part dels quilomicrons. En el fetge, on es produeix la major part de la seva síntesi, es secreta majoritàriament com a ApoA-I lliure de lípids.

4.1.2. Estructura

Com ja s'ha mencionat, l'ApoA-I madura està formada per un total de 243aa amb un pes molecular de 28.1KDa. El gen *APOA1* a partir del qual es sintetitza aquesta proteïna està format per 4 exons i 3 introns. El primer dels exons no es tradueix, sinó que la pre-pro-proteïna, que conté el pèptid senyal i el pro-pèptid s'obté a partir de la traducció del segon exó, i serà a la meitat del tercer exó on trobem els aa que conformaran la proteïna madura. El pèptid senyal (18 aminoàcids) s'elimina abans de que la proteïna sigui secretada per la cèl·lula. Els primers 43 residus de la proteïna madura (N-terminal) contenen un domini globular que es creu que juga un paper important en la iniciació de la unió a lípids i en la formació de les partícules de HDL naixents²²¹, la resta d'ApoA-I (aa 43-243), conté 10 repeticions en tàndem separades quasi sempre per una prolina i que formaran una α -helix amfipàtica amb els residus hidròfils i hidròfobs en costats oposats de la hèlix²²² (Figura16). La regió central és on es troba el domini per a l'activació de la LCAT^{223,224}, i és la que proporciona estabilitat a les HDL²²⁵. El domini C-terminal, és vital per a la interacció amb els fosfolípids²²⁶, així com per promoure el flux cel·lular de colesterol²²⁷.

Pel que fa a l'estructura d'ApoA-I formant part de les HDL, existeix una certa controvèrsia, donada per la dificultat en la cristallització per a la resolució de l'estructura per difracció de rajos X. Una de les opcions més estesa però, és el doble cinturó, on les molècules d'ApoA-I envolten la bicapa de fosfolípids formant un disc amb una orientació antiparal·lela. En aquest model hi ha certes discrepàncies pel que fa a l'orientació exacte de les molècules d'ApoA-I, doncs també es creu que podrien estar distribuïdes formant una estructura de forca²²⁸⁻²³⁰ (figura17).

A

1 **MKAAVLT**LAV **LFLTGSQARHFWQQ**DEPPQS PWDRVKDLAT VYVDVLKDSG
 51 **RDYVSQ**FEGS ALGKQLN LKLLDNWDSVTST FSKLREQLGP **VTQEFWDNLE**
 101 **KETEGLRQEM** **SKDLEEVKAK** VQPYLDDFQK KWQEEMELYR QKVEPLRAEL
 151 **QEGARQKLHE** LQEKLSP**LGE** EMRDRARAHV **DALRTHLAP** YSDELQRRLAA
 201 **RLEALKENGG** **ARLAEYHAKA** TEHLSTLSEK AKPALEDLRQ GLL PVLESFK
 251 **VSFLSALEEY** TKKLN**TQ**

B

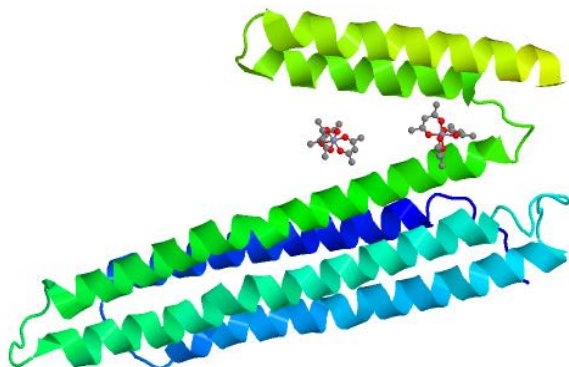


Figura 16 A. Seqüència de la proteïna ApoA-I (P02647) on podem observar en vermell la seqüència del pre-pro-pèptid, la part sense subratllar correspon al pèptid senyal, mentre que els aminoàcids subratllat fan referència al propèptid, tota la seqüència en vermell serà escindida, per formar la proteïna madura de 243aa. En verd la zona N-terminal amb el domini globular, i en negreta i blau alternats les 10 repeticions en tàndem que formaran la α -hèlix. **B. Estructura secundària de l'ApoA-I lliure de lípids**, extreta de RCSB Protein Data Bank³⁰⁷.

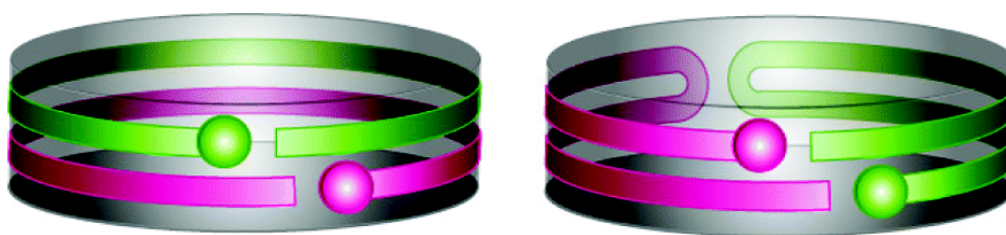


Figura 17 Imatge de les possibles orientacions que adopta ApoA-I envoltant la bicapa lipídica. En la primera imatge observariem la forma antiparal·lela, mentre que la segona correspondria a la distribució en forma de forca²²⁸.

4.1.3. Variants genètiques d'ApoA-I

Actualment hi ha descrites més de 60 variants que afecten al gen d'*APOA1*, la meitat de les quals afecten a la viabilitat funcional de la proteïna, i es troben associades a baixes concentracions d'ApoA-I - HDL, ja sigui per falta o molt baixa activació de LCAT o per formació de dipòsits amiloides d'ApoA-I; A més del fet que les baixes concentracions de HDL estan estretament relacionades amb el risc de patir malalties cardiovasculars²³¹⁻²³⁵.

Existeix una excepció, anomenada ApoA-I Milano²³⁶, que consisteix en una substitució d'arginina per cisteïna (p.R173C), i tot i estar relacionada amb baixos nivells de HDL, proporciona protecció contra les malalties cardiovasculars. En fer estudis amb aquesta variant es va observar que la mutació que contenia afavoria la unió a lípids i que el catabolisme de les partícules de HDL en els individus portadors de la mutació estava accelerat, per tant tot i tenir una menor concentració de HDL en el plasma, aquestes eren molt més eficients realitzant la seva funció de transport revers del colesterol²³⁷.

4.2. Apolipoproteïna A-II

L'ApoA-II és la segona proteïna més abundant de les HDL i representa un 20% del contingut proteic total d'aquestes. El gen que la codifica es troba en la regió q21-23 del cromosoma 1²³⁸, el qual dona un pèptid madur de 77 aminoàcids i 8.7 KDa . Es sintetitza principalment al fetge, i en més petita quantitat a l'intestí. Normalment es sol trobar en plasma formant homodímers units per ponts disulfur mitjançant la única cisteïna existent en cada molècula²³⁹. Malgrat tot, també es pot trobar formant heterodímers d'ApoA-II amb ApoE i ApoD, i en alguns casos, molt menys freqüentment, es troba la forma monomèrica^{240,241}.

La funció principal d'ApoA-II en les HDL és estructural, però diversos estudis la relacionen també amb les lipases hepàtiques i amb la LCAT, tot i que en aquests casos no està tant clar exactament quin paper tindria. Hi ha estudis contradictoris on relacionen ApoA-II amb l'activació²⁴² mentre que n'hi ha d'altres que afirmen que ApoA-II inhibeix la lipasa hepàtica^{243,244}. També hi ha descrits efectes oposats respecte si les HDL que contenen ApoA-I i ApoA-II afavoreixen o contraresten el flux de colesterol cel·lular^{245,246}. El que sí està més clar és el fet que, tot i no ser un cofactor de la LCAT com l'ApoA-I, ApoA-II en elevades concentracions pot bloquejar-ne la seva activació²⁴⁷⁻²⁴⁹.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

La GESF idiopàtica es una malaltia renal associada a síndrome nefròtica, sense tractament efectiu, i causada per un factor plasmàtic desconegut que permeabilitza els glomèruls. Molts pacients GESF evolucionen a malaltia renal terminal, requerint transplantament renal, amb el greu problema que un important percentatge d'aquests pacients recidiva, implicant nous transplantaments. S'han utilitzat tècniques proteòmiques per detectar els potencials inductors de la malaltia i molècules que puguin servir com a marcadors pronòstics de recidiva. Hem trobat específicament associades a GESF idiopàtic unes formes modificades de apolipoproteïnes de HDL: una d'apolipoproteïna A-II (ApoA-II_m) al plasma dels pacients GESF idiopàtics, i una d'apolipoproteïna A-I (ApoA-I_b) a l'orina dels pacients trasplantats amb recidiva de GESF. Aquestes dades, junt amb les aportades per altres investigadors, suggereixen que les apolipoproteïnes A poden estar implicades en la patogènia de GESF.

D'aquí la següent hipòtesis de treball:

“Les formes modificades d'ApoA que hem trobat als pacients de GESF idiopàtica poden estar implicades a la patogènia de GESF i poden servir com a biomarcadors predictius de recaiguda de GESF post trasplantament.”

OBJECTIUS

Per tal de resoldre la hipòtesi els objectius plantejats són els següents:

1. Validació de les proteïnes diferencials trobades per 2D-PAGE (ZAG i ApoA-Ib) entre pacients GESF recidivants i GESF no recidivants.
2. Optimització i translació a la clínica dels biomarcadors de recidiva de GESF idiopàtica post trasplantament.
 - a. Determinació d'Apoa-Ib en orina mitjançant mètodes automatitzats.
 - b. Optimització western-blot de ApoA-II_m en sang.
 - c. Relació d'ApoA-Ib i Apo-II a orina.
3. Caracteritzar la naturalesa de la modificació de la ApoA-Ib i ApoA-II_m dels pacients GESF idiopàtics.
 - a. Determinació de possibles variacions genètiques en els gens *APOA1* i *APOA2*
 - b. Determinació de possibles modificacions post-traduccionals (PTM).
4. Estudiar la presència de ApoA-Ib en pacients GESF idiopàtics no trasplantats.
 - a. Determinació de la presència de ApoA-Ib en pacients no trasplantats.
 - b. Seguiment pre-trasplantament, post-trasplantament immediat, i cada 3 mesos, de la presència de ApoA-Ib
5. Establir la implicació de la ApoA-Ib en les recidives GESF.
 - a. Estudiar la presència de ApoA-I en biòpsies de ronyó de pacients GESF

Hipòtesi i Objectius

- b. Efectes de la ApoA-Ib en el seu entorn fisiològic
 - c. Extracció de ApoA-Ib del plasma de pacients GESF
 - d. Efecte de la ApoA-Ib *in vivo*.
6. Dissenyar estratègies terapèutiques per evitar recidives basades en el seu ús com biomarcador pronòstics o, si es demostra la seva patogenicitat, definint estratègies terapèutiques.

MATERIALS, MÈTODES I PACIENT

1. Pacients

Les mostres biològiques de pacients es van obtenir seguint les directrius del projecte PR-IR 103/2008 aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) del Institut Recerca HUVH, informant als pacients de la realització de l'estudi i obtenint el consentiment informat. Es va seguir en tot moment la normativa nacional i europea sobre estudis clínics i protecció de dades de caràcter personal. Les dades dels pacients inclosos en l'estudi, tant demogràfiques com clíniques, es van introduir en una base de dades creada en *OpenOffice Base* (OpenOffice).

Per a la obtenció de les mostres d'orina, plasma i DNA es va comptar amb la participació de varis hospitals espanyols: Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona), Fundació Puigvert (Barcelona), Hospital del Mar (Barcelona), Hospital Clínic (Barcelona), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Barcelona), Hospital Juan Canalejo (A Coruña), Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz), Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid), Hospital Universitario La Paz (Madrid), Hospital Clínico San Carlos (Madrid), Hospital Universitario Carlos Haya (Málaga), Hospital Universitario La Fe (Valencia), Hospital Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital Universitario Cruces (Barakaldo), Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza), Hospital General Universitario de Alicante (Alacant), Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba).

Les mostres de biòpsies es van obtenir del servei d'anatomia patològica del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Del total de mostres de pacient recollides es van utilitzar diferents subgrups segons les necessitats de cada un dels experiments realitzats. Les característiques de cada un d'aquets subgrups utilitzats es troben detallades en l'apartat de resultats corresponent segons cada cas.

2. Obtenció i processat de mostres biològiques

Es van obtenir mostres d'orina i plasma de tots els pacients, així com mostres de DNA i biòpsies de ronyó dels subgrups detallats en la secció de resultats. El processament d'aquestes mostres es detalla a continuació

2.1. Plasma

Es van recollir 10 ml de sang de cada pacient en tubs amb EDTA (BD Vacutainer®, ref 367653), per evitar la coagulació. La sang es va centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient, i es va recollir el sobrenedant (plasma), el qual després de ser al·liquotat i etiquetat es va conservar a -80 °C fins al moment de ser utilitzat.

2.2. Orina

La orina recollida en un pot de 100 ml estèril, es va traspasar a 2 tubs falcon™ de 15 ml i es va centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts per eliminar restes cel·lulars que poguessin estar presents en la mostra. El sobrenedant es va congelar a -20 °C per tal que les sals precipitessin. Posteriorment es va descongelar, tornar a centrifugar 10 minuts a 3000 rpm i es va recollir el sobrenedant per poder concentrar-lo. La concentració es va realitzar per ultrafiltració per membrana de 3KDa de tall (Merck-Millipore, UFC900324),

seguint els següents paràmetres: centrifugació a 5000xg i a 4°C en una centrífuga d'angle fix, deixant-ho l'estona convenient (normalment entre 1 hora i 1 hora 30 minuts) fins a obtenir un volum final de 500-750µl. L'orina concentrada degudament etiquetada es va conservar a - 80 °C. Posteriorment es va quantificar la proteïna d'aquestes orines mitjançant el mètode Bradford.

QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES EN ORINA (MÈTODE BRADFORD)

Es va utilitzar aquest mètode de quantificació en totes les orines concentrades recollides, per tal de poder carregar la mateixa quantitat de proteïna en els SDS-PAGE (apartat 3.1). El mètode utilitzat va ser el Pierce™ Coomassie (Bradford) (Thermo Fisher Scientific Inc, 23200), on es fa servir un estàndard d'albumina per a la recta patró a partir de la qual s'extreu el valor de proteïna de la pròpia mostra. Aquesta tècnica es interferida per detergents però és compatible amb reductors. Compatible amb tris 2M, DTT 5mM, 2ME 1M, azida sòdica 0.5%, leupeptina 10mg/ml, PMSF 1mM, urea 3M.

En un primer moment, es van diluir les mostres amb aigua MilliQ a diferents concentracions:

- a. Dilució 1:10: En el cas dels controls sans o pacients sense proteïnúria.
- b. Dilució 1:100: Pacients amb síndrome nefròtica. En aquest cas, a vegades es va necessitar diluir fins a 1:500, a causa de l'elevada proteïnúria.

La corba estàndard utilitzada en el nostre cas va ser la que té un rang de detecció de 0.2 a 1.5µg/ µl. I es va preparar diluint a diferents concentracions

l'estàndard d'albumina (BSA) (Thermo Fisher Scientific Inc, 23209) segons indica la taula 4.

BSA (2mg/ml) µl	Aigua µl	Concentració BSA µg/µl
0	50	0
5	45	0,2
10	40	0,4
15	35	0,6
20	30	0,8
25	25	1
30	20	1,2
37,5	12,5	1,5

Taula 4. Taula de concentracions de la recta patró

Per analitzar grans quantitats de mostres es van utilitzar plaques de 96 pous. Van ser necessaris 250 µl de reactiu de treball per cada mostra amb els seus respectius triplicats i per a cada estàndard que es va analitzar. Es van aplicar 5 µl de mostra o estàndard en els pous de la placa corresponent, es van afegir 250 µl de reactiu de treball, tapar i agitar suaument durant 30". Es va deixar a temperatura ambient durant 10minuts i es va fer la lectura amb el lector de plaques ELx800 (BioTek) a 590nm.

2.3. DNA

EXTRACCIÓ DEL DNA

Per a l'extracció de DNA a partir de sang total es va utilitzar el kit comercial de Gentra Puregene Blood kit (QIAGEN Sciences, 158467), partint d'1 ml de sang total de cada pacient en tubs amb EDTA (BD Vacutainer®, 367653), per evitar la coagulació. El protocol seguit per a l'obtenció del DNA va ser el especificat pel kit.

En un primer pas es procedeix a la lisi cel·lular:

1. Es va afegir 1ml de sang total en un tub de 5 o 10ml, que contingui 3ml de RBC Lysis Solution (llisa els eritròcits). Barrejar per inversió i incubar 10minuts a temperatura ambient. Tornar a invertir el tub durant la incubació, almenys un cop.
2. Es va centrifugar a 2000g durant 10 minuts. Treure el sobrenedant amb pipeta pasteur estèril deixant el pellet amb uns 100-200µl del líquid residual.
3. Posteriorment es va vortejar el tub vigorosament per tal de resuspendre les cèl·lules. Això facilita la lisi cel·lular en el pas nº4.
4. Per a llisar les cèl·lules es va afegir 1ml de Cell Lysis Solution i es va pipetejar amunt i avall amb pipeta pasteur estèril nova. Si tenim cèl·lules senceres després de barrejar, s'incuba a 37°C, fins que es veu la solució homogènia. Les mostres es mantenen estables, en la solució de lisi i a T^aambient durant 18 mesos coma mínim.

El següent pas consisteix en la precipitació de proteïnes:

1. Es va deixar refredar les mostres fins a temperatura ambient.
2. Al llisat cel·lular se li van afegir 333µl de Protein Precipitation Solution.
3. Es va vortejar vigorosament durant 20segons com a mínim (millor 2 x 20seg) per barrejar bé i que quedi homogènia.
4. La centrifugació es va realitzar a 2000g durant 10minuts. El precipitat de proteïna forma un pellet consistent i de color marró fosc. *Si el precipitat no es veu prou consistent, s'ha de tornar a repetir el pas nº3, incubar durant 5min en gel i tornar a centrifugar com en el pas nº4.*

Finalment es precipita el DNA i s'hidrata per tal de poder guardar-lo:

1. El sobrenedant es va passar amb pipeta pasteur estèril nova en un tub de 5 o 10ml nou, que contingui 1ml d'isopropanol 100%.
2. Es va barrejar el sobrenedant invertint el tub fins a observar el DNA en forma de medusa o filets.
3. Posteriorment es va centrifugar a 2000g durant 3minuts per precipitar el DNA que formarà un pellet petit i blanc.
4. El sobrenedant es va descartar decantació i es va assecar el tub amb paper absorbent deixant-lo breument boca avall. Es va afegir 1ml d'Etanol 70% i es va invertir el tub varies vegades per a netejar el pellet de DNA.
5. Es va centrifugar a 2000g durant 2minuts. A continuació es va treure l'etanol per decantació amb molt de compte. *El pellet es pot despendre, per tant, vigilarem el pellet de DNA. Si el pellet es desprèn, centrifugarem de nou 2minuts més.*
6. Es va deixar el tub boca avall i assecar durant 15minuts a T^aambient.
7. Finalment es van afegir 100µl de DNA Hydration Solution (la concentració final de DNA era aproximadament de 300µg/ml; en els casos que era molt més elevada es va diluir amb més hydration solution o amb aigua estèril).
8. Es va deixar que es dissolgués el DNA O/N a 37°C o a 65°C durant 1hora.
9. La mostra es va traspasar a un tub eppendorf de 0.5 o 1.5ml.
10. Es va identificar correctament i es va guardar una alíquota a 2-8°C (la d'ús habitual) i una altre a -80°C.

QUANTIFICACIÓ I QUALITAT DEL DNA OBTINGUT

La concentració del DNA es va mesurar espectrofotomètricament (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc), mesurant l'absorbància del DNA a 260nm i el quocient 260nm/280nm, on l'absorbància a 280nm correspon a la presència de proteïnes i substàncies orgàniques contaminants que contingui la mostra. Aquest quocient és un indicador de la puresa del DNA i ha de tenir un valor entre 1.6 i 2.

2.4. Biòpsies

Les biòpsies de ronyó van ser proporcionades per el servei d'anatomia patològica del Hospital Universitari de Vall d'Hebron. Els talls histològics ja estaven inclosos en parafina sobre un portaobjectes.

3. Anàlisis de proteïnes

3.1. SDS-PAGE d'una dimensió o western blot (WB)

ELECTROFORESIS

La electroforesis en gels d'acrilamida en presència de SDS, és la tècnica més utilitzada per la separació i anàlisis de proteïnes. Els gels d'acrilamida utilitzats per l'anàlisi de les proteïnes son unidimensionals i desnaturalitzants (SDS-PAGE). Es basen en un suport físic format per fibres de monòmers d'acrilamida entrecruades amb bis-acrilamida que polimeritzen en presència de radicals lliures aportats pel persulfat d'amoni i que queden estabilitzats pel TEMED. El SDS és un detergent aniònic que s'uneix a les proteïnes carregant-

les negativament i desfent-ne la seva estructura tridimensional, fent que migrin de manera proporcional al seu pes molecular si son sotmeses a un camp elèctric.

El protocol seguit per a la electroforesis es detalla a continuació:

- **Reactius i equips:**

- Gels de poliacrilamida d'un 1mm de gruix (taula 5)
 - H₂O MilliQ™
 - 30% Acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad Laboratories, 161-0158)
 - 4x Tris pH 8.8 (taula 11)
 - 4x Tris pH 6.8 (taula 11)
 - SDS 10%
 - Persulfat Amònic 10 % (PanReac AppliChem, A2941)
 - TEMED (GE Healthcare Life Sciences, 17-1312-01)
- Sistema mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories)
- Fonts d'electroforesi (Bio-Rad Laboratories)
- *Buffer* d'electroforesis 1x (taula 12)
- Solució d'equilibrat (taula 15)
- Prestained SDS-PAGE standards, Broad Range (Bio-Rad Laboratories, 1610318)

Components	Gel Separador (Concentració final Acrilamida, %)		Gel Concentrador
	12.5% (ApoA-I)	15% (ApoA-II)	
30% Acrilamida/ bisacrilamida (ml)	8.3	10	1.3
4x Tris pH 8.8 (ml)	5	5	-
4x Tris pH 6.8 (ml)	-	-	2.5
SDS 10% (ml)	0.2	0.2	0.1
H2O MilliQ™ (ml)	6.4	4.7	6
Persulfat Amònic 10 % (µl)*	100	100	70
TEMED (µl)*	10	10	7

** El persulfat amònic i el TEMED s'afegeixen al final ja que promouen la polimerització dels gels de poliacrilamida*

Taula 5. Composició per a quatre gels de poliacrilamida d'1 mm de gruix

- **Preparació de la mostra:**

- Plasma: es van afegir 10 µl de plasma a 90 µl de solució d'equilibrat. Agitar i deixar 30min a temperatura ambient. Es van carregar 10µl per pou.
- Orina Concentrada: es va diluir en 50 µl de solució d'equilibrat el volum d'orina necessari per obtenir una concentració final de 3µg/µl de proteïna. Es va agitar i deixar 30min a temperatura ambient. Es va carregar un volum de 20µl/pou, que corresponen a 60µg de proteïna/pou.
- Plasma Control: es va afegir 1 µl de plasma control a 240 µl de solució d'equilibrat. Es va agitar i deixar 30min a temperatura ambient. Es van carregar 10µl per pou, que corresponen a 3µg de proteïna per pou.
- Marcador de pes molecular: Prestained SDS-PAGE standards, Broad Range, es van carregar directament 10µl/pou.

- **Electroforesis:**

- Es van muntar el gels en la cubeta d'electroforesi seguint les instruccions del fabricant i es van cobrir amb *buffer* d'electroforesi 1x.
- Es van carregar les mostres sota el *buffer*. El glicerol del *buffer* d'equilibrat fa que la mostra s'enfonsi. El marcador i/o el control de plasma es van carregar en un carril lateral.
- Es va realitzar l'electroforesi a 30V constants 15min i a continuació 200 V fins que el front va sortir del gel.
- Es va desmuntar el suport i separar els vidres. Es va descartar el gel concentrador, i es va transferir el gel separador.

TRANSFERÈNCIA I DETECCIÓ

Aquesta tècnica ens permet realitzar la transferència de les proteïnes del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF per poder realitzar la detecció específica de les proteïnes d'interès mitjançant anticossos específics.

El procediment de la transferència i la detecció es detalla a continuació:

- **Reactius i equips:**

- Membrana de PVDF (Merck-Millipore, IPVH00010)
- *Buffer* de transferència Towbin 1x (taula 13)
- Metanol (Merck, 106009)
- Llet en pols descremada (Central Lechera Asturiana) o albúmina (PanReac AppliChem, A6588)
- Sistema mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories)

- PBS 1x amb 0,1 % (v/v) de Tween 20 (Thermo Fisher Scientific inc, BP337) (taula 16).
- Anticossos primaris i secundaris (Taula 6).
- Sistema de revelat per quimioluminescència Luminata Forte (Merck-Millipore, WBLUF0500)
- Detector de quimioluminescència LAS3000 (Fuji Photo Film)
- **Transferència**
 - La membrana de PVDF (utilitzada enlloc de la nitrocel·lulosa per a proteïnes de pes molecular petit, per sota de 30kDa), es va tractar prèviament: submergint-la en metanol fins que quedés translúcida. Es va deixar en *buffer* de transferència fins a l'hora de ser utilitzada.
 - Es va muntar el transblot segons instruccions del fabricant.
 - La transferència es va realitzar a 70 V constants durant 1 h en *buffer* de transferència.
- **Bloqueig, incubació i detecció**
 - Es va submergir la membrana en PBS-Tween.
 - Va ser bloquejada amb 5% de llet en pols diluïda en PBS-Tween durant 1h 30 min a temperatura ambient.
 - Es va incubar la membrana amb l'anticòs primari desitjat i a la dilució en la solució corresponent en cada cas (Taula 6).
 - Es van realitzar 4 rentats de 5 minuts en PBS-Tween. En agitació.

- La incubació amb l'anticòs secundari (el corresponent segons el anticòs primari utilitzat, taula 6) en solució de bloqueig es va realitzar a temperatura ambient durant 1 h en agitació.
- Es va repetir els 4 rentats de 5 minuts en PBS-Tween. En agitació.
- Es va revelar amb Luminata Forte seguint les especificacions recomanades per la casa comercial.
- La lectura es va realitzar al LAS3000 durant el temps necessari per a veure les bandes.

	Anticòs	Proveïdor (referència)	Tipus d'anticòs	Hoste	Buffer de dilució	Concentració d'ús
Primaris	anti – ApoA1	Abnova (PAB8546)	Policlonal	Conill	5% albúmina en PBS-Tween	1:4000
	anti – ApoA1	Abnova (PAB9966)	Policlonal	Cabra	5% llet en pols desnatada en PBS-Tween	1:2500
	anti – ApoA11	Abnova (PAB9967)	Policlonal	Cabra	5% llet en pols desnatada en PBS-Tween	1:1000
	anti - ZAG	Abnova (H00000563-B0)	Policlonal	Ratolí	5% llet en pols desnatada en PBS-Tween	1:1000
	Anti-transferrina	Biovision (7012-30T)	Policlonal	Conill	5% llet en pols desnatada en PBS-Tween	1:4000
Secundaris	anti – cabra	DAKO (P0449)	Policlonal	Conill	5% llet en pols desnatada en PBS-Tween	1:2000
	anti – conill	DAKO (P0448)	Policlonal	Cabra	5% llet en pols desnatada en PBS-Tween	1:2000
	anti - ratolí	DAKO (P0260)	Policlonal	Conill	5% llet en pols desnatada en PBS-Tween	1:1000

Taula 6. Anticossos utilitzats en la immunodetecció per Western Blot

3.2. Electroforesis bidimensional (2D)

La electroforesis bidimensional es una tècnica d'alta resolució per la separació de barreges complexes de proteïnes. Durant la electroforesis

bidimensional les proteïnes son separades seqüencialment per dos criteris físics: en primer lloc en funció del seu punt isoelèctric (isoelectroenfoc), i a continuació, segons la seva massa molecular (SDS-PAGE). Finalment les proteïnes separades son processades per a la seva tinció i identificació per espectrometria de masses.

3.2.1. Primera dimensió: Isoelectroenfoc (IEF)

Aquesta primera part es basa en el desplaçament de les proteïnes en un gradient de pH en aplicar una diferencia de potencial. Les proteïnes, contingudes a la mostra diluïda amb un *buffer* de baixa força iònica, migraran fins a la regió de pH que coincideixi amb el seu punt isoelèctric.

Els reactius i procediment de la tècnica es detallen a continuació:

- **Reactius i equips:**

- Tires de 24cm amb rang de pH 3-10 lineal (GE Healthcare Life Sciences, 17-6002-44)
- Solució de rehidratació (taula 17)
- IPG ampholine *buffer* pH 3–10 (GE Healthcare Life Sciences, 17-6000-87)
- HED, hydroxiethyl disulfide (DeStreak) (GE Healthcare Life Sciences, 17-6003-18)
- DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare Life Sciences, 17-1335-01)
- Strip Holder de ceràmica (GE Healthcare Life Sciences, 80-6469-88)
- Font IPGphor (Pharmacia Biotech)

- **Procediment:**

- Es va afegir 6µl de DeStreak a 500µl de solució de rehidratació.
- A la solució anterior se li va afegir la quantitat necessària de mostra per obtenir una concentració de proteïna entre 500 i 1000µg
- Es van carregar 450µl de la solució anterior al *Strip Holder*, evitant la formació de bombolles.
- Agafant la tira per l'extrem anòdic (+), es va col·locar sobre la suspensió proteica amb la cara que conté el gel cap per avall.
- Per tal d'evitar l'evaporació, es van aplicar unes gotes de *IPG Cover Fluid* sobre la tira fins que quedés totalment coberta. Es va tapar l'*Strip Holder* i es va col·locar al IPGphor per realitzar el isoelectroenfoc
- Els paràmetres fixats en la Font IPGphor van ser els següents:
 - Rehidratació: La rehidratació a de ser un mínim de 10 hores, però es pot augmentar fins a 18h per tal d'ajustar el temps a conveniència.
 - Enfoc:
 1. 1h a 500V
 2. 1h a 1000V
 3. 3h a 8000V
 4. 7h a 8000V
- Un cop finalitzat el IEF es pot realitzar el SDS-PAGE o bé guardar les tires a -80°C en tubs tancats, sempre posant el plàstic contra la paret del tub.

3.2.2. Segona dimensió: SDS-PAGE

Aquesta segona etapa consisteix en la separació de les proteïnes segons el seu pes molecular, tal com succeeix en l'apartat 2.1. Però adaptant els volums a un sistema de vidres més gran, utilitzant una acrilamida més resistent per aquest tipus de gels de major mida, canviant el buffer d'electroforesis convencional pel buffer tris-glicina, el qual permet una millor resolució de les proteïnes de baixa massa molecular i realitzant un tractament de la mostra retinguda en la tira de gel previ a la electroforesis.

- **Reactius i equips:**

- Solució d'equilibrat reductora (amb DTT):
 - 10mg de DTT (GE Healthcare Life Sciences, 17-1318-02) per cada 10ml de solució d'equilibrat (taula 15)
- Solució d'equilibrat alquiladora (amb iodoacetamida):
 - 400mg de iodoacetamida (Sigma-Aldrich, I1149) per cada 10ml de solució d'equilibrat.
- Gels d'acrilamida al 12.5% (taula 7)
 - H₂O MilliQ™
 - Duracryl (Proteomic Solutions, 80-0148)
 - 4x Tris pH 8.8 (taula 11)
 - SDS 10%
 - Persulfat Amònic (PanReac AppliChem, A2941)
 - TEMED (GE Healthcare Life Sciences, 17-1312-01)
- Solució de segellat d'agarosa (taula 18)
- *Buffer* d'electroforesis tris-glicina-SDS 10x (taula 12)

- Sistema de vidres i cubeta EttanDalt 6 (GE Healthcare Life Sciences, 80-6485-08)
- Font d'electroforesis (BioRad Laboratories)
- Termoblock, AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet International Inc)

Components	Gel Separador (quantitat per a 4 gels)
Duracryl (ml)	145.8
4x Tris pH 8.8 (ml)	84.5
SDS 10% (ml)	3.5
H2O MilliQ™ (ml)	113.5
Persulfat Amònic (mg)*	175
TEMED (µl)*	175

** El persulfat amònic i el TEMED s'afegeixen al final ja que promouen la polimerització dels gels de poliacrilamida*

Taula 7. Composició per a quatre gels de Duracryl per a la realització de 2D-PAGE de 24cm

- **Procediment:**

- Es van preparar i muntar els gels segons instruccions de la casa comercial.
- Es va ajustar el termoblock a 90°C, posant la solució de segellat d'agarosa per a que es fongués.
- Després de l'IEF es van equilibrar les tires 10 minuts amb solució d'equilibrat reductora i posteriorment 10minuts més amb solució d'equilibrat alquiladora.
- Es van rentar les tires en buffer d'electroforesis i es van col·locar sobre el gel SDS-PAGE fins a quedar en contacte amb el gel d'acrilamida.

- La solució de segellat temperada (sense deixar que solidifiqui), es va aplicar sobre la tira evitant la formació de bombolles entre la tira i el gel d'acrilamida.
- Un cop la solució de segellat es va solidificar, es va realitzar el muntatge dels vidres a la cubeta i es va omplir la cubeta interior amb *buffer* d'electroforesis tris-glicina 2x i la exterior amb 1x.
- Les condicions d'electroforesis van ser: 30' a 2.5W/gel i 100W totals el temps necessari fins que el front surtis, a una temperatura de 10°C.
- Posteriorment es van desmuntar els gels i es van tenyir amb una tinció compatible amb la posterior identificació per MALDI-TOF, en aquest cas el Coomassie Col·loïdal (descriu en l'apartat 2.2.3).

3.2.3. Tinció de proteïnes amb coomassie col·loïdal

Per a la visualització de les proteïnes després del 2D-PAGE, s'utilitza el Coomassie blau brillant, colorant de trifenilmetà, del qual n'existeixen dos tipus, el R-250 i el G-250, que difereixen per l'adició de dos grups metil, a més de per la tonalitat prèvia tinció del gel, en el primer cas vermellosa, en el segon cas verdosa.

Tant el R-250 com el G-250 són compatibles amb una posterior identificació proteica per espectrometria de masses. En el nostre cas es va seguir el protocol descrit per Candiano ²⁵⁰, el qual utilitza el coomassie blau brillant G-250.

- **Reactius:**

- Coomassie col·loïdal “Blue Silver”
 - Àcid ortofosfòric (Merck, 573)
 - Sulfat Amònic (Sigma-Aldrich, A5132)
 - Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, 161-0406)
 - H₂O MilliQ™
 - Methanol (Merck, 106009)
- Fixador per a coomassie col·loïdal (taula 8)

Reactiu	Quantitat
Metanol	500 ml
Ac. Ortofosfòric al 85%	30ml
Aigua MilliQ	Fins a 1 litre

Taula 8. Composició del fixador per a la tinció de coomassie col·loïdal

- **Procediment:**

- Es va prepara la solució coomassie col·loïdal:
 - A 100ml d'aigua MilliQ
 - 100 ml d'àcid ortofosfòric
 - 100g de sulfat d'amoni
 - 1,2g de coomassie brillant blue G-250
 - Enrasar amb 800ml d'aigua MilliQ
 - Afegir 200ml de metanol lentament.
- Un cop ha finalitzat el SDS-PAGE es van desmuntar els vidres i es va fixar el gel 1h en agitació suau amb el fixador per a coomassie col·loïdal

- La tinció amb coomassie col·loïdal “*Blue Silver*” es va realitzar durant 3-4 dies en agitació constant.
- Es va destenyir amb aigua MilliQ fins a la desaparició del *background*.

