



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

TESI DOCTORAL

**ESTUDI DELS MECANISMES GENÈTICS I MOLECULARS ASSOCIATS
A LES DIFERÈNCIES FENOTÍPIQUES OBSERVADES EN PACIENTS
AMB HIPOMAGNESÈMIA FAMILIAR AMB HIPERCALCIÚRIA I
NEFROCALCINOSI (HFHNC)**

MEMÒRIA PRESENTADA PER

Mònica Vall Palomar

PER OPTAR AL TÍTOL DE

Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

PROGRAMA EN BIOQUÍMICA, BIOLOGIA MOLECULAR I BIOMEDICINA

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA del Departament de

Bioquímica i Biologia Molecular

2015-2020

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. **Anna Meseguer Navarro** i la Dra. **Gema Ariceta Iraola**, al grup de Fisiopatologia Renal, CIBBIM Nanomedicina del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

Dra. Anna Meseguer Navarro
Directora i Tutora

Dra. Gema Ariceta Iraola
Directora

Mònica Vall Palomar
Candidata

Novembre 2020

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

**Vall d'Hebron**
Institut de Recerca

RESUM

RESUM

La hipomagnesèmia familiar amb hipercalciúria i nefrocalcinosi (HFHNC) és una tubulopatia minoritària autosòmica recessiva causada per mutacions als gens *CLDN16* o *CLDN19*, que codifiquen per la claudina-16 i -19, respectivament, que s'expressen a la porció gruixuda de la nansa ascendent de Henle, i estan implicades en el transport iònic paracel·lular. Aquesta malaltia es caracteritza per la pèrdua urinària massiva de calci i magnesi, nefrocalcinosi bilateral i progressió inexorable de la malaltia renal crònica, que desencadena en fallida renal. Addicionalment, la majoria de pacients amb mutacions a *CLDN19* també desenvolupen alteracions oculars, ja que aquest s'expressa a les cèl·lules epitelials de la retina. Característicament, existeix una gran variabilitat fenotípica entre els pacients, inclús entre aquells que comparteixen la mutació c.59G>A; p.G20D a *CLDN19* (mutació Hispànica), i entre membres d'una mateixa família. Aquest fenomen posa de manifest que, més enllà de la mutació causant de la malaltia, possiblement existeixen altres processos moleculars que determinen la progressió clínica dels pacients. Sota aquesta hipòtesi, aquest treball s'ha focalitzat en l'estudi dels factors genètics i epigenètics que podrien modular la progressió de la malaltia renal.

Per això, s'han obtingut les dades clíniques i mostres d'orina i sang de 30 pacients afectes d'HFHNC i 6 individus control, provinents d'arreu d'Espanya, essent aquests la majoria de pacients diagnosticats d'HFHNC en aquest territori. L'anàlisi de les dades clíniques va permetre avaluar les diferències en l'evolució de la malaltia renal en funció del sexe i el genotip, classificar els pacients segons la pèrdua anual de funció renal (progressió renal ràpida, moderada i lenta), identificar biomarcadors clínics de pronòstic, i evidenciar l'alta variabilitat fenotípica intrafamiliar.

L'estudi per la identificació de variants gèniques en homozigosi associades als fenotips més extrems (progressió ràpida i lenta) s'ha realitzat amb les dades obtingudes de la seqüenciació massiva de l'exoma dels 30 pacients inclosos en

la cohort. Seguint aquesta estratègia, s'han identificat un total de 45 variants gèniques. D'entre aquestes, per la funció fisiològica dels gens on es localitzen, en destaquen la rs11207827 (al gen *PAT1*) i la rs1050171 (al gen *EGFR*).

Per determinar els factors epigenètics implicats en la fisiopatologia de la HFHNC i en la seva progressió, s'han utilitzat els *urinary exosome-like vesicles* (uEVs) com a font no invasiva d'informació dels processos cel·lulars renals. Mitjançant *microarrays*, s'ha analitzat el perfil d'expressió dels miRNAs continguts als uEVs dels 20 pacients que mantenien els ronyons nadius funcionals identificant-se 24 miRNAs diferencialment expressats en el conjunt de pacients respecte el grup control, i 43 en el subconjunt dels pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. La comparació de pacients d'ambdós sexes, va mostrar únicament la infraexpressió del miR-1915-5p en aquells de sexe masculí. Per últim, s'han identificat 4 miRNAs diferencialment expressats en els pacients d'HFHNC amb progressió de la malaltia renal moderada, en comparació amb el de progressió lenta, i 8 en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. La biologia de sistemes i l'ús de xarxes neuronals d'intel·ligència artificial han permès associar els resultats obtinguts amb processos biològics crucials en la fisiopatologia de la HFHNC, com la fibrosi renal i el transport de calci i magnesi, entre d'altres.

Aquest treball, mitjançant dues estratègies complementàries, ha permès incrementar el coneixement de la fisiopatologia de la HFHNC i, per primer vegada, determinar factors clínics, genètics i epigenètics implicats en la progressió de la malaltia renal. Des del punt de vista translacional, aquesta tesi ha identificat nous possibles biomarcadors pronòstics de la HFHNC, així com noves dianes terapèutiques que podrien permetre modular la severitat de la malaltia i, en el millor dels casos, curar-la.

ÍNDEX

ÍNDEX

LLISTA DE FIGURES	13
LLISTA DE TAULES	15
ABREVIATURES	17
INTRODUCCIÓ	23
1. EL RONYÓ	25
1.1. LA NEFRONA. FISIOLOGIA TUBULAR	26
1.1.1. Túbul proximal	27
1.1.2. Nansa de Henle	30
1.1.2.1. Nansa descendent de Henle	30
1.1.2.2. Nansa prima ascendent de Henle	31
1.1.2.3. Nansa gruixuda ascendent de Henle	31
1.1.3. Túbul distal	42
1.1.4. Túbul col·lector	46
2. UNIONS HERMÈTIQUES	47
2.1. CLAUDINES	48
3. EL Mg^{2+} EN L'ORGANISME	53
3.1. DISTRIBUCIÓ I BALANÇ DEL Mg^{2+}	53
3.2. HIPOMAGNESÈMIA. MANIFESTACIONS CLÍNiques	55
4. HFHNC	56
4.1. HISTÒRIA	56
4.2. ETIOPATOGÈNIA	57
4.3. FISIOPATOLOGIA I FENOTIP	58
4.3.1. Variabilitat fenotípica	62
4.4. DIAGNÒSTIC	63
4.5. TRACTAMENT	64
5. MODIFICADORS GENÈTICS DEL FENOTIP	66
6. EXOSOMES	69
6.1. BIOGÈNESI	70
6.2. COMPOSICIÓ	70
6.3. ALLIBERAMENT I INTERNALITZACIÓ	72
6.4. FUNCIONS DELS EXOSOMES	73
6.5. AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ EXOSOMES URINARIS	74
7. miRNAs	77
7.1. BIOGÈNESIS	77
7.2. MECANISME D'ACCIÓ	78
7.2.1. Bases de dades miRNA-mRNA	80

7.3. miRNA EXOSOMAL	80
7.4. miRNA D'EXOSOMES URINARIS EN MALALTIA RENAL	81
JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESI	83
OBJECTIUS	87
MATERIALS I MÈTODES	91
1. PACIENTS	93
1.1. DADES CLÍNiques	94
1.1.1. Estimació de la pèrdua anual de funció renal	95
2. SEQÜENCIACIÓ MASSIVA D'EXOMES	96
2.1. PROCESSAMENT DE MOSTRES DE SANG	96
2.2. MANIPULACIÓ DEL DNA GENÒMIC	96
2.2.1. Extracció	96
2.2.2. Quantificació	97
2.3. SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA	97
2.3.1. Preparació de les mostres	97
2.3.2. Reacció de seqüenciació	98
2.4. ANÀLISI BIOINFORMÀTICA	99
2.5. ANÀLISI BIOESTADÍSTICA	100
3. AÏLLAMENT D'úEVs	103
3.1. ESTABLIMENT DEL MÈTODE	103
3.2. PROCESSAMENT MOSTRES DE PACIENTS	104
4. CARACTERITZACIÓ DELS úEVs	106
4.1. <i>NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS</i>	106
4.2. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ CRIOGÈNICA	106
4.3. <i>WESTERN-BLOT</i>	107
4.3.1. Extracció proteïnes	107
4.3.2. Immunodetecció	108
5. MANIPULACIÓ RNA D'úEVs	110
5.1. EXTRACCIÓ	110
5.2. QUANTIFICACIÓ	111
5.3. RETROTRANSCRIPCIÓ I PCR QUANTITATIVA	111
5.3.1. Establiment del mètode	111
5.4. <i>MICROARRAYS</i>	112
5.4.1. Anàlisi bioinformàtica	114
5.4.2. Anàlisi bioestadística	114
5.4.3. Validació per RT-qPCR	115
5.4.3.1. Anàlisi bioestadística	116
6. ANÀLISI BIOLÒGICA miRNAs	118

6.1. PREDICCIÓ DIANES DELS MIRNAS _____	118
6.2. BIOLOGIA DE SISTEMES _____	118
RESULTATS _____	123
1. DESCRIPCIÓ DE LA COHORT D'ESTUDI _____	125
1.1. DADES DEMOGRÀFIQUES _____	125
1.1. DADES GENÈTIQUES _____	126
1.2. DADES CLÍNiques _____	127
1.3. PROGRESSIÓ DE LA FUNCIÓ RENAL _____	129
1.4. MANIFESTACIONS OCULARS _____	133
1.5. VARIABILITAT FENOTÍPICA INTRAFAMILIAR _____	133
2. GENS MODIFICADORS DEL FENOTIP _____	135
3. PATRÓ D'EXPRESSIONI DE miRNAs D'uEVs _____	139
3.1. ESTABLIMENT DEL MÈTODE D'AÏLLAMENT D'uEVs I D'EXTRACCIÓ D'RNA _____	139
3.2. CARACTERITZACIÓ DELS uEVs DE LA COHORT D'ESTUDI _____	143
3.3. CARACTERITZACIÓ DE L'RNA D'uEVs DE LA COHORT D'ESTUDI _____	146
3.4. VALIDACIÓ TÈCNICA DELS <i>MICROARRAYS</i> _____	147
3.5. MODELITZACIÓ <i>IN SILICO</i> DE LA HFHNC _____	150
3.6. EXPRESSIONI DIFERENCIAL DE MIRNAS D'uEVs _____	150
3.6.1. Efecte de la malaltia _____	150
3.6.2. Efecte del genotip _____	154
3.6.3. Efecte del sexe _____	159
3.6.4. Efecte del fenotip renal _____	160
DISCUSSIÓ _____	165
1. CARACTERÍSTIQUES DE LA COHORT D'ESTUDI _____	168
2. GENS MODIFICADORS DEL FENOTIP _____	173
3. EXPRESSIONI DIFERENCIAL DELS miRNAs D'uEVs _____	179
CONCLUSIONS _____	203
REFERÈNCIES _____	207
ANNEXOS _____	239
ALTRES PUBLICACIONS _____	295

LLISTA DE FIGURES

Figura 1. Anatomia interna del ronyó	25
Figura 2. Estructura de la nefrona	27
Figura 3. Cèl·lula del túbul proximal	29
Figura 4. Cèl·lula de la TAL	33
Figura 5. Regulació de la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} a la TAL i al TCD	37
Figura 6. Mecanisme en contracorrent per la concentració de l'orina	39
Figura 7. Cèl·lula del túbul distal	45
Figura 8. Representació esquemàtica d'un monòmer de claudina	48
Figura 9. Patró d'expressió de les claudines al llarg de la nefrona humana	49
Figura 10. Mecanisme de regulació del complex claudina-16/19 per CaSR	52
Figura 11. Distribució del Mg^{2+} en l'organisme	54
Figura 12. Prevalença de les manifestacions clíniques dels pacients amb HFHNC	59
Figura 13. Nefrocalcinosi medul·lar bilateral i coloboma macular	61
Figura 14. Contingut general dels exosomes	72
Figura 15. Biogènesi i mecanisme d'acció dels miRNAs	79
Figura 16. Mètode utilitzat per seqüenciar els exomes	99
Figura 17. Pipeline utilitzat per l'anàlisi bioinformàtic de la seqüenciació dels exomes	100
Figura 18. Diagrama utilitzat per identificar variants gèniques associades a la progressió renal ràpida i lenta	102
Figura 19. Fórmules utilitzades per calcular l'odds ratio i el corresponent interval de confiança	103
Figura 20. Procediments per l'aïllament d'uEVs	105
Figura 21. Procediment utilitzat per realitzar els microarrays de miRNA dels uEVs	113
Figura 22. Fórmules utilitzades per analitzar les qPCR de les TLDA	117
Figura 23. Algoritme per seleccionar les proteïnes regulades pels miRNAs i incorporar-les a la xarxa proteica artificial	120
Figura 24. Característiques genètiques dels pacients inclosos a la cohort d'estudi	126
Figura 25. Signes i símptomes que van conduir al diagnòstic d'HFHNC	127
Figura 26. Supervivència renal lliure de CKD estadiatge 3	129
Figura 27. Comparació de la supervivència renal lliure de CKD estadiatge 3 entre pacients homes i dones	130