3.3. Electroforesis nativa (Blue Native-PAGE)

El BN-PAGE es una tècnica que utilitza el blau de coomassie en lloc del detergent SDS en el buffer catòdic, el qual manté les interaccions proteïna-proteïna i dona una carrega negativa al complex a estudiar. D'aquesta manera es permet la migració del complex segons la seva mida, impedit la dissociació de les seves subunitats i per tant la pèrdua de l'estructura nativa del complex.

251

Per tant aquesta tècnica ens serveix per separar les fraccions de HDL segons el seu diàmetre però sense desfer-ne l'estructura. Les condicions de l'electroforesi ens van permetre la separació de les fraccions de HDL en un rang de 7 a 12nm de diàmetre de partícula, a més de prevenir que les lipoproteïnes més grans penetressin en el gel²⁵².

El procediment seguit per a la separació d'aquestes fraccions es detalla a continuació.

- **Reactius i equips:**

- Gels no desnaturalitzants Novex 4-16% Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific Inc, BN1004BOX)
- *Buffer* de mostra NativePAGE™ Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific Inc, BN2003)
- H₂O Elix™

- XCell Sure Lock electrophoresis cell (Thermo Fisher Scientific Inc, EI0001).
 - NativePAGE Running Buffer (20x) (Thermo Fisher Scientific Inc, BN2001)
 - NativePAGE Cathode Additive (20x) (Thermo Fisher Scientific Inc, BN2002)
 - Membrana de PVDF (Merck-Millipore, IPVH00010)
 - *Buffer* de transferència Towbin 1x (taula 13)
 - Metanol (Merck, 106009)
 - Llet en pols descremada (Central Lechera Asturiana) o albúmina (PanReac AppliChem, A6588)
 - Sistema mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories)
 - PBS 1x amb 0,1 % (v/v) de Tween 20 (Thermo Fisher Scientific inc, BP337) (taula 16).
 - Anticòs primari anti ApoA1 (Abnova, PAB9966)
 - Anticòs secundari HRP-anti-cabra (Dako, P0449)
 - Sistema de revelat Luminata Forte (Merck-Millipore, WBLUF0500)
 - Detector de quimioluminescència LAS3000 (Fuji Photo Film. CO)
- **Procediment:**
 - La mostra es va preparar segons la taula 9.

Reactiu	Mostres sense detergent
Mostra de plasma	4µl (pacients) / 2 µl (controls)
Buffer de mostra (4X): Buffer Bis-tris pH 7.2; Glicerol; NaCl; Ponceau S	2.5 µl
Aigua MilliQ	Fins a 10 µl*

Taula 9. Preparació de les mostres per a la electroforesis nativa

- Es van muntar el gels en la cubeta d'electroforesi seguint les instruccions del fabricant
- Es van carregar les mostres (10µl/pou), carregant en el primer pou el mateix plasma control, que ens va servir per poder comparar entre si els diferents gels
- La cubeta interior es va omplir amb el *buffer* càtode i la exterior amb el *buffer* ànode (taula 10)

	Reactiu	Quantitat
Buffer càtode	NativePAGE Running Buffer (20x)	10 ml
	NativePAGE Cathode Additive (20x)	1 ml
	H ₂ O Elix	189 ml
	TOTAL	200 ml
Buffer ànode	NativePAGE Running Buffer (20x)	50ml
	H ₂ O/ Elix	950 ml
	TOTAL	1000ml

Taula 10. Tampons utilitzats en l'electroforesi nativa

- La electroforesi es va realitzar amb les següents condicions: 30minuts a 65V constants seguits de 16h a 100V constants en cambra freda (4°C)
- Un cop finalitzada l'electroforesi el gel separador va ser transferit a una membrana PVDF.
- La transferència, bloqueig, incubació i detecció de les HDL es va duu terme tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.1.

3.4. Anàlisi i processat d'imatges

3.4.1. Anàlisi i processat dels gels no desnaturalitzants

Les diferents fraccions de HDL obtingudes en el Blue Native es van quantificar utilitzant el *software Quantity One (Bio-Rad)* seguint les indicacions del manual d'ús del *software* per a anàlisi d'àrees. Tots els pacients analitzats es van relacionar amb el mateix control present en cada un dels gels, de tal manera que es poguessin comparar les diferents intensitats d'àrea obtingudes entre els pacients dels diferents gels.

3.4.2. Anàlisi i processat dels gels bidimensionals

La digitalització dels gels tenyits amb coomassie es va dur a terme amb el densitòmetre calibrat GS800 (Bio-Rad Laboratories) i va ser analitzat mitjançant el *software PDQuest 6.2 (Bio-Rad Laboratories)*. El procés d'identificació es va realitzar en col·laboració amb el grup de proteòmica del Vall d'Hebron Institut d'Oncologia.

Les proteïnes es visualitzen en el gel com a punts o taques, les quals poden correspondre a una o més proteïnes.

ANÀLISIS

En l'anàlisi realitzat mitjançant el PDQuest 6.2 (Bio-Rad Laboratories) es van identificar les taques diferencials entre els grups a comparar en cada cas, per així posteriorment identificar a quina proteïna corresponia cada una d'aquestes taques mitjançant els anàlisis de MALDI-TOF i de LC-ESI-MS/MS.

MALDI-TOF ANÀLISIS

Les taques diferencials van ser retallades i digerides amb tripsina, per posteriorment ser analitzades en el Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonics). Els espectres de calibratge van ser processats pel *software* FlexAnalysis 2.2 (Bruker Daltonics). El llistat de pics es va generar utilitzant les senyals amb ràtio massa:carrega (m/z) en un rang de 800-4000, amb el diferencial de senyal:soroll >3 . Els pèptids causats per la l'autolisis de la queratina i la tripsina es van eliminar de la llista de pics.

LC-ESI-MS/MS ANÀLISIS

Les taques diferencials també van ser analitzades amb l'espectròmetre de masses Esquire HCT IT (Bruker Daltonics) acoblat al Ultimate nano-HPLC (LC Packings). Les mostres digerides amb tripsina van ser carregades a la columna de nanoseparació PepMap (LC Packings). Els pèptids es van eluir cap a la font d'ionització mitjançant un gradient d'acetonitril a través d'una agulla de nanopulverització PicoTip (New Objective Inc). La fragmentació per MS/MS (1.9s, 100-2800 m/z) es va realitzar sobre els dos ions més intensos. La llista de pics va ser creada amb el *software* DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics).

IDENTIFICACIÓ PROTEICA

Les proteïnes van ser identificades utilitzant el *software* Mascot v.2.2.04 (Matrix Science, London UK) utilitzant com a base de dades la SwissProt database (v.2012.06) amb una tolerància de massa <100 ppm en MALDI-TOF i 1.5Da (precursor) i 0.5Da (fragment) en el MS/MS, permetent dos talls errats (missed cleavages) per part de la tripsina.

Els criteris d'identificació van ser, per a MALDI-TOF, una puntuació estadísticament significativa, i pels espectres MS/MS una puntuació superior a la puntuació de tall.

3.5. Anàlisi de proteïnes en nefelòmetre

La prova de translació a la clínica es va realitzar mitjançant una quantificació de ApoA-I d'un grup de mostres d'orina i amb l'ús del nefelòmetre BN ProSpec System® (Siemens Healthcare GmbH). Aquest anàlisi es va portar a terme amb la col·laboració amb el servei de bioquímica clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

4. Caracterització de les modificacions d'ApoA-Ib

Hi ha dos possibilitats que donarien lloc a un increment de pes molecular de l'Apoliproteïna A-Ib:

- Variacions genètiques que donin lloc a increment de pes directament o que permetin una PTM que derivi en un increment de pes
- PTM o processament anòmal de la proteïna que faci incrementar el pes molecular de la ApoA-I circulant

En el primer dels casos es necessària la seqüenciació del gen *APOA1*, mentre que en el segon cas es necessita de tècniques de espectrometria de masses on s'analitzi l'ApoA-I i l'ApoA-Ib aïllades de controls sans o de pacients GESF ApoA-Ib positius respectivament.

4.1. Anàlisi genètic

Es va portar a terme l'amplificació i seqüenciació del gen *APOA1* que codifica per l'Apolipoproteïna A-I, per tal d'observar alguna variació genètica comú en els pacients recidivants que pogués donar lloc a la proteïna ApoA-Ib.

4.1.1. Reacció en cadena de la polimerasa

REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR és un mètode de clonació de DNA in vitro, que es basa en la utilització d'uns *primers*, la seqüència dels quals és complementària a cada un dels fragments de DNA que es desitja amplificar. Mitjançant el enzim DNA polimerasa s'aconsegueix copiar de manera exponencial el fragment de DNA flanquejat pels *primers* fins a aconseguir-ne bilions de còpies.

L'amplificació s'aconsegueix mitjançant una reacció que consta de una repetició en cicle de varies etapes a diferents temperatures.

1. Desnaturalització inicial: 1 cicle. Es tracta de 3-10min a 93-98°C, amb l'objectiu de separar la doble cadena de DNA genòmic.
2. Reacció cíclica: 25-40 cicles que consten de 3 etapes:
 - a. Desnaturalització: 30-60s a 93-98°C amb l'objectiu de mantenir les cadenes separades.
 - b. Hibridació: 30-60s a la temperatura de hibridació (T_m) de la parella de *primers* (taula 11)

- c. Elongació: 30-90s (segons la mida del fragment a amplificar) a 72°C. En aquesta etapa la DNA polimerasa copia la seqüència d'interès.
3. Extensió final: 1 cicle. Aquest pas consisteix en 5-10 min a 72°C i el que es pretén es donar temps a la DNA polimerasa a que acabi de copia els fragments de DNA iniciats en els cicles anteriors.

PRIMERS

Les parelles de *primers* emprades en l'amplificació d'àcids nucleics es van dissenyar seguint els paràmetres necessaris per a obtenir unes condicions d'amplificació òptimes. De manera que es van tenir en compte que la llargada i la T_m dels dos oligonucleòtids fos similar, que el percentatge de GC s'aproximés el màxim possible al 50% i que el *primer* no presentés complementarietat ni amb ell mateix ni amb la parella corresponent. Per al disseny de primers es va utilitzar la web <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> i el proveïdor encarregat de la síntesi de oligonucleòtids va ser estat STABVIDA.

Nom primer	Seqüència 5'→3'	T _m (°C)	Orientació
AI1.1	CTGCCAACACAATGGACAAT	59.42	Directe
AI 1.2	ACGGGGATTTAGGGAGAAAG	59.42	Inversa
AI 2.1	CCCTAACCTAGGGAGCCAAC	59.96	Directe
AI 2.2	AAAGGGGCTTGCTACACTTG	59.38	Inversa
AI 3.1	CGTGATCACAGGCCACATT	59.71	Directe
AI 3.2	AGTGGGCTCAGCTTCTCTTG	59.75	Inversa
AI 4.1	GAAGAAGTGGCAGGAGGAGA	59.53	Directe
AI 4.2	GCACGGAGTTGTTGAGATCC	60.67	Inversa

Taula 11. Parelles de primers utilitzats per a la seqüenciació de *APOA1* amb les seves respectives d'elongació

PROTOCOL

- **Reactius i equips:**

- H₂O MilliQ™
- *Primers* (taula 11) a concentració de 20µM
- Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fiser Scientific Inc, 11304-011)
 - 10X High Fidelity Buffer [600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM (NH₄)₂SO₄]
 - 50 mM MgSO₄
- dNTP MIX 100mM (Bioline, BIO39028), s'ha de preparar a 10µM
- Mostra de DNA
- Termociclador G-Storm Thermal cycler (G-Storm, GS00001)

- **Procediment:**

- Es van preparar les mostres a analitzar amb els reactius:
 - DNA → 1-4 µl (aproximadament 100ng)
 - dNTPs → 0.5µl
 - *Primers* → 0.5µl (directe) + 0.5µl (revers)
 - *Buffer* 10x → 2.5µl
 - MgSO₄ → 1.5µl
 - *Taq* Polimerasa → 0.1µl
 - H₂O MilliQ → Fins a un volum final de 25µl
 - El programa utilitzat per a l'amplificació va ser el següent:
 - **94°C → 5'**
 - **94°C → 45''**
 - **60°C → 1'**

35cicles

- 72°C → 1' 15''
- 72°C → 5'

4.1.2. Electroforesis en gels d'agarosa

L'electroforesi en gels d'agarosa permet la separació analítica o preparativa de fragments de DNA d'una mida entre 50pb i 25Kpb. La resolució depèn de la concentració d'agarosa utilitzada (0.8-4%), de manera que, en augmentar la concentració millora la resolució de fragments de menor pes molecular. En el nostre cas la majoria de fragments eren de aproximadament 500pb, i la concentració d'agarosa utilitzada va ser del 2%.

- **Reactius i equips:**

- H₂O MilliQ™
- Agarosa AG-2 Mitja Electroendosmosis (Ecogen, AG0220)
- Marcador de pes molecular, HyperLadder™IV (Bioline, BIO-33056)
- *Buffer* TAE 1x (taula 19)
- Bromur d'etidi (0.5µg/ml de gel) → capaç d'intercalar-se entre el DNA i d'emetre fluorescència en ser exposat a la llum UV de longitud d'ona curta (310nm), detectant fins a 5ng de DNA
- *Buffer* de càrrega (Ecogen, BIO37045)
- Sistema d'electroforesis horitzontal (Bio-Rad Laboratories)
- Transiluminador Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Laboratories, 1708195)

- **Procediment:**

- Es va diluir la quantitat necessària d'agarosa mitjançant escalfor, en *buffer* TAE 1x i es va afegir el bromur d'etidi
- La barreja es va abocar a un portagels amb la pinta
- Un cop estava solidificat, el portagels es va col·locar dins una cubeta d'electroforesis amb TAE 1x.
- Es van preparar les mostres amb *buffer* de carrega a una proporció de producte de PCR: *buffer* de carrega 1:3. Posteriorment es van carregar les mostres i el marcador de pes molecular als diferents pous.
- Es va connectar la cubeta a la font de voltatge (60-120V) i es van deixar migrar les mostres fins que el front arribes pràcticament al final.
- El gel es va visualitzar en un transiluminador per comprovar que el fragment amplificat fos de la mida esperada seguint com a patró de mida el marcador de pes molecular.

4.1.3. Purificació, Seqüenciació i anàlisi de mutacions

Un cop comprovat en el transiluminador que el fragment amplificat es de la mida esperada, es va procedir a la purificació i la seqüenciació del producte de PCR, la qual es va realitzar externament per la empresa MacroGen Inc (Amsterdam).

4.1.4. Nomenclatura de les variants de seqüència

Les variants de seqüència detectades en els gens estudiats van ser designades seguint les recomanacions de den Dunnen i Antonarakis²⁵³ i les guies de la “*Human Genome Variation Society*” (<http://www.hgvs.org/>)

Les seqüències de referència es van extreure de la base de dades GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) : NG_012021, NM_000039 i NP_000030 (APOA1).

4.1.5. Eines *in silico*

Les eines *in silico* inclouen algorismes bioinformàtics que permeten predir la probable patogenicitat o neutralitat d'una substitució aminoacídica o de un potencial canvi de *splicing*.

Les variants de seqüència intròniques trobades van ser avaluades mitjançant programes de predicció d'*splicing*. Concretament es va utilitzar el “*Neural Network Genie Splice Site Prediction*” (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)²⁵⁴. Aquest programa avalua els llocs 5' i 3' d'*splicing*, la disrupció de la regió de polipirimidines o del lloc de ramificació (*branch site*), l'activació d'un lloc críptic d'*splicing* així com els llocs exònics o intrònics donadors i acceptors d'*splicing*.

4.2. Anàlisi de modificacions post-traduccionals (PTM) d'ApoA-Ib

4.2.1. Anàlisi amb PNGase

Es va investigar la presència de N-glicosilacions mitjançant la digestió amb l'enzim PNGase F (New England Biolabs Inc, P0704S). Per a tal efecte es van seguir les instruccions del fabricant. Es van utilitzar les mostres d'orina ApoA-Ib positives de quatre pacients i dos mostres de plasma, a més també es va utilitzar com a control positiu una mostra de transferrina. Totes les mostres van ser incubades amb i sense enzim per tal de visualitzar la possible digestió d'aquest enzim sobre la mostra. En cas de haver-hi N-glicosilacions, la

desglicosilació produiria una disminució del pes molecular en la mostra tractada amb l'enzim respecte la mostra no tractada en observar-les post-digestió per WB (apartat 3.1).

4.2.2. Anàlisi amb ProQ Emerald

Es va fer una primera aproximació a les possibles glicosilacions presents en ApoA-Ib mitjançant el reactiu ProQ Emerald 300 Glycoprotein gel staining (ThermoFisher, P21857).

Es van realitzar dos gels 2D-PAGE (apartat 3.2) a partir d'una mostra d'orina ApoA-Ib positiva. Un dels gels va ser tenyit amb coomassie col·loïdal (apartat 3.2.3) per a la observació de proteïnes totals, l'altre gel es va tenyir amb el reactiu ProQ emerald 300 seguint les instruccions del fabricant. La comparació dels dos gels ens permetria identificar per posició quines són les proteïnes glicosilades i si entre elles hi havia l'ApoA-Ib.

4.2.3. Anàlisi Proteòmica

Es va dur a terme la separació de les proteïnes en un gel 2D-PAGE tal com s'indica a l'apartat 3.2 i es van les taques corresponents a ApoA-I (en el cas que hi fos) i ApoA-Ib de la orina així com la ApoA-I i la proApoA-I del plasma de pacients GESF. L'anàlisi de modificacions post-traduccionals es va portar a terme juntament amb el grup de proteòmica del Vall d'Hebron Institut d'Oncologia i l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

En un primer anàlisi les taques corresponents a ApoA-I de plasma i ApoA-Ib d'orina es van retallar del gel, es van digerir amb tripsina i extreure del gel. Els pèptids tríptics es van analitzar mitjançant MALDI-TOF i LC-MS/MS.

Es va realitzar un primer anàlisi per MALDI-TOF amb l'Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonics), amb el software FlexAnalysis 2.2 (Bruker Daltonics), les proteïnes es van identificar mitjançant el Mascot v2.2.04 (Matrix Science) que utilitza el SwissProt com a base de dades de cerca. Els algorismes Findmod (Gasteiger et al., 2005) i Glycomod (Cooper, Gasteiger, & Packer, 2001) es van utilitzar per detectar modificacions post-traduccionals en les masses no identificades trobades en l'anàlisi per MALDI-TOF de ApoA-Ib, amb una tolerància de massa <100 ppm, permetent dos talls fallats per la tripsina, i considerant la carbamidometilació de la cisteïna així com l'oxidació de la metionina.

L'anàlisi de LC-MS/MS va ser realitzat en el espectròmetre de masses Esquire HCT IT (Bruker Daltonics) acoblat al nano-HPLC (LC Packings). Les mostres digerides amb tripsina es van carregar a una columna de nanoseparació 75-mm id, 15-cm PepMap (LC Packings) i els pèptids van ser eluïts mitjançant un gradient de acetonitril a través d'una agulla emissora de nanopulverització PicoTip (New Objective) cap a la font d'ionització. La fragmentació MS/MS (1.9s, 100-2800m/z) es va fer sobre els dos ions més intensos. La llista de pics va ser creada mitjançant el software DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics).

Per a la identificació dels glicopèptids i els glicans entre els pèptids tríptics de ApoA-Ib analitzats en LC-MS/MS es van utilitzar el ProteinScape 3.0 (Bruker Daltonics) i el Glycome DB (Ranzinger, Herget, von der Lieth, & Frank, 2011). Amb una tolerància de massa de 1.5Da (precursor) i 0.5Da(fragment), permetent dos talls fallats per la tripsina, carbamidometilació de la cisteïna així com l'oxidació de la metionina.

En un segon anàlisi les taques d'ApoA-I i ApoA-Ib de la orina així com la ApoA-I i la proApoA-I del plasma de pacients GESF es van es van retallar del gel, es van digerir amb tripsina i extreure del gel. Les mostres es van analitzar mitjançant l'espectròmetre de masses LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific) acoblat al sistema nanoAcquity UPLC (Waters). Els pèptids es van carregar a una columna de captura (nanoAcquity Symmetry C18, 5 µm, 180 µm × 20 mm) a un flux de 15µl/min amb fase mòbil A (0.1% àcid fòrmic). Els pèptids es van separa mitjançant una columna analítica nanoAcquity BEH C18, 1.7 µm, 75 µm × 200 mm) a un flux constant de 0.3µl/min utilitzant el següent gradient: 3% de fase mòbil B (acetonitril, 0.1% àcid fòrmic) durant 10 minuts, 7-25% fase mòbil B durant 210 minuts, 25-40% fase mòbil B durant 10 minuts, 85% fase mòbil B durant 10 minuts. Els pèptids van ser introduït al espectròmetre de masses a traves d'una agulla emissora de nanopulverització PicoTip (360 µm diàmetre exterior × 20 µm diàmetre interior, 10 µm tip) (New Objective). La fragmentació MS/MS (300-1700m/z) es va fer sobre els 15 pèptids més abundants. L'anàlisi dels pèptids es va dur a terme amb el software Proteome Discoverer 1.4. (Thermo Scientific) utilitzant l'algoritme de cerca del Mascot.

5. Anàlisi de les biòpsies de ronyó humà

Les tècniques d'immunohistoquímica (IHQ) ens permeten la identificació de determinats antígens, en aquest cas, sobre mostres de talls tissulars procedents de blocs parafinats de biòpsies renals de pacients GESF i pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF. L'aplicació directa d'anticossos sobre mostres de teixit permet la localització microanatòmica relacionada amb

els nivells d'expressió i la seva correlació amb paràmetres morfològics, augmentant així la sensibilitat i especificitat de l'estudi. La IHQ dels diferents talls de biòpsia de ronyó es va realitzar al servei d'Anatomia patològica del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Per a la realització de les IHQ es va utilitzar el mòdul automatitzat Benchmark XT (Ventana Medical Systems. Inc), i el kit de reactius específic ultraView Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems. Inc, ref.760-500) per a la detecció de IgG/IgM d'anticossos primaris de ratolí i conill. L'anticòs primari utilitzat en el nostre cas era un monoclonal de conill contra la proteïna ApoA-I (Abcam®, ab52945).

El protocol realitzat mitjançant el Benchmark XT és un protocol automatitzat on a cada pas s'incuba els portaobjectes amb les mostres durant un temps i una temperatura determinats.

- **Procediment automatitzat en Benchmark XT:**

- Desparafinat de les mostres amb EZ prep™ (10x) (Ventana Medical Systems. Inc, ref.950-102)
- Desemmascarament durant 60 minuts amb Cell Conditioning 1, pH 8 (Ventana Medical Systems. Inc, ref.950-124)
- Bloqueig de les mostres amb peròxid d'hidrogen al 3% 4min; kit ultraView Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems. Inc, ref.760-500)
- Rentats amb Reaction Buffer (Ventana Medical Systems. Inc, ref. 950-300)

- Incubació amb l'anticòs primari anti ApoA-I (Abcam®, ab52945) diluït 1:200 amb diluent DAKO REAL Antibody Diluent (Dako, S2022) durant 40minuts a temperatura ambient
- Rentats amb Reaction Buffer (Ventana Medical Systems. Inc, ref. 950-300)
- Incubació amb anticòs secundari, HRP Multipolimer del kit ultraView Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems. Inc, ref.760-500) durant 8 minuts.
- Rentats amb Reaction Buffer (Ventana Medical Systems. Inc, ref. 950-300)
- Incubació amb el cromogen: substrat de peròxid d'hidrogen i cromogen de tetrahidroclorur de 3, 3'-diaminobencidina DAB del kit ultraView Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems. Inc, ref.760-500) durant 8 minuts.
- Rentats amb Reaction Buffer (Ventana Medical Systems. Inc, ref. 950-300)
- Contra tinció amb Hematoxilina del kit ultraView Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems. Inc, ref.760-500) durant 8 minuts.
- Post Contratació amb Bluing reagent (Ventana Medical Systems. Inc, ref.760-2037)

Finalitzat aquest procés automatitzat, es van deshidratar les preparacions amb banys d'etanol i xilè i es van muntar amb medi de muntatge orgànic DPX (Sigma-Aldrich, ref.06522), afegint dos gotes d'aquest medi sobre la mostra i

col·locant un cobreobjectes a sobre. Un cop el DPX estava sec, les mostres ja estaven preparades per ser visualitzades al microscopi òptic.

6. Experiment *in vivo*

6.1. Cromatografia d'afinitat

La Cromatografia d'afinitat és una tècnica que permet separar determinats components d'una solució mitjançant la seva absorció selectiva . En el nostre cas ens permet la separació de apolipoproteïna A-Ib continguda en un barreja d'altres proteïnes constituents del plasma. Per tal efecte, prèviament s'uneix covalentment a la matriu de la columna d'afinitat un lligand (anticòs anti ApoA-I) que retindrà específicament la proteïna desitjada (ApoA-Ib i també ApoA-I), la qual posteriorment podrà ser eluïda de la columna mitjançant una solució capaç de trencar la interacció entre l'anticòs i la proteïna, i obtenint com a resultat final una solució amb la proteïna d'interès aïllada.

- **Reactius i equips:**

- H₂O MilliQ™
- 1 mg d'anticòs anti ApoA-I (Abnova, PAB9966)
- AffiGel-10 (Bio-Rad Laboratories, 153-6099)
- Columna amb base fritada (QIAGEN Sciences, 34964)
- Mini-columna amb base fritada (Bio-Rad Laboratories, 732-6008)
- *Buffer* d'acoblament pH7.3, 0.1M MOPS (Sigma-Aldrich, M3183)
- PBS 1x (taula 16)
- Solució pH 8.0, 1M etanolamina (Scharlau Chemicals, ET0028)
- Solució pH 7.4, 3mol/l tiocianat (Scharlau Chemicals, SO06750)

- Solució pH 7.4, 1mol/l tiocianat (Scharlau Chemicals, SO06750)
- Columna de Sephadex G10 (GE Healthcare Life Sciences, 17001001)
- **Preparació del gel:**
 - Disposar 0.7 ml per columna de Affi-Gel10 (ben homogeni) en la columna amb base fritada.
 - Deixar sortir el sobrenedant (sense deixar assecar el gel)
 - Rentar amb 3 volums de gel d'aigua MilliQ a 4°C.
- **Acoblament de l'anticòs al gel:**
 - Agafar 0.5ml de la suspensió de gel ben homogènia i transferir a un tub amb tap de rosca de 2.5ml
 - Afegir 0.5ml de buffer d'acoblament amb anticòs fred.
 - Deixar en agitació suau 4h a 4°C.
 - Retirar, deixar dipositar el gel i guardar el sobrenedant, el qual contindrà l'anticòs no unit.
 - Afegir al gel 0.5ml de buffer d'acoblament amb 50µl de solució d'etanolamina. Deixar en agitació suau 1h a temperatura ambient.
- **Acoblament de la columna sham (sense anticòs):**
 - Agafar 0.5ml de la suspensió de gel ben homogènia i transferir a un tub amb tap de rosca de 2.5ml
 - Afegir 0.5ml de buffer d'acoblament fred.
 - Deixar en agitació suau 4h a 4°C.
 - Retirar, deixar dipositar el gel i guardar el sobrenedant.

- Afegir al gel 0.5ml de buffer d'acoblament amb 200µl de solució d'etanolamina. Deixar en agitació suau 1h a temperatura ambient.
- **Preparació de les columnes d'afinitat:**
 - Transferir la suspensió de gel amb ApoA-I o sham a la minicolumna de base fritada de 1.5ml.
 - Deixar dipositar el gel al fons deixant sortir el sobrenedant.
 - Rentar la columna amb aigua fins que no es detectin contaminants.
 - Equilibrar la columna amb PBS amb 0.2% azida sòdica (3 volums de gel). Després de l'últim rentat, deixar 0.5 ml de PBS amb azida sòdica 0,2% cobrint la resina. Cal eliminar la azida sòdica abans d'utilitzar la columna, rentant amb 3 volums de gel de PBS.
 - La columna ja esta llesta per passar-hi el plasma. Es pot guardar (amb el líquid) a 4°C.
- **Extracció de la ApoA-I del plasma:**
 - S'utilitzaran dues alíquotes, una per a la columna *sham* i l'altre per la columna amb anticòs anti ApoA-I
 - L'alíquota utilitzada per a la prova e la columna consisteix en plasma control diluït 1:10 en PBS 1x: 100µl plasma + 900µl PBS 1x
 - Després d'eliminar l'azida sòdica mitjançant 3 volums de gel de PBS 1x s'aplicarà 1ml de mostra a cada columna
 - Incubar 1h en agitació a temperatura ambient

- Esperar que el gel s'assenti altre cop, aproximadament 1 h
 - Recollir l'eluit amb el qual es farà un Elisa d'ApoA-I per comprovar el percentatge d'unió (apartat 6.2).
 - Per acabar de rentar bé la columna s'aplicaran 1.5ml de PBS 1x i es recollirà l'eluit.
- **Elució de la ApoA-I de la columna:**
 - Aplicar 500 µl de tiocianat 1M per intentar desfer unions inespecífiques. Recollir fracció de sortida
 - Rentar amb 3 volums de gel de tiocianat 3M i recollir l'eluit.
 - Amb l'objectiu de guardar la columna per a utilitzar-la altre cop, es renta amb 3 volums de gel de PBS1x i 0.2 % d'azida sòdica

6.2. ELISA Apo-AI

L'Elisa utilitzat per a la detecció d'ApoA-I és "ApoA1(Human) ELISA Kit" (KA0460, Abnova). La realització de l'assaig elisa s'ha dut a terme seguint les instruccions del fabricant.

Per tal d'analitzar quin és el percentatge d'ApoA-I extret per la columna test i de la columna *sham* es van analitzar mitjançant elisa les següents mostres:

- Mostra previ acoblament de la columna *sham* (100µl plasma+ 900µl de PBS1x)
- Mostra previ acoblament de la columna test (100µl plasma+ 900µl de PBS1x)
- Mostra eluïda post-acoblament de la columna *sham*

- Mostra eluïda post-acoblament de la columna test

6.3. Assaig en gàbies metabòliques - Cerca pacient inductor de proteïnúria

Per tal de trobar el plasma de pacient GESF capaç de produir proteïnúria en rates es va començar amb una prova pilot, on es provava amb la injecció de diferents plasmes de pacients GESF amb ApoA-Ib positiva en orina, així com el plasma de controls.

- **Reactius i equips:**
 - Xeringues de 2 ml amb agulla 25G (BD Vacutainer®, 307727 i 300600)
 - Gàbies metabòliques (Tecniplast, 3700M071)
 - Plasma control i pacient.
 - Rates *Outbred* Sprague-Dawley 175-200g mascles (Janvier Labs)
 - 150µl per cada col·lector d'orina de HCl 6M (Merck-Millipore, 100319)
 - Clorur de sodi Meinsol® 9mg/ml (Solució salina) (Fresenius Kabi)
- **Procediment:**
 - El pes dels animals es un reflex directe del benestar d'aquest, així un animal que en condicions de menjar i beure *ad libitum* disminueix de pes al llarg de l'experiment, és una senyal de malestar, el qual podria afectar als resultats de l'experiment. Per aquest motiu es van pesar les rates inicialment i al final de l'experiment.

- Cada rata es posava en una de les gàbies metabòliques amb aigua i menjar *ad libitum*.
- La recollida d'orina es va realitzar durant 24h en gàbia metabòlica i posteriorment es va mesurar l'excreció urinària de proteïna.
- Es va realitzar una primera injecció intravenosa (cua) de 320µl de plasma de pacient GESF / control diluïts en un total de 750µl de salí. I posterior recollida d'orina durant 24h en gàbia metabòlica i mesura d'excreció urinària de proteïna.
- Passades les primeres 24h post injecció es van realitzar dues injeccions més cada 24h amb la corresponent recollida d'orina.
- Per últim es va pesar l'animal i es va procedir a realitzar l'eutanàsia mitjançant CO₂.

6.4. Anàlisi de proteïnúria en rates

La proteïnúria es va mesurar al servei de Bioquímica clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron mitjançant la tècnica del Pirogalol amb l'aparell Beckman Coulter AU 5800.

El Pirogalol és un mètode colorimètric quantitatiu que s'utilitza per mesurar la concentració proteica de la orina. Es basa en que les proteïnes presents en la mostra reaccionen en un medi àcid amb el complex vermell de Pirogalol-Molibdat originant un nou complex de color blau-lilos que es quantifica en el espectrofotòmetre a 600 nm. L'absorbància d'aquest complex és directament proporcional a la quantitat de proteïna de la mostra.

7. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística es va realitzar utilitzant els *softwares* Statgraphics (Statpoint Technologies Inc) i Graphpad prism 6 (GraphPad Software Inc).

Les dades obtingudes van ser analitzades mitjançant un ANOVA, quan els requeriments per a la realització d'un ANOVA no eren els adequats (no s'obtenia normalitat de residus ni igualtat de variàncies entre els grups a comparar), s'utilitzaven tests estadístics no paramètrics com t-Student o U-Mann-Whitney (per comparar dos grups) o el Kruskal-Wallis (comparació de 3 o més grups). La homogeneïtat de les variables qualitatives es va posar a prova amb la prova de Chi-quadrat. En tots els casos es considerava que hi havia diferències estadísticament significatives quan el p-valor era inferior a 0.5.