Figura 28. Comparació de la supervivència renal lliure de CKD estadiatge 3 entre pacients homozigots p.G20D i altres mutacions a <i>CLDN19</i> _____	131
Figura 29. Caracterització dels uEVs aïllats amb diferents procediments _____	141
Figura 30. Caracterització dels RNAs d'uEVs extrets mitjançant diferents mètodes _	143
Figura 31. Caracterització dels uEVs aïllats de la cohort d'estudi _____	145
Figura 32. Caracterització dels RNAs d'uEVs extrets de la cohort d'estudi _____	147
Figura 33. Intensitat relativa de detecció dels spike-ins exògens al microarray ____	148
Figura 34. Validació dels resultats dels microarrays de miRNA d'uEVs de la cohort d'estudi mitjançant RT-qPCR _____	149
Figura 35. Heatmap de la comparació pacients vs. individus controls _____	151
Figura 36. Contribució dels mRNAs diana dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients i controls en els processos biològics característics de la HFHNC _	153
Figura 37. Diagrama radial de la contribució dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients d'HFHNC vs. controls en els processos biològics característics de la HFHNC _____	154
Figura 38. Heatmap de la comparació pacients homozigots per la mutació p.G20D a <i>CLDN19</i> vs. individus controls _____	155
Figura 39. Contribució dels mRNAs diana dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots p.G20D a <i>CLDN19</i> i controls en els processos biològics característics de la HFHNC _____	157
Figura 40. Diagrama radial de la contribució dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots per la mutació p.G20D al gen <i>CLDN19</i> vs. controls en els processos biològics característics de la HFHNC _____	158
Figura 41. Heatmap de la comparació pacients home vs. dona _____	159
Figura 42. Heatmaps de les comparacions pacients amb progressió renal ràpida, moderada i lenta en els pacients inclosos en la cohort i el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a <i>CLDN19</i> _____	161
Figura 43. Contribució als processos biològics característics de la HFHNC dels mRNAs diana dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients amb progressió renal moderada vs. lenta, i dels miRNAs _____	163
Figura 44. Contribució als processos biològics característics de la HFHNC dels mRNAs diana dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots per la mutació p.G20D a <i>CLDN19</i> amb progressió renal moderada vs. lenta, i dels miRNAs _____	164

LLISTA DE TAULES

Taula 1. Manifestacions clíniques de la hipomagnesèmia _____	55
Taula 2. Components dels gels de poliacrilamida al 10 % i 15 % _____	108
Taula 3. Anticossos primaris utilitzats per western-blot _____	109
Taula 4. Anticossos secundaris utilitzats per western-blot _____	109
Taula 5. Spike-ins afegits als uEVs i a l'RNA exosomal _____	110
Taula 6. Comparacions i criteris bioestadístics utilitzats per l'anàlisi de les dades dels microarrays de miRNAs d'uEVs _____	115
Taula 7. miRNAs d'estudi inclosos a la TLDA _____	116
Taula 8. Estratificació de les puntuacions ANN _____	120
Taula 9. Centre hospitalari d'origen dels individus de la cohort d'estudi _____	125
Taula 10. Paràmetres bioquímics al moment del diagnòstic d'HFNHC _____	128
Taula 11. Classificació dels pacients segons la progressió de la malaltia renal _____	131
Taula 12. Paràmetres bioquímics dels pacients amb HFNHC al diagnòstic en funció de la progressió de la malaltia renal _____	132
Taula 13. Característiques clíniques de germans pacients d'HFNHC amb mutacions a <i>CLDN19</i> al diagnòstic i a l'últim seguiment _____	134
Taula 14. Odds ratio dels genotips homozigots de les SNVs potencialment modificadores del fenotip envers la progressió renal ràpida en la HFNHC _____	136
Taula 15. Descripció i efecte funcional de les SNVs seleccionats _____	138
Taula 16. Processos biològics emprats per la caracterització de la HFNHC _____	150
Taula 17. miRNAs diferencialment expressats en pacients vs. controls _____	152
Taula 18. miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients amb HFNHC homozigots per la mutació p.G20D a <i>CLDN19</i> i controls _____	156
Taula 19. Proteïnes codificades per mRNAs diana del miR-1915-5p altament relacionades amb els processos biològics estudiats _____	160
Taula 20. miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre el total de pacients amb progressió renal moderada vs. lenta _____	161
Taula 21. miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots per la mutació p.G20D a <i>CLDN19</i> amb progressió renal moderada vs. lenta _____	162

ABREVIATURES

ABREVIATURES

ADH	<i>Antidiuretic hormone / vasopresin</i>	Hormona antidiürètica / vasopresina
AENP		Associació espanyola de nefrologia pediàtrica
Ago2	<i>Argonaute-2</i>	
ANN	<i>Artificial Neural Networks</i>	
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Adenosina-trifosfat
ATPasa	<i>Adenosine triphosphatase</i>	Adenosina-trifosfatasa
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>	Proteïnes de la matriu òssia
CA	<i>Carbonic anhidrasa</i>	Anhidrasa carbònica
CaSR	<i>Calcium-sensing receptor</i>	Receptor sensor de calci
CD81	<i>Cluster of differentiation 81</i>	
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	DNA complementari
CKD	<i>Chronic kidney disease</i>	Malaltia renal crònica
CKD-EPI	<i>Chronic kidney disease-Epidemiology collaboration</i>	
CLDN	<i>Claudin</i>	Claudina
Cr	<i>Creatinine</i>	Creatinina
Crb3	<i>Crumbs cell polarity complex component 3</i>	
CRG-		Centre de regulació genòmica –
CNAG		Centre nacional d'anàlisi Genòmic
C _{RT}	<i>Relative threshold cycle</i>	Cicle llindar relatiu
C _{RT norm}	<i>Normalizing relative threshold cycle</i>	Cicle llindar relatiu normalitzador
cryo-TEM	<i>Cryogenic transmission electron microscopy</i>	Microscòpia electrònica de transmissió criogènica
C _T	<i>Threshold cycle</i>	Cicle llindar
CV	<i>Coefficient of variation</i>	Coefficient de variació
DM	<i>Diabetes mellitus</i>	Diabetis mellitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Àcid desoxiribonucleic
dsDNA	<i>Doubled stranded DNA</i>	DNA de doble cadena
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	Ditiotreitòl
ECL	<i>Extracellular loop</i>	
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Àcid etilenodiaminatetraacètic
EF _{Ca}	<i>Fractional excretion of calcium</i>	Excreció fraccionada de calci
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Factor de creixement epidèrmic
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Receptor del factor de creixement epidèrmic
eGFR	<i>Estimated glomerular filtration rate</i>	Taxa de filtració glomerular estimada
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i>	Canal de sodi epitelial
FR	<i>Renal failure</i>	Fallida renal

FE _{Mg}	<i>Fractional excretion of magnesium</i>	Excreció fraccionada de magnesi
gDNA	<i>Genomic DNA</i>	DNA genòmic
GFR	<i>Glomerular filtration rate</i>	Taxa de filtració glomerular
HFHNC	<i>Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis</i>	Hipomagnesèmia familiar amb hipercalciúria i nefrocalcinosi
ICMAB-CSIC		Institut de Ciència de Materials de Barcelona - Consell Superior d'Investigacions Científiques
IQR	<i>Interquartile range</i>	Rang interquartílic
ISEV	<i>International society for extracellular vesicles</i>	
ITU	<i>Urinary tract infection</i>	Infecció del tracte urinari
KCC4	<i>K-Cl cotransporter</i>	Cotransportador de K ⁺ /Cl ⁻
LNA	<i>Locked nucleic acids</i>	
logFC	<i>Logarithmic fold change</i>	
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>	Ronyó caní Madin-Darby
miRNA	<i>microRNA</i>	
MRE	<i>miRNA response element</i>	
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>	Àcid ribonucleic missatger
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>	Cossos multivesiculars
NCC	<i>Na/Cl co-transporter</i>	Cotransportador de Na/Cl
NHE3	<i>Na/H exchanger 3</i>	Intercanviador 3 de Na/H
NKCC2	<i>Na/K/2Cl co-transporter</i>	Cotransportador Na/K/2Cl
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>	
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>	
OR	<i>Odds ratio</i>	
PALS1	<i>Proteins associated with lin seven 1</i>	
PATJ	<i>PALS1-Associated tight junction protein</i>	
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>	Tampó de fosfat salí
PCA	<i>Principal components analysis</i>	Anàlisi dels components principals
P _{Cr}	<i>Plasmatic creatinine</i>	Creatinina plasmàtica
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reacció en cadena de la polimerasa
PGE ₂	<i>Prostaglandin E2</i>	Prostaglandina E2
PIC	<i>Protease inhibitor cocktail</i>	Còctel inhibidor de proteases
P _{Mg}	<i>Plasmatic magnesium</i>	Magnesi urinari
PQRAD	<i>Autosomal dominant polycystic kidney disease</i>	Poliquistosi renal autosòmica dominant
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>	Hormona paratiroide
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>	Fluorur de polivinilidè
QMPSF	<i>Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments</i>	PCR quantitativa fluorescent de múltiples fragments
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>	PCR quantitativa

RE	<i>Endoplasmic reticulum</i>	Reticle endoplasmàtic
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>	
RMA	<i>Robust multi-array average algorithm</i>	
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Àcid ribonucleic
RNAsa	<i>Ribonuclease</i>	Ribonucleasa
ROMK	<i>Renal outer medullary potassium channel</i>	
RPE	<i>Retinal pigment epithelium</i>	
RQ	<i>Relative quantification</i>	Quantificació relativa
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>	PCR cuantitativa
SEN		Societat espanyola de nefrologia
SNV	<i>Single nucleotide variant</i>	
TAL	<i>Thick ascending limb of henle</i>	Nansa gruixuda ascendent de Henle
TC	<i>Collecting duct</i>	Túbul col·lector
TCD	<i>Convolutated distal tubule</i>	Túbul contornejat distal
THP	<i>Tamm Horsfall protein / Uromodulin</i>	Uromodulina
TJ	<i>Tight junctions</i>	Unions hermètiques
TLDA	<i>TaqMan low density array cards</i>	
TM	<i>Transmembrane</i>	Transmembrana
TPMS	<i>Therapeutic performance mapping system</i>	
TRPM6	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 6</i>	
TRPV5	<i>Transient receptor potential channel subfamily V member 5</i>	
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>	
UAT		Unitat d'alta tecnologia
U _{Ca} /Cr	<i>Urinary Ca/creatinine ratio</i>	Rati calci/creatinina urinari
U _{Cr}	<i>Urinary creatinine</i>	Creatinina urinària
UEB		Unitat d'estadística i bioinformàtica
uEVs	<i>Urinary exosome-like vesicles</i>	
U _{Mg}	<i>Urinary magnesium</i>	Magnesi urinari
U _{Mg} /Cr	<i>Urinary Mg/creatinine ratio</i>	Rati magnesi/creatinina urinari
UTR	<i>Untranslated region</i>	
V _{te}	<i>Transepithelial voltage</i>	Voltatge transepietlial
WT	<i>Wild-type</i>	
ZO	<i>Zonula occludens</i>	

INTRODUCCIÓ

1. EL RONYÓ

Els ronyons, juntament amb els urèters, la bufeta urinària i la uretra, formen l'aparell urinari. Ambdós ronyons estan situats retroperitonealment a l'alçada de les vèrtebres T12 a la L3¹.

Anatòmicament, els components estructurals que formen els ronyons són el còrtex renal, la medul·la –on es situen les piràmides i les columnes renals– i la pelvis renal, encarregada de drenar l'orina. Cadascuna de les piràmides renals es pot dividir en la medul·la interna i l'externa, i alhora, aquesta última en la franja interna i externa de la mateixa (Figura 1)^{1,2}.

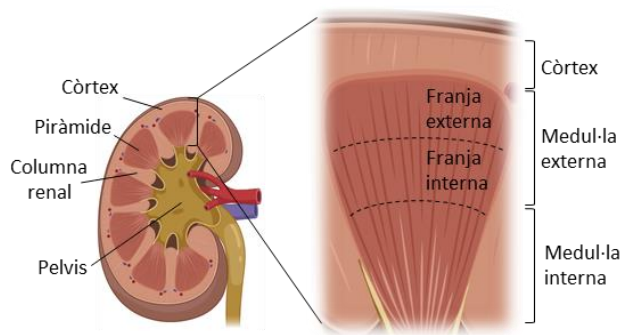


Figura 1. Anatomia interna del ronyó. Secció frontal del ronyó i del còrtex i medul·la renal.

Funcionalment, el ronyó és l'òrgan responsable de mantenir l'homeòstasi sistèmica, l'equilibri àcid-base, hídric i electrolític. Aquests processos es duen a terme a través de mecanismes de filtració, reabsorció i excreció de substàncies bioactives, productes residuals i metabòlits presents al torrent sanguini que són eliminats a través de l'orina. Aquestes tasques les realitzen l'aproximat milió de nefrones que conté cada ronyó, i que constitueixen la unitat funcional del ronyó. A més, mitjançant sistemes hormonals, el ronyó també és l'òrgan encarregat de regular la pressió arterial i la producció d'eritròcits i de vitamina D^{2,3}.

1.1. LA NEFRONA. FISIOLOGIA TUBULAR

La nefrona és la unitat anatòmica i funcional del ronyó a través de la qual es genera l'orina. En funció de la profunditat medul·lar a la que s'endinsen les nefrones, se'n poden distingir dos tipus: les nefrones corticals, que representen el 85 % del total de nefrones en humans, i les nefrones juxtamedul·lars, que suposen el 15 % restant⁴ (Figura 2).

Funcionalment (i anatòmicament) les nefrones estan dividides en la unitat de filtració, anomenat corpuscle renal –situat al còrtex renal– i la unitat de reabsorció i secreció, conegut com el túbul renal, localitzat tant al còrtex com a la medul·la renal. El corpuscle renal està format pel glomèrul (conjunt de capil·lars sanguinis) i la càpsula de Bowman, separats entre si per l'espai de Bowman. En aquesta regió és on es produeix el filtrat de la sang que arriba a través de l'arteriola aferent, generant l'orina primària o ultrafiltrat, i retorna per l'arteriola eferent. El volum d'orina primària formada per unitat de temps es coneix com taxa de filtració glomerular (GFR, *glomerular filtration rate*). El túbul renal és una llarga i contornejada estructura formada per cèl·lules epitelials unides entre sí mitjançant unions hermètiques (TJ, *tight junctions*) –que configuren la via de transport paracel·lular– que emergeix del glomèrul i té com a funció principal modificar la composició de l'orina primària mitjançant la reabsorció i secreció de soluts i d'aigua. El túbul renal es divideix en quatre segments funcionalment diferenciats: el túbul proximal, la nansa de Henle –formada per la descendent i l'ascendent prima i gruixuda– el túbul distal –que inclou el túbul contornejat distal i el túbul connector–, i el túbul col·lector (Figura 2). La pre-orina resultant del conjunt dels processos d'intercanvi que es produeixen al llarg dels tres primers segments desemboca als túbuls col·lectors, on es produeix un refinat final de la composició d'aquesta, generant l'orina final, que s'evoca als urèters per arribar a la bufeta urinària².