ANNEX MATERIALS I
MÈTODES

1. Composició dels tampons utilitzats

BUFFER D'ELECTROFORESIS			
Components	Concentració 10x	Quantitat 1L	Comentaris
Tris Base (Sigma-Aldrich, T1503)	250mM	30.25g	Diluir a concentració de treball 1x amb H ₂ O MilliQ™ en el moment d'ús. Guardar a 4°C
Glicina (PanReac AppliChem, 131340)	1.92M	144.1g	
SDS (GE Healthcare Life Sciences, 17131301)	1%	10g	
H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 1L	

Taula 12. Tampó per a la electroforesis convencional

BUFFER DE TRANSFERÈNCIA TOWBIN			
Components	Concentració 1x	Quantitat 1L	Comentaris
Tris Base (Sigma-Aldrich, T1503)	25mM	3.03 g	Guardar a 4°C
Glicina (PanReac AppliChem, 131340)	192mM	14.4g	
SDS (GE Healthcare Life Sciences, 17131301)	0.1%	1g	
Metanol (Merck-Millipore, 106009)	20%	200ml	
H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 1L	

Taula 13. Tampó per a la transferència convencional

BUFFERS PELS GELS D'ACRILAMIDA				
Tampó	Components	Concentració 4x	Quantitat	Comentaris
4x Tris pH 8.8	Tris Base (Sigma-Aldrich, T1503)	1.5M	181.5 g	Ajustar a pH 8.8 amb HCl 4M. Guardar a 4°C
	H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 1L	
4x Tris pH 6.8	Tris Base (Sigma-Aldrich, T1503)	0.5M	6g	Ajustar a pH 6.8 amb HCl 4M. Guardar a 4°C
	H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 100ml	

Taula 14. Tampó per a la realització dels gels d'acrilamida

SOLUCIÓ D'EQUILIBRAT			
Components	Concentració	Quantitat	Comentaris
Tris 1.5M pH 8.8	50mM	6.7ml	Aliquotar en falcons de 10ml. Guardar a -20°C
Urea (GE Healthcare Life Sciences, 17131901)	6M	72.07g	
Glicerol 87% (GE Healthcare Life Sciences, 17132501)	30%	69ml	
SDS (GE Healthcare Life Sciences, 17131301)	2%	4g	
Blau de Bromofenol (Sigma-Aldrich, B-7021)	0.002%	400µl	
H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 200ml	

Taula 15. Preparació de la solució d'equilibrat per a les tires del 2D-PAGE

PBS				
Tampó	Components	Concentració	Quantitat	Comentaris
PBS 1x	NaCl (Sigma-Aldrich, S7653)	137mM	16g	Esterilitzar al autoclau. Guardar a temperatura ambient.
	KCl (Sigma-Aldrich, P4504)	2.5mM	0.4g	
	Na ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich, 30435)	10mM	2.9g	
	KH ₂ PO ₄ (Merck-Millipore, 104873)	1.4mM	0.4	
	H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 2l	
PBS-Tween	PBS	1x	700ml	Guardar a temperatura ambient
	Tween 20 (Fisher Scientific, BP337)	0.1%	7ml	
	H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 7l	

Taula 16. Tampó PBS

SOLUCIÓ DE REHIDRATACIÓ			
Components	Concentració	Quantitat	Comentaris
Urea (GE Healthcare Life Sciences, 17131901)	8.5M	12.75g	Guardar a -20°C
Chaps (GE Healthcare Life Sciences, 17-1314-01)	2%	0.5g	
IPG ampholine buffer (GE Healthcare Life Sciences, 17-6000-87)	0.5%	125µl	
Blau de Bromofenol (Sigma-Aldrich, B-7021)	0.002%	50µl	
H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 25ml	

Taula 17. Solució de rehidratació per a les tires de 2D-PAGE

SOLUCIÓ DE SEGELLAT D'AGAROSA			
Components	Concentració	Quantitat	Comentaris
Buffer d'electroforesis	1x	100ml	Escalfar fins a la total dissolució de l'agarosa. Guardar a temperatura ambient
Agarosa (Ecogen, AG0220)	0.5%	0.5g	
Blau de Bromofenol (Sigma-Aldrich, B-7021)	0.002%	200µl	

Taula 18. Solució de segellat dels gels d'acrilamida de 2D-PAGE

TAE 50x			
Components	Concentració 1x	Quantitat	Comentaris
Tris base (Sigma-Aldrich, T1503)	40mM	242g	Diluir a concentració de treball 1x amb H ₂ O MilliQ™ en el moment d'ús. Guardar a temperatura ambient
Àcid acètic glacial (PanReac AppliChem, 141008)	20mM	57.1ml	
EDTA pH8	2mM	100ml	
H ₂ O MilliQ™		Enrasar a 1l	

Taula 19. Tampó TAE per a la transferència.

RESULTATS

1. Validació de les proteïnes diferencials trobades per 2D-PAGE a orina: ApoA-Ib i ZAG

1.1. Disseny experimental i pacients

Per determinar la importància de les proteïnes diferencial trobades mitjançant l'anàlisi 2D-PAGE (figura 12, de la introducció) com a biomarcadors de recidiva en pacients GESF posTx es va realitzar una validació individual de cada una d'aquestes proteïnes (ZAG i ApoA-Ib) mitjançant una tècnica alternativa (WB) i sobre una mostra de pacients que consistien en una ampliació del grup de pacients utilitzat per a la identificació de proteïnes diferencials.

Aquest nou grup de pacients ampliat incloïa a més de pacients GESF recidivants (GESF-R) (14 pacients) i GESF no recidivants (GESF-NR) (61 pacients), pacients amb GESF amb base genètica (GESF-FAM) (14 pacients), així com un grup de pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF (P-noGESF) (30 pacients) (taula 20).

Aquesta ampliació permetia determinar l'especificitat de les dos proteïnes candidates a biomarcador de recidiva. Així l'ampliació de pacients GESF-R i GESF-NR, ens permetia comprovar que seguia succeint el resultat obtingut en la verificació, el grup GESF-FAM ens permetia afirmar que la presència d'aquestes proteïnes era específica de GESF idiopàtica i el grup de pacients P-noGESF, permetia descartar que la presència sobretot de ApoA-Ib a l'orina fos resultat de la proteïnúria que presentaven els pacients GESF-R.

	GESF-R	GESF-NR	GESF-FAM	P-noGESF	Significança estadística
Edat (anys)	39.03 ± 4.09	46.09 ± 1.55	48.96 ± 2.85	52.40 ± 2.47	p<0.05 A
Homes/Dones	9/5	35/26	6/8	21/9	NS C
Hematòcrit (%)	35.7 ± 1.56 ¹	40.0 ± 0.7	40.0 ± 1.0	36.1 ± 1.3 ¹	p<0.01 A
Albúmina (g/dl)	3.25 ± 0.14 ¹	4.3 ± 0.06	4.47 ± 0.09	3.51 ± 0.16 ¹	p<0.0001 A
Prot. plasmàtiques (g/dl)	5.54 ± 0.26 ¹	7.17 ± 0.11	7.21 ± 0.13	6.16 ± 0.16 ¹	p<0.0001 A
Colesterol (mg/dl)	189.7 ± 16.8	173.6 ± 4.7	191.9 ± 9.6	201.9 ± 21.1	NS A
HDL (mg/dl)	50.1 ± 5.1	54.2 ± 2.4	50.2 ± 4.9	46.4 ± 3.6	NS A
Triglicèrids (mg/dl)	224.2 ± 29.1 ²	139.4 ± 10.5	165.9 ± 19.1	158.8 ± 12.6	p<0.005 KW
Creatinina (mg/dl)	2.28 ± 0.36 ¹	1.58 ± 0.12	1.47 ± 0.12	2.32 ± 0.22 ¹	p<0.004 KW
Proteinúria (g/24h)	7.69 ± 1.86 ¹	0.32 ± 0.05	0.32 ± 0.08	4.25 ± 0.52 ¹	p<0.0001 KW

Taula 20. Estadística clínica dels grups de pacients utilitzats per a validació de les proteïnes diferencials en orina ZAG i ApoA-I; Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard; ¹Diferent de NR i FAM; ²Diferent de NR, FAM i P; ³Diferent de P; Anàlisi estadística: A=Anova; KW= Kruskal-Wallis; C=Test Chi-quadrat

Com es pot observar a la taula 20, clínicament hi ha les diferències estadístiques esperades, així doncs observem que en general el grup P-noGESF i GESF-R són diferents del grup GESF-NR i GESF-FAM en la majoria de paràmetres. La causa d'aquesta diferència és el fet que tant P-noGESF com GESF-R presenten una síndrome nefròtica amb proteinúria abundant, la qual té un efecte directe en els paràmetres plasmàtics, mentre que els grups GESF-NR i GESF-FAM, es podrien considerar pacients clínicament "normals", doncs en el primer cas la malaltia es troba en remissió i el segon cas són pacients que un cop trasplantats, ja no presenten GESF i estan clínicament estables. Només en un paràmetre, els triglicèrids, el grup GESF-R és significativament diferent a la resta de grups.

Finalment i per tal de avaluar la capacitat predictiva de recidives d'ApoA-Ib com a possible biomarcador diagnòstic de recidiva post-trasplantament es va dur a terme un tercer estudi prospectiu amb 37 nous pacients GESF dividits en

Resultats

dos grups: 15 pacients GESF-R que presentaven proteïnúria superior o igual a 1.5g/dia i amb biòpsia confirmada de GESF i 22 pacients GESF-NR amb proteïnúria inferior a 1.5g/dia i sense recidiva de GESF o proteïnúria de més de 1.5g/dia però amb diagnòstic histològic diferent de GESF. A més també es va recollir mostra d'orina d'un tercer grup consistent en 24 pacients amb un diagnòstic de malaltia primària diferent de GESF, els quals tenien diferents graus de proteïnúria (P-noGESF). Les característiques clíniques d'aquests pacients es troben a la taula 21.

	GESF-R	GESF-NR	P-no GESF	Significança estadística
Edat (anys)	45.1±4.4	45.1±3.2	46.0±3.9	NS
Homes/Dones	8/7	14/8	16/8	NS
Albúmina (g/dl)	3.35±0.18	4.16±0.12	3.57±0.17	NS
Colesterol (mg/dl)	216.7±20.8	184.2±4.99	211.8±11.22	NS
Triglicèrids (mg/dL)	168.2±18.5	137.4±10.86	208.6±46.73	NS
Creatinina (mg/dl)	2.44±0.60	1.47±0.11*	2.52±0.35	p<0,001
Proteïnúria (g/dia)	5.18±1.40	0.83±0.23*	3.24±0.67	p<0,001

Taula 21. Estadística clínica dels grups de pacients utilitzats per establir el valor diagnòstic de ApoA-Ib en la recidiva de GESF postTx; Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard; *: diferències entre NR-GESF vs R-GESF/P-noGESF; Anàlisi estadística: Test Kruskal-Wallis

1.2. Validació de ZAG

Es va determinar la proteïna ZAG per WB en els grups de pacients descrits en l'apartat anterior (taula 20). La quantificació i posterior anàlisi estadístic mitjançant un test ANOVA va mostrar diferències significatives ($p < 0.0001$) entre els grups estudiats. En un anàlisi posterior comparant parelles de grups individualment vam poder observar que no hi havia diferències significatives entre els grups R (1892 ± 259 , mitjana \pm error estàndard; unitats arbitràries d'intensitat) i P (1981 ± 811), tot i que ambdós grups presentaven significativament més proteïna ZAG en orina que els grups NR (475 ± 163) i FAM (837 ± 474), els quals tampoc presentaven diferències significatives entre si (figura 18).

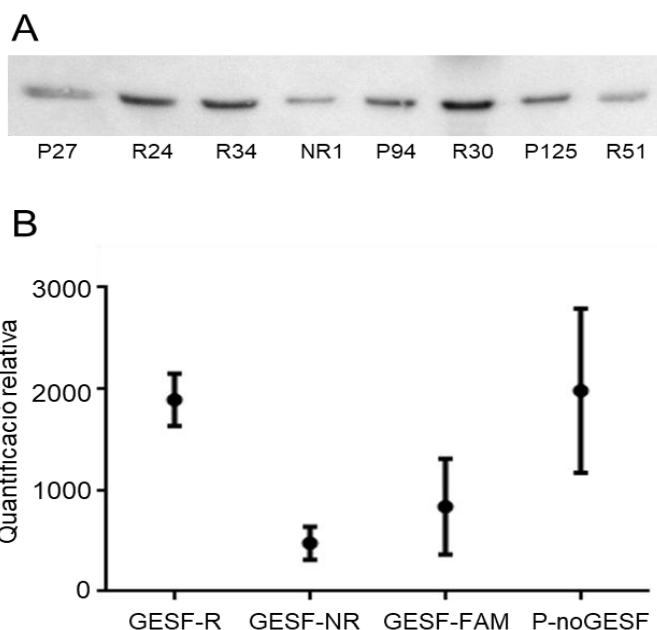


Figura 18. A. Western blot representatiu de ZAG on es troben representats els pacients P (proteïnúria no GESF), R (GESF recidivants) i NR (GESF no recidivants). **B. Representació de la quantificació** (mitjana \pm error estàndard, unitats arbitràries) post digitalització de les bandes ZAG. L'anàlisi realitzat amb ANOVA, dona diferències significatives ($p < 0.0003$) entre els grups. En el posterior anàlisi test-LSD confirma que les diferències entre els grups són: FAM=NR < P=R

Així doncs, tot i que la proteïna ZAG ens permet diferenciar els pacients GESF recidivants post-Tx dels GESF familiars i no recidivants, no permet la diferenciació entre pacients amb recaigudes GEFS d'aquells amb proteïnúria no relacionada amb GEFS. Aquest fet faria descartar ZAG coma biomarcador de la recidiva post-Tx ja que no esta directament relacionada amb les recaigudes GEFS després del trasplantament.

1.3. Validació de ApoA-Ib

Es va determinar ApoA-Ib per WB en els grups de pacients descrits en l'apartat anterior (taula 20). Aquesta determinació consistia en la comparació de la banda obtinguda de ApoA-Ib dels pacients d'estudi respecte una banda control de ApoA-I estàndard plasmàtica (HC). Determinant així els pacients ApoA-Ib positius aquells que presentaven una banda de ApoA-I amb un pes molecular superior al de la ApoA-I estàndard.

Un cop analitzats tots els pacients del grup de validació per WB, es va poder observar que tots els pacients GESF recidivants a excepció d'un (R112) presentaven la banda corresponent a ApoA-Ib (Figura 19a). Mentre que pel que fa als grups NR, FAM i P vam observar que en el cas de NR únicament en un dels pacients dels 61 estudiats s'observava l'ApoA-Ib, cap dels 14 pacients FAM estudiats presentava l'ApoA-Ib, i dels pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF, només en un cas s'observava aquesta forma de ApoA-I de més pes molecular.

En alguns casos s'observa més d'una banda d'ApoA-I, tal i com es pot veure per exemple en el pacient R107 de la figura 19a. Aquestes bandes probablement corresponen a altres isoformes d'ApoA-I, com les que ja havíem

detectat en el 2D-PAGE (figura12; introducció), a més també s'observen bandes en alguns pacients P, però en aquest cas el pes molecular estava per sota del observat en el cas d'ApoA-Ib (figura 19b). En estudiar el plasma no s'observava en cap cas la banda corresponent a ApoA-Ib, si no que s'observa la banda de pes molecular corresponent a l'ApoA-I estàndard (figura 19c).

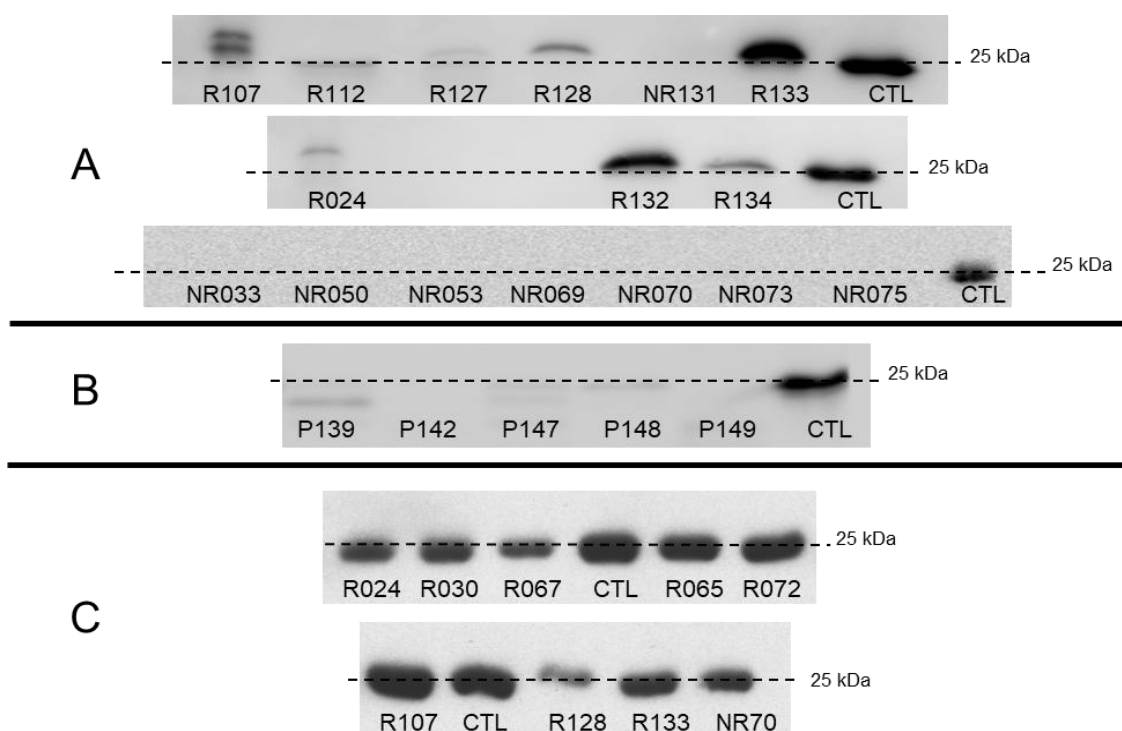


Figura 19. Exemples de western blots de ApoA-I corresponents a diferents pacients.

A. Orina de pacients GESF recidivants i GESF no recidivants. Els pacients positius presenten un banda de ApoA-Ib per sobre de la línia marcada de 25KDa (corresponents a la ApoA-I estàndard). Hi ha un únic pacient GESF recidivant negatiu (R112) que només presenta una banda de massa molecular igual a l'estàndard, però cap superior. **B.** Orina de pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF. Tot hi que s'observen bandes corresponents a ApoA-I, no es detecta cap banda amb un pes molecular més elevat (ApoA-Ib). **C.** Plasma de pacients GESF recidivants i no recidivants. En cap cas s'observa en plasma la banda corresponent a ApoA-Ib. **Codi mostres:** HC (control sans), R (GESF recidivants); NR (GESF no recidivants); P (pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF). Es carreguen 60µg de proteïna per pou. S'ha dibuixat una línia just per sobre de la ApoA-I dels controls de plasma per facilitar l'observació de la banda corresponent a ApoA-Ib

Resultats

A la figura 20 podem trobar la representació gràfica dels resultats obtinguts en quant a presència/absència d'ApoA-Ib, per cada un dels grups estudiats. No es van observar diferències significatives en el percentatge d'ApoA-Ib positius entre els grups NR, FAM i P (test Chi-quadrat, $p=0.4351$), però sí que s'observen diferències significatives entre el grup R i els altres tres grups. Com podem observar, el grup R presenta un major percentatge de pacients ApoA-Ib positius (test Chi-quadrat, $p<0.00001$). A més en estudiar la sensibilitat i l'especificitat de ApoA-Ib respecte el diagnòstic clínic de recidiva de GESF postTx, vam observar que ApoA-Ib presentava un especificitat del 98.1% i una sensibilitat del 92.8%, donant-li així un alt valor com a biomarcador de la recidiva de GESF postTx.

Pel que fa al pacient GESF recidivant R112 que va ser negatiu per ApoA-Ib, es van estudiar les característiques clíniques, i es va poder veure que aquest pacient presentava baixa proteïnúria (1g/d), es a dir, estava en remissió de la malaltia, a més de que la mostra d'orina obtinguda per a la realització de l'anàlisi de WB corresponia a orina extreta després del tractament de plasmafèresis, donant així indicis de que el pacient estava responent al tractament amb plasmafèresi i recuperant-se de la recidiva.

Sensibilitat	92.8 %	VPN	99.0 %
Especifictat	98.1 %	VPP	86.6%

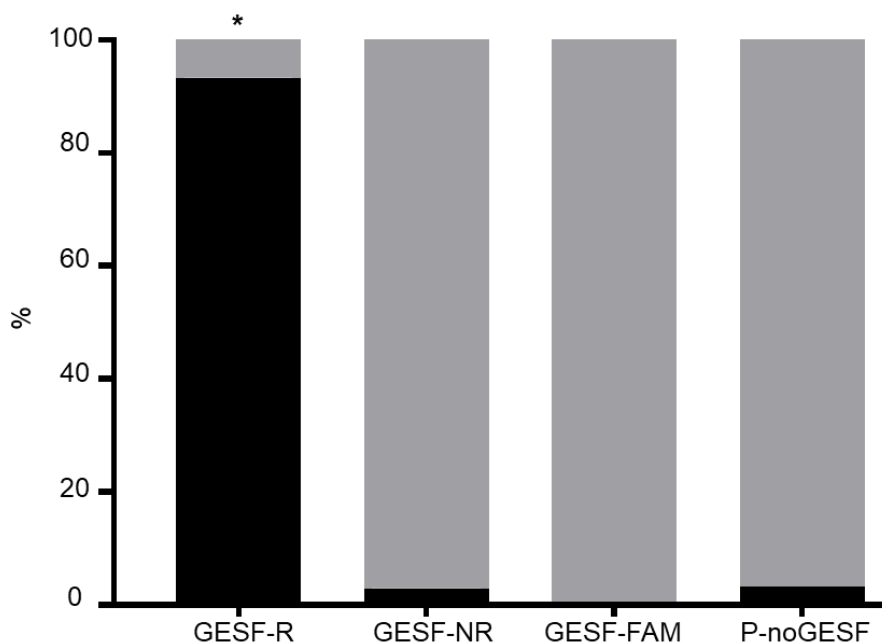


Figura 20. Distribució del percentatge dels pacients ApoA-Ib positius (negre) i negatius (gris) en el total de pacients estudiats. R: GESF recidivants, NR: GESF no recidivants; FAM: GESF familiars; P: proteïnúries no relacionades amb GESF. (*) Percentatge de casos ApoA-Ib positius significativament superior als altres grups (Test Chi-quadrat $p < 0.00001$). La taula superior indica la capacitat analítica entre el valor de ApoA-Ib positiu/negatiu obtingut per WB per detectar recidives en GESF dels 119 pacients estudiats, en relació al diagnòstic clínic. VPN. Valor predictiu negatiu, VPP: Valor predictiu positiu

Per comprovar que realment la plasmafèresis jugava un paper important en la presència de l'ApoA-Ib en orina, es van analitzar les mostres d'orina de dos pacients que van fer recidiva després del trasplantament. En un dels casos el tractament amb plasmafèresis va donar lloc a una remissió de la malaltia i l'ApoA-Ib va deixar d'aparèixer en el western blot (GESF 9), mentre que en l'altre cas malgrat la plasmafèresis no s'observava remissió i tot i que si que s'observa una parcial disminució d'ApoA-Ib, aquesta segueix estant present (GESF 33) (Figura 21). Així doncs aquest petit seguiment ens permetia

Resultats

observar com l'ApoA-Ib es veia afectada amb la plasmafèresis, però també que hi havia una correlació entre la recidiva de GESF i la seva presència en orina.

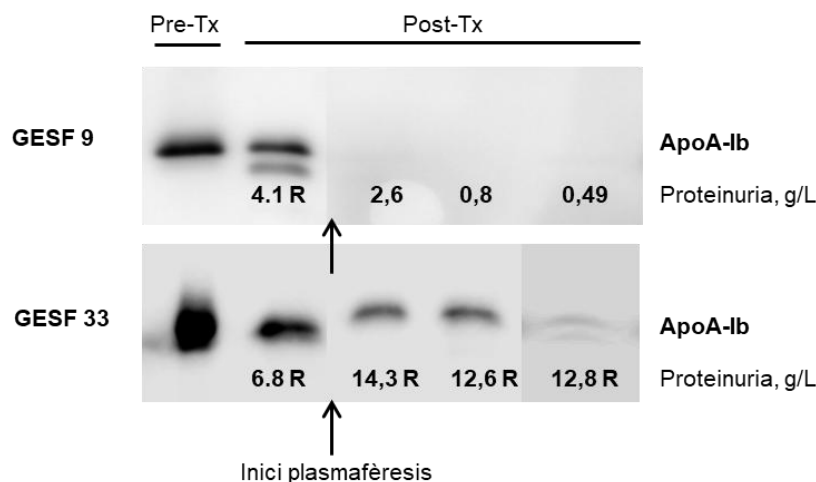


Figura 21. Western Blot on es pot observar l'efecte de la plasmafèresis sobre mostres d'orina de dos pacients GESF recidivants ApoA-Ib positius.

R: indica recidiva

Finalment es va analitzar l'orina de l'últim grup de pacients (taula 21) que ens permetria veure el valor d'aquest possible biomarcador diagnòstic de recidiva post-trasplantament en un entorn real. Amb l'anàlisi de ApoA-Ib en orina vam poder determinar que, 14 dels 15 pacients GESF-R eren positius per ApoA-Ib (93.3%), i solament 2 dels 22 pacients de GESF-NR presentaven aquesta proteïna en la orina (9.1%). Pel que fa als pacients P-noGESF, van ser positius per ApoA-Ib 3 dels 24 pacients estudiats (12.5%). Com podem observar a la figura 22, l'ApoA-Ib, permet diferenciar no únicament els pacient GESF no recidivants dels GESF recidivants, si no que també és útil per diferenciar aquests últims dels pacients trasplantats que presenten proteïnúria no relacionada amb GESF, presentant una bona especificitat (89.1%) a més d'una elevada sensibilitat (93.3%). Així doncs, la presència de ApoA-Ib esta significativament lligada a la recidiva post-trasplantament de GESF. Aquesta

característica pot ser d'especial interès quan no es pot realitzar una biòpsia (com per exemple pacients pediàtrics amb síndrome nefròtica) o en recidives primerenques, quan la biòpsia no sigui informativa. En aquests casos, la determinació de l'ApoA-Ib en l'orina podria ser útil en el diagnòstic de recidives GESF, ja que rarament es detecta en casos de proteïnúria post-trasplantament no relacionada (12,5%). A més, l'elevat valor predictiu negatiu d'ApoA-Ib respecte els altres dos grups estudiats (97,6%) indica que és especialment adequada per descartar el diagnòstic de recidiva de GESF quan ApoA-Ib no apareix en orina. Així doncs, ApoA-Ib pot ser utilitzat com a biomarcador per diferenciar la recidiva post-trasplantament de GESF d'altres malalties no relacionades amb característiques clíniques similars.

Per descartar definitivament que ApoA-Ib no estava relacionada amb els nivells de proteïnúria o creatinina, es van analitzar individualment els valors de proteïnúria i creatinina sèrica per cada un dels pacients inclosos en aquest estudi (figura 23). Com s'observa en la taula 21 i en la figura 23, no hi ha diferències significatives pel que fa a la proteïnúria i la creatinina entre els grups P-noGESF i GESF-R, tot i que la majoria dels pacients GESF-R presentaven ApoA-Ib en l'orina (93.3%), i la majoria dels pacients P-noGESF no la presentaven (87.5%) (figura 22B). L'anàlisi de regressió lineal tenint en consideració la presència d'ApoA-Ib com la variable predictiva i la creatinina sèrica, la proteïnúria i el grup de diagnòstic (classificat com GESF-R contra els altres dos grups, GESF-NR i P-noGESF) com a variables independents, va demostrar que GESF-R era l'únic predictor independent de ApoA-Ib (Risc relatiu 112; interval de confiança del 95%: 11-1224, $p < 0.0001$).

A

Detecció recidiva de GESF	Sensibilitat	Especificitat	VPP	VPN
GESF-R vs GESF-NR	93.3%	90.9%	87.5%	95.2%
GESF-R vs P-noGESF	93.3%	87.5%	82.4%	95.5%
GESF-R vs (GESF-NR + P-noGESF)	93.3%	89.1%	73.7%	97.6%

B

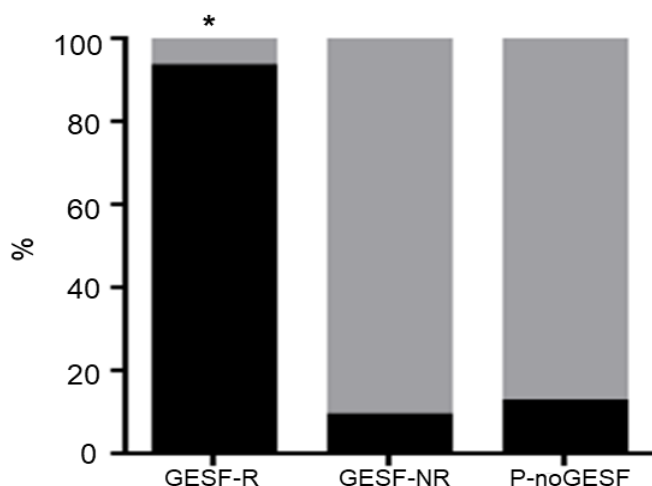


Figura 22. La ApoA-Ib urinària com a biomarcador de recidiva de GESF post-trasplantament. **A.** Valor diagnòstic de la ApoA-Ib en les recidives de GESF en els trasplantats renal. VPP: Valor predictiu positiu; VPN: Valor predictiu negatiu. **B.** Representació de la distribució de la presència de ApoA-Ib en els diferents grups. Pacients ApoA-Ib positius en barres negres, ApoA-Ib negatius en barres grises. * Diferències estadísticament significatives entre la GESF-R i els altres grups

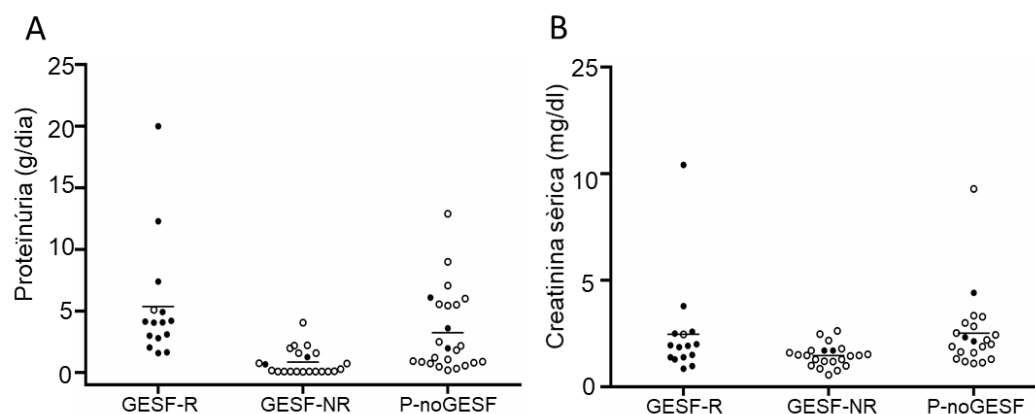


Figura 23. Relació entre ApoA-Ib i dels nivells de creatinina i proteïnúria. **A.** Valors individuals del nivell de proteïnúria. **B.** Valors individuals del nivell de creatinina sèrica; Els pacients ApoA-Ib positius es mostren en negre, mentre que els ApoA-Ib positius es mostren en blanc. La línia mostra la mitjana per cada un dels grups analitzats

1.4. Determinació d'ApoA-Ib per mètodes automatitzats

Amb l'objectiu de trobar un mètode automatitzable d'anàlisis d'ApoA-Ib en orina i com una primera aproximació al que podria ser a la detecció d'aquest biomarcador mitjançant aparells ja presents en el laboratori de bioquímica clínica del hospital, es va estudiar el rendiment analític de l'autoanalitzador clínic (nefelòmetre, BN ProSpec System) respecte el WB en la detecció d'ApoA-I. EL BN ProSpec és un nefelòmetre que permet mesurar de forma quantitativa, ràpida i precisa els nivells de la proteïna d'interès, en aquest cas l'ApoA-I, mitjançant l'ús d'anticossos, els quals com ja es va comprovar en el laboratori eren capaços de detectar també l'ApoA-Ib per western blot, així doncs eren equivalents en quant a detecció als els utilitzats normalment per a la detecció d'ApoA-Ib.

Així doncs, es va realitzar la determinació d'ApoA-I mitjançant el nefelòmetre, així com la detecció d'ApoA-Ib per WB d'un subconjunt de 57 mostres de l'estudi, que es troben distribuïdes de la següent manera: set de les mostres pertanyien a pacients GESF-R, 26 a pacients GESF-NR, 5 a pacients GESF-FAM i 19 a pacients P-noGESF. Les característiques clíniques dels grups de pacients es troben detallades a la taula 22.

Com es pot observar la diferències clíniques observades són les ja esperades tal com em observat en anteriors casos. Un cop analitzades cada una de les mostres tant amb el nefelòmetre com per WB, es va poder obtenir una relació dels casos positius i negatius detectats per cada un dels mètodes utilitzats (taula 23). Determinant que un resultat positiu d'ApoA-Ib per WB, seria aquell que presenta una banda d'un pes molecular superior a l'ApoA-I

Resultats

estàndard (com ja ha estat definit en l'apartat 1.3), mentre que els positius del nefelòmetre serien aquells que presentessin algun tipus de lectura d'ApoA-I, es a dir, una concentració d'ApoA-I superior a 5,06 mg/dl, el qual és el límit inferior de detecció del nefelòmetre BNProSpec per aquesta proteïna.

	GESF-R	GESF-NR	GESF-FAM	P-noGESF	Significança estadística
Hematòcrit (%)	29,80±5,20 ¹	38,96±0,93	40,60±1,28	37,50±1,39	p<0,05
Albúmina (g/dL)	3,01±0,16 ¹	4,28±0,10	4,60±0,11	3,45±0,226 ¹	p<0,0001
Colesterol (mg/dL)	199,0±27,12	167,8±7,13	198,2±11,02	197,0±22,73	NS
Proteïnes plasma (g/dl)	5,18±0,36 ¹	7,17±0,17	7,30±0,27	6,26±0,26 ²	p<0,0001
HDL (mg/dL)	39,10±3,60	52,23±4,02	46,40±6,28	52,89±5,39	NS
Triglicèrids (mg/dL)	332,7±84,65 ³	124,90±14,9	179,8±16,49	153,5±15,89	p<0,0005
Creatinina (mg/dL)	2,43±0,65 ²	1,39±0,11	1,60±0,17	1,91±0,24	p<0,05
Proteïnúria (g/24h)	14,16±6,11 ²	0,42±0,10	0,20±0,09	4,45±0,80 ¹	p<0,0001

Taula 22. Estadística clínica dels grups de pacients utilitzats per la comparació de determinacions de ApoA-I del nefelòmetre respecte WB; Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard, ¹Diferents de NR i FAM; ²Diferents de NR, FAM, P; ³Diferents de NR i P; Anàlisi estadística: ANOVA

La distribució de pacients ApoA-Ib positius i negatius es molt similar pel que fa als grups GESF-NR i GESF-FAM en els dos mètodes de detecció estudiats, però si ens centrem en els GESF-R i en els P-noGESF, podem observar que en el cas del nefelòmetre obtenim un elevat nombre de falsos positius (P-noGESF amb ApoA-Ib positiva) en el grup de proteïnúries no relacionades amb GESF.

Mètode de detecció		GESF-R	GESF-NR	GESF-FAM	P-noGESF	Significança estadística entre mètodes
Western-Blot	ApoA-Ib POSITIUS	6	0	1	1	R NS NR NS FAM NS P p<0.0033
	ApoA-Ib NEGATIUS	1	26	4	18	
Nefelòmetre	ApoA-I POSITIUS	4	1	1	9	
	ApoA-I NEGATIUS	3	25	4	10	

Taula 23. Distribució de la detecció de ApoA-I del nefelòmetre i la de ApoA-Ib en WB en cada un dels grups estudiats. Anàlisi estadística: Test Chi-quadrat.

Per saber fins a quin punt la detecció de cada un dels mètodes era fiable i concordava amb la realitat clínica dels pacients es va analitzar la sensibilitat i l'especificitat de cada un dels mètodes estudiats (WB i nefelòmetre) mitjançant la concordança del diagnòstic proporcionat per aquests dos mètodes respecte el diagnòstic clínic del que es disposava. Els resultats obtinguts per part del nefelòmetre, així com els resultats obtinguts per WB, es detallen a la taula 24. Com es pot observar, el rendiment analític obtingut amb el nefelòmetre (sensibilitat i especificitat del 57.1% i 78% respectivament; VPP= 26.7%, VPN= 92.9%) és inferior al obtingut per WB (sensibilitat i especificitat del 85.7% i 96% respectivament; VPP= 98%, VPN= 75%).