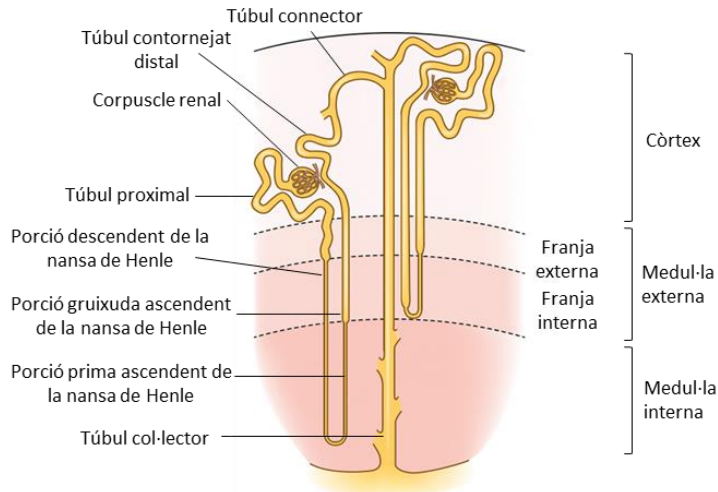


Figura 2. Estructura de la nefrona. Esquema dels diferents segments de la nefrona. El fluid tubular es genera al corpuscle renal i recorre tot el túbul fins alliberar l'orina final pel túbul col·lector. A l'esquerra, nefrona juxtamedul·lar; a la dreta nefrona cortical. Adaptada de⁵.

Per comprendre la fisiologia renal, en els següents apartats es descriuen els aspectes més rellevants de la fisiologia tubular en relació al transport d'electròlits i d'aigua, així com la relació d'aquests amb la reabsorció tubular de calci (Ca^{2+}) i magnesi (Mg^{2+}), ions objecte d'estudi en aquest treball. Cal mencionar que els valors que es mencionen tant de volum d'ultrafiltrat com de percentatges de reabsorció/secrèció de soluts a cada segment de la nefrona fan referència als d'un individu adult sa i que, en edats pediàtriques, aquests valors s'han d'ajustar en funció de la superfície corporal i de la maduració de la funció renal.

1.1.1. TÚBUL PROXIMAL

El túbul proximal és el primer segment del túbul renal, al que hi arriben aproximadament 180 L d'ultrafiltrat diaris amb una concentració de molècules de menys de 5 kDa (ions, glucosa, urea, aminoàcids i pèptids petits) similar a la plasmàtica i amb una baixa concentració de proteïnes, ja que el corpuscle renal limita el pas de proteïnes de més de 70 kDa^{2,6}. Tot i que el túbul proximal està

dividit en 3 subsegments morfològicament i funcionalment diferenciats², en aquest treball es tractarà com una única regió.

El túbul proximal és la regió on es produeix una major modificació de la composició de l'ultrafiltrat. El sodi (Na^+), a més de ser co-reabsorbit amb la glucosa, aminoàcids i fosfat mitjançant transportadors específics, entra a la cèl·lula a través de l'intercanviador apical NHE3 (*Sodium/hydrogen exchanger 3*, codificat pel gen *SLC9A3*), comportant la sortida de cations hidrogen (H^+) al lumen tubular. Aquests H^+ , juntament amb els alliberats per la bomba H^+ -ATPasa, es combinen amb el bicarbonat (HCO_3^-) present al lumen tubular i es genera diòxid de carboni (CO_2) i aigua (H_2O). El difon a la cèl·lula i es produeix la reacció inversa, generant HCO_3^- (i H^+) intracel·lular, que és co-transportat (amb Na^+) al fluid intersticial pel cotransportador NBCe1A (*Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1*, codificat pel gen *SLC4A4*)^{1,7}. Aquest procés configura l'inici de la regulació de l'equilibri àcid-base. No obstant, el mecanisme principal d'alliberament de Na^+ a l'espai intersticial és a través de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, a expenses de l'entrada de potassi (K^+) al citosol⁷.

El moviment iònic (principalment la reabsorció transcel·lular de Na^+) comporta una diferència en la concentració iònica entre la llum tubular i el fluid intersticial. Aquest esdeveniment permet la reabsorció paracel·lular d'aigua que, per efecte *solvent drag*, arrossega K^+ i genera una diferència de voltatge transepitelial (V_{te}) negativa al lumen (per a una major presència de cations a la regió basolateral), donant lloc a la reabsorció paracel·lular de clor (Cl^-). A mesura que s'avança pel túbul proximal, el cúmul de Cl^- al fluid intersticial reverteix la polaritat de la diferència de V_{te} , essent positiva al lumen, donant lloc a la reabsorció paracel·lular de Na^+ . Addicionalment, el Cl^- es reabsorbeix per via transcel·lular pel cotransportador KCC4 (*K⁺/Cl⁻ co-transporter 4*, codificat pel gen *SLC12A7*)⁸, i la reabsorció paracel·lular d'aigua es complementa amb la via transcel·lular a través dels transportadors aquoporina-1 i -7. Tant la reabsorció d'aigua, com el consegüent augment de la concentració de Mg^{2+} , Ca^{2+} , urea i

àcid úric al lumen tubular, fan que aquests siguin reabsorbits per via paracel·lular tant per difusió com per *solvent drag*^{1,2} (Figura 3).

Així doncs, a nivell del túbul proximal, la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} es pot veure reduïda tant per una disminució del V_{te} , com per una menor reabsorció d'aigua per via paracel·lular conseqüent a la inhibició de l'intercanviador NHE3 a través de l'acció de l'hormona paratiroide (PTH)^{9,10}. No obstant, cal mencionar, que la proporció de Mg^{2+} que s'absorbeix a la regió proximal de la nefrona és mínima i que aquest s'absorbeix majoritàriament a la nansa gruixuda ascendent de Henle i, en menys mesura, al túbul distal.

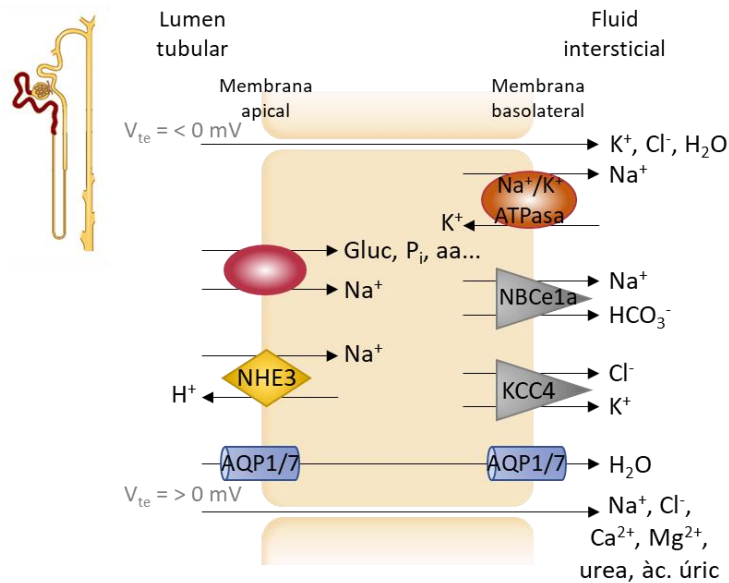


Figura 3. Cèl·lula del túbul proximal. El Na^+ es reabsorbeix a través de transportadors específics de glucosa (Gluc), fosfat (P_i) i aminoàcids (aa), i de l'intercanviador NHE3; i s'allibera a l'espai intersticial per la Na^+/K^+ -ATPasa i per NBCe1a, generant un voltatge transepitelial (V_{te}) negatiu al lumen als primers segments del túbul proximal (part superior de la figura). L'augment de Na^+ al fluid intersticial permet la reabsorció paracel·lular d'aigua, K^+ i Cl^- . El pas de Cl^- al fluid intersticial comporta un canvi en la polaritat del V_{te} (positiu al lumen) a l'últim segment del túbul proximal (part inferior de la figura), essent la força motriu per la reabsorció paracel·lular de cations com el Ca^{2+} i el Mg^{2+} .

Els ions amoni (NH_4^+) –produïts per amoniogènesi–, la creatinina, una petita part de la urea i d'àcid úric (inicialment reabsorbits) són secretats al túbul proximal¹¹. A més, en aquesta regió de la nefrona s'hi expressa exclusivament la 1- α -hidroxilasa (codificada pel gen *CYP27B1*), que és l'enzim encarregat de completar la síntesi del metabòlit actiu de la vitamina D (1,25-dihidroxivitamina D o calcitriol)³.

1.1.2. NANSA DE HENLE

La nansa de Henle està formada per diferents subsegments funcionalment i anatòmicament diferenciats i detallades a continuació: la descendent i l'ascendent. Aquesta última, alhora, es divideix en dues seccions: la prima i la gruixuda².

1.1.2.1. NANSA DESCENDENT DE HENLE

La major part de la nansa descendent de Henle expressa abundant aquoporina-1. La presència d'aquests canals d'aigua, juntament amb la baixa permeabilitat al Na^+ i al Cl^- característica d'aquest epitel·li, i l'alta concentració d'aquests ions al fluid intersticial, comporta la reabsorció massiva d'aigua ($\approx 15\%$ de l'aigua que conté l'ultrafiltrat). Addicionalment, també es produeix una secreció activa d'urea (veure apartat "Concentració de l'orina") mitjançant el transportador UT-A2 (codificat pel gen *SLC14A2*), així com la secreció passiva de K^+ que constitueix l'inici d'un procés anomenat reciclatge medul·lar de K^+ (veure apartat "Reciclatge medul·lar de K^+ "). Així doncs, a mesura que s'avança per la nansa descendent de Henle i s'endinsa a la medul·la renal, es genera un augment gradual de la concentració de soluts al lumen tubular^{6,8,12} (processos detallats a l'apartat "Concentració de l'orina").

1.1.2.2. NANSA PRIMA ASCENDENT DE HENLE

La nansa prima ascendent de Henle reabsorbeix Cl^- a través del canal CIC-Ka (codificat pel gen *CLCNKA*), acoblat a la subunitat Barttin (producte del gen *BSND*), tant a la regió apical com basolateral⁴. A més, donat que les TJ d'aquesta regió són relativament permeables al Na^+ i impermeables a l'aigua, es produeix una reabsorció neta de Na^+ i Cl^- independent d'aigua. En aquesta regió de la nefrona també es secreta urea per difusió facilitada i es reabsorbeix NH_4^+ i K^+ (veure apartat "Reciclatge medul·lar de K^+ "), per difusió i per via paracel·lular, respectivament^{2,6,8}. El resultat de tots aquests processos és un augment de concentració de soluts a l'interstici medul·lar, que és essencial pel control del volum i la concentració de l'orina¹ (veure apartat "Concentració de l'orina"). Tot i així, és important emfatitzar que, en humans, la majoria de nefrones (85 %) són corticals i, per tant, els manca de la nansa prima ascendent de Henle.

1.1.2.3. NANSA GRUIXUDA ASCENDENT DE HENLE

La nansa gruixuda ascendent de Henle (TAL, *thick ascending limb of Henle*) és crucial per a diverses tasques que desenvolupa la nefrona. S'hi poden distingir dos tipus cel·lulars: les cèl·lules R (*rough*), més abundants a la TAL més cortical, i les cèl·lules S (*smooth*), presents principalment a la TAL localitzada a la medul·la renal. El nom d'aquests tipus cel·lulars està determinat per la presència o absència, respectivament, de microvellositats a la regió apical^{13,14}. En hàmmster, ambdós tipus cel·lulars difereixen en la conductància al K^+ i al Cl^- (alta conductància apical i baixa basolateral de K^+ i baixa conductància basolateral de Cl^- en les cèl·lules R, i viceversa en les cèl·lules S)^{15,16}. A més, en rata s'han observat diferents patrons d'expressió del factor de creixement epitelial (EGF, *epidermal growth factor*) i del cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC2) entre ambdós tipus cel·lulars, essent més predominants en les cèl·lules S^{17,18}. Tot i que en humans no s'han descrit aquests dos tipus cel·lulars com a tal, sí que s'han identificat dues subpoblacions de cèl·lules a la TAL amb diferent expressió d'EGF. Així doncs, s'estima que l'heterogeneïtat observada en els models animals és similar a la humana¹⁹.

La TAL, a més de ser fonamental per la reabsorció de Na^+ , Cl^- , K^+ i cations divalents com el Ca^{2+} i el Mg^{2+} , també té un important paper en el procés de concentració de l'orina, de l'homeòstasi de l'equilibri àcid-base i de l'amoniac^{20,21}. Cadascun d'aquests processos es desenvolupen a continuació.

o Reabsorció de Na^+ i Cl^- – La reabsorció de Na^+ a la TAL es produeix mitjançant dues vies: la transcel·lular i la paracel·lular. La via transcel·lular inclou principalment dos mecanismes apicals, el cotransportador NKCC2 (codificat pel gen *SLC12A1*) i l'intercanviador NHE3. El cotransportador NKCC2 permet l'entrada de Na^+ , K^+ i Cl^- ; mentre que NHE3 reabsorbeix Na^+ a canvi de la sortida de H^+ . A la regió basolateral hi ha la bomba Na^+/K^+ -ATPasa que transporta Na^+ al fluid intersticial a canvi de l'entrada de K^+ , mantenint l'homeòstasi intracel·lular de Na^+ . Mutacions en la subunitat γ de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (codificada pel gen *FXYD2*) es relacionen amb la síndrome d'hipomagnesèmia dominant aïllada. El Cl^- reabsorbit per NKCC2 és alliberat al fluid intersticial mitjançant els transportadors KCC4, que simultàniament permet la sortida de Cl^- , i els canals de Cl^- formats per les subunitats CIC-Kb (producte del gen *CLCNKB*) i Barttin. Mutacions en aquestes subunitats són causants de la síndrome de Bartter de tipus 3 i 4 respectivament^{6,8} (Figura 4).