	Western Blot	Nefelòmetre
Sensibilitat	85,7%	57,1%
Especificitat	96%	78%
VPP	75%	26,7%
VPN	98%	92,9%

Taula 24. Determinació de la sensibilitat i l'especificitat del nefelòmetre i el WB

Aquesta diferència ve donada probablement pel fet que mentre que amb WB fem una detecció més acurada, doncs només es donen per positius aquells pacients que presenten l'ApoA-Ib, en el cas del nefelòmetre no es disposa d'un

anticòs específic per aquesta ApoA-Ib, si no que ha estat testat amb l'anticòs contra l'ApoA-I estàndard, pel que detecta tant els pacients que presenten aquesta ApoA-Ib com els pacients que presenten algunes de les isoformes d'ApoA-I en la orina, les quals com ja hem dit anteriorment presenten alguns pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF.

Així doncs, l'ús del nefelòmetre per analitzar l'ApoA-Ib seria menys efectiu que el western blot en el diagnòstic de recidives de GESF en les circumstancies actuals, doncs falla en la detecció de quasi la meitat de pacients recidivants i detecta com a positius un 52.5% dels pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF.

2. Capacitat pronostica i predictora de recidiva d'ApoA-Ib

Per avaluar si l'ApoA-Ib prediu el risc de recaiguda, es va dissenyar un seguiment, en el qual es determinava la ApoA-Ib dels pacients GESF idiopàtics que rebien un trasplantament de ronyó, en diversos moments: pre-trasplantament i a una setmana, un mes, tres mesos i un any després del trasplantament o quan es produïa un episodi de proteïnúria $\geq 1,5$ g / d amb indicació de biòpsia (figura 24).

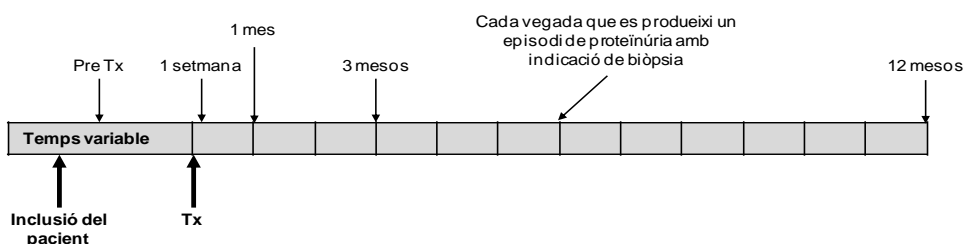


Figura 24. Esquema de recollida de mostres per a la determinació de la capacitat diagnòstica i predictora de recidiva de la ApoA-Ib.

			Post - Trasplantament			
Pacient	Pre-Tx	Tx	1 Setmana	1 Mes	3 Mesos	1 Any
RECIDIVA	GESF 33					
	ApoA-Ib	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu*
	Proteïnúria (g/24h)	37	6,8	14,3	12,6	12,8
	Creatinina (mg/dL)	5,44	3,47	1,74	2,01	2,08
	GESF 9					
	ApoA-Ib	Positiu	Positiu	Negatiu*	Negatiu*	Negatiu
	Proteïnúria (g/24h)	2,9	4,07	2,6	0,8	0,49
	Creatinina (mg/dL)	9,95	1,5	0,99	1,49	1,05
	GESF 16					
	ApoA-Ib	Anúria	Positiu	Positiu	Negatiu	Positiu
	Proteïnúria (g/24h)		1,5	4,4	1,39	1,6
	Creatinina (mg/dL)		2,43	1,77	1,89	1,4
GESF 12						
ApoA-Ib	Negatiu		Negatiu	Negatiu	Negatiu	
Proteïnúria (g/24h)	0,54	--	2,6	1,5	1,7	
Creatinina (mg/dL)	2,07		0,94	1,23	1,3	
NO RECIDIVA	GESF 6				--	
	ApoA-Ib		n.d. (#)	Negatiu	Negatiu	Negatiu
	Proteïnúria (g/24h)	Anúria	0,25	< 0,1	0,1	< 0,1
	Creatinina (mg/dL)		3,4	1,1	1,31	1
	GESF 13					
	ApoA-Ib	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu
	Proteïnúria (g/24h)	1,5	0,69	1,79	0,1	1,6
	Creatinina (mg/dL)	5,6	1,73	1,46	1,31	1,6
	GESF 15					
	ApoA-Ib	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu
	Proteïnúria (g/24h)	0,4	0,4	0,16	0,24	15,28 (¥)
	Creatinina (mg/dL)	1,1	1,1	0,96	0,93	1,56
	GESF 20					
	ApoA-Ib	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu
	Proteïnúria (g/24h)	n.d.	0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
	Creatinina (mg/dL)	5,25	1,85	1,6	1,37	1,7
	GESF 21					
	ApoA-Ib	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu
Proteïnúria (g/24h)	n.d.	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	
Creatinina (mg/dL)	8	2,77	1,07	1,47	0,99	
GESF 23						
ApoA-Ib	Anúria	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	
Proteïnúria (g/L)		0,3	< 0,1	0,49	< 0,1	
Creatinina (mg/dL)		3,06	1,57	1,67	1,48	
GESF 24						
ApoA-Ib	Negatiu		Positiu	Negatiu	Negatiu	
Proteïnúria (g/24h)	0,49	--	0,31	< 0,1	< 0,1	
Creatinina (mg/dL)	9,5		2,1	2	1,8	
GESF 25						
ApoA-Ib	Anúria	Negatiu		Negatiu	Negatiu	
Proteïnúria (g/24h)		1,64	--	< 0,1	0,1	
Creatinina (mg/dL)		4,87		1,3	1,3	
GESF 28						
ApoA-Ib	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	
Proteïnúria (g/24h)	n.d.	1,64	1,05	0,4	0,7	
Creatinina (mg/dL)	4,56	5,45	3,2	2,75	2,18	

Taula 25. Determinació de ApoA-Ib, proteïnúria i creatinina de cada una de les mostres recollides durant el seguiment d'un any post-trasplantament dels 13 pacients GESF idiopàtics estudiats. n.d.:no determinat; --: falta punt mostral; (#). Hematúria macroscòpica; (*): plasmafèresis; (¥): Rebuig crònic humoral

Resultats

Es van analitzar un total de 33 pacients diagnosticats de GESF que estaven inclosos en la llista d'espera per a un trasplantament. D'aquests, 25 pacients estaven en hemodiàlisi i 8 eren pacients en pre-dialisis. Dels pacients en diàlisi, no es va poder obtenir mostra d'orina per a l'avaluació de ApoA-Ib en 4 casos. Un cop analitzada la ApoA-Ib en el total els pacients pre-trasplantament dels que es disposava mostra d'orina (29 pacients), es va observar que ApoA-Ib era positiva en 11 casos, es a dir en un 37.9% de les mostres.

Dels 33 pacients inclosos en la llista d'espera, van rebre trasplantament durant la realització de l'estudi 17 pacients, dels quals es va poder dur a terme el complet seguiment d'un any en 13 casos. D'aquests 13 pacients en que es va poder realitzar el seguiment d'un any, es va observar recidiva en 4 pacients, el quals 3 d'ells eren ApoA-Ib positius abans de la recidiva. Els altres 9 pacients estudiats no van mostrar recidiva en cap ocasió, 8 d'ells van ser ApoA-Ib negatius en totes les mostres estudiades, i únicament en un cas, GESF-24, es va observar ApoA-Ib positiva 1 mes després del trasplantament (Taula 25). Com es pot observar en la taula 25, els pacients GESF-33 i GESF-9 presenten ApoA-Ib en orina abans del trasplantament. Si ens fixem pacient per pacient, podem observar que el pacient GESF-33, el qual va fer una immediata recidiva, era ApoA-Ib positiu en totes les mostres analitzades. El pacient GESF-9 era ApoA-Ib positiu abans del trasplantament, i just després de ser trasplantat (abans del diagnòstic de recaiguda), al ser tractat amb plasmafèresis va fer una remissió, fent així que les mostres recollides durant el tractament fossin ApoA-Ib negatives. Els pacient GESF-16 era anúric abans del trasplantament, pel que no es va poder determinar la ApoA-Ib pre-trasplantament. Però en les dos

recidives que va presentar aquest pacient, una immediatament després del trasplantament i l'altre a l'any de ser trasplantat, s'observa la ApoA-Ib positiva abans de l'augment de proteïnúria. Tot i que no es mostra a la taula 25, doncs el seguiment acabava a l'any de ser trasplantat, el pacient GESF-16 va respondre al tractament amb plasmafèresi després de la segona recidiva, el que va fer negativitzar de nou la ApoA-Ib en les mostres recollides després de l'any post-trasplantament. L'únic resultat discordant és el que correspon al pacient GESF-12, el qual va ser diagnosticat de recidiva de GESF dos mesos després de ser trasplantat, però no va presentar en cap moment la ApoA-Ib positiva.

3. Validació i optimització com a biomarcadors de les proteïnes diferencials trobades per 2D-PAGE a plasma: ApoA-II

En un estudi previ del grup⁷, on l'objectiu principal era buscar el factor plasmàtic causant de la glomeruloesclerosi focal i segmentaria, es van seleccionar vint-i-sis pacients pediàtrics amb GESF dels quals es va recollir el seu plasma. Els pacients es van classificar en dos grups, un format per 15 pacients GESF idiopàtics i l'altre grup conformat per pacients de GESF familiar (11 pacients). Les característiques clíniques dels pacients que conformaven cada un d'aquests grups es troben detallades en la taula 26, on es pot observar que no existeixen diferències significatives entre ambdós grups pel que fa als diferents paràmetres plasmàtics i d'orina.

	GESF idiopàtics	GESF familiar	Significança estadística
Edat (anys)	11.8 ± 1.1	8.6 ± 1.1	NS
Homes/Dones	6/9	4/7	NS
Hematòcrit (%)	35.6 ± 3.8	35.6 ± 1.21	NS
Albúmina (g/dl)	2.39 ± 0.44	2.21 ± 0.41	NS
Prot. plasmàtiques (g/dl)	4.86 ± 0.46	4.88 ± 0.42	NS
Colesterol (mg/dl)	297 ± 42	282 ± 34	NS
Triglicèrids (mg/dl)	172 ± 25	205 ± 25	NS
Creatinina (mg/dl)	0.44 ± 0.07	0.57 ± 0.11	NS
Proteïnúria (g/24h)	4.14 ± 0.82	3.37 ± 0.9	NS

Taula 26. Estadística clínica dels grups de pacients utilitzats per la validació de la Apolipoproteïna A-II; Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard; Anàlisi estadística: t-Student

Per tal de trobar el factor plasmàtic causant de GESF, es va realitzar un estudi proteòmic del plasma dels dos grups esmentats, mitjançant un gel bidimensional (2D-Page), a la figura 25, es mostren els dos mapes proteòmics obtinguts a partir dels pools de plasma dels pacients GESF familiars (figura 25A) i GESF idiopàtics (figura 25B). Amb l'objectiu de detectar proteïnes diferencials entre els dos mapes es va realitzar una comparació utilitzant el software PD-Quest de Bio-Rad. Entre les proteïnes diferencials trobades n'hi ha una, marcada amb un cercle a la figura 25, que cridava especialment l'atenció, per estar present en el pool de pacients de GESF idiopàtics i absent en el mapa corresponent als GESF genètics, i que per tant podria ser un bon candidat a factor plasmàtic causant de GESF idiopàtica. En retallar i analitzar aquesta proteïna mitjançant espectrometria de masses es va poder determinar que corresponia a l'apolipoproteïna A-II (ApoA-II) en la seva forma monomèrica, la qual, igual que l'ApoA-I, és una proteïna que forma part del les HDL.

Igual que en l'ApoA-I, per confirmar la relació amb GESF idiopàtica de la forma d'ApoA-II trobada (ApoA-II monomèrica; ApoA-II_m) mitjançant l'anàlisi 2D-PAGE es va realitzar una validació individual de cada pacient inclòs en el pool utilitzat per a la realització del gel bidimensional. Aquesta validació consistia en la detecció de la proteïna ApoA-II mitjançant una tècnica alternativa (WB). Com podem observar a la figura 26A, es va poder detectar la ApoA-II_m per WB, però no només apareixia en els pacients de GESF idiopàtica tal com succeïa en el 2D-Page, si no que els pacients amb GESF familiar també presentaven aquesta forma monomèrica. A més el grau de reproductibilitat del WB era molt baix, donant lloc a que per una mateixa mostra de plasma a vegades s'observés la ApoA-II_m i d'altres no.

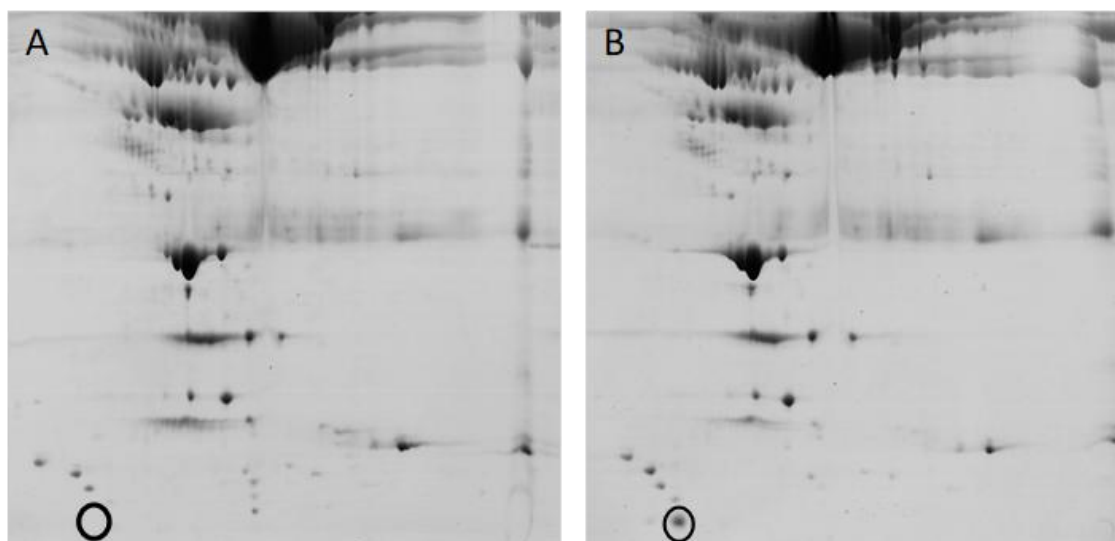


Figura 25. Electroforesis bidimensional del pool de mostres de plasma de pacients GESF d'origen genètic (A) i GESF idiopàtics (B). El punt encerclat correspon a la ApoA-II monomèrica, present únicament en els pacients GESF idiopàtics

Com que l'absència o presència d'ApoA-II_m no permetia diferenciar entre pacients GESF idiopàtics i pacients GESF familiars, es va realitzar una quantificació relativa de les bandes corresponents a ApoA-II_m observades al

Resultats

western-blot per cada un dels pacients. Per a tal efecte es va utilitzar en *software Quantity One* de BioRad, aquest programa calcula la intensitat de les bandes sumant la intensitat dels píxels inclosos dins la banda i corregint pel valor de la intensitat de fons o *background*. Els nivells de l'ApoA-II_m es van referir als nivells d'ApoA-II dimèrica del propi pacient per tal de contrarestar possibles errors en la càrrega de la mostra. Com es pot observar en el gràfic de la figura 26b, hi ha més quantitat d'ApoA-II monomèrica en els pacients GESF idiopàtics en comparació amb els GESF familiars, però l'anàlisi estadístic t-Student va confirmar que aquestes diferències no eren significatives. Pel que malgrat el que s'observava per 2D-PAGE (figura 25), sembla que l'ApoA-II_m no es exclusiva dels pacients idiopàtics, si no que es troba present també en els pacients GESF familiars, i per tant no es pot considerar un candidat a factor permeabilitzador causant de GESF. Tot i així, el fet que al igual que l'ApoA-I estigui formant part de les HDL, dona indicis que podria haver-hi alguna relació d'aquestes dos proteïnes amb la malaltia de GESF.

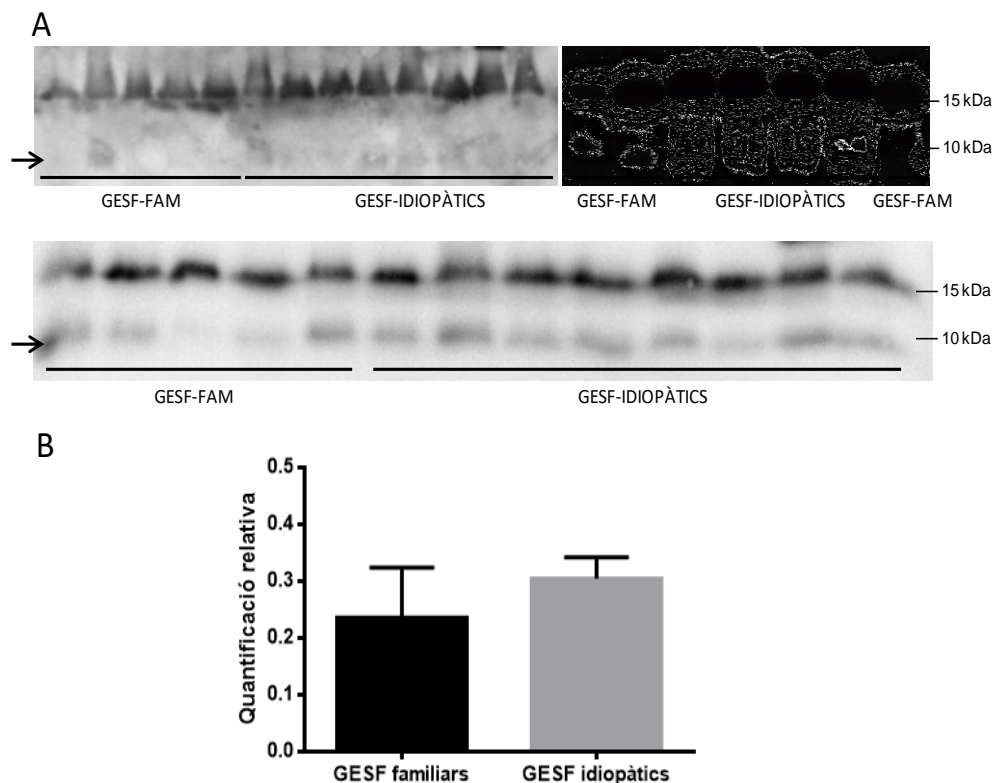


Figura 26 Validació de ApoA-IIm **A.** Exemples de western blot de ApoA-II corresponents a diferents pacients GESF idiopàtics i GESF d'origen genètic (GESF-FAM) on s'observa la baixa reproductibilitat dels resultats observats mitjançant 2D-PAGE. Amb un fletxa esta marcada la ApoA-II monomèrica, les bandes superiors corresponen a la ApoA-II en el seu estat dimèric. **B.** Representació gràfica de la quantificació de la relació de ApoA-II monomèrica respecte la ApoA-II dimèrica per als dos grups estudiats. No s'observen diferències significatives entre els dos grups (t-Student).

4. Relació d'ApoA-Ib i ApoA-II en orina

La determinació d'ApoA-IIm té una baixa reproductibilitat en plasma, i la seva quantificació no permet diferenciar entre GESF idiopàtics i GESF familiar, però semblava evident que tenia alguna relació amb GESF. Això va fer pensar que la determinació en orina d'ApoA-I podria complementar la capacitat diagnòstica d'ApoA-IIm que prèviament ja havíem detectat, reforçant l'ús

Resultats

d'aquestes dos proteïnes coma biomarcadors de la recidiva post-trasplantament.

Es va fer la determinació d'ApoA-II en orina dels pacients estudiats prèviament per a la determinació de ApoA-Ib, les característiques clíniques dels quals es troben recollides en la taula 20. La forma que es trobava en la orina dels pacients estudiats corresponia a la ApoA-II en estat dimèrica, i en cap cas es va trobar la forma monomèrica. Igual que succeïa en la determinació d'ApoA-Ib, es va trobar que la presència o absència de l'ApoA-II es distribuïa de forma diferencial entre els diferents grups. La representació gràfica d'aquesta distribució l'observem en la figura 27.

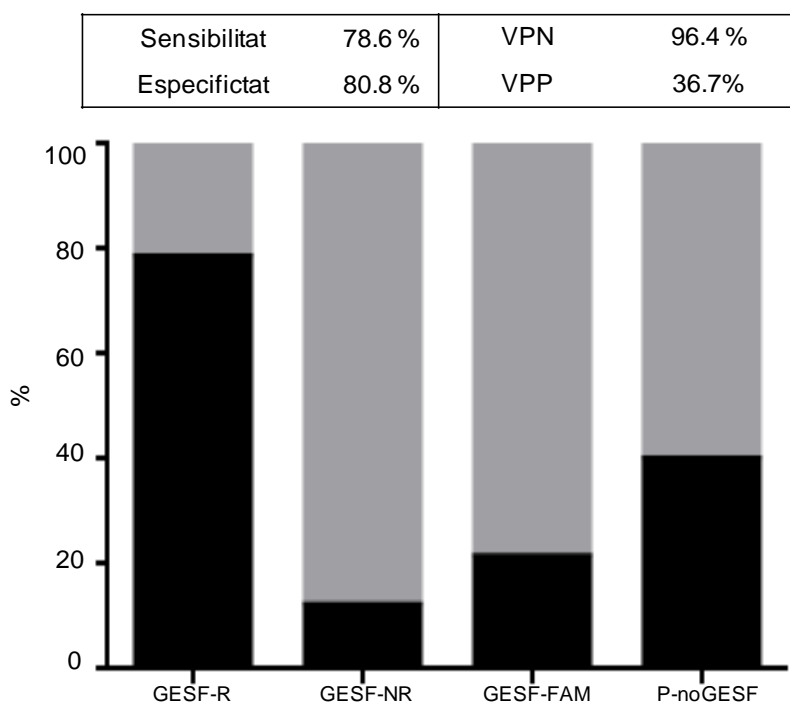


Figura 27. Distribució dels pacients ApoA-II positius(negre) i negatius (gris) en el total de pacients estudiats. R: GESF recidivants, NR: GESF no recidivants; FAM: GESF familiars; P: proteïnúries no relacionades amb GESF. No s'observen diferències significatives entre grups (Test Chi-quadrat $p=0.52$). La taula indica la capacitat analítica entre el valor de ApoA-Ib positiu/negatiu obtingut per WB per detectar recidives en GESF dels pacients estudiats, en relació al diagnòstic clínic. VPN. Valor predictiu negatiu, VPP:Valor predictiu positiu

La distribució de ApoA-II entre els diferents grups va ser molt semblant a la observada anteriorment en ApoA-Ib (figura 20), i malgrat que si que s'observava més presència d'ApoA-II en el grup corresponent a GESF recidivants, en aquesta ocasió les diferències observades no eren significatives. A més en estudiar la sensibilitat i l'especificitat d'ApoA-II respecte el diagnòstic clínic de recidiva de GESF post-Tx, vam observar que presentava un especificitat (80.8%) i una sensibilitat (78.6%) inferiors a les observades en ApoA-Ib (98.1% i 92.8% respectivament) descartant-la així com a biomarcador complementari o substitutiu d'ApoA-Ib en la recidiva de GESF post-Tx.

El fet que no pogués ser utilitzat com a biomarcador de recidiva, i que la seva presència finalment no sembla estar directament lligada per si sola a la causa de GESF, va fer que aquesta línia de recerca de l'ApoA-II com a tal es deixés parada en aquest punt per tal de seguir amb la investigació de l'ApoA-Ib.

5. Caracterització de les modificacions d'ApoA-Ib

Per elucidar la causa de l'elevat de pes molecular d'ApoA-Ib en orina de pacients GESF recidivants es van contemplar dos possibilitats:

1. Variacions genètiques: que poguessin donar lloc a un increment de pes molecular directament o modificacions de les proteïnes derivades de variacions genètiques que permetessin una modificació post traduccional que provoques l'augment de la massa molecular. El que comportava l'estudi del gen de *APOA1*.
2. Modificacions post-traduccional o processaments anòmals de la proteïna que incrementessin la massa de l'ApoA-I. Aquestes

alteracions es van investigar mitjançant tècniques bioquímiques i d'espectrometria de masses aplicades a ApoA-Ib i ApoA-I purificades obtingudes de pacients GESF positius per ApoA-Ib seleccionats i individus de referència.

5.1. Determinació de variants genètiques

S'ha realitzat la seqüenciació del gen *APOA1*, incloent exons, introns i la zona 5'UTR per tal de buscar polimorfismes, mutacions o zones susceptibles d'*splicing* alternatiu que fossin comuns en els pacients GESF recidivants.

L'estudi genètic d'*APOA1* es va dur a terme sobre un total de 24 mostres de pacients, els quals es classificaven en dos grups, 8 pacients recidivants que presentaven la forma ApoA-Ib en orina i 16 pacients GESF-FAM i GESF-NR els quals no presentaven, ni havien presentat en cap mostra d'orina aquesta forma modificada d'ApoA-I. Aquest pacients provenien de diferents regions d'Espanya i en tots els casos es va determinar la presència d'ApoA-Ib en orina mitjançant western-blot. Les seqüències obtingudes es van alinear amb la seqüència consens (Referència NCBI: NG_012021.1) per tal de buscar les diferències entre els dos grups de pacients esmentats.

Un cop fet l'anàlisi del gen *APOA1*, es van identificar total de 7 polimorfismes (SNPs), un dels quals es trobava a la zona 5'-UTR i la resta en les zones intròniques dels gen, en cap cas es va trobar cap variant genètica en la zona codificant del gen. Els SNPs trobats es troben detallats a la taula 27, on a més de la nomenclatura a nivell genòmic, hi ha la referència utilitzada en la base de dades d'SNPs del NCBI (National Center for Biotechnology

Information), així com la distribució de les freqüències al·lèliques per cada un dels SNPS en cada un dels grups.

Mitjançant el trest Chi-quadrat es van analitzar les possibles diferències significatives pel que fa a la distribució de les freqüències al·lèliques de ambdós grups, considerant que hi hauria diferències significatives en aquells casos en que el p-valor fos inferior a 0.05, es pot observar que no hi ha cap polimorfisme en els pacients ApoA-Ib positius diferencial dels polimorfismes trobats en els pacients ApoA-Ib negatius. A més, tots els SNPs trobats es trobaven prèviament descrits i en cap cas podrien explicar l'augment de pes molecular de la ApoA-Ib. El fet de que siguin SNPs situats en les zones no codificants de la proteïna final descarta la possibilitat de que puguin donar lloc a una modificació post-traducciona d'origen genètic que provoques l'augment de pes molecular de la ApoA-Ib. Un altre opció d'augment de massa seria la possibilitat d'un *splicing* alternatiu, aquesta opció es va descartar mitjançant l'ús de softwares predictors d'*splicing* (*Neural Network Genie Splice Site Prediction*).

SNP	Al·lels	ApoA-Ib positius (GESF-R)	ApoA-Ib negatius (GESF-NR/GESF-FAM)	Significança estadística
		Freq. Al·lèlica (%)	Freq. Al·lèlica (%)	
IVS1-75 G>A (rs670)	G	62.5	84.4	NS
	A	37.5	15.6	
IVS1+67 C>T (rs5069)	C	93.8	100	NS
	T	6.2	0	
IVS3+33 T>C (rs2070665)	T	12.5	3.1	NS
	C	87.5	96.9	
c.IVS3+134 T>C (rs5072)	T	12.5	3.1	NS
	C	87.5	96.9	
IVS4-211 T>C (rs7116797)	T	18.8	3.1	NS
	C	81.2	96.9	
IVS4-274 C>T (rs12718464)	C	100	84.4	NS
	T	0	15.6	
IVS4-63 C>T (rs5076)	C	93.8	100	NS
	T	6.2	0	

Taula 27. Distribució al·lèlica per cada un dels SNPS trobats en ambdós grups estudiats. No s'observen diferències estadísticament significatives entre els dos grups d'estudi, per a cap polimorfisme (Test Chi-quadrat)

5.2. Determinació de modificacions post-traduccionals

Un cop descartades les possibles modificacions genètiques, es va plantejar que l'augment de pes podia ser causat per una modificació post-traduccional o un processament anòmal de la proteïna.

Per justificar l'augment de massa al voltant de 1-2KDa observat per WB de l'ApoA-Ib, una primera possibilitat era que la proteïna patís un procés de glicosilació, es a dir, la incorporació de carbohidrats a la proteïna. Aquesta glicosilació és un procés dirigit per enzims i condicionat per llocs específics d'unió, que pot succeir de forma paral·lela a la síntesi de la proteïna o de manera post-traduccional, quan la síntesi de la proteïna ja ha finalitzat.

Segons el lloc on es produeixi la glicosilació podem trobar N-glicosilacions, (unió de l'oligosacàrid al grup amino lliure d'una asparagina) i O-glicosilacions (unió de l'oligosacàrid sobre el grup hidroxil de residus de treonina o serina).

També existeix la glicació, o glicosilació no enzimàtica, que consisteix en la modificació post-traduccional permanent dels grups amino de les proteïnes i la qual ve donada per un augment de glucosa en sang que accelera la reacció entre sucres i altres molècules com les proteïnes, d'aquí resulta la formació de productes finals de glicosilació avançada (AGEs).

Per comprovar la presència o absència de N-glicosilacions es va realitzar una digestió amb l'enzim PNGasa F (New England Biolabs, P0704S) el qual és una amidasa que elimina la majoria dels oligosacàrids enllaçats a asparagina. Per a tal efecte es van agafar mostres de orina de quatre pacients GESF recidivants als quals ja se'ls havia detectat l'ApoA-Ib prèviament per WB i una

mostra de plasma control, i es va procedir a la digestió de cada una de les mostres amb l'enzim ja esmentat. Un cop digerides, es va fer un WB i una posterior detecció de l'ApoA-I i de la transferrina (control positiu de N-glicosilacions) mitjançant els anticossos corresponents. La presència de N-glicosilacions es confirma quan la proteïna que la conté migra fins a la seva massa molecular nativa en presència de l'enzim.

Com es pot observar a la figura 28, no hi havia canvis de pes molecular en absència de l'enzim, si no que les bandes corresponents a l'ApoA-I, ApoA-Ib i transferrina es mantenen en el mateix pes molecular que en el cas de no digestió. Quan hi havia presència de PNGasa, i per tant es produïa la digestió de les N-glicosilacions, la transferrina, la qual es un glicoproteïna de 80Kda que és troba N-glicosilada en les posicions Asn432 i Asn630²⁵⁵, disminuïa de pes molecular, però en cap dels pacients estudiats l'ApoA-Ib tornava al seu pes molecular estàndard. Així doncs, es va poder descartar que l'augment de pes molecular de l'ApoA-Ib fos causat per la presència d'una N-glicosilació.

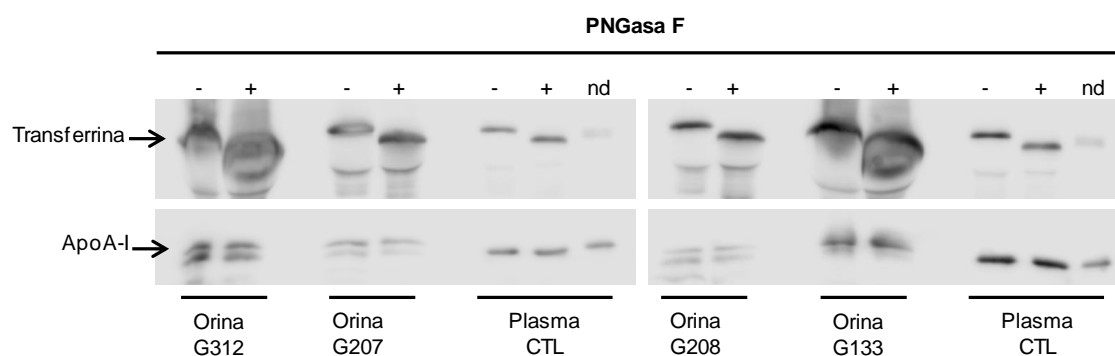


Figura 28. Digestió amb l'enzim PNGasa F d'orines test i plasma control. -: digestió sense enzim (control negatiu), +: digestió amb enzim (prova); nd: no digerit

La determinació de O-glicosilacions es va realitzar mitjançant l'ús de ProQ Emerald 300 (Thermo Fisher, P21857), el qual és un reactiu que reacciona amb els grups de carbohidrats àcid periòdic oxidats, generant una senyal fluorescent en les glicoproteïnes. Aquest tipus de tinció permet la detecció de glicoproteïnes a una concentració de 300pg per banda o taca. Per determinar si la ApoA-Ib presentava una glicosilació es van realitzar dos gels d'electroforesis bidimensional a partir de la mostra d'orina d'un pool de pacients GESF recidivant, al qual prèviament s'havia detectat la ApoA-Ib per WB. Un dels gels es va tenyir amb coomassie col·loïdal per tal de poder visualitzar i localitzar la ApoA-Ib, l'altre gel es va tenyir amb ProQ Emerald, el que ens permetia veure totes les glicoproteïnes presents en la orina del pacient estudiat. Els mapes proteòmics obtinguts amb la tinció de coomassie col·loïdal i la tinció ProQ Emerald es mostren a la figura 29A i 29B respectivament.

Tal i com es pot observar en la figura 29, tot i que la ApoA-Ib sí que està present en el mapa corresponent a la tinció amb coomassie (figura 29A), aquesta no s'observa en el mapa corresponent a la tinció amb ProQ Emerald (figura 29B), el que permetria descartar la presència de O-glicosilacions en l'ApoA-Ib.

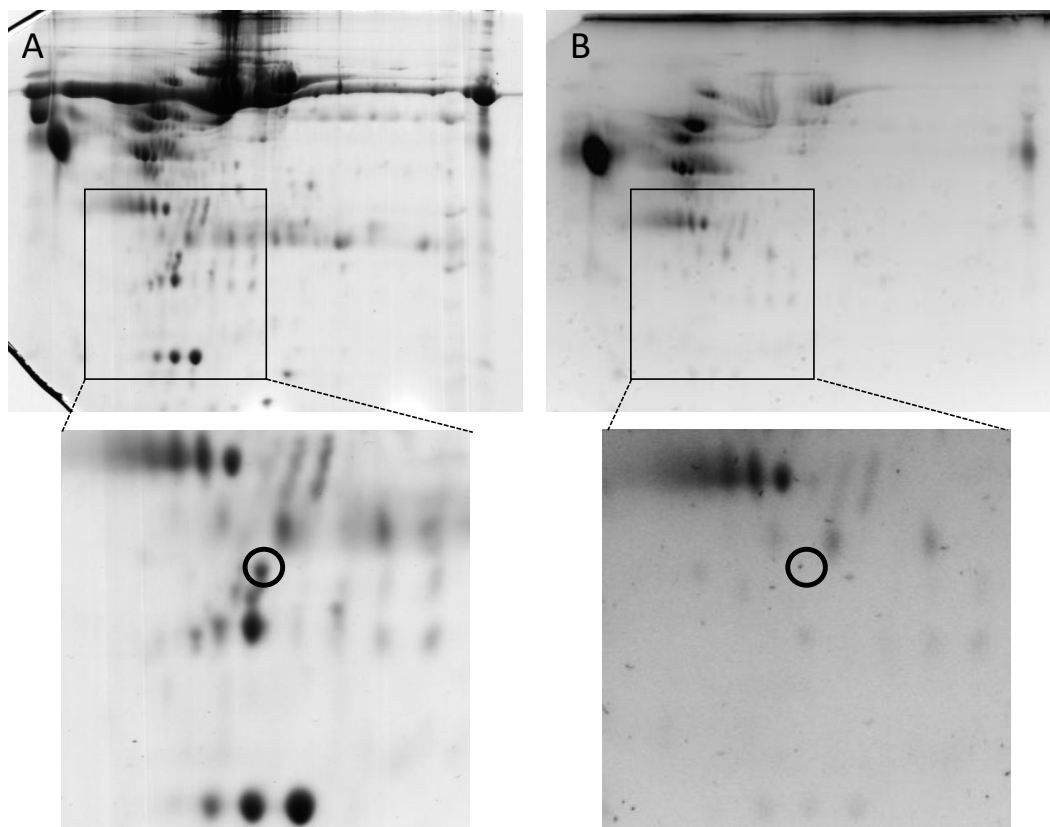


Figura 29. Determinació de les O-glicosilacions mitjançant ProQ Emerald. A. Tinció total amb coomassie col·loidal. **B.** Tinció amb proQ Emerald. El cercle assenyalava la ApoA-Ib

Per tal de validar aquests resultats, es va realitzar un anàlisi de l'ApoA-Ib amb MALDI-TOF i LC-MS/MS, i en aquest cas es va detectar el que semblava correspondre a una O-glicosilació en la Ser-166 que podria explicar l'augment de massa de l'ApoA-Ib, però posteriors anàlisis amb equips de més alta resolució van descartar aquesta possibilitat, descartant així definitivament les O-glicosilacions com a causa de l'augment de pes molecular observat en l'ApoA-Ib.