El gen *SLC12A1*, per mecanismes d'*splicing* alternatiu, dona lloc a 3 isoformes diferents: NKCC2A, NKCC2B i NKCC2F, que difereixen tant en l'afinitat iònica com en la distribució d'aquestes al llarg de la TAL. En humans, la isoforma NKCC2A –la menys afí al Cl^- – és la més abundant al llarg de total la TAL; la segona isoforma més expressada a la regió més cortical és la NKCC2B, amb una major afinitat pel Cl^- ; i, a les regions medul·lars, ho és la NKCC2F, amb menor afinitat pel mateix²². Aquesta distribució de les diferents isoformes al llarg de la TAL, tot i diferir lleugerament amb la descrita en altres espècies^{23,24}, encaixa amb la necessitat d'un augment progressiu de l'afinitat pel Cl^- , ja que la concentració d'aquest al fluid tubular disminueix progressivament a les regions corticals. La inhibició del transportador NKCC2 és el mecanisme d'acció dels

diürètics de nansa (per exemple, furosemda o bumetanida) i, mutacions en aquest gen donen lloc a la síndrome de Bartter de tipus 1²⁵.

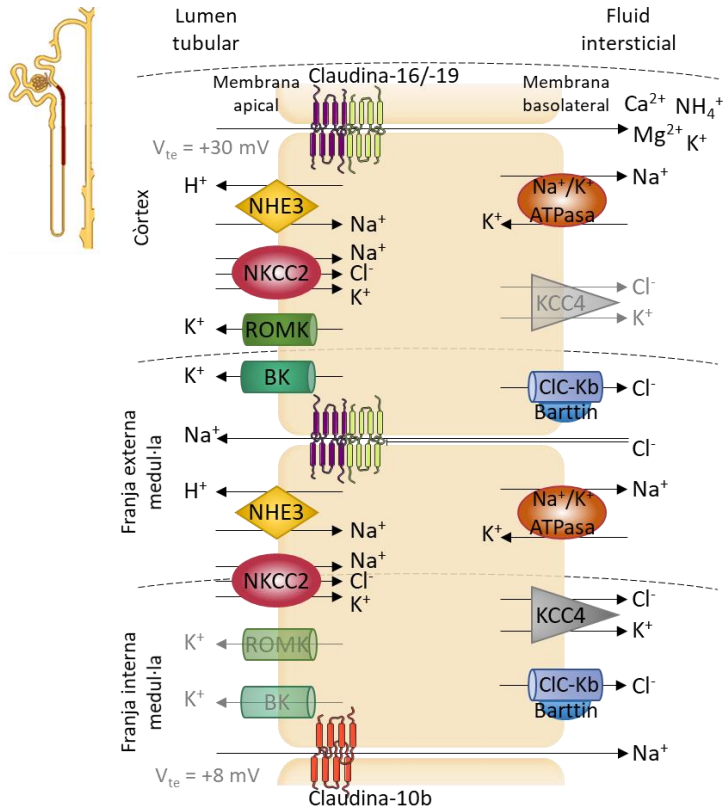


Figura 4. Cèl·lula de la TAL. A la TAL, el Na⁺ es reabsorbeix a través de NKCC2, que també reabsorbeix Cl⁻ i K⁺, i l'intercanviador NHE3. El Na⁺ és alliberat al fluid intersticial per la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa. A la TAL situada a la franja interna de la medul·la renal, el K⁺ i el Cl⁻ reabsorbits per NKCC2 són alliberats al fluid intersticial generant una diferència de voltatge transepitelial (V_{te}) positiu al lumen de +8 mV, que és la força motriu per la reabsorció paracel·lular de Na⁺ a través de les *tight junctions* on s'hi expressa la claudina-10. La reabsorció continuada de Na⁺ genera un gradient de concentració i, a la TAL localitzada a la franja externa de la medul·la renal, aquest és retornat al lumen tubular per via paracel·lular a través del complex claudina-16/19. Aquest retorn de Na⁺, juntament amb una disminució de l'expressió de KCC4 que allibera K⁺ al fluid intersticial, i un augment de canals de K⁺ apicals (ROMK i BK), promou l'augment del V_{te} a +30 mV, donant lloc a la reabsorció paracel·lular de Ca²⁺, Mg²⁺ i altres cations a través del complex claudina-16/19.

Per altra banda, també es produeix una reabsorció de Na^+ per via paracel·lular a la TAL compresa a la franja interna de la medul·la renal, gràcies al V_{te} positiu del lumen tubular, així com una secreció de Na^+ a la TAL localitzada a la franja externa de la medul·la externa²⁶ (Figura 4).

El transport de Na^+ i Cl^- està altament regulat per múltiples efectors. L'augment d'AMP cíclic (AMPC) intracel·lular estimulat per l'hormona antidiürètica (ADH, *antidiuretic hormone*), la PTH, el glucagó, la calcitonina, l'activació β -adrenèrgica i l'angiotensina II comporten un augment en la reabsorció de Na^+ i Cl^- ⁵; mentre que la prostaglandina E2 (PGE_2), elevades concentracions de Ca^{2+} extracel·lular –a través de l'activació de l'*extracellular calcium-sensing receptor* (CaSR)–, i l'òxid nítric intracel·lular inhibeixen la producció de AMPC i, alhora, afavoreixen la degradació del mateix²⁷, exercint l'efecte contrari en el transport de Na^+ i Cl^- ²⁸⁻³⁰.

○ Reciclatge medul·lar de K^+ – El procés de reciclatge medul·lar de K^+ s'inicia a la nansa descendent de Henle i finalitza a la regió medul·lar del túbul col·lector. Degut a l'alta concentració de K^+ dipositat a la medul·la renal, conseqüent a la reabsorció de K^+ a la nansa ascendent de Henle, la nansa descendent de Henle de les nefrones juxtamedul·lars secreten K^+ a la llum tubular de manera passiva⁸. A nivell de la TAL, el 90 % del K^+ reabsorbit té lloc a través del transportador NKCC2³¹ i, part d'aquest K^+ intracel·lular, principalment a la TAL medul·lar, és reabsorbit i alliberat al fluid intersticial a través del cotransportador KCC4⁵. A la TAL més cortical, en canvi, el K^+ és majoritàriament retornat al lumen tubular pels transportadors apicals ROMK (codificat pel gen *KCNJ1*), i el canal BK (també conegut com *calcium-activated maxi K⁺ channel*). Ambdós transportadors de K^+ també s'expressen a la TAL més medul·lar, tot i que amb menys intensitat. Mutacions al gen *KCNJ1* dona lloc a la síndrome de Bartter de tipus 2³². A més de la via transcel·lular, a la TAL cortical, el K^+ també es reabsorbeix per via paracel·lular gràcies al V_{te} positiu del lumen tubular³³. Aquest reciclatge del K^+ a la TAL, a més de contribuir en la generació del V_{te} , garanteix la presència de K^+ al lumen tubular, imprescindible

pel funcionament de NKCC2³⁴. L'últim mecanisme implicat en el reciclatge medul·lar de K⁺ és la reabsorció de K⁺ a la regió medul·lar del túbul col·lector³³.

La intensitat en la que es produeixen tots aquests processos, juntament amb la secreció (o no) de K⁺ al túbul distal, que està relacionada amb la ingesta dietètica de K⁺, determina la quantitat de K⁺ eliminat per l'orina^{6,8}.

○ Reabsorció de Ca²⁺ i Mg²⁺ – A la TAL es reabsorbeixen aproximadament el 25 % del Ca²⁺ i el 60 % del Mg²⁺ filtrat al corpuscle renal³⁵. La reabsorció d'aquests dos cations divalents es produeix exclusivament per via paracel·lular, i de manera més predominant a la TAL cortical i a la franja externa de la medul·la, gràcies a la diferència V_{te} positiu al lumen tubular^{36,37}. Per comprendre la fisiologia de la reabsorció de Ca²⁺ i Mg²⁺ a la TAL, cal distingir la TAL localitzada al còrtex (i a la franja externa de la medul·la), de la situada a la franja interna de la medul·la, ja que difereixen tant a nivell de transport electrolític (mencionat prèviament) com a nivell d'expressió de proteïnes de TJ, que són les que en determinen la selectivitat iònica del transport paracel·lular²¹.

El transport diferencial entre la membrana apical i la basolateral de les cèl·lules de la TAL, conseqüent a la presència de diferents tipus de transportadors en ambdues membranes fa que, globalment, la membrana apical i la basolateral tinguin diferents permeabilitats iòniques i, en conseqüència, diferent potencial de membrana. La diferència entre els potencials de membrana apical i basal a la regió més medul·lar de la TAL constitueixen una lleugera diferència de V_{te} que és positiva al lumen (+8 mV) degut a l'abundància de cations al lumen tubular³⁸, que és la força motriu per la reabsorció paracel·lular de Na⁺ a través de les TJ on s'hi expressa la claudina-10b^{39,40}. La reabsorció continuada de Na⁺ per via paracel·lular (i transcel·lular) a les regions més medul·lars comporta la dilució del fluid tubular i, per tant, un augment en la diferència de concentració de Na⁺ entre el fluid tubular i l'intersticial a les regions més corticals, el que dona lloc a la secreció paracel·lular de Na⁺, a través del complex format per les claudines-16/19.

Aquest Na^+ retornat al lumen tubular, a més de ser substrat del transportador NKCC2 i permetre l'activitat del mateix, juntament amb un augment de l'expressió de ROMK a la membrana apical³⁵, contribueixen a incrementar, encara més, la diferència de V_{te} fins a valors de +30 mV^{41,42}. Aquesta diferència de V_{te} permet la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} per via paracel·lular a través del complex format per les claudines-16/19 expressat a les TJ^{36,39} (Figura 4).

A la membrana basolateral de la TAL s'hi expressa el CaSR (codificat pel gen *CASR*) que, com el seu nom indica, és sensible a les concentracions de Ca^{2+} extracel·lular³⁰, tot i que també a les del Mg^{2+} i altres cations divalents⁴³. Una de les múltiples conseqüències de l'activació del CaSR és la inhibició de producció de PTH a les glàndules paratiroides⁴⁴. Per això, mutacions que comporten un guany de funció desencadenen la hipocalcèmia autosòmica dominant⁴⁵, mentre que la pèrdua de funció dona lloc a l'hiperparatiroidisme sever neonatal i a la hipercalcèmia hipocalciúrica familiar^{46,47}. El CaSR regula negativament la reabsorció paracel·lular de Ca^{2+} i Mg^{2+} a la TAL mitjançant mecanismes epigenètics⁴⁸ (veure apartat "Claudines"). Per altra banda, l'activació del CaSR comporta l'activació de la fosfolipasa A2 (PLA_2) i, per tant, la producció d'àcid araquidònic, que pot ser metabolitzat per dues vies diferents, generant àcid 20-hidroxicicosatetraenoic (20-HETE) o PGE_2 ⁵. Tot i que la primera via és més predominant a la TAL³⁰, el CaSR estimula també l'expressió del factor de necrosi tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$, *tumor necrosis factor alpha*), activant així la segona via⁴⁹. El 20-HETE inhibeix el cotransportador NKCC2, els canals apicals ROMK, els canals basolaterals de Cl^- i també la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, comportant l'abolició del V_{te} i, per tant, de la reabsorció paracel·lular de Ca^{2+} i Mg^{2+} ^{28,30,50}. Aquest efecte final és també produït per la PGE_2 ⁵¹. Cal mencionar que, tots els factors que alteren la reabsorció de Na^+ i Cl^- a la TAL, modifiquen indirectament també el transport de Ca^{2+} i Mg^{2+} degut a variacions en el V_{te} , que és la força motriu per la reabsorció paracel·lular d'ambdós cations.

En humans, la TAL és un dels segments de la nefrona sensible a la PTH (ja que expressa el receptor PTHR1⁵²), a la calcitonina i, a diferència d'altres

espècies, no ho és a l'ADH⁵³. La PTH és una hormona secretada en resposta a estats hipocalcèmics⁵⁴ i hiperfosfatèmics⁵⁵. Al túbul proximal, estimula la producció de calcitriol⁵⁴, mentre que a la TAL, inhibeix la transcripció de claudina-14, afavorint així la reabsorció paracel·lular de Ca^{2+} i Mg^{2+} ⁵⁶. En paral·lel, la calcitonina també estimula la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} mitjançant mecanismes encara desconeguts⁵⁷. A la part superior de la figura 5 s'esquematitzen els processos que regulen la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} a la TAL.