Una segona possibilitat que podria explicar l'augment de pes molecular que s'observa en l'ApoA-Ib respecte l'ApoA-I, és que aquesta proteïna de més

Resultats

pes molecular passen per un processament de la proteïna anòmal, es dir que el pèptid senyal o el pro-pèptid no fossin correctament escindits. Per valorar aquesta possibilitat es va procedir a aïllar l'ApoA-Ib. Així com l'ApoA-I estàndard (en els casos en que aquesta estava present) de la orina de 6 pacients GESF recidivants (figura 30A), a més també es van aïllar l'ApoA-I i la pro-ApoA-I del plasma d'aquests pacients (figura 30B). Per a poder aïllar les taques corresponents a les proteïnes ja mencionades es va realitzar un gel 2D-PAGE utilitzant un rang de pH de 4 a 7 que posteriorment es va tenyir amb coomassie col·loïdal. Les taques corresponents es van ser enviades a la unitat de proteòmica del European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) on es van retallar i digerir amb tripsina, per a continuació passar-les per un espectròmetre de masses LTQ-Orbitrap, i confrontar tot seguit les seqüències obtingudes contra una base de dades de proteòmica humana. Les seqüències obtingudes individualment per cada un dels pacients es troba representada en la figura 31, on en vermell podem observar la cobertura per cada una de les taques analitzades, es a dir, els pèptids trobats en l'anàlisi.

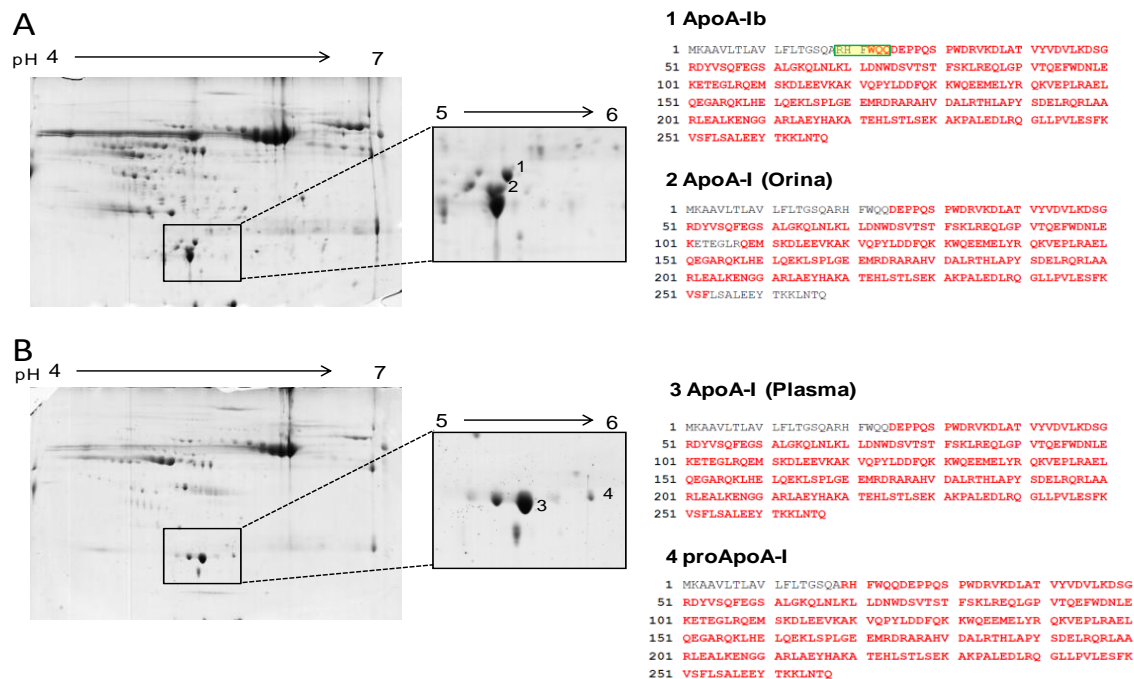


Figura 30. Aïllament de les taques corresponents a ApoA-Ib, ApoA-I i pro-ApoA-I. **A** 2D-PAGE obtingut a partir de la mostra d'orina d'un dels pacients GESF recidivants analitzats on s'observa en el quadre més ampliat la presència de la taca corresponent a la ApoA-Ib (1) així com la taca corresponent a la ApoA-I estàndard (2). **B** 2D-PAGE obtingut a partir de la mostra de plasma d'un dels pacients GESF recidivants analitzat on es pot observar la taca corresponent a ApoA-I estàndard (3) a més de la taca corresponent a pro-ApoA-I (3). A la dreta es troben les seqüències obtingudes del anàlisi amb LTQ-Orbitrap. En vermell s'indica la seqüència trebada, i el quadre verd marca el pro-pèptid (RHF^WQ^Q)

Si ens fixem en la cobertura marcada en vermell en la figura 31, veiem que en la zona N-terminal hi ha una seqüència extra en les mostres corresponents a ApoA-Ib que no es troba en la forma d'ApoA-I estàndard (ni la corresponent a orina, ni la que correspon a plasma). Aquesta seqüència correspon al pro-pèptid (RHF^WQ^Q), el qual està present en la proApoA-I, la forma immadura de l'ApoA-I, la qual està present de manera natural al plasma. La diferència principal, és que mentre que en el plasma trobem tota la seqüència corresponent a aquest pro-pèptid (N₋₂₂RHF^WQ^Q₂₄-C), en l'ApoA-Ib només s'han cobert els últims 3 aminoàcids de la seqüència (N₋₂₂WQ^Q₂₄-C), la massa teòrica dels quals seria de 460.49Da, el qual podria explicar la diferència de pes observada entre ApoA-I i ApoA-Ib.

6. IMPLICACIÓ DE APOA-Ib EN LES RECIDIVES DE GESF / MALALTIA DE GESF

Fins ara hem vist que ApoA-Ib esta estretament relacionada amb les recidives de GESF, però no sabem si aquesta ApoA-Ib d'un pes molecular més elevat que l'ApoA-I estàndard pot influir d'alguna manera en el seu entorn fisiològic. Per poder desvetllar si podria haver-hi algun tipus d'implicació de la ApoA-Ib en el seu entorn fisiològic es van idear tres aproximacions:

1. L'estudi de les subpoblacions de HDL, per saber si hi havia alguna relació entre la presència d'ApoA-Ib i la distribució de les diferents subpoblacions de HDL
2. L'estudi de biòpsies de ronyó humà, per saber si s'observen dipòsits d'ApoA-I en pacients GESF idiopàtics recidivants
3. L'estudi in-vivo, on es pretenia observar la capacitat inductora de malaltia tenia ApoA-Ib

6.1. APOA-Ib I LES SUBPOBLACIONS DE HDL

El indicatiu que ens va fer pensar en una possible relació entre ApoA-Ib i les subpoblacions/subfraccions de HDL, era el fet que ApoA-I és la proteïna majoritària que conforma les HDL, seguida de l'ApoA-II, que com em observat en apartats anteriors també sembla estar relacionada amb la malaltia de GESF. Que dos proteïnes com l'ApoA-I i l'ApoA-II tant abundants en les HDL hagin sigut trobades diferencialment en els mapes proteòmics d'orina de pacients GESF recidivants i en el mapa proteòmic de sèrum de pacients GESF

Resultats

idiopàtics respectivament, ens indicava que podria existir alguna relació entre la presència d'ApoA-Ib i la distribució de les diferents subpoblacions de HDL.

Amb l'objectiu de veure si hi havia alguna afectació en les subpoblacions de HDL que pogués ser deguda a la presència d'ApoA-Ib, es va procedir a l'anàlisi de les fraccions de HDL. Per a la realització d'aquest estudi es disposava de plasma de dos grups de pacients, un primer grup format per pacients ApoA-Ib positius en orina, que incloïa pacients GESF idiopàtics recidivants post trasplantament (GESF-R; 13 pacients) i un segon grup format per pacients ApoA-Ib negatius en orina. Aquest segon grup es va dividir en dos subgrups, un amb proteïnúria equivalent a la dels pacients recidivants però no relacionada amb GESF (P-noGESF; 11 pacients) i un format per pacients GESF idiopàtics trasplantats que no havien recidivat (GESF-NR; 20 pacients). Les característiques clíniques es troben detallades a la taula 28.

	GESF-R	P-noGESF	GESF-NR	R vs. P Significança estadística	R vs. NR Significança estadística
Edat (anys)	42.4 ± 3.4	47.3 ± 3.7	42.4 ± 2.9	NS	NS
Homes/Dones	7/6	9/2	9/11	NS	NS
Hematòcrit (%)	34.54 ± 2.38	32.91 ± 2.66	41.1 ± 1.2	NS	p<0.05
Albúmina (g/dL)	3.42 ± 0.15	3.76 ± 0.28	4.32 ± 0.10	NS	p<0.0002
Colesterol (mg/dL)	201.2 ± 16.5	164.3 ± 11.4	189.9 ± 6.9	NS	NS
HDL (mg/dL)	32.3 ± 2.3	40.3 ± 4.7	37.1 ± 3.2	NS	NS
Triglicèrids (mg/dL)	226.9 ± 24.0	170.6 ± 15.1	154.9 ± 11.0	NS	p<0.005
Creatinina (mg/dL)	1.78 ± 0.25	2.08 ± 0.37	1.30 ± 0.10	NS	NS
ApoA-I plasmàtica (mg/dL)	143.1 ± 7.3	130.1 ± 9.2	144.3 ± 7.2	NS	NS
Proteïnúria (g/24h)	6.05 ± 1.29	3.33 ± 0.84	0.55 ± 0.23	NS	p<0.000007

Taula 28 Característiques clíniques dels pacients utilitzats per a l'estudi de les fraccions de HDL. Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard, Anàlisi estadística: U-MannWhitney

Les úniques diferències significatives rellevants trobades en la clínica d'aquests pacients és la menor proteïnúria i triglicèrids, així com la major quantitat d'albumina del grup NR, diferències esperables donat que els pacients del grup GESF-NR estan en remissió de la seva malaltia.

Per poder visualitzar les subpoblacions de HDL, han estat descrits diferents mètodes d'electroforesis no desnaturalitzant o nativa com són el descrit per Rosenson et al.²⁰⁹ on s'obtenen les HDL purificades mitjançant la ultracentrifugació del plasma i una posterior electroforesis nativa per finalment tenir la proteïna total. Altres autors^{256,257}, utilitzen gels de poliacrilamida en gradient (3-31%) on separen electrofòreticament les diferents subfraccions de HDL i posteriorment igual que abans les tenyeixen amb blau de coomassie per a la detecció de les proteïnes o amb Sudan Black per la detecció dels lípids. En el nostre cas es va realitzar una electroforesis no desnaturalitzant amb el plasma directament sense ultracentrifugadgar, i en lloc de tenyir el gel amb coomassie, es va realitzar una immunotinció amb l'anticòs anti-ApoA-I, d'aquesta manera podíem veure les diferents fraccions d'HDL (de les quals ApoA-I n'és la proteïna majoritària) i l'ApoA-I lliure no lligada a lípids present en el plasma. Les zones descrites mitjançant aquest mètode van ser A1 (>300KDa), A2 (300-200KDa), A3 (200-120 KDa), A4 (120-55 KDa) i A5 (<55KDa), on A5 correspon a aquesta ApoA-I lliure en plasma (figura 32) La quantificació de cada una d'aquestes fraccions estudiades es troba detallada en la taula 29.

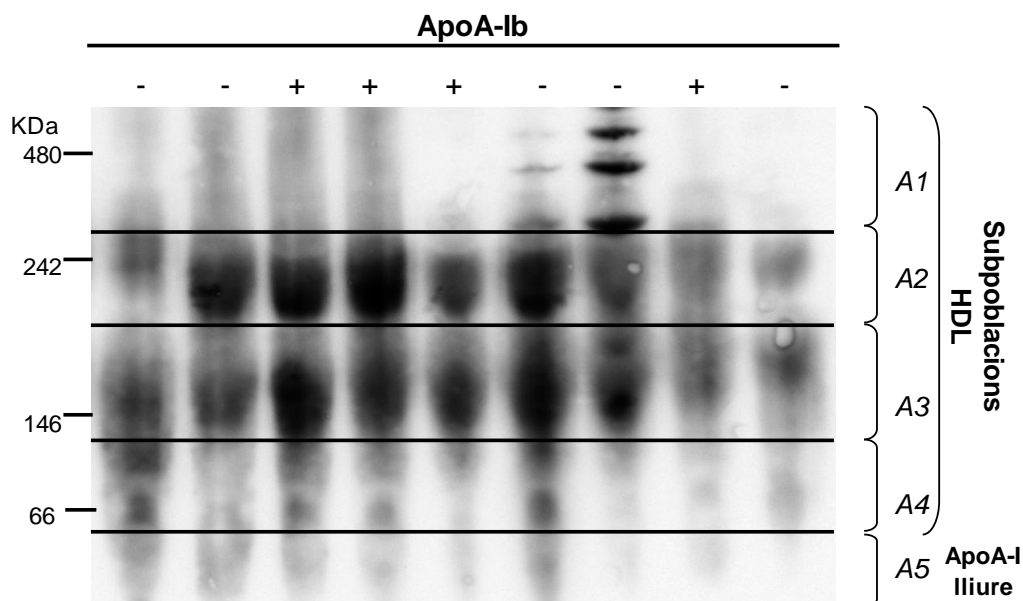


Figura 32. Gel d'electroforesis nativa de HDL tenyides amb anticòs Anti-ApoA-I on es troben detallades les subpoblacions de HDL estudiades

	GESF-R	P-noGESF	GESF-NR	R vs P Significancia estadística	R vs NR Significancia estadística
A1	1,01±0,05	1,16±0,15	1,29±0,15	NS	NS
A2	0,71±0,09	1,16±0,23	0,96±0,1	NS	NS
A3	0,9±0,09	1,75±0,28	1,49±0,19	p=0,0043	p=0,0043
A4	1,42±0,09	1,44±0,14	1,48±0,12	NS	NS
A5	1,77±0,12	1,28±0,06	1,26±0,05	p=0,0005	p=0,0005

Taula 29. Quantificació de les diferents subpoblacions observades i diferències estadístiques entre grups; Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard; Anàlisi estadística: Anova / Kruskal-Wallis (distribució no normal)

La Figura 33a mostra la quantificació obtinguda per cada una de les subpoblacions analitzades dels diferents grups (taula 29) en format de gràfic. Si s'observa més detalladament cada una de les subfraccions, trobem diferències significatives en les fraccions A3 (corresponent al pes molecular 200-120 KDa) i A5 (corresponent a la ApoA-I lliure, pes molecular <55 KDa), amb uns p-valor de $p < 0.01$ i $***p < 0.001$ respectivament. Més concretament és tracta d'una disminució de la fracció A3, així com un increment de la fracció A5 en els

pacients ApoA-Ib positius respecte els pacients ApoA-Ib negatius (GESF no recidivants i proteïnúries no relacionades amb GESF) (Figura 33A). A més en fer els estudis de correlació, s'observa correlació inversa entre aquestes dues subfraccions (anàlisi de regressió amb $p < 0.01$) (Figura 33B). En cap cas s'observen diferències significatives pel que fa a les subpoblacions entre els grups NR-GESF i P-noGESF.

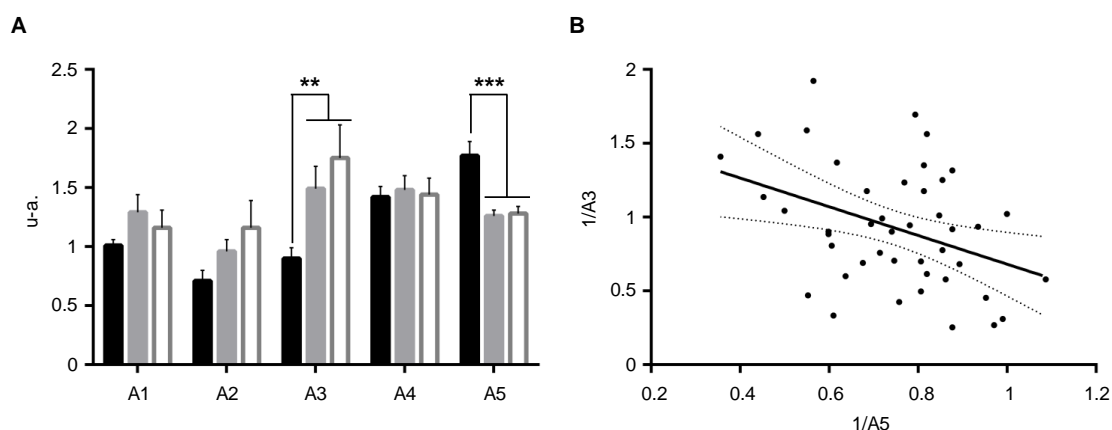


Figura 33: Subfraccions de HDL tenyides amb ApoA-I. **A.** Quantificació de les subfraccions de HDL tenyides. Disminució significativa de la fracció A3 i increment de la fracció A5 en pacients R-GESF (barres negres) respecte pacients NR-GESF (barres grises) i P-noGESF (barres blanques); ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$. **B.** Anàlisi de la correlació de les fraccions A3 i A5. Correlació inversa significativa, $p < 0.0098$

En analitzar més detingudament les fraccions A3 i A5, observem que la relació A5/A3 està incrementada significativament ($p < 0.0001$) en els pacients GESF recidivants respecte els altres dos grups estudiats (Figura 34A). Per tal d'estudiar la capacitat diagnòstica de la relació A5/A3 com a biomarcador de recidiva de GESF es va realitzar la corba ROC (Receiver Operating Characteristic)(figura 34B), on es va observar una àrea sota la corba (AUC) de 0.9091 (95% CI 0.7897-1.028, $p = 0.0007$). Quan la relació A5/A3 està en l'òptim del punt de truncació (1.054), la sensibilitat i l'especificitat són 92.31% i 81.82% respectivament. Sugerint que la relació A5/A3 podria ser útil per discriminar proteïnúria induïda per la recidiva de GESF de altres proteïnúries no

Resultats

relacionades amb GESF, a més de mostrar que la presència d'ApoA-Ib s'associa a una alteració de la distribució de les HDL, el que podria comportar efectes patològics.

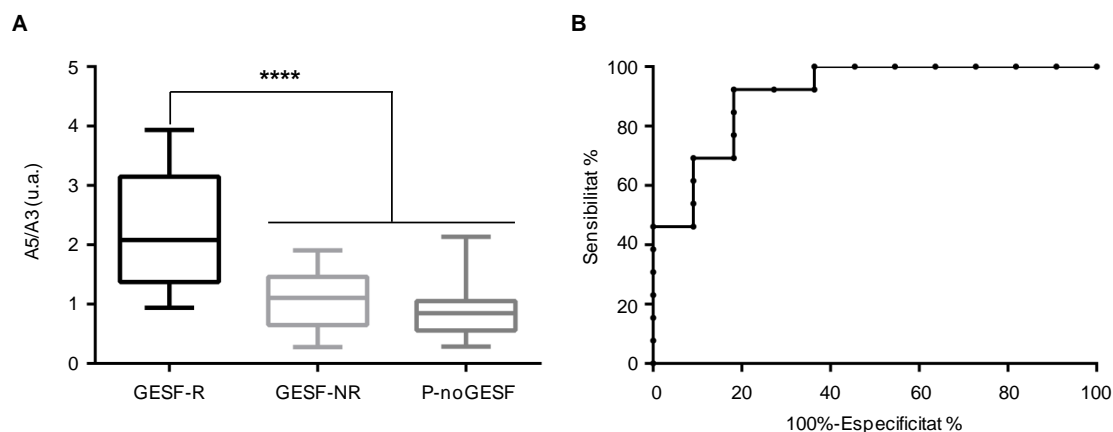


Figura 34 . A. La relació de les subfraccions A5/A3 de HDL tenyides amb ApoA-I és més elevada en pacients R-GESF que en la resta de grups estudiats ($p < 0.0001$). **B.** Corba ROC dels pacients R-GESF respecte els pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF. (AUC=0.9091).

6.2. APOA-Ib EN BIOPSIES DE RONYÓ

Està descrit que dipòsits de immunocomplexes en el glomèrul són causants de nefropaties, com és per exemple el cas de la nefropatia per IgA²⁵⁸. Un altre cas de malaltia renal per dipòsits en la qual a més a més esta implicada la ApoA-I, és la amiloïdosis renal hereditària per ApoA-I, en la qual diverses mutacions en el gen de la ApoA-I, provoquen que la proteïna sigui menys estable, perdent la seva estructura terciària o superior i agregant-se entre si formant una estructura secundària en forma de filaments que es dipositen en el glomèrul i causen la lesió glomerular que durà lloc a la malaltia renal²⁵⁹⁻²⁶¹. Per això no era difícil pensar que potser en el cas de la ApoA-Ib

podria passar alguna cosa similar a la que succeeix en l'amiloïdosi renal o en la nefropatia per IgA.

Amb l'objectiu de dilucidar si l'ApoA-Ib creava o no dipòsits fibrosos en els glomèruls de pacients GESF que poguessin explicar la recidiva de la malaltia, es va procedir a la immunotinció amb ApoA-I de biòpsies de dos grups de pacients. Un primer grup estava format per quatre pacients amb malalties renals diferents a GESF (hipoplàsia renal congènita, insuficiència renal no filiada i 2 glomerulonefritis membrano-proliferativa), i un segon grup format per sis pacients GESF que havien recidivat i que eren ApoA-Ib positius en orina, les dades clíniques d'ambdós grups es troben recollides a la taula 30.

	R-GESF	P-noGESF	Significança estadística
Edat (anys)	47,04 ± 9,41	40,02 ± 4,74	NS
Albúmina (g/dL)	3,53 ± 0,21	3,73 ± 0,49	NS
Colesterol (mg/dL)	223,0 ± 28,27	156,0 ± 24,35	NS
Triglicèrids (mg/dL)	279,8 ± 102,8	182 ± 76,05	NS
Creatinina (mg/dL)	2,34 ± 0,94	2,38 ± 0,61	NS
Proteinúria (g/24h)	3,86 ± 1,16	2,023 ± 1,15	NS

Taula 30 Característiques clíniques dels pacients utilitzats per a l'estudi de les biòpsies; Dades expressades com Mitjana ± Error estàndard; Anàlisi estadística: t-Student

A la figura 35 i 36 podem observar els glomèruls immunotenyits contra ApoA-I i ApoA-Ib de les biòpsies corresponents als pacients no GESF i GESF respectivament. Com es pot observar no s'observen diferències en quant a tinció de ApoA-I entre els dos grups estudiats, i en cap cas es presenten dipòsits d'ApoA-I. En ambdós casos podem s'observa tinció negativa en les

Resultats

cèl·lules epitelials parietals, i positiva en les cèl·lules podocitaries, tant en membrana com en citoplasma. A més s'observa una tinció puntejada a l'interior de les cèl·lules del túbul proximal que correspon a l'acumulació de proteïnes, la qual és típica dels pacients amb proteïnúria, com és el cas dels pacients GESF i dels pacients no-GESF seleccionats. El que si s'observa és el glomèrul totalment o parcialment esclerosat en el cas dels pacients GESF, característica histològica definitiva d'aquesta malaltia.

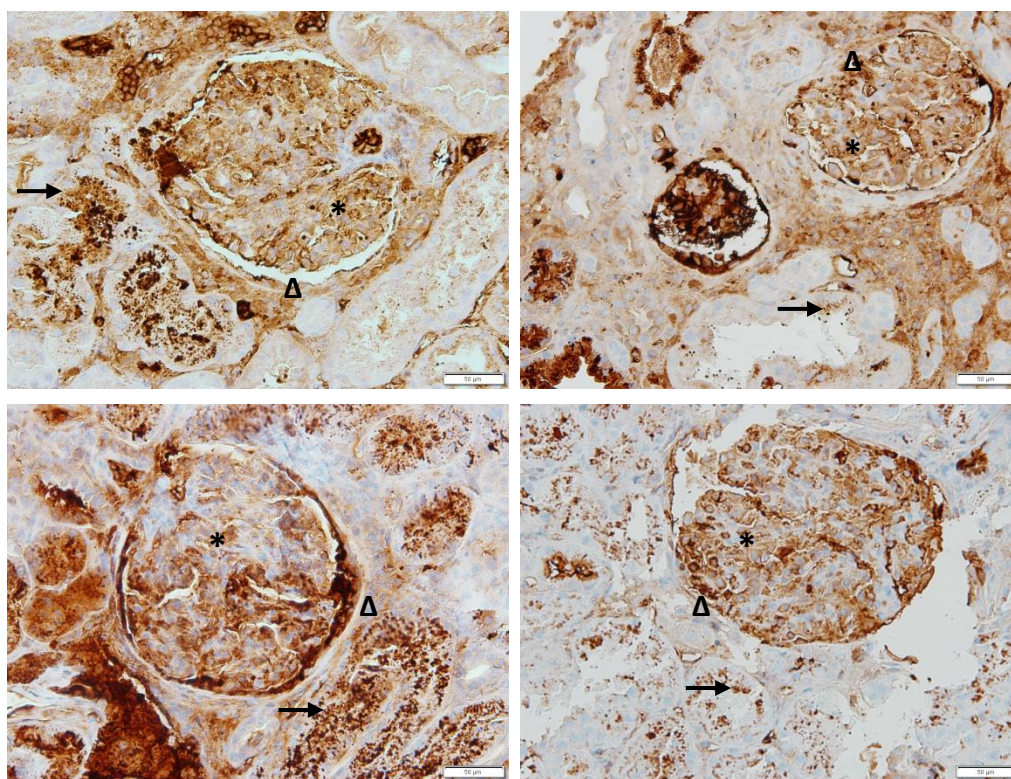


Figura 35: Biòpsies immunotenyides per ApoA-I corresponents a pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF. El glomèrul s'observa histològicament normal. S'observa tenyida positivament la proteïna acumulada en les cèl·lules tubulars (fletxa), així com en el citoplasma i la membrana dels podòcits (*). No hi ha marcatge o és inespecífic en les cèl·lules parietals (Δ).

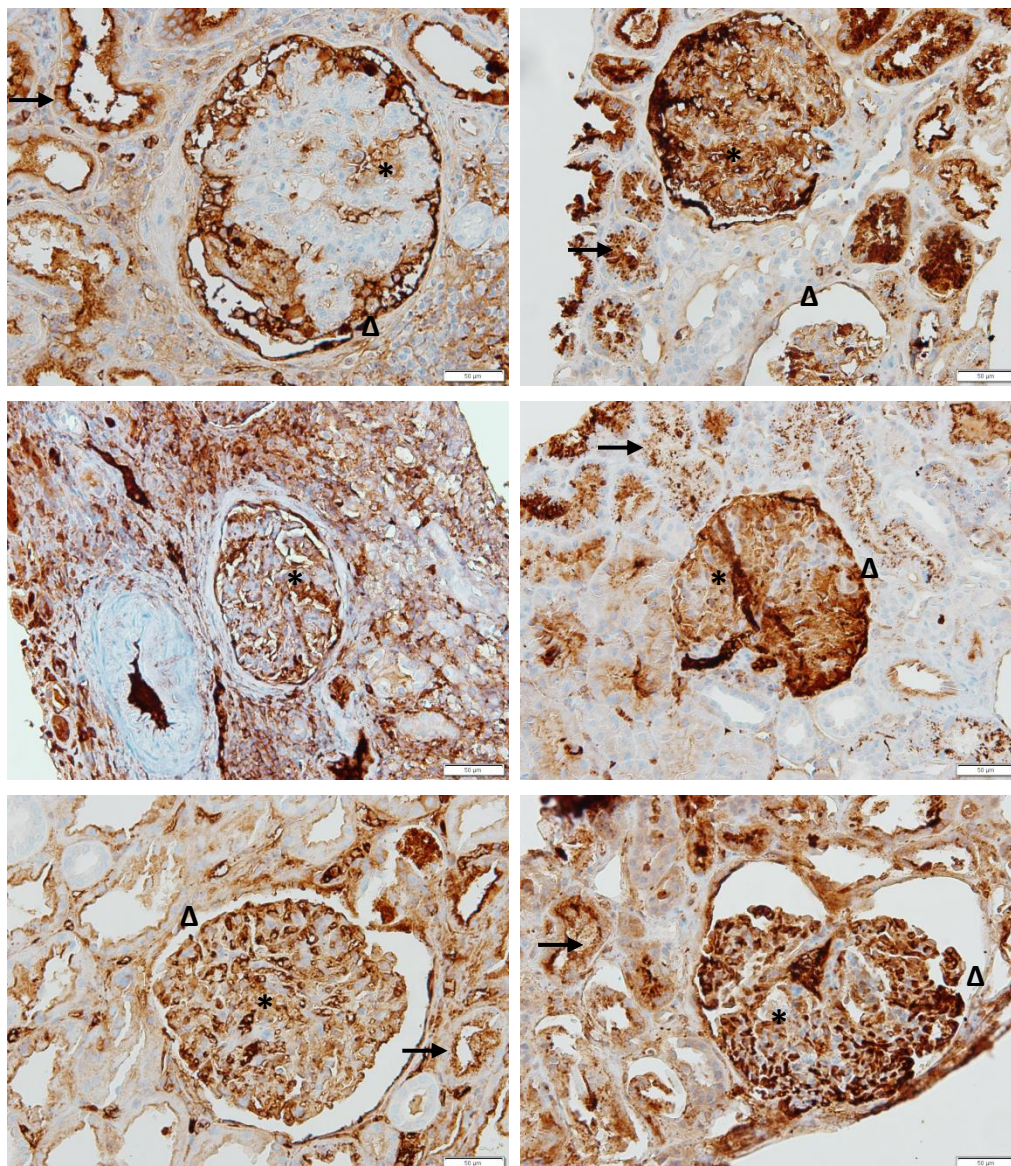


Figura 36: Biòpsies immunotenyides per ApoA-I/ApoA-II corresponents a pacients GESF recidivants. El glomèrul s'observa totalment o parcialment esclerosat. S'observa tenyida positivament la proteïna acumulada en les cèl·lules tubulars (fletxa), així com en el citoplasma i la membrana dels podòcits (*). No hi ha marcatge o és inespecífic en les cèl·lules parietals (Δ).

6.3. APOA-Ib IN VIVO

Per tal de valorar quin era la capacitat inductora de recidiva de la ApoA-Ib es va plantejar un prova pilot que consistia en l'ús d'una columna d'afinitat amb anticòs anti-ApoA-I acoblat per a la depleció de la ApoA-I total del plasma (ApoA-I i ApoA-Ib) i una posteriorment la injecció intravenosa en cua d'aquest plasma depleccionat de ApoA-I a rates Sprague-Dawley. L'esquema del disseny experimental es troba detallat a la figura 37.

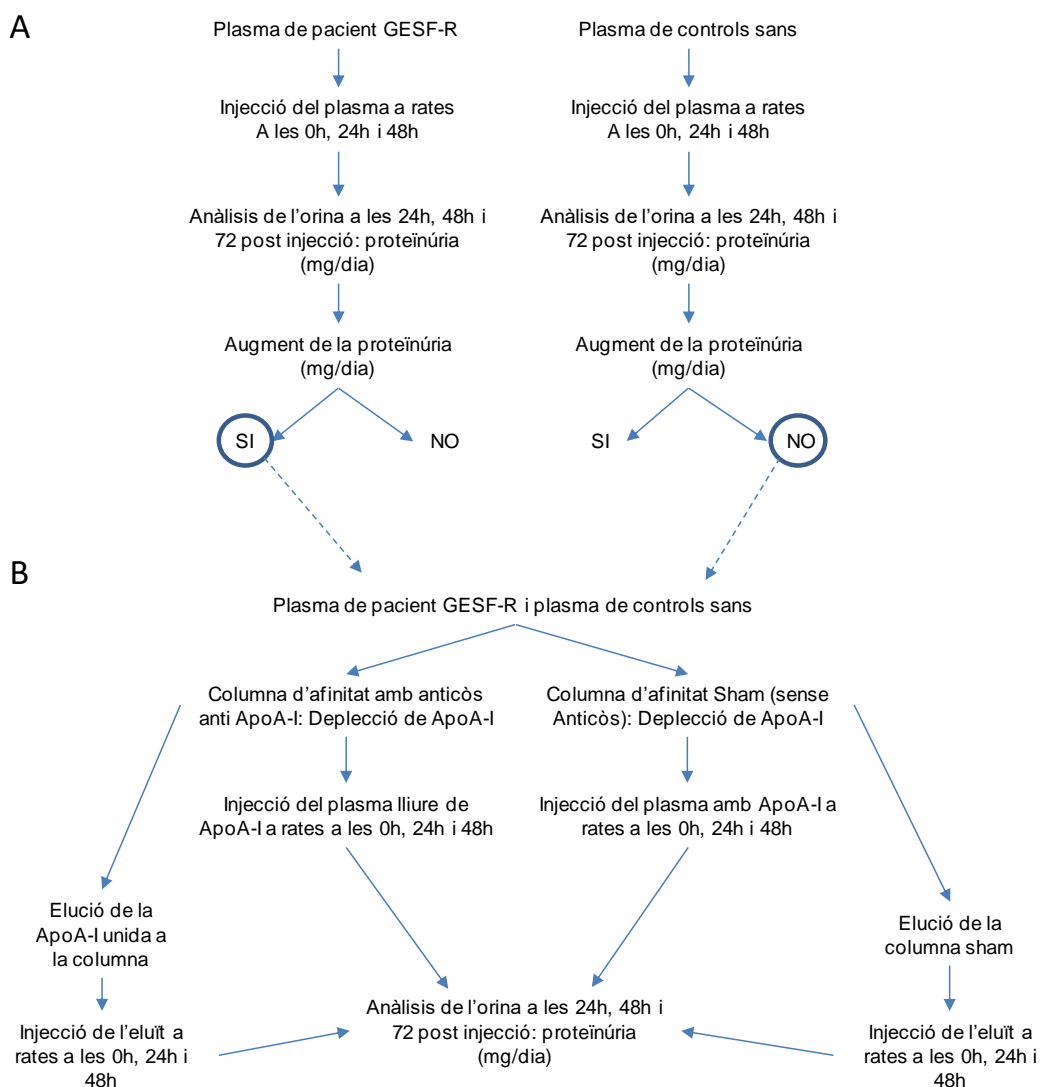


Figura 37 Disseny experimental per valorar la capacitat inductora de recidiva de la ApoA-Ib A: Cerca del pacient causant de proteïnúria **B:** prova pilot definitiva

Com es pot observar en la figura 37A el pas previ a la realització de la prova pilot és troba un pacient capaç de produir la proteïnúria en rates, el qual és el un dels símptomes de la glomeruloesclerosi més fàcilment identificable, i que prèviament ha estat descrit en altres experiments amb rates⁷⁸.