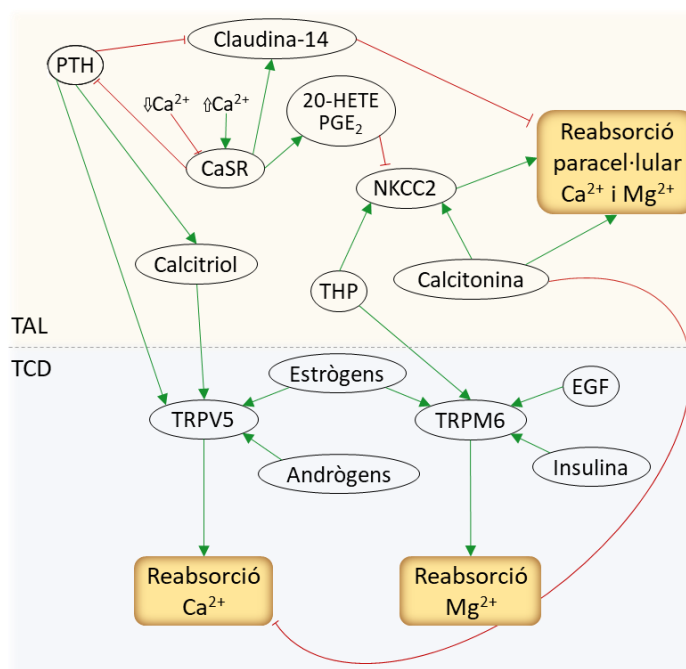


Figura 5. Regulació de la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} a la TAL i al TCD. Les fletxes verdes indiquen estimulació, mentre que les línies vermelles mostren inhibició. TAL, nansa gruixuda ascendent de Henle; TCD, túbul contornejat distal; PTH, hormona paratiroidal; 20-HETE, àcid 20-hidroxicicosatetraènic; PGE_2 , prostaglandina E2; THP, uromodulina; EGF, factor de creixement epidèrmic.

- o Concentració de l'orina – La totalitat de la nansa de Henle està implicada en la concentració de l'orina, que té lloc gràcies al gradient osmòtic medullar generat per l'anomenat mecanisme en contracorrent, basat en l'intercanvi de

substàncies. Aquest mecanisme es produeix a través de 3 processos: el sistema multiplicador en contracorrent a les nefrones juxtamedul·lars, el reciclatge de la urea als túbuls col·lectors i l'intercanvi a contracorrent a la vasa recta (vasos sanguinis localitzats al voltant de la nansa de Henle)¹.

El sistema multiplicador en contracorrent (Figura 6A) s'inicia per l'absorció de Na^+ i Cl^- per NKCC2 a la TAL, provocant un augment de l'osmolaritat intersticial. Aquest augment de soluts al fluid intersticial comporta la reabsorció d'aigua a la nansa descendent de Henle (permeable a l'aigua, però no als soluts), donant lloc a un augment gradual de la concentració tubular de Na^+ i Cl^- a mesura que descendeix cap a la part més medul·lar d'aquesta. L'alta concentració de Na^+ i Cl^- que arriba a la nansa prima ascendent fa que aquesta regió –impermeable a l'aigua i permeable als soluts– reabsorbeixi Na^+ i Cl^- , contribuint en l'augment de l'osmolaritat intersticial a la regió més medul·lar. Aquesta reabsorció de Na^+ i Cl^- continua al llarg del TAL i, a mesura que la concentració luminal de Na^+ i Cl^- disminueix, es redueix també la reabsorció d'aquests ions. Tots aquests processos es produeixen simultàniament i constantment, pel que es genera un cicle retroalimentat a sí mateix. El segon mecanisme és el reciclatge de la urea als tubs col·lectors. Al llarg de la nefrona, amb excepció del túbul proximal, la concentració d'urea al lumen tubular augmenta degut a la secreció de la mateixa i a la reabsorció d'aigua. És per això que la urea és reabsorbida per difusió passiva a la regió medul·lar del túbul col·lector, provocant un augment d'aquesta a l'interstici medul·lar que, en part, és reciclada i secretada al fluid tubular a la nansa descendent de Henle. Per últim, el gradient osmòtic medul·lar és mantingut gràcies al tercer mecanisme: l'intercanvi a contracorrent a la vasa recta (Figura 6B). La vasa recta és una estructura capil·lar paral·lela i contraposada a la nansa de Henle. Aquesta disposició pròxima al túbul renal permet l'intercanvi de substàncies entre la sang i el fluid tubular que circulen en sentits oposats. Inicialment, quan la vasa recta s'endinsa a la medul·la renal, en paral·lel a la TAL, es produeix una alliberació d'aigua de la sang al fluid intersticial simultània a l'entrada de Na^+ i Cl^- al torrent sanguini. Aquest procés continua al llarg de tota la vasa recta

descendent fins arribar a la part més profunda de la medul·la, on l'osmolaritat vascular s'igualava amb la intersticial i la del lumen tubular a 1.200 mOsm. Alhora, a la vasa recta ascendent succeeix el procés contrari: donat que l'osmolaritat de tots els fluids va disminuint, s'allibera Na^+ i Cl^- de la sang al fluid intersticial i l'aigua torna a entrar a la vasa recta fins que aquesta arriba al còrtex renal, on torna a tenir l'osmolaritat inicial (300 mOsm). Cal mencionar que tant el fluid intersticial, la vasa recta, com el fluid tubular es troben constantment en equilibri osmòtic, pel que l'augment de concentració de soluts a la regió medul·lar es produeix simultàniament als tres fluids¹.

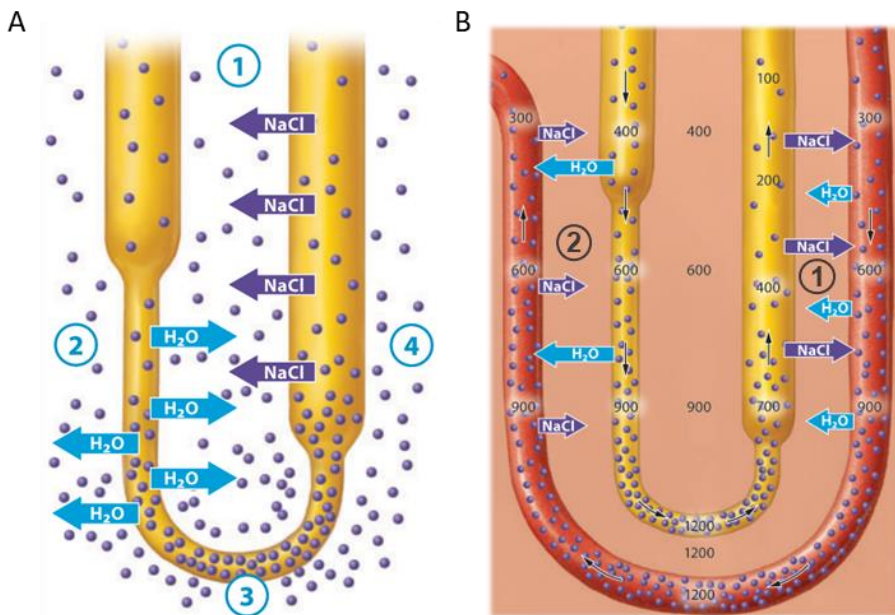


Figura 6. Mecanisme en contracorrent per la concentració de l'orina. A) Sistema multiplicador en contracorrent. La reabsorció de Na^+ i Cl^- independent aigua a la TAL (1) comporta un augment de la concentració d'aquests ions al fluid intersticial i permet que la nansa descendent de Henle reabsorbeixi aigua (2), provocant un augment de la concentració de soluts al lumen tubular a mesura que aquest s'endinsa a la medul·la (3) i, per tant, aquests ions tornen a ser substrats per la reabsorció a la TAL (4), tancant així el cicle. B) Intercanvi a contracorrent a la vasa recta. A la medul·la renal la vasa recta descendent, amb una osmolaritat lleugerament inferior a la del fluid intersticial, allibera aigua a aquest i n'absorbeix el Na^+ i Cl^- reabsorbits i alliberats a l'interstici per la TAL (1). Aquest procés continua al llarg de tota la vasa recta descendent per tal d'igualar les osmolaritats entre ambdós fluids, ja que a l'interstici aquesta augmenta progressivament. Per tal de mantenir l'equilibri osmòtic, el procés s'inverteix a la vasa recta ascendent, on s'absorbeix aigua a la sang i es secreta Na^+ i Cl^- (2). Adaptada de¹.

La sincronització de tots aquests processos generen un gradient osmòtic al llarg de la medul·la renal que és el que permet que es produeixi la concentració de l'orina. No obstant, aquest procés també depèn de l'activitat de l'ADH. L'ADH, que s'allibera en resposta a canvis en l'osmolaritat sanguínia, permet que, a mesura que el túbul col·lector s'endinsa a la medul·la renal i, per tant, l'osmolaritat intersticial augmenta gradualment, es reabsorbeixi aigua al túbul col·lector (i al túbul distal) mitjançant l'augment d'expressió d'aquaporina-2^{1,58}.

○ Homeòstasi de l'equilibri àcid-base – Tot i que la majoria del HCO_3^- es reabsorbeix al túbul proximal, a la TAL s'absorbeix aproximadament el 15 % de HCO_3^- ⁵⁹. Donades l'estructura i les característiques funcionals de la nansa descendent de Henle, la concentració de HCO_3^- al fluid tubular augmenta a mesura que s'endinsa a la medul·la renal. A la TAL, com en altres parts de la nefrona, el mecanisme de reabsorció de HCO_3^- consisteix en la secreció de H^+ al lumen tubular i l'alliberament de HCO_3^- per la membrana basolateral. La principal via de secreció apical de H^+ a la cèl·lula de la TAL és l'intercanviador NHE3 ^{60,61}, tot i que també s'ha detectat la presència d'una bomba H^+ -ATPasa⁶². De la mateixa manera que al túbul proximal, el H^+ secretat es combina amb el HCO_3^- present al lumen i, mitjançant l'activitat de l'anhidrasa carbònica IV, es genera H_2O i CO_2 . Aquest últim difon a la cèl·lula, on es produeix la reacció inversa amb la presència de l'anhidrasa carbònica II (CA II) intracel·lular²⁰. El HCO_3^- intracel·lular generat és reabsorbit al fluid intersticial per l'intercanviador aniónic AE2, que allibera HCO_3^- i permet l'entrada de Cl^- , i d'un cotransport de K^+ - HCO_3^- , probablement a través de KCC4 ⁵. També s'ha descrit la presència d'una bomba Na^+/H^+ a la membrana basolateral que permet l'entrada d'ambdós cations, així com la del cotransportador NBCn1 , que es creu que permet l'entrada de HCO_3^- i Na^+ a la cèl·lula⁶³.

La reabsorció del HCO_3^- a la TAL està regulada per canvis en l'equilibri àcid-base, probablement, a través de l'estimulació hormonal dels glucocorticoides i l'aldosterona⁶⁴.

○ Homeòstasi de l'amoni (NH_4^+) – L' NH_4^+ és produït i secretat al túbul proximal, reabsorbit a la TAL, concentrat a l'interstici medul·lar i, finalment, secretat al túbul col·lector en forma de NH_3 , on es combina amb H^+ i s'elimina per l'orina en forma de NH_4^+ . Tot i que l' NH_4^+ es reabsorbeix al llarg de tota la TAL, la quantitat de NH_4^+ transportat a la TAL medul·lar és dues vegades superior al de la TAL cortical⁶⁵, contribuint així en la formació d'un gradient cortico-medul·lar de NH_4^+ . Donat que l'ió NH_4^+ té el mateix radi iònic que el K^+ , pot ser transportat a través dels mecanismes de transport del K^+ (NKCC2 i ROMK a la membrana apical, KCC4 i la bomba Na^+/K^+ -ATPasa a la membrana basolateral, així com per via paracel·lular)⁵. Tot i així, el principal mecanisme involucrat en la reabsorció de NH_4^+ a la TAL és a través d'NKCC2 a la membrana apical i, l'intercanviador de Na^+/H^+ NHE4 (*sodium/hydrogen exchanger 4*) a la membrana basolateral, intercanviant Na^+ per NH_4^+ ⁶⁶. L'entrada transitòria de NH_4^+ a la cèl·lula provoca una lleugera acidificació intracel·lular que inhibeix la reabsorció del mateix, i que és neutralitzada per l'entrada basolateral de HCO_3^- per NBCn1⁶⁷. Finalment, al túbul col·lector, l' NH_3 intersticial entra per difusió a la cèl·lula i és secretat per via transcel·lular⁶⁸. Globalment, l'excreció renal d'amoni és regulada per múltiples factors: l'acidosi metabòlica, la hipopotassèmia, els glucocorticoides i l'alta aportació proteica nutricional comporten un augment de l'excreció d'amoni urinari⁶⁸.

Tot i la impermeabilitat d'aquest epitel·li a l'aigua, a la regió basolateral de la TAL s'hi expressa l'aquaporina-1, que permet el flux d'aigua entre el fluid intersticial i la cèl·lula per tal de permetre canvis en el volum cel·lular en resposta als canvis d'osmolaritat conseqüents a l'alta activitat de transport iònic transcel·lular⁶⁹.

Les cèl·lules de la TAL són les úniques en tot l'organisme que expressen la uromodulina o *Tamm-Horsfall protein* (THP)⁷⁰. La THP (codificada pel gen *UMOD*) és una glicoproteïna expressada a la membrana apical de les cèl·lules de la TAL⁷¹ –tot i que també s'ha descrit la seva presència a la membrana

basolateral⁷²– que es secreta fisiològicament per l'orina. Malgrat es desconeix la funció específica d'aquesta proteïna, s'ha descrit que l'expressió de la THP està incrementada en dietes riques en sal⁷³ i, que un augment en l'expressió d'aquesta, comporta una estimulació de l'activitat dels transportadors apicals NKCC2⁷⁴ (Figura 5) i ROMK⁷⁵. Alhora, es coneix que la THP té un paper protector enfront les infeccions del tracte urinari (ITU) i la nefrolitiasi⁷³. Mutacions al gen *UMOD* desencadenen la malaltia autosòmica dominant quística medul·lar de tipus 2 i la nefropatia hiperuricèmica familiar juvenil⁷⁶. També s'han descrit variants en aquest gen que confereixen un augment en la susceptibilitat a desenvolupar hipertensió i malaltia renal crònica (CKD, *chronic kidney disease*)⁷⁷.