Es va recollir plasma i orina de 12 potencials pacients GESF recidivants capaços d'induir la malaltia en rates. A partir de la orina es va comprovar que realment aquests pacients GESF recidivants presentessin la ApoA-Ib. A més dels pacients GESF també es va recollir plasma de 2 controls sans.

En dur a terme la injecció intravenosa en cua del plasma de cada un dels pacients i controls seleccionats es va observar que dels 12 pacients GESF seleccionats únicament 2 van donar lloc a un increment significatiu de la proteïnúria respecte els controls ($p < 0.05$; figura 38). Obtenint així dos candidats per a la realització de la segona part de la prova pilot consistent en la depleció de la ApoA-I del plasma mitjançant la columna d'afinitat acoblada amb anticòs anti ApoA-I. Aquesta segona part és la que ens permetrà afirmar o descartar la hipòtesis de que ApoA-I es un dels inductors de la recidiva.

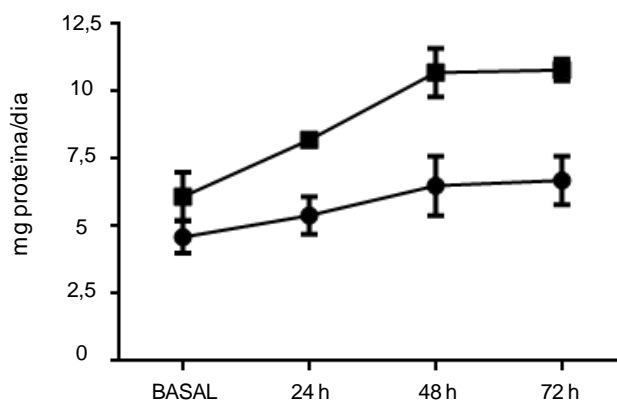


Figura 38. Prova pilot en rates. Mesures de proteïnúria obtingudes previ injecció de plasma (basal), i cada 24 hores post-injecció de plasma (24h, 48h i 72h). Els quadrats representen les mesures de les rates que han rebut plasma de pacients GESF recidivants (ApoA-Ib positius), les rodones representen les mesures de les rates que han rebut plasma control. Anàlisi t-Student $p < 0.05$

Resultats

Per a l'execució de la segona part del disseny experimental (figura 37B) es va elaborar una columna d'afinitat test a partir d'1mg d'anticòs anti ApoA-I (el qual també reconeixia ApoA-Ib) i una segona columna d'afinitat sham (sense anticòs).

A partir d'1mg d'anticòs contra ApoA-I/ApoA-Ib es va aconseguir obtenir una columna amb un 60% d'aquest anticòs acoblat. Paral·lelament també es va elaborar una columna *sham* que no contenia anticòs. Per comprovar-ne la capacitat de captació, es va procedir a passar a través de la columna test (amb anticòs unit) i de la columna *sham* (sense anticòs) 100µl de plasma control, recollint les fraccions d'entrada i sortida, per posteriorment mitjançant l'assaig ELISA d'ApoA-I comprovar quina era la quantitat d'aquesta proteïna captada per cada una de les columnes.

L'assaig ELISA va permetre determinar que la capacitat de captació de la columna test era entre un 20 i un 30% d'ApoA-I present als 100µl de plasma (figura 39), pel que per treure una quantitat raonable d'ApoA-I, s'hauria de passar els 100µl de plasma entre 3 i 4 vegades per la columna. L'experiment plantejat en rates comporta 3 injeccions de 350µl de sèrum sense ApoA-I/ApoA-Ib en un total de 8 rates. Per tant per cada rata es necessiten vora 1ml de plasma sense Apo, pel que hauríem de passar aquest plasma unes 30-40 vegades per la columna per a poder extreure tota la Apo present. Així doncs, tenint en compte que la ApoA-I és una proteïna abundant en plasma, la quantitat emprada d'anticòs no es suficient per la seva depleció, i es necessari la realització d'una columna amb més anticòs que permeti la depleció total d'ApoA-I/ApoA-Ib del plasma per dur a terme la segona part del disseny

experimental i comprovar així si la presència de la ApoA-Ib era la causant de la proteïnúria.

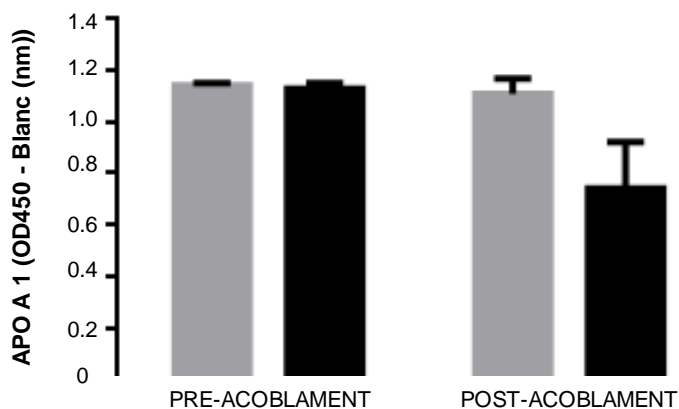


Figura 39. Determinació mitjançant elisa de l'ApoA-I present en la mostra previ acoblament i post acoblament. Les barres grises corresponen a la columna *sham* (sense anticòs). Les barres negres corresponen a la columna test (amb anticòs anti-ApoA-I)

Per tant aquest punt del projecte queda parat a expenses d'aconseguir més finançament que ens permeti elaborar un columna d'afinitat que deplecioni completament la ApoA-I del plasma dels dos pacients GESF inductors de la proteïnúria en rates.

DISCUSSIÓ

Com ja s'ha comentat en la introducció, la Glomeruloesclerosi Segmentària i Focal és una malaltia renal definida per un conjunt de lesions glomerulars associades a una considerable pèrdua de proteïnes en l'orina i resistència al tractament amb esteroides (síndrome nefròtica corticoresistent). És considerada com un grup d'entitats clíniques que produeix el mateix resultat final, una lesió glomerular que dona lloc a una elevada proteïnúria¹. De les formes de GESF existents aquesta tesi s'ha centrat en la GESF primària o idiopàtica l'origen de la qual es desconeix. Tot i aquesta causa desconeixuda varis estudis suporten la idea de que està causada per un o diversos factors circulants desconeixuts que s'originen fora del ronyó²⁻⁴.

La manca de resposta al tractament amb esteroides i la progressió freqüent cap a la insuficiència renal terminal fan que finalment es requereixi diàlisi o trasplantament renal, però un dels principals problemes de GESF, és la freqüent recidiva post-trasplantament, la qual pot succeir fins i tot hores després de rebre el trasplantament⁵. Sovint aquesta recidiva acaba produint la pèrdua de l'empelt, fent així que sigui necessari un nou trasplantament. Tot i que hi ha diverses mesures terapèutiques per reduir el risc de recidiva, aquestes presenten resultats molt diversos^{5,202}.

Un altre punt important de GESF és el diagnòstic, sobretot en el cas de les recidives post trasplantament. El diagnòstic es basa en les característiques clíniques, es a dir, augment sobtat de proteïnúria a rang nefròtic i en les característiques histològiques, la detecció de la glomeruloesclerosi segmentària a la biòpsia renal. No obstant l'augment de proteïnúria pot venir causat per altres causes o pot passar desapercebut en el cas de que no augmenti fins a rang nefròtic. Pel que fa a les troballes histològiques, aquestes no solen

aparèixer fins al cap d'un mes a partir de l'aparició de la proteïnúria⁶, i malgrat aparèixer poden passar desapercebudes a causa de la característica focal de la malaltia, doncs la zona biopsiada podria no contenir cap glomèrul esclerosat que ens proporcionés el diagnòstic⁵¹. Així, el diagnòstic de recidiva de GESF té un alt valor predictiu positiu quan coincideixen les característiques clàssiques, la proteïnúria severa i les lesions escleròtiques segmentàries glomerulars a la biòpsia, però la seva absència no exclou el diagnòstic.

D'aquí sorgeix la necessitat de buscar proteïnes útils coma biomarcador que permetin un ràpid diagnòstic així com un pronòstic de la recidiva de GESF, el qual a més de ser beneficiós per aquests pacients amb risc de recidiva proporcionaria noves idees sobre els mecanismes patogènics de la GESF idiopàtica. Per tot això es va dissenyar un estudi en el qual mitjançant tècniques proteòmiques es pretenia detectar els potencials inductors de la malaltia a més de molècules que poguessin servir com a marcadors pronòstics de recidiva. Es van trobar específicament associades a GESF idiopàtic unes formes d'apolipoproteïnes de HDL, una en plasma de pacients GESF idiopàtics i absent en el plasma dels pacients GESF familiars (on la causa de la malaltia és d'origen genètic), l'apolipoproteïna A-II en la seva forma monomèrica (ApoA-II_m)²⁶², i una altre present en la orina de pacients trasplantats amb recidiva de GESF i absent en aquells que no recidivaven després del trasplantament, l'apolipoproteïna A-Ib (ApoA-Ib)⁸, la qual és va identificar com una forma modificada de ApoA-I que presenta un pes molecular més elevat que la seva homòloga estàndard de plasma.

ZAG i ApoA-Ib com a biomarcadors de recidiva

En el primer estudi realitzat de comparació proteòmica publicat per Lopez-Hellin⁸ que consistia en la comparació dels mapes proteòmics 2D-PAGE de plasma i orina provinents de pacients GESF recidivants i GESF no recidivants, es van detectar set proteïnes diferencials presents únicament en la orina dels pacients GESF recidivants, aquestes proteïnes eren l'alfa-1-antitripsina (A1AT), el precursor α -1-microglobulina/bikunina (AMBP), la hemopexina (HEMO), la transtiretina (TTHY), la zinc- α -2-glicoproteïna (ZAG) i la Apolipoproteïna A-I (ApoA-I). D'aquestes, cinc (A1AT, AMBP, RET4, TTHY i HEMO) es van descartar, doncs no estaven específicament associades a la recidiva, ja que prèviament s'havia descrit la seva associació a altres malalties renals, així doncs la A1AT es troba incrementada en el dany renal agut²⁶³ i en síndromes nefròtics produït per diverses causes²⁶⁴, la AMBP urinària es troba associada a la funció tubular deteriorada²⁶⁵, a glomerulopaties²⁶⁶ i al trasplantament renal²⁶⁷, la funció tubular deteriorada també augmenta els nivells de RET4²⁶⁵ i hi ha glomerulopaties de diversos orígens que augmenten els nivells de TTHY així com de HEMO²⁶⁸.

Per a la validació de les altres 2 proteïnes restants (ApoA-I i ZAG), es va realitzar una mesura individual per western blot amb una ampliació de pacients entre els quals s'hi incloïa pacients GESF familiar per tal de determinar així si les proteïnes eren específiques de GESF idiopàtics i pacients amb nivells de proteïnúria i albúmina plasmàtica semblant als pacients GESF recidivant però que no tenien antecedents de GESF per tal de verificar que la presència de ApoA-I i ZAG no era un artefacte de la proteïnúria.

ZAG és una proteïna que ha estat relacionada amb la mobilització lipídica²⁶⁹, a més s'ha observat que augmenta la seva presència en orina en condicions de consum energètic²⁷⁰ i sol trobar-se nivells baixos d'aquesta en la lesió renal aguda²⁷¹. L'anàlisi individual mitjançant western-blot va permetre determinar que malgrat que hi havia diferències significatives pel que fa a la presència de ZAG a nivell urinari entre el grup de pacients GEFS recidivants i els grups de pacients GESF no recidivants i GESF d'origen genètic, aquesta proteïna no permet diferenciar entre pacients GESF recidivants de pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF, per tant, al no ser específic no seria útil com a biomarcador, tal i com es pot apreciar a la figura 18.

L'ApoA-I és una proteïna petita de 28KDa, la qual és la proteïna majoritària que conforma les HDL i que sol estar absent en la orina de controls sans i de pacients amb proteïnúria glomerular²⁷²⁻²⁷⁴. La presència d'ApoA-I en orina s'ha associat prèviament a proteïnúria post-renal i hematúria²⁷⁵, detectant-la per exemple mitjançant tècniques de proteòmica en pacients amb càncer de bufeta^{274,276}. La diferència principal d'altres estudis proteòmics realitzats on apareixia ApoA-I amb el nostre estudi, és el fet, que l'ApoA-I detectada de manera diferencial en els pacients GESF recidivants no correspon a l'ApoA-I estàndard de 28KDa, si no que es detecten diverses formes modificades d'ApoA-I d'un pes o càrrega diferents a l'estàndard. De totes aquestes formes detectades, l'ApoA-Ib està present amb més intensitat que la resta en els pacients GESF recidivants, a més d'estar absent en l'orina dels altres grups estudiats, inclosos els pacients amb proteïnúria no relacionada amb la malaltia de GESF, i absent també en plasma.

L'ApoA-Ib és un forma de més pes molecular que l'ApoA-I, i aquest increment de pes molecular podria correspondre a canvis postraduccionalis d'ApoA-I com acilacions²⁷⁷ o glicacions²⁷⁸ ja descrites prèviament. Malgrat que la majoria de pacients GESF no recidivants trasplantats no mostraven cap banda corresponent a ApoA-I en el western-blot de validació, en alguns casos els pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF presentaven diferents bandes de menys pes molecular corresponents a ApoA-I , però no l'ApoA-Ib (figura 19).

En aquest primer estudi es van detectar tres resultats discrepants entre els 119 pacients estudiats. Dos d'aquets resultats corresponien a falsos positius (un en pacients GESF no recidivants i l'altre en pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF), aquests valors discrepants podrien ser causats per la manca de sensibilitat del diagnòstic clínic, doncs, la cicatrització glomerular ve precedida per un període indeterminat d'acció del factor permeabilitzador, amb proteïnúria activa però sense lesió histològica, aquest fet, junt amb la naturalesa focal de la malaltia indiquen que una biòpsia negativa no exclou necessàriament l'existència de GESF idiopàtica⁵¹. En els pacients estudiats es van realitzar diversos diagnòstics clínics de recidiva on l'ApoA-Ib positiva estava acompanyada de biòpsies sense lesió de GESF, indicant que l'aparició d'ApoA-Ib precedia la lesió histològica i suggerint així que Apo-Ib podria ser útil per incrementar la sensibilitat del diagnòstic clínic. El tercer resultat discordant corresponia a un fals negatiu en el grup de pacients recidivants, però en estudiar més a fons les característiques clíniques d'aquest pacient es va observar que presentava un baix nivell de proteïnúria, el que indicaria que la malaltia estava en remissió, a més de que la mostra d'orina obtinguda per a la

realització del western-blot de la validació individual corresponia a orina extreta després del tractament en plasmafèresis, donant indicis de que aquest tractament podria afectar a la presència d'ApoA-Ib.

Per tal de valorar fins a quin punt la plasmafèresis afectava al resultat del WB es van analitzar diverses mostres en diferents moments mostrals de dos pacients que van fer recidiva post-trasplantament, però amb la diferencia que mentre que en un pacient el tractament amb plasmafèresis permetia una remissió de la malaltia, en l'altre pacient aquest tractament no era eficaç. Els resultats obtinguts mitjançant aquest assaig van ser que mentre que en el primer cas s'observava l'ApoA-Ib just abans i just després del trasplantament, aquesta deixava d'aparèixer després del tractament amb plasmafèresis, però per contra en el segon cas tot i el tractament amb plasmafèresis, ApoA-Ib apareixia en totes les mostres obtingudes durant el procés (abans i després del trasplantament), tot i que si que s'observava un lleugera disminució de la intensitat en les mostres posteriors a la plasmafèresis (figura 21). Així doncs, podem afirmar que ApoA-Ib es pot veure afectada per la plasmafèresis, però sembla que connecta amb l'eficàcia de la plasmafèresis en fer remetre la recidiva de GESF.

Tot i que en aquest punt no hi ha proves per determinar si ApoA-Ib és la conseqüència de la recidiva de GESF o esta relacionada amb la seva patogènia, si que tenim indicis sobre la seva implicació de les HDL o dels seus components en GESF, doncs en l'estudi realitzat amb pacients pediàtrics, on es comparava plasma de GESF idiopàtics i GESF secundaris d'origen genètic, també es va detectar una forma diferencial de ApoA-II, un altre component de les HDL, present en el plasma dels GESF idiopàtics i absent en els de tipus

genètic¹²³. En altres estudis s'ha demostrat que components de les HDL són capaços d'inhibir la permeabilitat glomerular a l'albumina induïda pel plasma de pacients GESF²⁷⁹. També s'han associat a GESF variants genètiques dels components de les HDL com la ApoE²⁸⁰ o la paraxonasa²⁸¹ i sobretot l'apolipoproteïna L1¹³⁶, demostrant així que hi ha una forta relació entre GESF i les HDL.

Les conclusions d'aquest primer estudi poden ser clínicament rellevants, doncs malgrat els tres resultats discordants ApoA-Ib es detecta molt significativament ($p < 0.00001$) en la orina de GESF recidivants respecte els altres grups d'estudi (GESF d'origen genètic, no recidivants o proteïnúries no relacionades amb GESF), amb una sensibilitat i una especificitat molt elevades, 92.8% i 98.1% respectivament, donant indicis de l'associació que existeix entre ApoA-Ib i la recidiva post-trasplantament (figura 20). A més també proporciona noves dades que donen suport a la relació prèviament descrita entre les partícules de HDL i la glomeruloesclerosi focal i segmentaria.

ApoA-Ib: biomarcador de recidiva

Degut al petit nombre de pacients inclosos a l'estudi precedent, va ser necessari validar l'associació d'ApoA-Ib amb la recidiva post-trasplantament de GESF, estudiant una nova cohort de 61 pacients, dels quals 37 eren GESF. En aquest nou estudi s'ha pogut confirmar que l'ApoA-Ib apareix en la recidiva de GESF, i no només permet diferenciar els GESF no recidivants dels que si que recidiven, si no també pacients trasplantats renals amb patologies subjacents no relacionades amb GESF amb una bona especificitat (87,5%) i una excel·lent sensibilitat (93,3%). La presència d'ApoA-Ib esta estadísticament relacionada

amb la recidiva post-Tx de GESF, però no a altres etiologies de dany de l'empelt que presenten proteïnúries de grau variable (figura 22B). Aquesta característica pot ser d'especial interès en biòpsies primerenques, fins a un mes després de la recidiva, quan aquesta biòpsia no és informativa perquè encara no ha donat temps a establir-se les lesions típiques de la glomeruloesclerosi focal i segmentaria. En aquests casos la determinació de ApoA-Ib en orina pot ser de gran ajuda en el diagnòstic de recidiva de GESF, doncs rarament es detecta en casos de proteïnúria no relacionada amb GESF (12.5%). A més, l'alt valor predictiu negatiu d'ApoA-Ib (95,5%) indica que el marcador és especialment adequat per evitar el diagnòstic de GESF quan l'ApoA-Ib és negativa, cosa que complementa el gran valor predictiu positiu de la biòpsia renal. Aquestes dades demostren que ApoA-Ib pot ser utilitzat com a biomarcador per distingir la recurrència post-trasplantament de GESF d'altres malalties no relacionades amb característiques clíniques similars.

Entre els 24 pacients inclosos en el grup de proteïnúries no relacionades amb GESF es van analitzar 11 pacients que presentaven glomerulonefritis recurrent (6 glomerulonefritis membranoproliferativa, 3 glomerulonefritis membranosa i 2 nefropatia per Ig A) en el seu ronyó natiu. D'aquest subgrup es va detectar 3 falsos positius per ApoA-Ib, 2 amb glomerulonefritis membranoproliferativa i 1 amb glomerulonefritis membranosa. Tanmateix, només 2 d'aquests pacients van mostrar recidiva de la malaltia primària després del trasplantament renal. Aquests resultats suggereixen que l'ApoA-Ib urinària està específicament relacionada amb la recidiva de GESF (figura 22A), però per descartar una associació d'ApoA-Ib amb altres malalties glomerulars

recidivants, s'hauria d'investigar en una cohort més gran d'aquest tipus de pacients.

Per tal de determinar definitivament que ApoA-Ib era independent als nivells de proteïnúria i creatinina, es van analitzar la proteïnúria i la creatinina sèrica de la cohort de pacients anteriorment esmentada conclouent que no hi havia cap relació entre ApoA-Ib i la proteïnúria o creatinina sèrica (figura 23), descartant de manera definitiva que l'aparició d'ApoA-Ib a orina sigui conseqüència de la pèrdua general de proteïnes plasmàtiques associada a GESF.

Detecció automatitzada de ApoA-Ib

El fet que ApoA-Ib sigui un bon biomarcador de recidiva post-trasplantament, a més d'un potencial biomarcador pronòstic de la recidiva abans del trasplantament, ens va fer plantejar si seria possible la seva detecció de forma rutinària en el laboratori de bioquímica clínica del hospital mitjançant un dels aparells ja existents, com és el nefelòmetre BN ProSpec, per aquest motiu es va fer una primera aproximació a aquest tipus de detecció i es va estudiar el rendiment analític del nefelòmetre respecte a la detecció que s'havia dut a terme fins ara al laboratori mitjançant western-blot.

Després d'analitzar 57 mostres, entre les quals hi havia mitjançant la determinació per western-blot, 8 mostres ApoA-Ib positives (dos de les quals eren falsos positius) i 49 mostres ApoA-Ib negatives (de les quals 1 era un fals negatiu), es va observar que els resultats obtinguts de l'anàlisi amb el nefelòmetre (límit inferior de detecció de 5.06 mg/dl) presentaven una sensibilitat pràcticament un 30% inferior a la obtinguda amb el western-blot i

una especificitat de quasi un 20% per sota. En el cas del nefelòmetre i a diferència dels resultats obtinguts per western-blot, el valor predictiu positiu era molt baix, fet que venia donat per la gran quantitat de falsos positius que s'obtenien en analitzar les mostres amb el BN ProSpec, ja que l'anticòs amb el que treballa detecta tant l'ApoA-I estàndard com la ApoA-Ib, fent així que totes aquelles mostres que contenen l'ApoA-I o fragments d'aquesta però no l'ApoA-Ib, siguin determinades com a positives malgrat no ser el cas.

En resum, actualment i amb els aparells i reactius dels que es disposa en el laboratori de bioquímica clínica del hospital no seria possible la detecció automàtica de ApoA-Ib, si no que seria necessari el desenvolupament d'un anticòs específic per a aquesta forma de la ApoA-Ib que pogués ser incorporat al panell d'anticòsos que ja utilitzen els nefelòmetres automatitzats, o bé utilitzar sistemes independents d'anticòs, com l'espectrometria de masses.

Valor pronòstic de ApoA-Ib en la recidiva de GESF.

Un punt important a estudiar era la possible capacitat predictiva d'ApoA-Ib, es a dir, determinar si la detecció precoç d'ApoA-Ib en orina de GESF idiopàtics podria preveure la recidiva post-trasplantament abans que les manifestacions clíniques fossin evidents.

El valor pronòstic d'ApoA-Ib és complex de demostrar, ja que requereix el seguiment superior a un any després del trasplantament d'un nombre important de pacients diagnosticats de GESF idiopàtic. El fet que alguns pacients en llista d'espera per a un trasplantament siguin anúrics, com ja s'espera, disminueix encara més el nombre de mostres que potencials a recollir. Tenint en compte aquestes dificultats, vam dissenyar un estudi per comprovar si es podia

detectar ApoA-Ib abans de les recidives, valorant la possibilitat de que ApoA-Ib fos detectada abans del trasplantament o que es detectes ApoA-Ib després del trasplantament, però abans de la recidiva de la malaltia.

Quatre dels 13 pacients estudiats van presentar una recidiva de GESF durant el primer any després del trasplantament i l'ApoA-Ib va predir correctament el resultat del post-trasplantament (recidiva de GESF) en tres d'aquests pacients. L'ApoA-Ib va ser positiva abans del trasplantament en dos pacients dels 4 pacients que presentaven recidiva de GESF (taula 25; GESF-33 i GESF- 9). L'episodi de recidiva del pacient GESF-33 no va entrar en remissió durant el període d'estudi, fins i tot després del tractament de plasmafèresi el pacient presentava l'ApoA-Ib en totes les mostres d'orina recollides durant un any. D'altra banda, el pacient GESF-9 va respondre al tractament de plasmafèresi després de la recidiva i ApoA-Ib es va tornar negativa quan es va remetre la malaltia. El pacient GESF-16, malgrat ser anúric abans del trasplantament, va ser positiu per ApoA-Ib prèviament a una recidiva post-trasplantament immediata, que es va remetre espontàniament, moment en que ApoA-Ib es va tornar negativa (taula 25 resultats). La resta de pacients que no van presentar recidiva, no només durant el primer any després del trasplantament, sinó també els anys posteriors, van ser negatius per ApoA-Ib en totes les seves mostres, excepte una mostra del pacient GESF-24. Com era d'esperar, cap dels pacients no recurrents presentava alts nivells de proteïnúria durant un any després del trasplantament, excepte el GESF-15 al final del període de seguiment. En aquest cas es va descartar una recidiva de GESF mitjançant una biòpsia que mostrava signes clars de rebuig humoral crònic,

cosa que també quedava confirmada pel fet que ApoA-Ib era negativa (taula 23).

Com que la presència d'ApoA-Ib en l'orina no depèn dels nivells de proteïnúria (figura 23), els resultats d'ApoA-Ib observats en aquests pacients poden atribuir-se directament a recidives de GESF. Addicionalment, vam observar que la proporció de pacients GESF en llista d'espera que eren positius per ApoA-Ib en orina (37,9%) era similar a la incidència mitjana de recidives de GESF després del trasplantament, la qual es calcula que és del 30-50%^{282,283}, fet que reforça el valor predictiu d'ApoA-Ib. Si això es confirma en estudis més amplis indicaria que ApoA-Ib pre-trasplantament pot estratificar els pacients segons el seu risc de recidiva de GESF post-trasplantament.

La principal limitació del nostre estudi és la quantitat de pacients de GESF idiopàtica dels que es disposa. La GESF idiopàtica és una malaltia amb una baixa incidència de 0,2 a 1,8 / 100,000 per any, depenent de la cohort^{48,284} i la recidiva apareix en un 30-40% dels pacients una vegada trasplantats³¹, això fa que en general els estudis de GESF idiopàtica es realitzin amb cohorts petites de pacients^{86,119,285}. I malgrat que la quantitat de pacients inclosos no es del tot suficient per extreure'n una conclusió definitiva, les dades obtingudes suggereixen fortament que ApoA-Ib seria útil en l'avaluació del risc de recidiva de cada un dels pacients en una etapa primerenca, fins i tot abans de ser trasplantats.

El fet que GESF idiopàtica sigui causada per un factor plasmàtic encara desconegut^{48,83,286,287} i atès que hem observat que ApoA-Ib està específicament relacionada amb les recidives de GESF i que desapareix amb la remissió de la

recidiva de GESF, tant d'una manera espontània com en resposta al tractament, podríem dir que aquesta forma de més pes molecular que d'apolipoproteïna A-I juga un paper important en la patogènia de GESF, ja sigui de forma directa o de manera indirecta.

Validació de ApoA-II com a possible factor plasmàtic causant de GESF

En un estudi previ del grup¹²³ on es buscava el factor plasmàtic causant de GESF, es van comparar els mapes proteòmics (2D-PAGE) d'un pool de plasma de pacients GESF idiopàtics i un pool de plasma de pacients GESF d'origen genètic (GESF familiars), el que va permetre observar que hi havia una proteïna diferencial present en els pacients GESF idiopàtics però absent en els GESF genètics, aquesta proteïna corresponia a l'apolipoproteïna-II, la qual apareixia en la forma monomèrica (ApoA-II_m).

La ApoA-II és un proteïna petita de 14KDa, la qual és la segona proteïna majoritària que conforma les HDL, i igual que la ApoA-I, sol estar absent en la orina de controls sans i de pacients amb proteïnúria glomerular²⁷³. I tal com succeeix amb la ApoA-I la presència de ApoA-II en orina s'ha associat tècniques de proteòmica en pacients amb càncer de bufeta²⁷⁴. El curiós d'aquesta proteïna detectada en el 2D-PAGE dels GESF idiopàtics és el fet que per a la realització del 2D-PAGE s'utilitzen agents reductors, pel que s'esperaria que en ambdós grups d'estudi s'observés l'ApoA-II en estat monomèric, pel que podria ser que els pacients GESF idiopàtics presentin algun tipus de factor que facilita aquesta reducció el qual està absent en els pacients GESF familiars.

En intentar validar aquest resultat individualment mitjançant western-blot, vam poder observar que aquesta forma apareixia en els dos grups d'estudi, i no només això si no que els resultats eren baixament reproduïbles (figura 26A). Mitjançant la quantificació d'aquesta forma de ApoA-II, vam poder observar que malgrat que els GESF idiopàtics presentaven nivells més alts de ApoA-II_m, aquests no eren significativament superiors als nivells de ApoA-II_m dels pacients GESF familiars (figura 26B), el que descartaria aquesta proteïna com a possible factor plasmàtic causant de GESF idiopàtica. Malgrat que no s'ha pogut validar l'associació exclusiva de la ApoA-II_m amb GESF idiopàtics, el fet que sigui una proteïna abundant de les HDL, igual que ho és la ApoA-I, reforça la idea que hi ha algun tipus de relació de les partícules de HDL o dels seus components amb la malaltia de GESF.

A causa de la baixa reproductibilitat que tenia l'ApoA-II_m plasmàtica per western-blot i al fet que la seva quantificació no permetés diferenciar significativament els GESF idiopàtics dels GESF genètics, però al estar d'alguna forma relacionada amb l'ApoA-I, doncs ambdues proteïnes són components de les HDL, va fer pensar que potser la determinació de ApoA-II en orina permetria reforçar encara més l'ús d'aquestes dos proteïnes com a biomarcadors de recidiva post-trasplantament. Per aquest motiu es va procedir a determinar la presència en orina d'ApoA-II en el grup de 119 pacients utilitzats en la validació d'ApoA-I_b. Els resultats obtinguts pel que fa a la distribució d'ApoA-II positius en els diferents grups estudiats (figura 27) va ser molt semblant a la obtinguda per l'ApoA-I_b (figura 20), tot i així la sensibilitat (80.8%) i l'especificitat (78.6%) observades en l'ApoA-II eren inferiors a les observades en ApoA-I_b (98.1% i 92.8% respectivament), descartant l'ús

d'ApoA-II com a biomarcador de recidiva post-trasplantament enfront de l'ús de ApoA-Ib.

Tots aquests resultats van fer que la línia de recerca de la ApoA-II com a tal quedés aturada en aquest punt, dedicant tots els esforços en la caracterització de la ApoA-Ib, per tal de poder entendre si hi havia una relació directa entre ApoA-Ib i el desenvolupament de la malaltia de GESF que li conferís en aquesta proteïna el títol de possible factor permeabilitzador.

Caracterització de ApoA-Ib

Amb la finalitat de saber com la ApoA-Ib podia afectar en el seu entorn fisiològic, i així tenir indicis de si podia ser conseqüència o causa de la malaltia, a més de poder detectar-la més específicament, es va realitzar la caracterització d'aquesta ApoA-Ib per així saber quina modificació li conferia aquest augment de pes molecular.

Aquest augment de pes molecular podia venir donat per dos causes principals, un primera que implicava el gen *APOA1*, es a dir, variants genètiques que donessin directament un augment de pes molecular com podria ser un polimorfisme exònic, present en tots els individus amb ApoA-Ib i que provoques un allargament de la cadena polipeptídica o un canvi que doni lloc a un splicing alternatiu o indirectament que un canvi d'aminoàcids permeti una modificació post-traducciona no permesa en l'ApoA-I salvatge. La segona causa que podria donar a lloc a l'augment de massa seria el fet de patir modificacions post-traduccionals sobre la proteïna estàndard o processaments anòmals de l'apolipoproteïna A-I.

1. Determinació de variants genètiques:

El gen *APOA1* està format per 4 exons i 3 introns. La traducció que permet l'obtenció de la pre-pro-proteïna, la qual conté el pèptid senyal, s'inicia a partir del segon exó, i és la meitat del tercer exó i el quart que conformaran la proteïna final de 28.1KDa. Actualment s'han descrit més de 60 variants d'*APOA1* la meitat de les quals es troben associades a baixes concentracions d'ApoA1-HDL i estan estretament relacionades amb el risc de malalties cardiovasculars²³¹⁻²³⁵, però també s'han associat mutacions d'ApoA-I a dany renal, a causa de deposicions amiloides, entre les quals trobem la p.G26R²⁸⁸, p.L60R²⁸⁹ i la p.A175P²⁹⁰.

Per a la cerca de variants genètiques comuns entre els pacients GESF recidivants capaces de produir un augment de pes molecular es va realitzar la seqüenciació completa del gen *APOA1*, incloent exons, introns i la zona 5'UTR. Aquest estudi es va realitzar sobre un grup de 24 pacients entre els que s'inclouen 8 pacients recidivants (que havien presentat ApoA-Ib en orina) i 16 pacients que no presentaven aquesta ApoA-Ib en l'orina. Per a la determinació de les diferències entre els dos grups d'estudi es van alinear les seqüències obtingudes amb la seqüència consens (NCBI: NG_01202.1).

Es van identificar un total de 7 polimorfismes (taula 27), entre els quals hi havia el -75G>A situat a la zona 5'UTR, aquest polimorfisme ha estat prèviament associat al risc de patir càncer renal, a susceptibilitat de patir dany cardiopulmonar agut després d'una cirurgia de bypass i com a marcador del risc de patir càncer de mama entre d'altres²⁹¹⁻²⁹³. Altres polimorfismes identificats eren el IVS1+67C>T i IVS+33 T>C que juntament amb el citat

anteriorment també han estat associats a dislipèmia²⁹⁴. Però en cap cas s'ha trobat bibliografia que relaciones algun dels polimorfismes identificat amb la malaltia GESF.

Amb l'estudi de les freqüències al·lèliques de cada un dels polimorfismes identificats (taula 27) hem pogut demostrar que els pacients amb recidiva de GESF no presenten variacions genètiques comunes en el gen *APOA1*, que puguin explicar l'augment del pes molecular d'ApoA-Ib. No s'ha detectat cap variació genètica a la regió exònica dels pacients GESF ApoA-Ib positius respecte a la seqüència de consens d'*APOA1* o dels pacients negatius d'ApoA-Ib que han estat seqüenciats. Tots els polimorfismes han estat localitzats en regions intròniques i 5'UTR, sense poder produir ni alterar la proteïna ApoA-I, i sense crear nous llocs d'splicing alternatius. Aquests resultats demostren que ApoA-Ib no és una variant genètica d'ApoA-I. A més, tot i que aquest estudi no era un estudi poblacional basat en cas-control, les variacions genètiques observades en els pacients amb GESF ApoA-Ib positius no eren diferents de les observades en pacients sense ApoA-Ib, tal com s'indica a la taula 27.

2. Determinació de modificacions post-traduccionals:

Existeixen diferents tipus de modificacions post-traduccionals de les quals pot ser susceptible una proteïna, però que puguin donar lloc a l'augment de pes molecular al voltant de 1-2kDa les possibilitats es redueixen a glicosilacions ja siguin N o O-glicosilacions.