A la regió compresa entre el final de la TAL i l'inici del túbul contornejat distal hi ha l'aparell juxtaglomerular, format per la màcula densa, les cèl·lules granulars (cèl·lules especialitzades de l'arteriola aferent) i les cèl·lules mesangials extraglomerulars. La disposició espacial i l'estructura de l'aparell juxtaglomerular permet la regulació del volum extracel·lular i de l'excreció de Na⁺ i Cl⁻ gràcies al mecanisme de retroalimentació túbul-glomerular: les cèl·lules de la màcula densa actuen com a sensors del flux i de la composició de Na⁺ i Cl⁻ al fluid tubular i modulen la secreció de renina per part de les cèl·lules granulars, activant així l'eix renina-angiotensina-aldosterona, alhora que regulen el GFR². Així doncs, la composició de la pre-orina que arriba a l'aparell juxtaglomerular, producte directe de l'activitat de la TAL, és un factor determinant per la regulació del GFR²¹.

1.1.3. TÚBUL DISTAL

El túbul distal, inclou dos segments de la nefrona: el túbul contornejat distal (TCD) i el túbul connector. El TCD és un epiteli impermeable a l'aigua, configurant-se com el segment de dilució més terminal de la nefrona⁷⁸, mentre que el túbul connector expressa canals d'aquaporina-2⁶.

Al TCD es produeix la reabsorció del 5 al 10 % de Na^+ a través del cotransportador de Na^+/Cl^- (NCC, codificat pel gen *SLC12A3*), i el canal de sodi epitelial sensible a amilorida (ENaC, *Epithelial sodium channel*). El cotransportador NCC és la molècula diana dels diürètics tiazides i, mutacions en aquest gen desencadenen la síndrome de Gitelman⁷⁹, que cursa amb hipopotassèmia, hipomagnesèmia i hipocalciúria. A nivell basolateral, la sortida al fluid intersticial del Na^+ reabsorbit té lloc a través de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, que extreu Na^+ a canvi de l'entrada de K^+ ⁸⁰. Aquest K^+ intracel·lular és retornat a l'espai intersticial per l'heterodímer format per Kir4.1/Kir5.1 (codificats per *KCNJ10* i *KCNJ16*, respectivament)⁸¹. Mutacions en aquests gens causen malalties que, a nivell renal, cursen amb un fenotip similar a la síndrome de Gitelman^{82,83}. A la regió més inicial del TCD, el Cl^- es reabsorbeix a través d'*NCC*⁸⁴, i s'allibera a l'interstici pel canal *ClC-Kb/Barttin*⁸⁵ i *KCC4*⁸⁶; mentre que, a la regió més final, es reabsorbeix per via paracel·lular gràcies a la diferència de V_{te} lumen negatiu⁸⁷ (Figura 7). La reabsorció de Na^+ i Cl^- al TCD està altament regulada per la concentració tubular d'aquests ions. Així doncs, una dieta pobra en sal, i hormones com l'aldosterona i l'angiotensina II augmenten reabsorció de Na^+ i Cl^- ⁷⁸. A nivell del TCD es produeix una secreció de K^+ depenent del V_{te} negatiu al lumen i del flux de fluid luminal, a través de ROMK i BK⁸⁷, que augmenta a mesura que incrementa l'expressió d'ENaC⁸⁸. Així doncs, l'ús de diürètics de nansa (inhibidors de NKCC2), comporta un augment de la concentració tubular de Na^+ , un increment del flux tubular i, conseqüentment, un augment en la secreció de K^+ ⁸⁷ (Figura 7).

La reabsorció del Ca^{2+} a TCD té lloc a través de mecanismes transcel·lulars actius, essent una regió clau pel refinament dels nivells d'excreció urinària de Ca^{2+} . A la membrana apical s'hi expressa el canal TRPV5 (*transient receptor potential channel subfamily V member 5*, codificat pel gen *TRPV5*) que permet l'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula⁸⁹. A nivell intracel·lular, el Ca^{2+} s'associa amb la calbindina-D28K (producte del gen *CALB1*) i és alliberat al fluid intersticial a través de les bombes Ca^{2+} -ATPasa (PMCA1 i PCMA4) i l'intercanviador NCX1 (*Type 1 sodium calcium exchanger*)^{90,91} (Figura 7). La reabsorció de Ca^{2+} al TCD

està regulada principalment per la modulació de TRPV5: la PTH n'augmenta l'expressió i l'activitat, i n'inhibeix la internalització de la membrana^{92,93}, alhora que incrementa la presència de calbindina-D28K⁵⁶. El calcitriol, igual que els andrògens, estimulen la transcripció de *CALB1* i *TRPV5*⁹⁴⁻⁹⁶. S'ha mostrat també que els estrògens estimulen l'expressió de TRPV5⁹⁷ i de la bomba PMCA⁹⁸. En sentit contrari, la calcitonina regula negativament la reabsorció de Ca²⁺ al TCD, a través de mecanismes encara desconeguts, però de manera independent a TRPV5 i a la Calbindina-D28K⁹⁹. A la part inferior de la figura 5 s'esquematitzen els processos reguladors de la reabsorció de Ca²⁺ al TCD.

Aproximadament el 10 % del Mg²⁺ filtrat al glomèrul és reabsorbit al TCD per via transcel·lular⁸⁷. El canal apical TRPM6 (*transient receptor potential cation channel subfamily M member 6*, codificat pel gen *TRPM6*), reabsorbeix Mg²⁺¹⁰⁰ i, mutacions en aquest gen desencadenen la hipomagnesèmia amb hipocalcèmia secundària¹⁰¹. A nivell basolateral, es desconeix el transportador que allibera el Mg²⁺ al fluid intersticial; no obstant, els transportadors ciclina M₂ (CNNM2, codificat pel gen *CNNM2*) i SLC41A1, en són candidats¹⁰⁰ (Figura 7). Mutacions a *CNNM2* desencadenen la hipomagnesèmia dominant¹⁰². El transportador TRPM6 és regulat per múltiples efectors (Figura 5): l'EGF¹⁰³ i la insulina¹⁰⁴ n'augmenten la presència a la membrana apical, la THP regula positivament el canal TRPM6 interaccionant directament i impeding-ne l'endocitosi¹⁰⁵, els estrògens n'estimulen l'expressió i, altres factors com la ingesta dietètica de Mg²⁺¹⁰⁶, el pH i la concentració intracel·lular d'ATP¹⁰⁷ en modulen l'activitat. L'EGF és una proteïna soluble generada per l'escissió proteolítica del pro-EGF, expressat a la membrana basolateral de la cèl·lula del TCD. L'EGF alliberat és el lligand del receptor d'EGF (EGFR, *EGF receptor*), localitzat a la mateixa membrana, i és qui desencadena la regulació positiva del transportador TRPM6⁸⁷. S'han descrit mutacions al gen *EGF* causants d'hipomagnesèmia aïllada d'herència recessiva¹⁰⁸. A nivell farmacològic, els diürètics àmpliament utilitzats tiazides, inhibeixen l'expressió de TRPM6, comportant un augment en l'excreció de Mg²⁺ per via urinària¹⁰⁹.

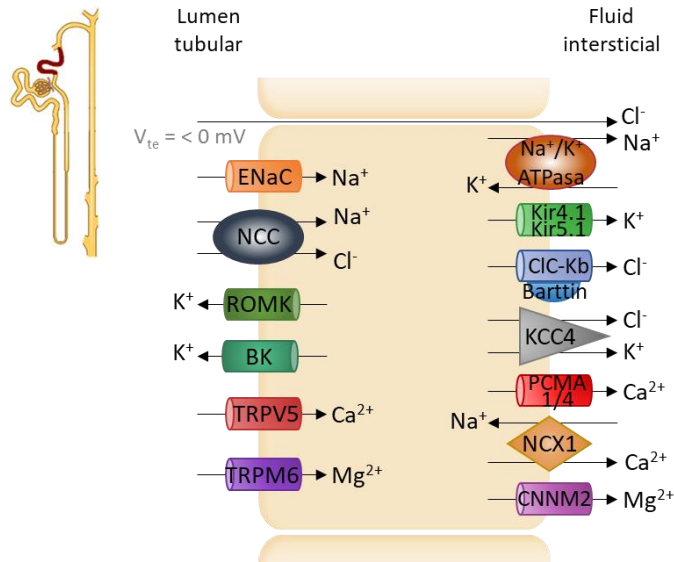


Figura 7. Cèl·lula del túbul distal. El túbul distal reabsorbeix la majoria de soluts de manera transcel·lular. La reabsorció de Na⁺ a través del cotransportador NCC (acompanyat de Cl⁻) i del canal ENaC, així com la subsegüent alliberació d'aquests al fluid intersticial comporta l'entrada de K⁺ per la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa, alliberat tant a l'interstici com al fluid tubular, i la generació d'un voltatge transepitelial negatiu al lumen que permet la reabsorció paracel·lular de Cl⁻. El Ca²⁺ i el Mg²⁺ es reabsorbeixen també per via transcel·lular a través de canals específics.

Al túbul connector, la reabsorció de Na⁺ apical té lloc a través de l'intercanviador NHE2 i del canal ENaC i, a nivell basolateral, el Na⁺ és alliberat al fluid intersticial a través de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa que, alhora, permet l'entrada de K⁺. Aquest K⁺ és secretat al fluid tubular pels canals apicals ROMK i BK. L'expressió i l'activitat d'ENaC, de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa i de ROMK estan estretament regulades positivament per l'aldosterona. El túbul connector, mitjançant els mateixos mecanismes que el túbul col·lector, també està implicat en la regulació de l'equilibri àcid-base (veure apartat "Túbul col·lector"). Tot i així, cal mencionar que el paper del túbul connector en l'homeòstasi àcid-base es troba incrementat en situacions d'acidosi metabòlica a través d'un augment en el transport de NH₄⁺ ¹¹⁰.

1.1.4. TÚBUL COL·LECTOR

El túbul col·lector (TC), l'últim segment de la nefrona, està format per dos tipus cel·lulars: les cèl·lules principals i les cèl·lules intercalades; i és el segment responsable del refinament final de la composició de l'orina, així com de regular el moviment d'aigua, Na^+ , Cl^- i K^+ , i l'equilibri àcid-base¹¹¹.

Les cèl·lules principals del TC, igual que les del túbul connector, s'encarreguen de reabsorbir Na^+ a través dels canals apicals ENaC i de secretar K^+ per ROMK, juntament amb l'activitat de la bomba basolateral Na^+/K^+ -ATPasa. Al TC hi arriben aproximadament 10 L d'aigua diaris² i, sota la regulació de l'ADH, part d'aquesta és reabsorbida a través de la combinació d'expressió apical i basolateral dels canals d'aquoporina-2, -3 i -4¹¹¹. Les cèl·lules intercalades, en canvi, s'encarreguen principalment de regular l'equilibri àcid-base mitjançant la secreció al fluid tubular de HCO_3^- i H^+ generats al citosol per la CA II¹¹².

Al TC també es regula l'excreció urinària de NH_4^+ . La reabsorció massiva de NH_4^+ a la TAL provoca un augment de la concentració d'aquest al fluid intersticial, que és la força motriu— juntament amb l'acidificació de l'orina— per la secreció transcel·lular de NH_4^+ a la llum tubular¹¹³⁻¹¹⁵. En aquesta regió de la nefrona també s'hi expressa la CaSR a la membrana apical, essent un mecanisme sensor de la calciúria¹¹⁶.

2. UNIONS HERMÈTIQUES

Les TJ són un tipus d'unió intercel·lular que permet segellar lateralment les cèl·lules evitant el pas lliure de molècules entre els compartiments apical i basolateral. Les TJ també contribueixen al manteniment de la polaritat cel·lular prevenint la difusió lateral de les proteïnes integrals de membrana i mantenint així les funcions especialitzades de cada regió. Malgrat totes les TJ són impermeables a macromolècules, la permeabilitat a molècules petites varia en funció del tipus d'epiteli i del patró de proteïnes que les formen¹¹⁷.

Estructuralment, les TJ estan formades per proteïnes integrals de membrana –que tenen contacte directe amb la cèl·lula adjacent– i per proteïnes adaptadores que permeten la unió de les proteïnes de membrana amb el citoesquelet cel·lular. En funció del nombre de dominis transmembrana (TM) de les proteïnes integrals de membrana, se'n distingeixen 3 grups: a) amb un únic domini TM, que inclou, entre d'altres, les *junctional adhesion molècules* (JAMs) i la *Crumbs protein homolog 3* (Crb3), b) amb tres dominis TM, la *blood vessel epicardial substance* (Bves) i, c) amb quatre dominis TM, també anomenades tetraspanines, on hi ha les claudines i les proteïnes TAMP (*Tight junction-associated MARVEL proteins*), on s'inclouen entre d'altres l'occludina. Aquestes proteïnes tenen la capacitat d'interaccionar directament amb proteïnes adaptadores com les *Zonula occludens-1, -2 i -3* (ZO-1, -2 i -3), Par3, Par6, PALS1 (també anomenada MPP5, *MAGUK p55 subfamily member 5*) i PATJ (*Pals1-associated tight junction protein* o *Protein associated to tight junctions*)¹¹⁸. A continuació es detallen les característiques de les claudines, així com la seva presència, funció i característiques al llarg del túbul renal.

2.1. CLAUDINES

Les claudines són una família de proteïnes que, en humans, inclouen almenys 23 membres¹¹⁹. Són proteïnes integrals de membrana d'entre 21 i 28 kDa que contenen 4 dominis TM, dos *loops* extracel·lulars (ECL1 i ECL2) i ambdós extrems, C- i N-terminals, intracel·lulars¹²⁰. A més d'actuar a les TJ com a barrera i porus iònic selectiu del transport paracel·lular (capacitat conferida per l'ECL1)¹²¹, estan implicades també en el desenvolupament fetal¹²². Les claudines actuen en forma de polímers interaccionant simultàniament entre elles en *trans* (amb claudines de la cèl·lula adjacent) –a través de l'ECL2^{123–}, i en *cis* (amb claudines de la mateixa cèl·lula). Aquests complexos poden estar formats per un únic tipus de claudina o per claudines diferents¹²⁰. L'extrem C-terminal, que conté el domini PDZ que li permet interaccionar amb les proteïnes adaptadores¹²⁴, és crucial per la localització de la proteïna a les TJ i per mantenir l'estabilitat de la mateixa (Figura 8).

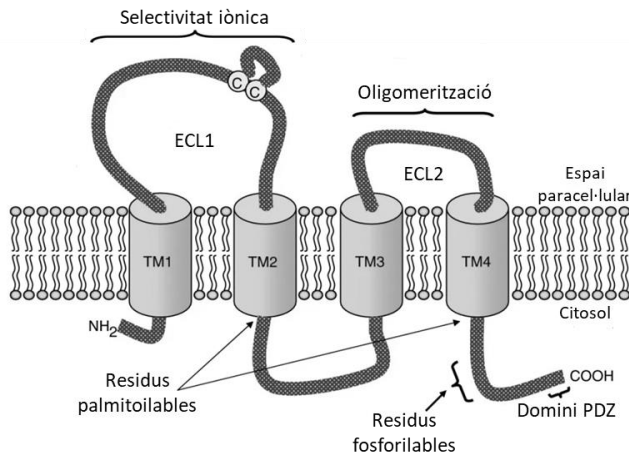


Figura 8. Representació esquemàtica d'un monòmer de claudina. Model representatiu de les característiques bàsiques estructurals de les claudines. L'ECL1 i l'ECL2 representen els *loops* extracel·lulars 1 i 2, que els confereix la selectivitat iònica i la capacitat d'oligomerització, respectivament. Els 4 dominis transmembrana es representen com TM1-4. Adaptada de¹¹⁹.

Al ronyó, cada segment de la nefrona expressa un conjunt específic de claudines, conferint a cadascun d'aquests una permeabilitat i selectivitat paracel·lular única. Tot i l'escassa informació que es disposa en humans, a la Figura 9 es detalla el patró d'expressió de les claudines en la nefrona humana. Focalitzant l'atenció a la TAL, segment de la nefrona objecte d'estudi, s'hi expressen simultàniament la claudina-3¹²⁵, -10^{125,126}, -14⁴⁸, -16^{125,127} i -19¹²⁷. La claudina-3 actua com a barrera no selectiva¹²⁸, i se'n desconeix la seva funció en la fisiologia de la TAL¹²⁴, mentre que el paper de les claudines-10, -14, -16 i -19 a la TAL es detalla a continuació.

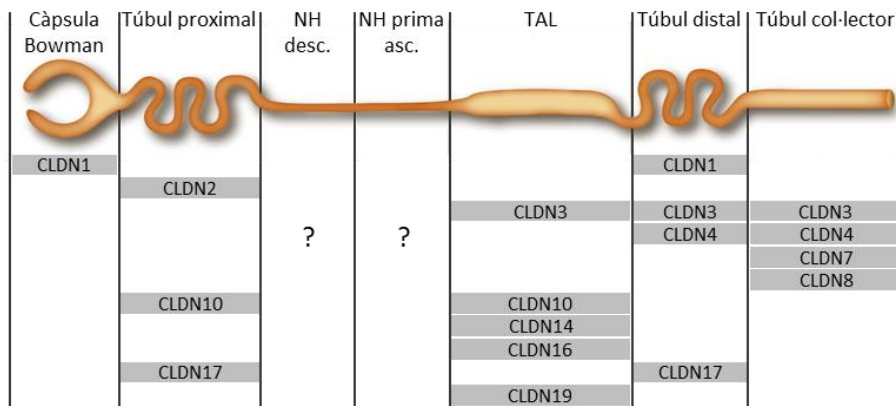


Figura 9. Patró d'expressió de les claudines (CLDN) al llarg de la nefrona humana. Els interrogants mostren l'absència d'informació al respecte en aquestes regions de la nefrona humana. Adaptada de¹²⁹. NH: Nansa de Henle; TAL: nansa gruixuda ascendent de Henle.

El gen *CLDN10*, que codifica per la claudina-10, dona lloc a dues isoformes diferents: la claudina-10a i la claudina-10b¹³⁰. Els homodímers de claudina-10b (la isoforma expressada a la TAL⁴⁰) permeten la reabsorció paracel·lular de Na⁺ a les regions més medul·lars^{126,131}. Mutacions amb pèrdua de funció al gen *CLDN10* desencadenen la síndrome HELIX, que cursa amb una baixa excreció urinària de Mg²⁺ i tendència a la hipermagnesèmia¹²⁶ degut a una manca en la reabsorció de Na⁺, el que genera un V_{te} positiu al lumen superior al fisiològic, i, per tant, s'incrementa la reabsorció paracel·lular de Ca²⁺ i Mg²⁺¹²⁹.

A la TAL localitzada a la franja externa de la medul·la externa i al còrtex renal, la claudina-16 (també anomenada paracel·lina-1) i la claudina-19 (codificades pels gens *CLDN16* i *CLDN19* respectivament) són crucials per la reabsorció paracel·lular de Ca^{2+} i Mg^{2+} ¹²⁷. Ambdues claudines, a través dels dominis TM 3 i 4, oligomeritzen en *cis*^{132,133} formant un heterodímer que alhora interacciona en *trans* (a través de l'ECL2) amb dímers antiparal·lels de les mateixes claudines de la cèl·lula adjacent¹³³ és a dir, cada claudina amb la mateixa claudina de la cèl·lula adjacent. De fet, la presència i la interacció en *cis* d'ambdues claudines és indispensable per la correcta localització d'aquestes a les TJ¹²⁷. En paral·lel, en models murins s'ha descrit que les claudines-16 i -19 poden interaccionar en *cis* també amb elles mateixes i que, la claudina-19 també ho pot fer també amb la claudina-3⁴⁰ i la claudina-10b¹²⁷. L'absència de claudina-16 o claudina-19 en models murins *knock-down* manté intacta l'expressió de la claudina-10b a les TJ, així com d'altres proteïnes implicades en aquestes estructures com la ZO-1 i l'occludina¹²⁷.

Funcionalment, en base a assajos funcionals en diversos models cel·lulars, existeixen dues hipòtesis sobre la funció d'aquest complex claudina-16/19: que la claudina-16 permet el pas de Na^+ mentre que la claudina-19 actua com a barrera pels anions¹³²⁻¹³⁵; i que el complex claudina-16/19 actua com a porus paracel·lular de cations divalents com el Ca^{2+} i el Mg^{2+} ^{134,136-140}. En túbuls renals aïllats de ratolins s'ha descrit que el transport paracel·lular de Na^+ és més prevalent en les regions medul·lars on s'hi expressa més abundantment la claudina-10b, mentre que a les regions més corticals (còrtex renal i franja externa de la medul·la renal), on predominen les claudines-16 i -19, augmenta el transport paracel·lular de Mg^{2+} i se'n redueix el de Na^+ de manera gradual⁴⁰. En paral·lel, es coneix que ambdues claudines són les responsables del transport paracel·lular de cations divalents com el Ca^{2+} i el Mg^{2+} , ja que mutacions amb pèrdua de funció en aquests gens donen lloc a la síndrome d'hipomagnesèmia familiar amb hipercalciúria i nefrocalcinosi (HFHNC)^{141,142} –objecte principal d'aquest treball– en la que la reabsorció renal de Ca^{2+} i Mg^{2+} es troba dràsticament reduïda¹⁴³. Així doncs, ambdues hipòtesis són complementàries,

ja que la secreció de Na^+ independent de Cl^- és el que genera el V_{te} suficient per la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} per via paracel·lular a la TAL (Figura 4). Així doncs, el complex intra- i inter-cel·lular de claudines-16 i -19 a l'epiteli polaritzat de la TAL confereix una permeabilitat paracel·lular selectiva per cations¹³², abolida per la pèrdua de funció sinèrgica d'ambdues^{132,133,141}.

A més del ronyó, s'ha descrit la presència de la claudina-16 a les glàndules salivals humanes¹⁴⁴ i a les glàndules mamàries murines¹⁴⁵. La presència d'un segon inici de traducció de l'mRNA de *CLDN16* genera dos productes proteics que difereixen en els primers 70 aminoàcids de l'extrem N-terminal de la proteïna, i es creu que només la forma truncada es localitza a les TJ, mentre que la isoforma completa es troba a endosomes i lisosomes¹³⁴. No obstant, existeixen treballs en els que es mostra una correcta localització subcel·lular a les TJ de la isoforma completa de la claudina-16¹⁴⁶. La claudina-16 interacciona directament amb la proteïna adaptadora ZO-1 a través del domini PDZ¹⁴⁷. Mutacions en aquest domini¹⁴⁸ o la pèrdua d'interacció conseqüent a la desfosforilació del residu Ser217 de la claudina-16 comporta la internalització i la localització d'aquesta a lisosoma¹³⁶, disminuint així la reabsorció paracel·lular de Ca^{2+} i Mg^{2+} ^{147,149}. S'ha observat que en ratolins *knock-out* pel gen de la *Cldn16* –una fenocòpia de la HFHNC en humans–, la deleció del gen *Cldn10* reverteix la hipomagnesèmia i normalitza l'excreció urinària de Ca^{2+} i Mg^{2+} mitjançant l'activació de mecanismes compensatoris al túbul distal¹³⁷.

La claudina-19, a més d'expressar-se a la TAL, també és present a l'epiteli pigmentari de la retina¹⁴² i, durant el desenvolupament ocular, regula l'expressió de factors neurotròfics i de marcadors de diferenciació a les vesícules òptiques, modulant així el funcionament de l'epiteli pigmentari de la retina^{150,151}. A més, també s'ha evidenciat l'expressió de la claudina-19 als axons mielinitzats de les cèl·lules de *Schwann* del sistema nerviós perifèric, suggerint la seva implicació en el manteniment de la velocitat de conducció dels potencials d'acció¹⁵². El complex claudina-16/19 també s'expressa a les TJ dels

ameloblasts, les cèl·lules encarregades de secretar l'enamel (la capa més superficial de l'esmalt dental) durant el desenvolupament^{153,154}.

La claudina-14 (producte del gen *CLDN14*) s'expressa juntament amb les claudines-16 i -19 a la franja externa de la medulla externa i al còrtex renal¹⁵⁵. A nivell extrarenal, la claudina-14 s'expressa també a les cèl·lules ciliades de la còclea, a l'orella interna¹⁵⁶ i, mutacions en aquest gen desencadenen un tipus de sordesa no sindròmica autosòmica recessiva (DFNB29)¹⁵⁷. Per altra banda, s'ha descrit la presència de mutacions en heterozigosi a *CLDN14* en nounats amb malformació a la vena cerebral magna¹⁵⁸. A nivell renal, la claudina-14 interacciona directament amb la claudina-16 i n'aboleix la selectivitat catiònica del complex claudina-16/19⁴⁸. L'abundància de la claudina-14 a la TAL està regulada per 2 microRNAs (miR-9 i miR-374), l'expressió dels quals està inhibida per l'activació del receptor basolateral CaSR, sensible a altes concentracions de Ca^{2+} extracel·lular (Figura 10). No obstant, ni en pacients amb mutacions al gen *CLDN14* ni en els models animals *knock-out* pel mateix gen s'han descrit alteracions renals^{156,157}. Tot i així, sí que s'ha correlacionat la presència d'un polimorfisme al gen *CLDN14* (rs219780[C]) amb un major risc de nefrolitiasi hipercalciúrica i amb una reducció de la densitat òssia¹⁵⁹.

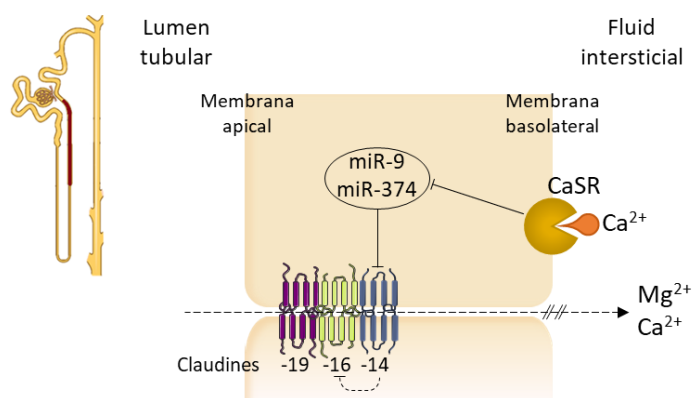


Figura 10. Mecanisme de regulació del complex claudina-16/19 per CaSR. L'activació del receptor CaSR per un augment de Ca^{2+} al fluid intersticial redueix l'expressió dels microRNAs miR-9 i miR-374 que regulen negativament la claudina-14. Aquesta doble regulació negativa comporta la inhibició la selectivitat catiònica del complex claudina-16/19 i, per tant, la reabsorció paracel·lular de Ca^{2+} i Mg^{2+} .

Com s'ha mencionat prèviament, la disfunció del complex claudina-16/19, que dona lloc a la HFHNC, és l'objecte principal d'aquest treball. Donat que la conseqüència clínica primària d'aquesta malaltia és la hipomagnesèmia, a continuació es detallarà la importància d'aquest catió en l'organisme.

3. EL Mg^{2+} EN L'ORGANISME

El Mg^{2+} és el quart catió més abundant en l'organisme i el segon a nivell intracel·lular¹⁰⁰. El Mg^{2+} , a més de ser essencial pel desenvolupament fetal¹⁶⁰, actua com a cofactor de més de 600 enzims (entre els quals hi trobem un implicat en la generació d'ATP), és essencial per múltiples processos com la síntesi d'àcids nucleics i proteïnes, regula canals de Na^+ , K^+ i Ca^{2+} , modula la secreció, l'alliberació i l'activitat de la PTH i participa en la formació òssia i l'estabilitat neuromuscular^{11,100,161-163}. La principal funció biològica, és a nivell del sistema nerviós i cardiovascular, on participa en l'estabilització del voltatge de les membranes cel·lulars, el manteniment del potencial elèctric del sistema nerviós, l'activitat sinàptica, la funció de la placa motora, la contracció muscular i la resistència vascular perifèrica¹⁶⁴.