Un altre possibilitat és la glicació o glicosilació no enzimàtica, la qual ja ha estat reportada sobre ApoA-I²⁹⁵. El procés de glicació és un procés relacionat

amb alts nivells de glucosa i d'agents oxidants a la sang, pel qual es produeix una reacció dels sucres que passen a lligar-se a la proteïna (metilgloxal, glixal, 3-desoxiglucosona)²⁹⁶. Aquest tipus de modificació sol afegir de 30 a 200 Da al pes molecular original de la proteïna, pel que no podria explicar l'augment de massa que s'observa en ApoA-Ib. Una glicosilació no enzimàtica múltiple capaç d'explicar un augment d'1KDa generaria un conjunt de molècules d'ApoA-I amb diferents glicacions, que anirien des de cap fins al màxim teòric (ApoA-I té 35 possibles llocs de glicació: 21 lisines i 14 arginines), aquestes molècules de ApoA-I es veurien en el 2D-PAGE com una banda ampla que va des de la massa d'ApoA-I no glicada fins a l'ApoA-I totalment glicada en lloc de les dues taques o bandes corresponents a ApoA-I i ApoA-Ib que observem en el 2D-PAGE i en el WB respectivament (figura 13 i 14). Així doncs la glicosilació no enzimàtica quedaria descartada com a causant de la ApoA-Ib.

Les N-glicosilacions es van poder descartar mitjançant l'ús de l'enzim PNGase F, el qual es una amidasa que elimina els oligosacàrids units a asparagina. En la figura 28 es pot observar com malgrat l'ús de l'enzim en mostres que presenten la ApoA-Ib, aquesta no disminueix de pes molecular, per contra el control positiu, la transferrina, sí que disminueix de pes molecular, doncs gràcies a l'acció de la PNGasa les dos N-glicosilacions que presenta en les posicions Asn432 i Asn630²⁵⁵ són escindides. Aquesta prova ens permet descartar la presència de N-glicosilacions en la ApoA-Ib.

Per a la determinació de les O-glicosilacions es van realitzar dos aproximacions, la primera consistia en una tinció específica de O-glicosilacions i la segona mitjançant MALDI-TOF i LC-MS/MS. Per a la tinció es va utilitzar el

reactiu comercial ProQ Emerald 300, aquest reactiu reacciona amb els grups de carbohidrats àcid periòdic oxidats i genera una senyal fluorescent en les glicoproteïnes. En analitzar el mapa proteòmic d'un pool de pacients GESF recidivants, els quals es va comprovar que presentaven la ApoA-Ib mitjançant la tinció de proteïnes totals, es va poder observar que en el punt on s'hauria de visualitzar ApoA-Ib no hi havia senyal (figura 29), descartant així la presència de O-glicosilacions. Aquest resultat es va validar amb l'anàlisi d'ApoA-Ib per MALDI-TOF i LC-MS/MS, on es va detectar el podria correspondre a una O-glicosilació en la Ser-166, la qual va ser descartada en posteriors anàlisis amb equips de més elevada resolució. Per tant quedava descartat que l'augment de pes que presentava la ApoA-Ib fos causat per una N o O-glicosilació.

Finalment, es va considerar la possibilitat que l'augment del pes molecular d'ApoA-Ib fos causa d'un procés de maduració incompleta d'ApoA-I. Aquest procés de maduració requereix un primer pas en el qual el pèptid senyal és escindit de manera co-translacional en l'interior cel·lular i posteriorment hi ha un segon pas d'escissió, on el pro-pèptid s'elimina per donar lloc a l'ApoA-I madura. Aquest segon pas de divisió es produeix fora de la cèl·lula, ja que el pro-pèptid està present en la proteïna secretada²⁹⁷. La pro-apoA-I es detecta en plasma, sent aproximadament el 7% del total de la ApoA-I, percentatge que augmenta en circumstàncies patològiques²⁹⁸.

Es van aïllar i analitzar mitjançant LTQ-Orbitrap les taques corresponents a ApoA-Ib i ApoA-I (en el cas de ser-hi) de la orina i les taques corresponents a ApoA-I i pro-ApoA-I del plasma de sis pacients GESF recidivants. Després d'estudiar la cobertura per cada una de les taques analitzades (figura 31) es va

observar que les mostres que corresponien a ApoA-Ib presentaven una seqüència extra d'aminoàcids absent en la ApoA-I (d'orina i de plasma). Aquesta seqüència, a diferència de la taca de pro-ApoAI on la cobertura observada era la corresponent a tot el pro-pèptid (N-₂₂RHFWQQ₂₄-C), cobria únicament una part del pro-pèptid, concretament els 3 últims aminoàcids (N-₂₂WQQ₂₄-C), la massa teòrica dels quals seria 460.49 Da, el que podria explicar la diferència de pes observada entre ApoA-Ib i ApoA-I. El fet que no estigui el pro-pèptid sencer i que per tant el final N-terminal d'ApoA-Ib sembla començar a triptòfan en posició 22 en comptes de l'arginina a la posició 19 podria explicar el canvi de punt isoelèctric observat en ApoA-Ib. Així doncs el punt isoelèctric de la pro-ApoA-I plasmàtica (AA 19-267) és de 5.45, mentre que el punt isoelèctric teòric de la seqüència d'aminoàcids 22 a 267 seria de 5.27.

Aquest pro-pèptid tot i que és essencial per a la síntesis i secreció efectives de ApoA-I, també s'ha observat que la posterior escissió es un requisit indispensable per a l'efectiva interconversió de subfraccions de HDL^{218,219}. Novament es mostra un forta relació entre la malaltia de GESF i les HDL o algun dels seus components, com ja ha estat reportat en altres estudis^{279-281,299}.

Efecte d'ApoA-Ib en les HDL

Per poder desvetllar quin tipus d'implicació podria tenir ApoA-Ib en el seu entorn fisiològic així com en un intent de trobar un marcador substitutiu per a ApoA-Ib en sang, es van explorar els possibles efectes posteriors causats per l'alteració present en ApoA-Ib sobre les partícules HDL, sent ApoA-I el seu principal component proteic.

Hem utilitzat un nou enfocament per detectar la distribució d'ApoA-I en subpoblacions de HDL. Tot i que les tècniques estàndard requereixen l'aïllament d'aquestes HDL del plasma abans de la separació de fraccions i quantifiquen la proteïna total²⁰⁹ en el nostre cas hem utilitzat una quantificació immunoquímica d'ApoA-I en una electroforesi nativa de plasma total. Aquest procés permet, a més, determinar la distribució d'ApoA-Ib entre les subfraccions HDL, la detecció d'una fracció de baix pes molecular inferior a 55kDa que inclou l'ApoA-I lliure que no es pot detectar en determinacions convencionals que impliquen l'aïllament de les HDL del plasma.

Es va estudiar un grup de pacients amb GESF recidivants amb ApoA-Ib en orina, un grup de GESF no recidivants sense ApoA-Ib i un tercer grup de pacients amb un rang de proteïnúria similar als pacients GESF recidivants però que no sense antecedents de GESF i també sense ApoA-Ib en l'orina, aquest tercer grup ens permetia compensar els possibles efectes de la pèrdua de proteïnes dels lípids plasmàtics. No es van trobar diferències en la concentració de colesterol total o colesterol lligat a HDL (taula 28), però sí que hi va haver diferències en la distribució de les diferents fraccions de HDL (figures 32 i 33). La fracció A3 es trobava disminuïda considerablement ($p < 0.01$) en els pacients GESF recidivants (ApoA-Ib positius), respecte els altres dos grups d'estudi (ApoA-Ib negatius), mentre que la fracció A5 corresponent a l'apoA-I/ApoA-Ib no unida a HDL incrementava significativament ($p < 0.001$) en el grup corresponent als pacients ApoA-Ib positius. En cap cas s'observen diferències pel que fa a la distribució de les diferents subfraccions de HDL entre els dos grups ApoA-Ib negatius (GESF-NR i P-noGESF) (figura 33A). Es va interpretar que ApoA-Ib podria vincular-se més feblement a les HDL o interferir amb la

unió de l'ApoA-I estàndard, el que faria augmentar proporcionalment la quantitat d'ApoA-Ib o ApoA-I lliure, quedant reflectida aquesta correlació inversa en l'anàlisi de regressió ($p < 0.01$) de la figura 33B.

A causa del petit pes molecular, l'ApoA-I o ApoA-Ib lliure s'aclareixen molt ràpidament de la sang a l'orina. ApoA-I estàndard no es sol observar en l'orina²⁷²⁻²⁷⁴ però en els pacients GESF recidivants es detecta l'ApoA-Ib però no l'ApoA-I estàndard⁸. Es postula que ApoA-Ib s'uneix de forma feble a l'HDL, circula a la sang com a proteïna no unida i s'aclareix ràpidament a l'orina, on es pot detectar.

També hem demostrat que la proporció fracció A5 / A3 és major en els pacients amb recidives de GESF en comparació amb els altres dos grups testats (GESFN no recidivants i proteïnúries no relacionades amb GESF, Figura 34A). Aquesta relació de les fraccions A5 / A3 podria discriminar la proteïnúria relacionada amb la recidiva de GESF d'altres tipus de proteïnúria d'una manera similar a la com ho fa l'ApoA-Ib, sent així un marcador complementaria a ApoA-Ib, que a més ens proporcionaria l'avantatge de que al ser una determinació plasmàtica es podria determinar en pacients anúrics. L'anàlisi ROC de la relació A5 / A3 mostra el seu gran potencial com a marcador diagnòstic de recidives de GESF (Figura 34B), amb un rendiment diagnòstic similar al obtingut amb ApoA-Ib. Aquesta alteració de les HDL, permet reforçar la hipòtesis d'una possible relació entre l'ApoA-Ib i la síndrome nefròtica via les HDL.

Efecte d'ApoA-Ib en biòpsies renals

Està descrit que els dipòsits proteics en el glomèrul poden ser causa de nefropaties com per exemple la nefropatia per IgA²⁵⁸ o la nefritis lúpica^{300,301} on es produeixen dipòsits de C4d (fracció del component del complement 4). També s'ha observat que la deposició d'apolipoproteïnes juga un paper en la coagulació i la fibrinòlisi dins dels glomèruls en pacients amb malalties glomerulars³⁰². També existeix l'amiloïdosi renal hereditària on s'ha observat que mutacions en el gen *APOA1* provoquen una inestabilitat en l'ApoA-I fent que es formin agregats filamentosos d'aquesta que en dipositar-se al glomèrul causen la lesió glomerular que acabarà desenvolupant la malaltia renal²⁵⁹⁻²⁶¹. Tots aquests indicis reportats feien pensar en una possible implicació entre la ApoA-Ib i el glomèrul on s'acabés produint igual que en el cas de l'amiloïdosi o la nefropatia per IgA dipòsits d'ApoA-Ib que acabessin donant lloc a la GESF i les seves recidives.

Per a la detecció d'aquets possibles dipòsits es van immunotenyir amb anticòs contra l'apoA-I/ApoA-Ib biòpsies de dos grups de pacients, un primer grup estava format per pacients amb GESF recidivants amb ApoA-Ib positiva en orina (figura 36), i el segon grup estava format per pacients amb malalties renals d'etiologia diferent a GESF (figura 35), entre els que hi havia hipoplàsia renal congènita, insuficiència renal no filiada i glomerulonefritis membranoproliferativa. No es van detectar diferències en quant a la tinció amb ApoA-I entre els dos grups d'estudi, a més de no observar cap tipus de dipòsits d'ApoA-I que pogués reforçar la nostra hipòtesis.

Malgrat tot no es descarta que hi pugui haver alguna interacció transitòria d'ApoA-Ib amb el glomèrul i per tant no detectable amb aquesta tècnica, o que fins i tot hi hagi un dipòsit minoritari amb ApoA-I que seria també indetectable, doncs seria necessari l'ús d'un anticòs específic contra aquesta proteïna de més pes molecular que ens permetés diferenciar si hi ha alguna distribució diferencial de ApoA-Ib en el glomèrul.

Efecte d'ApoA-Ib in vivo

Esta àmpliament estudiat que el factor o factors causants de GESF han de ser plasmàtics^{48,286}, i s'ha comprovat que el plasma de pacients GESF idiopàtics és capaç d'augmentar la permeabilitat a l'albumina en glomèruls aïllats de rata² així com induir l'esborrament podocitàri i provocar proteïnúria en ser injectat en rates^{1,78,79,303}. Per tant, per obtenir una confirmació definitiva de si ApoA-Ib és o no causa directa de GESF i les seves recidives es va dissenyar una prova pilot (figura 37) que consistia en la injecció d'aquesta proteïna en rates i la posterior determinació de la proteïnúria. Per a dur a terme aquesta prova pilot eren necessaris dos punts clau, un consistia en obtenir el plasma d'un o varis pacients GESF idiopàtics capaços de produir la proteïnúria en rates i un segon punt consistia en obtenir una columna d'afinitat prou eficient com per eliminar tota l'Apo-I/ApoA-Ib del plasma d'aquests pacients.

Després de recollir orina de 12 pacients GESF recidivants (ApoA-Ib positius en orina) potencialment inductors de proteïnúria en rata i dur a terme la primera part de la prova pilot, vam poder obtenir un augment de la proteïnúria en rates en dos dels dotze casos provats (figura 38). Paral·lelament es va elaborar una columna d'afinitat amb partir d'1mg d'anticòs anti-ApoA-I (el qual

també reconeixia ApoA-Ib) i malgrat que si que es va aconseguir acoblar un 60% l'anticòs, la columna no era prou eficient per eliminar tota l'Apo-AI/ApoA-Ib present en el plasma, probablement perquè la lligació covalent de l'anticòs a la columna li fa perdre gran part de la seva activitat, fent així que aquest punt del projecte quedés parat a expenses d'aconseguir més finançament per a la realització d'una columna amb més contingut d'anticòs que ens permetés eliminar tota l'ApoA-I/ApoA-Ib plasmàtica i seguir així amb el disseny experimental plantejat (figura 37B), i determinar si ApoA-Ib és capaç per si sola d'induir proteïnúria en rates.

Després de la realització d'aquesta tesi s'ha demostrat en dos cohorts independents que ApoA-Ib és un bon biomarcador de recidiva post-trasplantament de GESF amb una sensibilitat i una especificitat del 92.8% i el 98.1% respectivament en el primer grup d'estudi de validació, i del 93.3% i 89.1% en el segon estudi de confirmació, a més de poder ser utilitzat com a biomarcador negatiu (valor predictiu negatiu del 99% en el primer grup i del 97.6% en el segon grup), es a dir l'absència d'ApoA-Ib permet excloure el diagnòstic de recidiva amb una elevada confiança, fins i tot en presència de proteïnúria severa.

S'ha pogut comprovar que complementa el diagnòstic clàssic basat en evidències histològiques en la biòpsia renal, sobretot en els casos primerencs on les lesions encara no s'han desenvolupat i que per tant el diagnòstic no és clar, a més, té com avantatge que és un biomarcador no invasiu que permet fer mesures fàcils i repetides amb un resultat qualitatiu.

Les dades obtingudes a partir del seguiment en el període d'un any de diversos pacients, indiquen que ApoA-Ib podria ser de gran utilitat en la predicció de la recidiva post-trasplantament de GESF. I en els casos on no es disposa d'orina, com és el cas dels pacients en diàlisi, la determinació de subclasses d'HDL permeten ser un biomarcador alternatiu a la ApoA-Ib.

Finalment ApoA-II sembla presentar una correlació amb ApoA-Ib pel que fa a les recidives de GESF però la sensibilitat i l'especificitat més baixes que les obtingudes amb ApoA-Ib no permetrien utilitzar-lo com a biomarcador alternatiu a ApoA-Ib.

Hem pogut determinar que ApoA-Ib és en realitat una forma de apolipoproteïna A-I amb una maduració errònia i que presenta una part del pro-pèptid unit a ella, donant-li així més pes molecular i un punt isoelèctric més bàsic del que s'esperaria per a la ApoA-I estàndard. A l'estar descrit que la presència del pro-pèptid d'ApoA-I produeix inestabilitat en les HDL, fent així que no madurin correctament^{218,219}, es va estudiar aquesta possibilitat, obtenint coma resultat que hi havia els pacients GESF recidivants presentaven més ApoA-I/ApoA-Ib lliure que els grups de pacients GESF no recidivants i els pacients amb proteïnúria no relacionada amb GESF, cosa que ens fa pensar que potser aquesta ApoA-Ib s'uneix més feblement a les HDL i que per tant en circular en sang com a proteïna no unida s'aclareix més ràpidament, el que respondria la pregunta de perquè tot i ser capaços de veure-la en orina, no podem trobar-la en sang. Que circuli de manera lliure en la orina i s'aclareixi ràpidament en el ronyó també dona peu a la hipòtesis de que aquesta forma anòmala de ApoA-I amb el pro-pèptid podria ser un dels factors plasmàtics catalitzadors de la malaltia de GESF.

Sabent que GESF idiopàtica està causada per un factor plasmàtic encara desconegut^{48,83,286,287,304}, i havent trobat que ApoA-Ib esta fortament relacionada amb les recidives de GESF a més de desaparèixer quan es produeix la remissió d'aquesta recidiva, ja sigui de manera espontània o en resposta al tractament, ens va fer pensar que aquesta forma anormal d'Apolipoproteïna A-I podria tenir un paper en la patogènia de GESF, ja sigui de manera directa o d'una manera indirecta. El fet de que aparegui només en els pacients recidivants i no en tots els pacients GESF idiopàtics es podria explicar tenint en compte que els pacients no recidivants estan en remissió, en fase no activa i sense proteïnúria, i que per tant seria interessant aconseguir una cohort més grans de pacients i determinar si tots els pacients GESF idiopàtics en fase activa de la malaltia presenten o no ApoA-Ib independentment de si després recidiven o no. La hipotètica acció patogènica de l'ApoA-Ib es podria donar indirectament a través de les alteracions que produeix sobre les HDL, doncs ja ha estat estudiada la important relació que tenen els lípids en el desenvolupament de la glomeruloesclerosi focal i segmentaria³⁰⁵. Podria ser que aquesta ApoA-Ib a causa del pro-pèptid interferís en el desenvolupament de les HDL, impeding la correcte formació de les diferents subfraccions de HDL en els pacients GESF recidivants i que aquest mal desenvolupament de les HDL acabes produint efectes en el ronyó que es traduirien en les lesions glomerulars, bé per dipòsit o per interacció dels lípids amb els podòcits³⁰⁶. Una altre alternativa seria una acció directa per dipòsits de la mateixa ApoA-Ib no unida a HDL sobre el ronyó que produís la lesió glomerular, d'una manera semblant a com succeeix amb l'amiloïdosi renal²⁵⁹⁻²⁶¹. Tot i que aquesta última

Discussió

hipòtesis es va intentar comprovar mitjançant la immunotinció de biòpsies renals, el fet de no disposar d'un anticòs específic contra ApoA-Ib no va permetre extreure'n conclusions definitives. Per aquest motiu la prova *in vivo* seria definitiva per saber si realment aquesta ApoA-Ib està directament implicada en la malaltia de GESF o es un conseqüència d'aquesta malaltia, la qual és una línia d'investigació que s'està duent a terme en el nostre laboratori per tal d'aclarir la implicació d'ApoA-Ib en la fisiopatologia GESF.

CONCLUSIONS

Conclusions

1. ApoA-Ib és un bon marcador diagnòstic de recidiva post-trasplantament, havent-la detectat en la orina amb una sensibilitat del 92.8% i una especificitat del 98.1%, així com un 99% i un 86.6% de valor predictiu negatiu i positiu respectivament.
2. L'absència d'ApoA-Ib en orina permet excloure un diagnòstic de recidiva de GESF amb una elevada probabilitat, fins i tot en presència de proteïnúria severa.
3. L'automatització de la seva mesura en nefelòmetres clínics amb anticòs contra ApoA-I és menys sensible i específica que la seva determinació manual per western-blot.
4. ApoA-II_m té una pitjor correlació amb la malaltia que ApoA-Ib.
5. ApoA-Ib no presenta cap modificació genètica específica en el gen *APOA1* diferent de l'ApoA-I estàndard.
6. L'augment de pes molecular d'ApoA-Ib es causat per la presència d'una part del pro-pèptid, concretament els tres últims aminoàcids (N₋₂₂WQQ₂₄-C).
7. No s'observen dipòsits d'ApoA-I diferencials en biòpsies de ronyó GESF recidivants respecte controls amb proteïnúria no relacionada amb GESF.
8. Hi ha una associació entre l'alteració de les fraccions A3 i ApoA-I lliure (A5) de les HDL i la presència d'ApoA-Ib, la qual no esta relacionada amb la proteïnúria ni amb la malaltia de GESF pròpiament.
9. L'anàlisi de la subclasse HDL podria constituir un marcador alternatiu per ApoA-Ib a la sang.

10. L'ApoA-Ib podria ser útil per detectar els pacients amb risc de recidiva post-trasplantament de GESF, malgrat que son necessaris estudis amb més pacients

BIBLIOGRAFIA

1. D'Agati, V. D., Kaskel, F. J. & Falk, R. J. Focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2398–411 (2011).
2. Savin, V. J. *et al.* Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* **334**, 878–83 (1996).
3. McCarthy, E. T., Sharma, M. & Savin, V. J. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **5**, 2115–2121 (2010).
4. Savin, V. J., McCarthy, E. T. & Sharma, M. Permeability factors in nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Research and Clinical Practice* **31**, 205–213 (2012).
5. Vinai, M., Waber, P. & Seikaly, M. G. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in renal allograft: an in-depth review. *Pediatr Transpl.* **14**, 314–325 (2010).
6. Canaud, G. *et al.* Recurrence of nephrotic syndrome after transplantation in a mixed population of children and adults: course of glomerular lesions and value of the Columbia classification of histological variants of focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrol Dial Transpl.* **25**, 1321–1328 (2010).
7. Lopez-Hellin, J. *et al.* Proteomic differential analysis of sporadic and genetic focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol.* **24**, 1777–1899 (2009).
8. Lopez-Hellin, J. *et al.* A Form of Apolipoprotein A-I Is Found Specifically in Relapses of Focal Segmental Glomerulosclerosis Following Transplantation. *Am. J. Transplant* **13**, (2012).
9. Frayn, K. N. *Características metabólicas de los órganos y tejidos.* (Ediciones Omega, S.A., 1998).
10. Brenner, B. M. & Rector, F. C. *The Kidney.* (Saunders, 2004).

Bibliografía

11. Hernando Avendaño, L. & Aljama García, P. *Nefrología clínica*. (Médica Panamericana, 2008).
12. CIN'2003. Dieguez. LA BARRERA DE FILTRACION GLOMERULAR. Available at: <https://www.uninet.edu/cin2003/conf/sdieguez/dieguez.html>. (Accessed: 16th September 2018)
13. Satchell, S. The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat. Rev. Nephrol.* **9**, 717–25 (2013).
14. Nielsen, R. & Christensen, E. I. Proteinuria and events beyond the slit. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 813–22 (2010).
15. Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K. & Mundel, P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **17**, 428–37 (2007).
16. Suh, J. H. & Miner, J. H. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat. Rev. Nephrol.* **9**, 470–7 (2013).
17. Thier, S. *Fisiopatología*. (Editorial Medica Panamericana, 1983).
18. Orth, S. R. & Rits, E. The nephrotic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1202–1211 (1998).
19. Kodner, C. Nephrotic Syndrome in Adults: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* **80**, 1129–1134 (2009).
20. Hull, R. P. & Goldsmith, D. J. A. Nephrotic syndrome in adults. *BMJ* **336**, 1185–9 (2008).
21. Siddall, E. C. & Radhakrishnan, J. The pathophysiology of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **82**, 635–642 (2012).
22. Trevisan, R., Dodesini, A. R. & Lepore, G. Lipids and renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, S145–S147 (2006).
23. Gbadegesin, R., Lavin, P., Foreman, J. & Winn, M. Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update. *Pediatr. Nephrol.* **26**, 1001–15 (2011).

24. RICH, A. R. A hitherto undescribed vulnerability of the juxtamedullary glomeruli in lipoid nephrosis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **100**, 173–86 (1957).
25. Nagi, A. H., Alexander, F. & Lannigan, R. Light and electron microscopical studies of focal glomerular sclerosis. *J. Clin. Pathol.* **24**, 846–50 (1971).
26. Churg, J., Habib, R. & White, R. H. Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children. *Lancet* **760**, 1299–302 (1970).
27. Habib, R. Editorial: Focal glomerular sclerosis. *Kidney Int.* **4**, 355–61 (1973).
28. Mason, P. D. & Hoyer, P. F. in *Comprehensive Clinical Nephrology* 218–227 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-323-05876-6.00017-4
29. Appel, G. B. & D'Agati, V. D. in *Comprehensive Clinical Nephrology* 228–240 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-323-05876-6.00018-6
30. Maas, R. J., Deegens, J. K., Smeets, B., Moeller, M. J. & Wetzels, J. F. Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 768–776 (2016).
31. Fogo, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 76–87 (2014).
32. Bose, B. & Cattran, D. Glomerular diseases: FSGS. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 626–32 (2014).
33. Rydel, J. J., Korbet, S. M., Borok, R. Z. & Schwartz, M. M. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: Presentation, course, and response to treatment. *Am. J. Kidney Dis.* **25**, 534–542 (1995).
34. Tryggvason, K. & Pettersson, E. Causes and consequences of proteinuria: The kidney filtration barrier and progressive renal failure. *Journal of Internal Medicine* **254**, 216–224 (2003).

Bibliografía

35. Deegens, J. K. J. J. K. *et al.* Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **74**, 1568–1576 (2008).
36. Cameron, J. S., Turner, D. R., Ogg, C. S., Chantler, C. & Williams, D. G. The long-term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* **10**, 213–218 (1978).
37. Velosa, J. A. *et al.* Treatment of Severe Nephrotic Syndrome With Meclofenamate: An Uncontrolled Pilot Study. *Mayo Clin. Proc.* **60**, 586–592 (1985).
38. Jefferson, J. A. & Nast, C. C. Focal and segmental glomerulosclerosis-are we there yet? *Adv. Chronic Kidney Dis.* **21**, 398–9 (2014).
39. Schell, C. & Huber, T. B. New players in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant* **27**, 3406–12 (2012).
40. Aparecida da Silva, C. *et al.* Renal biopsy: use of biomarkers as a tool for the diagnosis of focal segmental glomerulosclerosis. *Dis. Markers* **2014**, 192836 (2014).
41. Fernández, G. Glomerulonefritis primarias. *Nefrología al día* 23–45 (2010).
42. D'Agati, V. D. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 271–81 (2008).
43. D'Agati, V. D., Fogo, A. B., Bruijn, J. A. & Jennette, J. C. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am. J. Kidney Dis.* **43**, 368–82 (2004).
44. Thomas, D. B. *et al.* Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int.* **69**, 920–6 (2006).
45. Reidy, K. & Kaskel, F. J. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol.* **22**, 350–4 (2007).

46. Jefferson, J. A. & Shankland, S. J. The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **21**, 408–416 (2014).
47. Korbet, S. Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* **9**, 1333–1340 (1998).
48. Rosenberg, A. Z. & Kopp, J. B. Focal Segmental Glomerulosclerosis. **12**, 502–517 (2017).
49. Sprangers, B., Meijers, B. & Appel, G. FSGS : Diagnosis and Diagnostic Work-Up. **2016**, (2016).
50. Howie, A. J. Problems with 'focal segmental glomerulosclerosis'. *Pediatr. Nephrol.* **26**, 1197–205 (2011).
51. Thomas, D. B. Focal segmental glomerulosclerosis: a morphologic diagnosis in evolution. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **133**, 217–23 (2009).
52. Bandari, J., Fuller, T. W., Turner, R. M. & D'Agostino, L. A. Renal biopsy for medical renal disease: Indications and contraindications. *Canadian Journal of Urology* **23**, 8121–8126 (2016).
53. Whittier, W. L. & Korbet, S. M. Renal biopsy: update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13**, 661–665 (2004).
54. Redondo Pachón, M. D. *et al.* [Markers of podocyte dedifferentiation in a patient with collapsing glomerulonephritis]. *Nefrologia* **30**, 360–6 (2010).
55. Swaminathan, S. *et al.* Collapsing and non-collapsing focal segmental glomerulosclerosis in kidney transplants. *Nephrol. Dial. Transplant* **21**, 2607–14 (2006).
56. Stokes, M. B. & D'Agati, V. D. Morphologic Variants of Focal Segmental Glomerulosclerosis and Their Significance. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **21**, 400–407 (2014).
57. Mungan, S., Turkmen, E., Aydin, M. C., Saglam, A. E. & Ertoy Baydar, D. Tip lesion variant of primary focal and segmental glomerulosclerosis: clinicopathological analysis of 20 cases. *Ren. Fail.* 1–8 (2015).

doi:10.3109/0886022X.2015.1033635

58. Stokes, M. B., Valeri, A. M., Markowitz, G. S. & D'Agati, V. D. Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features. *Kidney Int.* **70**, 1783–92 (2006).
59. Kambham, N., Markowitz, G. S., Valeri, A. M., Lin, J. & D'Agati, V. D. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int.* **59**, 1498–509 (2001).
60. Herlitz, L. C. *et al.* Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 163–72 (2010).
61. McGraw, M., Poucell, S., Sweet, J. & Baumal, R. The significance of focal segmental glomerulosclerosis in oligomeganephronia. *Int. J. Pediatr. Nephrol.* **5**, 67–72 (1984).
62. Bhathena, D. B., Julian, B. A., McMorrow, R. G. & Baehler, R. W. Focal sclerosis of hypertrophied glomeruli in solitary functioning kidneys of humans. *Am. J. Kidney Dis.* **5**, 226–32 (1985).
63. Hodgin, J. B., Rasoulpour, M., Markowitz, G. S. & D'Agati, V. D. Very low birth weight is a risk factor for secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 71–6 (2009).
64. Harvey, J. M. *et al.* Renal biopsy findings in hypertensive patients with proteinuria. *Lancet* **340**, 1435–6 (1992).
65. Falk, R. J. & Jennette, J. C. Sick cell nephropathy. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* **23**, 133–47 (1994).
66. Ponticelli, C. Recurrence of focal segmental glomerular sclerosis (FSGS) after renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant* **25**, 25–31 (2010).
67. Meyrier, A. Focal and segmental glomerulosclerosis: multiple pathways are involved. *Semin. Nephrol.* **31**, 326–32 (2011).
68. Höcker, B. *et al.* Recurrence of proteinuria 10 years post-transplant in NPHS2-associated focal segmental glomerulosclerosis after conversion

- from cyclosporin A to sirolimus. *Pediatr. Nephrol.* **21**, 1476–1479 (2006).
69. Kriz, W. The role of the podocyte in the degeneration of a renal glomerulus. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* **27**, 1–13 (1997).
70. Lim, B. J., Yang, J. W., Do, W. S. & Fogo, A. B. Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J. Pathol. Transl. Med.* (2016). doi:10.4132/jptm.2016.09.21
71. Kriz, W. The pathogenesis of 'classic' focal segmental glomerulosclerosis—lessons from rat models. *Nephrol. Dial. Transplant* **18 Suppl 6**, vi39-44 (2003).
72. Königshausen, E. & Sellin, L. Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates. *BioMed Research International* **2016**, (2016).
73. Vincenti, F. & Ghiggeri, G. M. G. M. New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am. J. Transplant* **5**, 1179–1185 (2005).
74. Matalon, A. *et al.* Plasmapheresis treatment of recurrent FSGS in adult renal transplant recipients. *Clin. Nephrol.* **56**, 271–8 (2001).
75. Davenport, R. D. Apheresis treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation: re-analysis of published case-reports and case-series. *J. Clin. Apher.* **16**, 175–8 (2001).
76. Artero, M. L., Sharma, R., Savin, V. J. & Vincenti, F. Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* **23**, 574–81 (1994).
77. Haas, M. *et al.* Plasma immunoadsorption treatment in patients with primary focal and segmental glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant* **13**, 2013–6 (1998).
78. Avila-Casado, M., Perez-Torres, I. & Auron, A. Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney ...* **66**, 133–143 (2004).

Bibliografia

79. Sharma, M., Sharma, R., Reddy, S. R. S. R., McCarthy, E. T. E. T. & Savin, V. J. V. J. Proteinuria After Injection of Human Focal Segmental Glomerulosclerosis factor. *Transplantation* **73**, 366–372 (2002).
80. Kemper, M. J., Wolf, G. & Müller-Wiefel, D. E. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N. Engl. J. Med.* **344**, 386–7 (2001).
81. Gallon, L., Leventhal, J., Skaro, A., Kanwar, Y. & Alvarado, A. Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1648–9 (2012).
82. Sharma, M., Sharma, R., McCarthy, E. T. & Savin, V. J. 'The FSGS factor:' enrichment and in vivo effect of activity from focal segmental glomerulosclerosis plasma. *J Am Soc Nephrol* **10**, 552–561 (1999).
83. Cravedi, P., Kopp, J. B. & Remuzzi, G. Recent Progress in the Pathophysiology and Treatment of FSGS Recurrence. *Am. J. Transplant* **13**, 266–74 (2013).
84. Charba, D. S. D. S. *et al.* Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb)). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F138-44 (2009).
85. Harris, J. J. *et al.* Active proteases in nephrotic plasma lead to a podocin-dependent phosphorylation of VASP in podocytes via protease activated receptor-1. *J. Pathol.* **229**, 660–671 (2013).
86. Delville, M. *et al.* A circulating antibody panel for pretransplant prediction of FSGS recurrence after kidney transplantation. *Sci. Transl. Med.* **6**, 256ra136 (2014).
87. Alachkar, N., Gupta, G. & Montgomery, R. A. Angiotensin Antibodies and Focal Segmental Glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **368**, 971–973 (2013).
88. Wei, C. *et al.* Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat. Med.* **14**, 55–63 (2008).

89. Wei, C. *et al.* Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Med.* **17**, 952–60 (2011).
90. Savin, V. J., McCarthy, E. T., Sharma, R., Charba, D. & Sharma, M. Galactose binds to focal segmental glomerulosclerosis permeability factor and inhibits its activity. *Transl. Res.* **151**, 288–92 (2008).
91. Savin, V. J. *et al.* Renal and Hematological Effects of CLCF-1, a B-Cell-Stimulating Cytokine of the IL-6 Family. *J. Immunol. Res.* **2015**, 1–11 (2015).
92. Sharma, M. *et al.* 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. *Transl. Res.* **166**, 384–98 (2015).
93. De Smet, E., Rioux, J. P., Ammann, H., Déziel, C. & Quérin, S. FSGS permeability factor-associated nephrotic syndrome: Remission after oral galactose therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 2938–2940 (2009).
94. Kopač, M., Meglič, A. & Rus, R. R. Partial Remission of Resistant Nephrotic Syndrome After Oral Galactose Therapy. *Ther. Apher. Dial.* **15**, 269–272 (2011).
95. Sgambat, K., Banks, M. & Moudgil, A. Effect of galactose on glomerular permeability and proteinuria in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **28**, 2131–2135 (2013).
96. Chatzigeorgiou, A., Lyberi, M., Chatzilymperis, G., Nezos, A. & Kamper, E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors* **35**, 474–83 (2009).
97. Blasi, F. & Carmeliet, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 932–943 (2002).
98. Behrendt, N. *et al.* The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH₂-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *J. Biol. Chem.* **265**, 6453–60 (1990).

Bibliografia

99. Smith, H. W. & Marshall, C. J. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 23–36 (2010).
100. Wei, C. *et al.* Circulating suPAR in Two Cohorts of Primary FSGS. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 2051–2059 (2012).
101. Cobos, E., Jumper, C. & Lox, C. Pretreatment determination of the serum urokinase plasminogen activator and its soluble receptor in advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **9**, 241–6 (2003).
102. Giamarellos-Bourboulis, E. J. *et al.* Risk assessment in sepsis: a new prognostication rule by APACHE II score and serum soluble urokinase plasminogen activator receptor. *Crit. Care* **16**, R149 (2012).
103. Zimmermann, H. W., Koch, A., Seidler, S., Trautwein, C. & Tacke, F. Circulating soluble urokinase plasminogen activator is elevated in patients with chronic liver disease, discriminates stage and aetiology of cirrhosis and predicts prognosis. *Liver Int.* **32**, 500–9 (2012).
104. Edsfeldt, A. *et al.* Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with inflammation in the vulnerable human atherosclerotic plaque. *Stroke* **43**, 3305–12 (2012).
105. Lund, I. K., Illemann, M., Thurison, T., Christensen, I. J. & Høyer-Hansen, G. uPAR as anti-cancer target: evaluation of biomarker potential, histological localization, and antibody-based therapy. *Curr. Drug Targets* **12**, 1744–60 (2011).
106. Sier, C. F. M. *et al.* The Level of Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor Is Increased in Serum of Ovarian Cancer Patients¹. *CANCER Res.* **58**, 1843–1849 (1998).
107. Sidenius, N. *et al.* Serum level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a strong and independent predictor of survival in human immunodeficiency virus infection. *Blood* **96**, 4091–5 (2000).
108. Donadello, K. *et al.* Soluble urokinase-type plasminogen activator

- receptor as a prognostic biomarker in critically ill patients. *J. Crit. Care* **29**, 144–149 (2014).
109. Eugen-Olsen, J. & Giamarellos-Bourboulis, E. J. suPAR: The unspecific marker for disease presence, severity and prognosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **46**, S33–S34 (2015).
110. Geboers, D. G. P. J. *et al.* Plasma suPAR as a prognostic biological marker for ICU mortality in ARDS patients. *Intensive Care Med.* **41**, 1281–1290 (2015).
111. Maas, R. J. H., Deegens, J. K. J. & Wetzels, J. F. M. Serum suPAR in patients with FSGS: trash or treasure? *Pediatr. Nephrol.* **28**, 1041–8 (2013).
112. Maas, R. J. H., Wetzels, J. F. M. & Deegens, J. K. J. Serum-soluble urokinase receptor concentration in primary FSGS. *Kidney Int.* **81**, 1043–4 (2012).
113. Meijers, B. *et al.* The soluble urokinase receptor is not a clinical marker for focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1–5 (2014). doi:10.1038/ki.2013.505
114. Wada, T. *et al.* A multicenter cross-sectional study of circulating soluble urokinase receptor in Japanese patients with glomerular disease. *Kidney Int.* **85**, 641–8 (2014).
115. Sinha, A. *et al.* Serum-soluble urokinase receptor levels do not distinguish focal segmental glomerulosclerosis from other causes of nephrotic syndrome in children. *Kidney Int.* **85**, 649–58 (2014).
116. Cathelin, D. *et al.* Administration of Recombinant Soluble Urokinase Receptor Per Se Is Not Sufficient to Induce Podocyte Alterations and Proteinuria in Mice. *J Am Soc Nephrol* **25**, 1662–1668 (2014).
117. Bock, M. E., Price, H. E., Gallon, L. & Langman, C. B. Serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor levels and idiopathic FSGS in children: A single-center report. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **8**,

- 1304–1311 (2013).
118. Spinale, J. M. *et al.* A reassessment of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in glomerular disease. *Kidney Int.* 1–11 (2014). doi:10.1038/ki.2014.346
119. Franco Palacios, C. R. *et al.* Urine But Not Serum Soluble Urokinase Receptor (suPAR) May Identify Cases of Recurrent FSGS in Kidney Transplant Candidates. *Transplantation* **00**, 1–6 (2013).
120. Norden, A. G. W., Lapsley, M. & Unwin, R. J. Urine retinol-binding protein 4: a functional biomarker of the proximal renal tubule. *Adv. Clin. Chem.* **63**, 85–122 (2014).
121. Zager, R. A., Johnson, A. C. M. & Frostad, K. B. Rapid renal alpha-1 antitrypsin gene induction in experimental and clinical acute kidney injury. *PLoS One* **9**, e98380 (2014).
122. Zager, R. A., Johnson, A. C. M. & Becker, K. Renal cortical hemopexin accumulation in response to acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303**, F1460-72 (2012).
123. López Hellín, J. *et al.* Proteomic differential analysis of idiopathic and genetic focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol.* **26**, 1349–1362 (2011).
124. Pollak, M. R. Familial FSGS. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **21**, 422–425 (2014).
125. Kestilä, M. *et al.* Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein—Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. *Mol. Cell* **1**, 575–582 (1998).
126. Boute, N. *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* **24**, 349–354 (2000).
127. Hinkes, B. *et al.* Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat.*

- Genet.* **38**, 1397–1405 (2006).
128. Kim, J. M. *et al.* CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* **300**, 1298–300 (2003).
 129. Winn, M. P. *et al.* Medicine: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science (80-.)*. **308**, 1801–1804 (2005).
 130. Kaplan, J. M. *et al.* Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* **24**, 251–256 (2000).
 131. Brown, E. J. *et al.* Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* **42**, 72–76 (2010).
 132. Mele, C. *et al.* MYO1E Mutations and Childhood Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 295–306 (2011).
 133. Akilesh, S. *et al.* Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest.* **121**, 4127–4137 (2011).
 134. Gee, H. Y. *et al.* ARHGDIA mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J. Clin. Invest.* **123**, 3243–3253 (2013).
 135. Jeanpierre, C. *et al.* Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 824–33 (1998).
 136. Genovese, G., Friedman, D. & Ross, M. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science (80-.)*. **329**, 841–845 (2010).
 137. Tzur, S. *et al.* Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. *Hum. Genet.* **128**, 345–350 (2010).

Bibliografia

138. Kopp, J. B. *et al.* APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 2129–37 (2011).
139. Friedman, D. J., Kozlitina, J., Genovese, G., Jog, P. & Pollak, M. R. Population-Based Risk Assessment of APOL1 on Renal Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 2098–2105 (2011).
140. Friedman, D. & Pollak, M. Genetics of kidney failure and the evolving story of APOL1. *J. Clin. Invest.* **121**, (2011).
141. Rennke, H. G. & Klein, P. S. Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* **13**, 443–56 (1989).
142. Ikezumi, Y. *et al.* Low Birthweight and Premature Birth Are Risk Factors for Podocytopenia and Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am. J. Nephrol.* **38**, 149–157 (2013).
143. Morgan, C., Al-Aklabi, M. & Garcia Guerra, G. Chronic kidney disease in congenital heart disease patients: a narrative review of evidence. *Can. J. kidney Heal. Dis.* **2**, 27 (2015).
144. Aygun, B., Mortier, N. A., Smeltzer, M. P., Hankins, J. S. & Ware, R. E. Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia. *Pediatr. Nephrol.* **26**, 1285–1290 (2011).
145. Wickman, C. & Kramer, H. Obesity and Kidney Disease: Potential Mechanisms. *Semin. Nephrol.* **33**, 14–22 (2013).
146. Hanly, P. J. & Ahmed, S. B. Sleep Apnea and the Kidney. *Chest* **146**, 1114–1122 (2014).
147. Ko, G. J., Obi, Y., Tortorici, A. R. & Kalantar-Zadeh, K. Dietary protein intake and chronic kidney disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **20**, 77–85 (2017).
148. Friedman, E. A. & Tao, T. K. Disappearance of uremia due to heroin-associated nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* **25**, 689–93 (1995).

149. Markowitz, G. S. *et al.* Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1164–72 (2001).
150. Markowitz, G. S., Nasr, S. H., Stokes, M. B. & D'Agati, V. D. Treatment with IFN- α , - β , or - γ Is Associated with Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 607–615 (2010).
151. Faul, C. *et al.* The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. **14**, (2008).
152. Meehan, S. M. *et al.* De novo collapsing glomerulopathy in renal allografts. *Transplantation* **65**, 1192–7 (1998).
153. Nadasdy, T., Allen, C. & Zand, M. S. Zonal distribution of glomerular collapse in renal allografts: possible role of vascular changes. *Hum. Pathol.* **33**, 437–41 (2002).
154. Stokes, M. B., Davis, C. L. & Alpers, C. E. Collapsing glomerulopathy in renal allografts: a morphological pattern with diverse clinicopathologic associations. *Am. J. Kidney Dis.* **33**, 658–66 (1999).
155. Hunley, T. E., Fogo, A., Iwasaki, S. & Kon, V. Endothelin A receptor mediates functional but not structural damage in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 1718–23 (1995).
156. Vollenbröcker, B. *et al.* mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**, F418-26 (2009).
157. Letavernier, E. *et al.* Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 630–638 (2009).
158. Letavernier, E. *et al.* High Sirolimus Levels May Induce Focal Segmental Glomerulosclerosis De Novo. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 326–333 (2007).
159. Mohamed, N., Goldstein, J., Schiff, J. & John, R. Collapsing

- Glomerulopathy Following Anthracycline Therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **61**, 778–781 (2013).
160. Lee, V. W. & Harris, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* **16**, 30–38 (2011).
161. Wan, Y. G. *et al.* Low-dose of multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. f., a natural regulator of TGF- β 1/Smad signaling activity improves adriamycin-induced glomerulosclerosis in vivo. *J. Ethnopharmacol.* **151**, 1079–1089 (2014).
162. Zickri, M. B., Fattah, M. M. A. & Metwally, H. G. Tissue Regeneration and Stem Cell Distribution in Adriamycin Induced Glomerulopathy. *Int. J. stem cells* **5**, 115–124 (2012).
163. Meehan, S. M., Kim, L. & Chang, A. A spectrum of morphologic lesions of focal segmental glomerulosclerosis by Columbia criteria in human immunodeficiency virus infection. *Virchows Arch.* **460**, 429–435 (2012).
164. Cohen, A. H. & Nast, C. C. HIV-associated nephropathy. A unique combined glomerular, tubular, and interstitial lesion. *Mod. Pathol.* **1**, 87–97 (1988).
165. Wyatt, C. M., Klotman, P. E. & D'Agati, V. D. HIV-Associated Nephropathy: Clinical Presentation, Pathology, and Epidemiology in the Era of Antiretroviral Therapy. doi:10.1016/j.semnephrol.2008.08.005
166. Bruggeman, L. A. *et al.* Renal epithelium is a previously unrecognized site of HIV-1 infection. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 2079–2087 (2000).
167. Marras, D. *et al.* Replication and compartmentalization of HIV-1 in kidney epithelium of patients with HIV-associated nephropathy. *Nat. Med.* **8**, 522–526 (2002).
168. Zuo, Y. *et al.* HIV-1 Genes vpr and nef Synergistically Damage Podocytes, Leading to Glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2832–2843 (2006).
169. He, J. C. *et al.* Nef stimulates proliferation of glomerular podocytes

- through activation of Src-dependent Stat3 and MAPK1,2 pathways. *J. Clin. Invest.* **114**, 643–651 (2004).
170. Snyder, A. *et al.* HIV-1 viral protein r induces ERK and caspase-8-dependent apoptosis in renal tubular epithelial cells. *AIDS* **24**, 1107–1119 (2010).
171. Rosenstiel, P. E. *et al.* HIV-1 Vpr inhibits cytokinesis in human proximal tubule cells. *Kidney Int.* **74**, 1049–1058 (2008).
172. Genovese, G. *et al.* A risk allele for focal segmental glomerulosclerosis in African Americans is located within a region containing APOL1 and MYH9. *Kidney ...* **78**, 698–704 (2010).
173. Kasembeli, A. N. *et al.* APOL1 Risk Variants Are Strongly Associated with HIV-Associated Nephropathy in Black South Africans. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2015). doi:10.1681/ASN.2014050469
174. Moudgil, A. *et al.* Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* **59**, 2126–2133 (2001).
175. Tomlinson, L., Boriskin, Y., McPhee, I., Holwill, S. & Rice, P. Acute cytomegalovirus infection complicated by collapsing glomerulopathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 187–189 (2003).
176. Li, R.-M. *et al.* Molecular identification of SV40 infection in human subjects and possible association with kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2320–2330 (2002).
177. Hogan, J. & Radhakrishnan, J. The Treatment of Idiopathic Focal Segmental Glomerulosclerosis in Adults. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **21**, 434–441 (2014).
178. Ramos Cebrián, M. & Zarauza Santoveña, A. Glomerulonefritis Crónicas. *Protoc. diagnósticoterapéuticos en Nefrol. Pediatría* **1**, 315–332 (2014).
179. Fornoni, A. *et al.* Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci. Transl. Med.* **3**, 85ra46 (2011).

Bibliografia

180. Glomerulonephritis Work Group, K. KDIGO Clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidnet Int. Suppl.* **2**, 1–274 (2012).
181. Canaud, G. *et al.* Therapeutic approach to focal and segmental glomerulosclerosis recurrence in kidney transplant recipients. *Transplant. Rev. (Orlando)*. **24**, 121–8 (2010).
182. Cattaran, D. C. *et al.* A randomized trial of cyclosporine in patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **56**, 2220–2226 (1999).
183. Segarra, A. *et al.* Combined therapy of tacrolimus and corticosteroids in cyclosporin-resistant or -dependent idiopathic focal glomerulosclerosis: a preliminary uncontrolled study with prospective follow-up. *Nephrol. Dial. Transplant* **17**, 655–62 (2002).
184. Duncan, N. *et al.* Treatment of focal and segmental glomerulosclerosis in adults with tacrolimus monotherapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 3062–3067 (2004).
185. Westhoff, T. H. & van der Giet, M. Tacrolimus in the treatment of idiopathic nephrotic syndrome. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**, 1099–110 (2007).
186. Choudhry, S. *et al.* Efficacy and Safety of Tacrolimus Versus Cyclosporine in Children With Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *Am. J. Kidney Dis.* **53**, 760–769 (2009).
187. Ohta, T. *et al.* Effect of pre- and postoperative plasmapheresis on posttransplant recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in children. *Transplantation* **71**, 628–633 (2001).
188. Pradhan, M., Petro, J., Palmer, J., Meyers, K. & Baluarte, H. J. Early use of plasmapheresis for recurrent post-transplant FSGS. *Pediatr. Nephrol.* **18**, 934–938 (2003).
189. Gonzalez, E., Ettenger, R., Rianthavorn, P., Tsai, E. & Malekzadeh, M. Preemptive plasmapheresis and recurrence of focal segmental

- glomerulosclerosis in pediatric renal transplantation. *Pediatr. Transplant.* **15**, 495–501 (2011).
190. Trachtman, R., Sran, S. S. & Trachtman, H. Recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation. *Pediatr. Nephrol.* (2015). doi:10.1007/s00467-015-3062-1
191. Straatmann, C. *et al.* Success with plasmapheresis treatment for recurrent focal segmental glomerulosclerosis in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* **18**, 29–34 (2014).
192. Hattori, M. *et al.* A Combined Low-Density Lipoprotein Apheresis and Prednisone Therapy for Steroid-Resistant Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis in Children. *Am. J. Kidney Dis.* **42**, 1121–1130 (2003).
193. Oto, J. *et al.* Low-density lipoprotein apheresis in a pediatric patient with refractory nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis. *J. Anesth.* **23**, 284–287 (2009).
194. Araki, H. *et al.* Focal Segmental Glomerular Sclerosis Ameliorated by Long-term Hemodialysis Therapy with Low-density Lipoprotein Apheresis. *Intern. Med.* **54**, 2213–2217 (2015).
195. Cho, J.-H. *et al.* Successful treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis with a low dose rituximab in a kidney transplant recipient. *Ren. Fail.* **36**, 623–626 (2014).
196. Stewart, Z. A., Shetty, R., Nair, R., Reed, A. I. & Brophy, P. D. Case report: Successful treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis with a novel rituximab regimen. in *Transplantation Proceedings* **43**, 3994–3996 (2011).
197. Roccatello, D. *et al.* High-Dose Rituximab Ineffective for Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Long-Term Observation Study. *Am. J. Nephrol.* **46**, 108–113 (2017).
198. Fernandez-Fresnedo, G. *et al.* Rituximab Treatment of Adult Patients with Steroid-Resistant Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin. J. Am. Soc.*

- Nephrol.* **4**, 1317–1323 (2009).
199. Kronbichler, A. & Bruchfeld, A. Rituximab in adult minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron - Clinical Practice* **128**, 277–282 (2014).
200. Cho, M. E., Hurley, J. K. & Kopp, J. B. Sirolimus Therapy of Focal Segmental Glomerulosclerosis Is Associated With Nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* **49**, 310–317 (2007).
201. Trachtman, H. *et al.* Efficacy of galactose and adalimumab in patients with resistant focal segmental glomerulosclerosis: report of the font clinical trial group. *BMC Nephrol.* **16**, 111 (2015).
202. Canaud, G. *et al.* Intensive and prolonged treatment of focal and segmental glomerulosclerosis recurrence in adult kidney transplant recipients: a pilot study. *Am. J. Transplant* **9**, 1081–6 (2009).
203. Huang, K., Ferris, M. E., Andreoni, K. A. & Gipson, D. S. The differential effect of race among pediatric kidney transplant recipients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* **43**, 1082–90 (2004).
204. Nehus, E. J., Goebel, J. W., Succop, P. S. & Abraham, E. C. Focal segmental glomerulosclerosis in children: Multivariate analysis indicates that donor type does not alter recurrence risk. *Transplantation* **96**, 550–554 (2013).
205. Sener, A., Bella, A. J., Nguan, C., Luke, P. P. W. & House, A. A. Focal segmental glomerular sclerosis in renal transplant recipients: Predicting early disease recurrence may prolong allograft function. *Clin. Transplant.* **23**, 96–100 (2009).
206. Hickson, L. J. *et al.* Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: Outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation* **87**, 1232–1239 (2009).
207. Mahesh, S. *et al.* Demographics and response to therapeutic plasma exchange in pediatric renal transplantation for focal glomerulosclerosis: A

- single center experience. *Pediatr. Transplant.* **12**, 682–688 (2008).
208. Schachter, M. E. *et al.* Recurrent focal segmental glomerulosclerosis in the renal allograft: single center experience in the era of modern immunosuppression. *Clin Nephrol* **74**, 173–181 (2010).
209. Rosenson, R. S. *et al.* HDL Measures, Particle Heterogeneity, Proposed Nomenclature, and Relation to Atherosclerotic Cardiovascular Events. *Clin. Chem.* **410**, 392–410 (2011).
210. von Eckardstein, A. & Kardassis, D. *High Density Lipoproteins. From Biological Understanding to Clinical Exploitation.* Springer open **224**, (Springer International Publishing, 2015).
211. Skinner, E. R. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* **5**, 241–247 (1994).
212. Syvanne, M., Kahri, J., Virtanen, K. S. & Taskinen, M. R. HDLs containing apolipoproteins A-I and A-II (LpA-I:A-II) as markers of coronary artery disease in men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* **92**, 364–370 (1995).
213. Rader, D. J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: Implications for novel therapies. *Journal of Clinical Investigation* **116**, 3090–3100 (2006).
214. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 125–138 (2008).
215. Arciello, A., Piccoli, R. & Monti, D. M. Apolipoprotein A-I: The dual face of a protein. *FEBS Letters* **590**, 4171–4179 (2016).
216. Mangaraj, M., Nanda, R. & Panda, S. Apolipoprotein A-I: A Molecule of Diverse Function. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **31**, 253–259 (2016).
217. Chau, P., Fielding, P. E. & Fielding, C. J. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) cleaves human proapolipoprotein A1 and regulates its activation for lipid binding. *Biochemistry* **46**, 8445–8450 (2007).

Bibliografia

218. Sviridov, D., Pyle, L. E., Jauhiainen, M., Ehnholm, C. & Fidge, N. H. Deletion of the propeptide of apolipoprotein A-I reduces protein expression but stimulates effective conversion of pre beta -high density lipoprotein to alpha -high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **41**, (2000).
219. Francone, O. L. *et al.* Disruption of the murine procollagen C-proteinase enhancer 2 gene causes accumulation of pro-apoA-I and increased HDL levels. *J. Lipid Res.* **52**, 1974–83 (2011).
220. Brewer Jr., H. B. *et al.* The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* **80**, 623–630 (1978).
221. Palgunachari, M. N. *et al.* Only the Two End Helices of Eight Tandem Amphipathic Helical Domains of Human Apo A-I Have Significant Lipid Affinity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, (1996).
222. Segrest, J. P. *et al.* The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* **33**, 141–166 (1992).
223. Roosbeek, S. *et al.* Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* **42**, 31–40 (2001).
224. Frank, P. G. *et al.* Importance of central alpha-helices of human apolipoprotein A-I in the maturation of high-density lipoproteins. *Biochemistry* **37**, 13902–9 (1998).
225. McManus, D. C. *et al.* Distinct central amphipathic alpha-helices in apolipoprotein A-I contribute to the in vivo maturation of high density lipoprotein by either activating lecithin-cholesterol acyltransferase or binding lipids. *J. Biol. Chem.* **275**, 5043–5051 (2000).
226. Saito, H. *et al.* Alpha-Helix Formation Is Required for High Affinity Binding of Human Apolipoprotein A-I to Lipids. *J. Biol. Chem.* **279**, 20974–20981 (2004).

227. Burgess, J. W. *et al.* Deletion of the C-terminal domain of apolipoprotein A-I impairs cell surface binding and lipid efflux in macrophage. *Biochemistry* **38**, 14524–14533 (1999).
228. Silva, R. A. G. D., Hilliard, G. M., Li, L., Segrest, J. P. & Davidson, W. S. A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins. *Biochemistry* **44**, 8600–8607 (2005).
229. Segrest, J. P. *et al.* A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 31755–31758 (1999).
230. Gogonea, V. Structural insights into high density lipoprotein: Old models and new facts. *Frontiers in Pharmacology* **6**, (2016).
231. Sorci-Thomas, M. G. & Thomas, M. J. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends in Cardiovascular Medicine* **12**, 121–128 (2002).
232. Pisciotta, L. *et al.* A complex phenotype in a child with familial HDL deficiency due to a novel frameshift mutation in APOA1 gene (apoA-I Guastalla). *J. Clin. Lipidol.* **9**, 837–846 (2015).
233. Bandarian, F., Hedayati, M., Daneshpour, M. S., Naseri, M. & Azizi, F. Genetic polymorphisms in the APOA1 gene and their relationship with serum HDL cholesterol levels. *Lipids* **48**, 1207–1216 (2013).
234. Hovingh, G. K. *et al.* A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1429–1435 (2004).
235. Kronenberg, F. Genetic variation in HDL-related genes and the association with cardiovascular disease: HDL particles as chameleons of lipoprotein metabolism. *Journal of Internal Medicine* **270**, 128–131 (2011).
236. Weisgraber, K. H., Bersot, T. P. & Mahley, R. W. A-I(Milano) apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I

- apoprotein from human high density lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation* **66**, 901–907 (1980).
237. Franceschini, G. *et al.* Increased Cholesterol Efflux Potential of Sera From ApoA-IMilano Carriers and Transgenic Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1257–1262 (1999).
238. Martin-Campos, J. M., Escola-Gil, J. C., Ribas, V. & Blanco-Vaca, F. Apolipoprotein A-II, genetic variation on chromosome 1q21-q24, and disease susceptibility. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 247–253 (2004).
239. Blanco-Vaca, F., Escolà-Gil, J. C., Martín-Campos, J. M. & Julve, J. Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J. Lipid Res.* **42**, 1727–39 (2001).
240. Weisgraber, K. H. & Mahley, R. W. Apoprotein (E-A-II) complex of human plasma lipoproteins. I. Characterization of this mixed disulfide and its identification in a high density lipoprotein subfraction. *J. Biol. Chem.* **253**, 6281–6288 (1978).
241. Blanco-Vaca, F., Via, D. P., Yang, C. Y., Massey, J. B. & Pownall, H. J. Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* **33**, 1785–96 (1992).
242. JAHN, C. E., OSBORNE, J. C., SCHAEFER, E. J. & BREWER, H. B. Activation of the Enzymic Activity of Hepatic Lipase by Apolipoprotein A-II: Characterization of a Major Component of High Density Lipoprotein as the Activating Plasma Component in vitro. *Eur. J. Biochem.* **131**, 25–29 (1983).
243. Kubo, M. *et al.* Apo A-I and Apo A-II inhibit hepatic triglyceride lipase from human postheparin plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 261–266 (1981).
244. Masaki, S., Norihiro, S., Roger L., B., Kohji, S. & Richard L., J. Effect of apolipoproteins on the hepatic lipase-catalyzed hydrolysis of human plasma high density lipoprotein²-triacylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta*

- (*BBA*)/*Lipids Lipid Metab.* **713**, 292–299 (1982).
245. Fruchart, J. C. & Ailhaud, G. Apolipoprotein A-containing lipoprotein particles: Physiological role, quantification, and clinical significance. *Clin. Chem.* **38**, 793–797 (1992).
246. Lagrost, L. *et al.* Modulation of cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells by the apolipoprotein content of high density lipoprotein particles: Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and A-II. *J. Biol. Chem.* **270**, 13004–13009 (1995).
247. Forte, T. M., Bielicki, J. K., Goth-Goldstein, R., Selmek, J. & McCall, M. R. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J. Lipid Res.* **36**, 148–57 (1995).
248. Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S. & Assmann, G. Cholesterol efflux, cholesterol esterification, and cholesteryl ester transfer by LpA-I and LpA-I/A-II in native plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1412–1418 (1995).
249. Marzal-Casacuberta, A. *et al.* Functional lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and high density lipoprotein deficiency in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J. Biol. Chem.* **271**, 6720–6728 (1996).
250. Candiano, G. *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–33 (2004).
251. Wittig, I., Braun, H.-P. & Schägger, H. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 418–28 (2006).
252. Gugliucci, A., Caccavello, R., Kotani, K., Sakane, N. & Kimura, S. Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: A practical zymogram method to assess HDL function. *Clin. Chim. Acta.* **415**, 162–8 (2013).

253. den Dunnen, J. T. & Antonarakis, S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum. Mutat.* **15**, 7–12 (2000).
254. Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D. & Haussler, D. Improved splice site detection in Genie. *J. Comput. Biol.* **4**, 311–23 (1997).
255. Wada, Y. Mass spectrometry of transferrin glycoforms to detect congenital disorders of glycosylation: Site-specific profiles and pitfalls. *Proteomics* **16**, 3105–3110 (2016).
256. Rainwater, D. L., Moore, P. H. & Gamboa, I. O. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J. Lipid Res.* **45**, 773–775 (2004).
257. Zeljkovic, A. *et al.* Characteristics of low-density and high-density lipoprotein subclasses in pediatric renal transplant recipients. *Transpl. Int.* **24**, 1094–1102 (2011).
258. Knoppova, B. *et al.* The origin and activities of IgA1-containing immune complexes in IGA nephropathy. *Frontiers in Immunology* **7**, 117 (2016).
259. Andeen, N. K., Lam, D. Y., de Boer, I. H. & Nicosia, R. F. Renal ApoA-1 amyloidosis with Glu34Lys mutation and intra-amyloid lipid accumulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 2703–5 (2014).
260. Dember, L. M. in *Amyloidosis: Diagnosis and Treatment (Contemporary Hematology)* 129–143 (2010). doi:10.1007/978-1-60761-631-3_9
261. Hawkins, P. N. Hereditary systemic amyloidosis with renal involvement. in *Journal of Nephrology* **16**, 443–448 (2003).
262. Hellin, J. L. *et al.* Very low-molecular-mass fragments of albumin in the plasma of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* **54**, 871–80 (2009).
263. Metzger, J. *et al.* Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury. *Kidney Int.* **78**, 1252–1262 (2010).

264. Candiano, G. *et al.* Proteomics of plasma and urine in primary nephrotic syndrome in children. *Contrib. Nephrol.* **160**, 17–28 (2008).
265. Yu, H. *et al.* Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J. Clin. Pathol.* **36**, 253–9 (1983).
266. Romão, E. A. *et al.* Renal disorders involved in the pathophysiology of urinary excretion of a-1 microglobulin in patients with glomerulopathies. *Clin. Nephrol.* **72**, 473–81 (2009).
267. Seeman, T., Dusek, J., Vondrák, K., Spatenka, J. & Feber, J. Profiling proteinuria in children after renal transplantation. *Pediatr. Nephrol.* **24**, 2439–44 (2009).
268. Varghese, S. A. *et al.* Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 913–22 (2007).
269. Bing, C., Mracek, T., Gao, D. & Trayhurn, P. Zinc- α 2-glycoprotein: an adipokine modulator of body fat mass? *Int. J. Obes.* **34**, 1559–1565 (2010).
270. Cabassi, A. & Tedeschi, S. Zinc- α 2-glycoprotein as a marker of fat catabolism in humans. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **16**, 267–271 (2013).
271. Aregger, F. *et al.* Urinary proteomics before and after extracorporeal circulation in patients with and without acute kidney injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **139**, 692–700 (2010).
272. Gomo, A. A., Henderson, L. O., Myrlick, J. E., Gomo, Z. A. & Myrick, J. E. High-density lipoprotein apolipoproteins in urine: I. Characterization in normal subjects and in patients with proteinuria. *Clin Chem* **34**, 1775–1780 (1988).
273. Graversen, J. H. *et al.* A pivotal role of the human kidney in catabolism of HDL protein components apolipoprotein A-I and A-IV but not of A-II. *Lipids* **43**, 467–70 (2008).
274. Chen, Y. T. Y. *et al.* Discovery of novel bladder cancer biomarkers by

- comparative urine proteomics using iTRAQ technology. *J. proteome ...* **9**, 5803–5815 (2010).
275. Tasic, V. & Korneti, P. SDS-PAGE of urinary proteins for detection of nonglomerular hematurias. *Nephron* **88**, 387–388 (2001).
276. Li, H. *et al.* Identification of Apo-A1 as a biomarker for early diagnosis of bladder transitional cell carcinoma. *Proteome Sci.* **9**, 21 (2011).
277. Hoeg, J. M., Meng, M. S., Ronan, R., Fairwell, T. & Brewer, H. B. Human Apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* **261**, 3911–3914 (1986).
278. Nobécourt, E. *et al.* Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 766–772 (2010).
279. Candiano, G. *et al.* Apolipoproteins prevent glomerular albumin permeability induced in vitro by serum from patients with focal segmental glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 143–50 (2001).
280. Asami, T., Ciomartan, T., Hayakawa, H., Uchiyama, M. & Tomisawa, S. Apolipoprotein E epsilon 4 allele and nephrotic glomerular diseases in children. *Pediatr. Nephrol.* **13**, 233–6 (1999).
281. Frishberg, Y., Toledano, H., Becker-Cohen, R., Feigin, E. & Halle, D. Genetic polymorphism in paraoxonase is a risk factor for childhood focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* **36**, 1253–61 (2000).
282. Shimizu, A., Higo, S., Fujita, E., Mii, A. & Kaneko, T. Focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation. *Clin Transpl.* **25 Suppl 2**, 6–14 (2011).
283. Sprangers, B. & Kuypers, D. R. Recurrence of glomerulonephritis after renal transplantation. *Transplantation Reviews* **27**, 126–134 (2013).
284. Floege, J. & Amann, K. Primary glomerulonephritides. *Lancet* **387**, 2036–2048 (2016).
285. Kalantari, S. *et al.* Predictive urinary biomarkers for steroid-resistant and

- steroid-sensitive focal segmental glomerulosclerosis using high resolution mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *BMC Nephrol.* **15**, 141 (2014).
286. Maas, R. J., Deegens, J. K. & Wetzels, J. F. Permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome: Historical perspectives and lessons for the future. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 2207–2216 (2014).
287. Wen, Y., Shah, S. & Campbell, K. N. Molecular mechanisms of proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis. *Front. Med.* **5**, 1–9 (2018).
288. Van Allen, M. W., Frohlich, J. A. & Davis, J. R. Inherited predisposition to generalized amyloidosis. Clinical and pathological study of a family with neuropathy, nephropathy, and peptic ulcer. *Neurology* **19**, 10–25 (1969).
289. Soutar, A. K. *et al.* Apolipoprotein AI mutation Arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7389–93 (1992).
290. Lachmann, H. J. *et al.* Misdiagnosis of Hereditary Amyloidosis as AL (Primary) Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1786–1791 (2002).
291. Liu, Z. *et al.* Apolipoprotein A1 -75 G/A and +83 C/T polymorphisms and renal cancer risk. *Lipids Health Dis.* **14**, 143 (2015).
292. Hamrita, B. *et al.* Apolipoprotein A1 -75 G/A and +83 C/T polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in breast cancer. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1637–1643 (2011).
293. Tu, J. *et al.* Association of apolipoprotein A1 -75 G/A polymorphism with susceptibility to the development of acute lung injury after cardiopulmonary bypass surgery. *Lipids Health Dis.* **12**, 172 (2013).
294. Feng, D. W. *et al.* Association of APOA1 gene polymorphisms (rs670, rs5069, and rs2070665) with dyslipidemia in the Kazakhs of Xinjiang. *Genet. Mol. Res.* **15**, (2016).
295. Lapolla, A. *et al.* Nonenzymatically glycated lipoprotein ApoA-I in plasma of diabetic and nephropathic patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1126**, 295–9

- (2008).
296. Nobécourt, E. *et al.* Effects of cross-link breakers, glycation inhibitors and insulin sensitisers on HDL function and the non-enzymatic glycation of apolipoprotein A-I. *Diabetologia* **51**, 1008–17 (2008).
 297. Li, W. H., Tanimura, M., Luo, C. C., Datta, S. & Chan, L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J. Lipid Res.* **29**, 245–71 (1988).
 298. Marchi, N. *et al.* ProApolipoprotein A1: a serum marker of brain metastases in lung cancer patients. *Cancer* **112**, 1313–24 (2008).
 299. Freedman, B. I. *et al.* Apolipoprotein L1 nephropathy risk variants associate with HDL subfraction concentration in African Americans. *Nephrol. Dial. Transplant* **26**, 3805–10 (2011).
 300. Kim, M.-K. *et al.* Pathogenesis and significance of glomerular C4d deposition in lupus nephritis: activation of classical and lectin pathways. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 2157–67 (2013).
 301. Li, S.-J. *et al.* Peritubular capillary C4d deposition in lupus nephritis different from antibody-mediated renal rejection. *Lupus* **16**, 875–880 (2007).
 302. Suzuki, S. *et al.* Significance of Glomerular Deposition of Apolipoprotein (a) in Various Glomerulopathies. *Am. J. Nephrol.* **17**, 499–504 (1997).
 303. Le Berre, L. *et al.* Effect of plasma fractions from patients with focal and segmental glomerulosclerosis on rat proteinuria. *Kidney Int.* **58**, 2502–11 (2000).
 304. Basse, L. *et al.* Accelerated postoperative recovery programme after colonic resection improves physical performance, pulmonary function and body composition. *Br. J. Surg.* **89**, 446–453 (2002).
 305. Fornoni, A., Merscher, S. & Kopp, J. B. Lipid biology of the podocyte—new perspectives offer new opportunities. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 379–388 (2014).

306. Vaziri, N. D., Navab, M. & Fogelman, A. M. HDL metabolism and activity in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 287–96 (2010).
307. Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M. & Murthy, H. M. K. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2126–31 (2006).