3.1. DISTRIBUCIÓ I BALANÇ DEL Mg^{2+}

El contingut total de Mg^{2+} en l'organisme d'un adult de 70 Kg és d'entre 21 i 28 g¹⁶³, mentre que en el d'un noutat de 3,5 Kg és d'aproximadament 5 g¹⁶⁵. Més del 99 % del Mg^{2+} es troba a l'espai intracel·lular, a l'os i al múscul, mentre que només l'1 % restant és circulant en plasma¹⁰⁰. Del Mg^{2+} circulant, se'n poden distingir 3 fraccions: la ionitzada (55-60 %), la complexada amb citrat, fosfat, oxalat o sulfat (20-25 %) i la unida a l'albumina (20-30 %)^{166,167}. Les dues primeres fraccions componen la forma del Mg^{2+} ultrafiltrable i representa la fracció amb activitat biològica activa¹⁶⁸ (Figura 11).

Els nivells plasmàtics de Mg^{2+} estan regulats mitjançant 3 processos: l'absorció intestinal, l'emmagatzematge ossi i l'excreció urinària¹⁶⁸ (Figura 11). Aproximadament, el 40 % del Mg^{2+} ingerit (ingesta diària recomanada entre 80 i 410 mg/dia, segons edat i sexe¹⁶⁹) és reabsorbit a l'intestí prim i gruixut^{166,170}. A l'intestí prim, a altes concentracions de Mg^{2+} luminal, l'absorció es produeix per via paracel·lular, mentre que a baixes concentracions, té lloc l'absorció activa a través del canal TRPM6¹⁶⁸. A l'intestí gruixut, en canvi, el Mg^{2+} s'absorbeix únicament per via transcel·lular mitjançant els transportadors apicals de la cèl·lula TRPM6 i TRPM7, i CNNM4 a la membrana basolateral¹⁰⁰. Es desconeix el detall de la regulació de l'absorció intestinal de Mg^{2+} , però és influenciada pel contingut nutricional dels aliments i a través de l'acció de la PTH, el calcitriol, l'aldosterona, l'hormona del creixement i la calcitonina¹⁷¹.

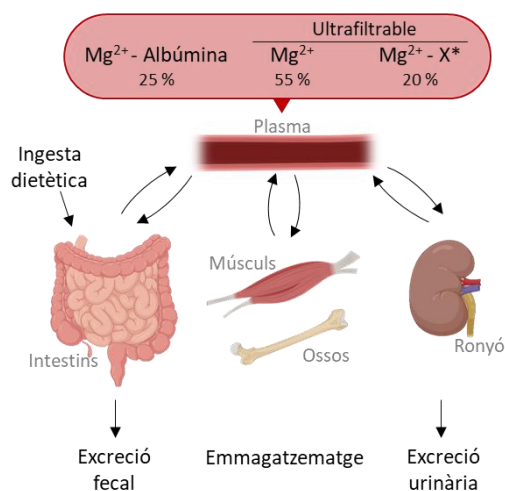


Figura 11. Distribució del Mg^{2+} en l'organisme. * Mg^{2+} complexat.

Els processos de transport tubular renal de Mg^{2+} a cada segment de la nefrona s'han descrit als apartats anteriors. No obstant, cal destacar que la regulació de l'excreció renal de Mg^{2+} és clau per mantenir es nivells plasmàtics d'aquest catió. Dels, aproximadament, 2.400 mg de Mg^{2+} filtrat al corpuscle renal, entre el 95 i el 99 % és reabsorbit al llarg de la nefrona, majoritàriament

a la TAL^{8,100}. Tot i així, en episodis d'hipomagnesèmia, l'excreció urinària de Mg^{2+} es redueix fins al 0,5 % del Mg^{+2} present a l'ultrafiltrat; mentre que, en casos d'hipermagnesèmia, l'excreció pot augmentar fins al 80 %¹⁷². La reabsorció renal de Mg^{2+} depèn de diversos factors: mentre que estats hipercalcèmics i d'acidosi n'augmenten l'excreció, la PTH incrementa la reabsorció del mateix a la TAL. L'excreció urinària de Mg^{2+} es pot avaluar mitjançant l'excreció fraccionada de Mg^{2+} (EF_{Mg}), calculada a partir dels nivells urinaris (U) i plasmàtics (P) de Mg^{2+} i creatinina (Cr): $FE_{Mg} = (U_{Mg} \times P_{Cr}) / (U_{Cr} \times P_{Mg})$ ¹⁷³, el rati urinari de Mg^{2+} i creatinina ($U_{Mg/Cr}$), els valors fisiològics dels quals depenen de l'edat, i la quantitat absoluta de Mg^{2+} diari excretat¹⁶⁸.

3.2. HIPOMAGNESÈMIA. MANIFESTACIONS CLÍNiques

La regulació de l'homeòstasi del Mg^{2+} té com objectiu mantenir els nivells plasmàtics d'aquest dins del rang fisiològic (1,6-2,6 mg/dL (0,7-1,1 mM), en adults¹⁷⁴). Per tant, valors plasmàtics inferiors a 1,6 mg/dL es consideren hipomagnesèmia. En conseqüència al gran nombre de processos en els que està implicat el Mg^{2+} i la rellevància d'aquests, la hipomagnesèmia pot desencadenar un ampli rang de manifestacions clíniques (Taula 1).

Taula 1. Manifestacions clíniques de la hipomagnesèmia. Adaptat de¹⁶⁸.

Trastorns	Signe / Síntoma
Homeòstasi d'altres ions	Hipocalcèmia, hipopotassèmia
Neuromusculars	Irritabilitat muscular, hiperreflexia, tetània, debilitat muscular, atàxia, nistagme, marejos, depressió, psicosi
Cardiovasculars	Arítmies, hipertensió arterial
Digestius	Disfàgia
Endocrins	Resistència òssia a la PTH, hiperreninisme, hiperaldosteronisme
Hematològics	Anèmia

En funció de l'origen causant de la hipomagnesèmia, se'n distingeixen la nutricional –per una ingesta dietètica insuficient–, la intestinal –per absorció deficient de Mg^{2+} a l'intestí–, i la renal, que es produeix quan hi ha una pèrdua excessiva de Mg^{2+} per via urinària. Aquesta última causa d'hipomagnesèmia pot ser deguda a defectes renals intrínsecs (com és el cas de la HFHNC o altres malalties hereditàries) o secundària a alteracions metabòliques o endocrines, així com conseqüència a l'acció d'alguns fàrmacs o tòxics¹⁶⁸.

4. HFHNC

La HFHNC és una malaltia genètica minoritària d'herència autosòmica recessiva. Es caracteritza per una pèrdua renal massiva de Mg^{2+} i Ca^{2+} per via urinària, que causa hipomagnesèmia persistent i nefrocalcinosi bilateral¹⁷⁵ amb progressió inexorable a CKD i al tractament renal substitutiu fallida renal (FR)¹⁴³.

4.1. HISTÒRIA

La manca d'informació disponible sobre la fisiologia tubular renal va endarrerir el coneixement de les tubulopaties renals i, més concretament de la HFHNC, el que va suposar l'infradiagnòstic d'aquesta entitat¹⁷⁶. La primera referència de la HFHNC va ser l'any 1972, en el que es va publicar el cas de dos germans que presentaven hipomagnesèmia, hipercalciúria i nefrocalcinosi, el que es va anomenar la síndrome de Michelis-Castrillo¹⁷⁷. Fins el moment cap cas descrit presentava afectació ocular, i no va ser fins l'any 1979 que es va relacionar la hipercalciúria amb el coloboma macular bilateral¹⁷⁸. A partir d'aquesta data, el nombre de casos reportats va augmentar considerablement^{176,179,180}. L'any 1987, Juan Rodríguez Soriano *et al.*, en aportar 3 casos nous als 15 ja descrits, van classificar la síndrome hipomagnesèmia-

hipercalciúria familiar com una malaltia congènita d'herència autosòmica recessiva i van suggerir que el defecte genètic alterava el funcionament de la TAL, implicant el transport de Ca^{2+} i Mg^{2+} , però no el de Na^+ ni Cl^- ¹⁸¹. Vuit anys més tard, al 1995, Manuel Praga *et al.* van publicar les dades corresponents a 8 pacients més, reportant un deteriorament progressiu de la funció renal i observant que el dany tubular no recidivava després del trasplantament renal. El títol d'aquest article va donar lloc al nom definitiu de l'entitat: hipomagnesèmia familiar amb hipercalciúria i nefrocalcinosi¹⁸². Tot i així, no va ser fins l'any 1999¹⁴¹ i 2006¹⁴² quan es van identificar els gens causants de la malaltia.

4.2. ETIOPATOGENÈIA

La HFHNC, tot i ser una malaltia monogènica, presenta heterogeneïtat gènica. Pot ser causada per mutacions amb pèrdua de funció dels gens *CLDN16* (o *PCLN1*), localitzat al cromosoma 3q27.29, que codifica per la claudina-16 (o Paracel·lina-1) (OMIM #248250)¹⁴¹ o *CLDN19*, al cromosoma 1p34.2, que codifica per la claudina-19 (OMIM #248190)¹⁴². Fins el moment, s'han identificat almenys 70 mutacions diferents a *CLDN16* causants d'HFHNC^{134,141,188–197,148,198–206,153,174,183–187}, mentre que a *CLDN19*, només se n'han descrit 24 variants patogèniques^{132,142,212–215,185,196,201,207–211}.

A data de 2014 (últimes dades epidemiològiques disponibles), amb una prevalença desconeguda, però inferior a 1/1.000.000, s'havien descrit aproximadament 178 pacients amb diagnòstic genètic, dels quals, 106 presentaven mutacions al gen *CLDN16* i 72 al gen *CLDN19*²¹⁶. L'any 2013 a Espanya hi havia registrats un total de 35 pacients amb HFHNC²¹⁷. En molts casos, l'absència d'un diagnòstic genètic, així com la falta de coneixement i consciència de la malaltia comporta l'infradiagnòstic de l'entitat i n'impedeix el coneixement de les dades epidemiològiques amb exactitud²¹⁶. Globalment, la prevalença de pacients amb mutacions al gen *CLDN16* és superior a la de

pacients amb variants patogèniques a *CLDN19*, no obstant, a la regió del mar Mediterrani la proporció de casos amb alteracions al gen *CLDN19* és més elevada²¹⁸. La mutació c.59G>A; p.G20D a *CLDN19* –que comporta la retenció de la proteïna a reticle endoplasmàtic i, per tant, la pèrdua total de la funció¹⁴²– es va denominar com la mutació espanyola/hispànica ja que es va identificar en un grup de pacients espanyols (o de procedència espanyola) i tots ells compartien l'haplotip al llarg de més de 450kb al voltant del gen¹⁴², confirmant la presència d'un avantpassat comú^{142,185,208}. Al gen *CLDN16* també es coneix l'efecte fundador de dues mutacions –c.453G>T; p.L151F i c.416C>T; p.A139V– prevalents a Alemanya i a l'est d'Europa¹⁹⁴ i a nord d'Àfrica¹⁸⁵, respectivament.

4.3. FISIOPATOLOGIA I FENOTIP

Com ja s'ha mencionat prèviament, el defecte primari de la HFHNC és la disfunció de la claudina-16 o de la claudina-19, implicades en la reabsorció paracel·lular de Ca^{2+} i Mg^{2+} a la TAL¹³². Tot i la pèrdua massiva de Ca^{2+} i Mg^{2+} per orina, els nivells de Ca^{2+} sèric en pacients amb HFHNC solen mantenir-se dins del rang fisiològic¹⁴³ [8,8 – 10,6 mg/dL (2,2-2,64 mmol/L)¹⁷⁴]. No obstant, sí que s'han descrit alguns casos amb hipocalcèmia en el moment del diagnòstic clínic^{187,202,211}. De manera contrària, generalment els pacients sí que desenvolupen hipomagnesèmia, que pot desencadenar complicacions sistèmiques severes¹⁴³. No obstant, més enllà de la hipercalciúria, la hipermagnesúria, la hipomagnesèmia, les manifestacions clíniques característiques de la HFHNC comprenen un ampli rang de signes i símptomes^{143,153,154,207,218}, recopilats a la figura 12.

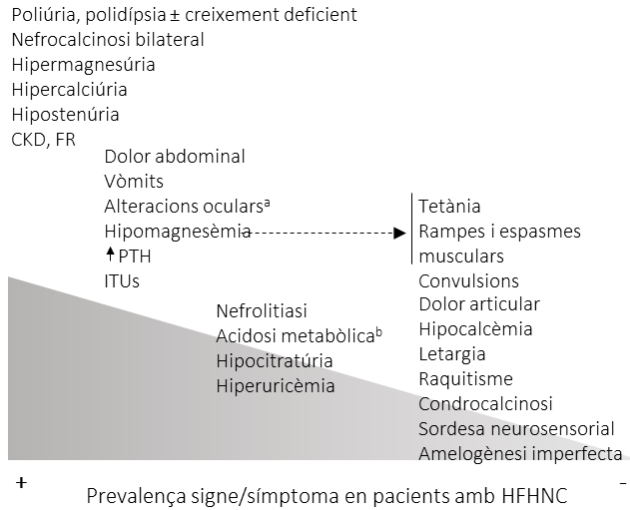


Figura 12. Prevalença de les manifestacions clíniques dels pacients amb HFHNC. CKD, *chronic kidney disease*; FR, fallida renal; PTH, Hormona paratiroide; ITUs, Infeccions del tracte urinari. ^aLes alteracions oculars únicament són presents en pacients amb mutacions al gen *CLDN19*. ^bAcidosis metabòlica suggestiva d'acidosis tubular renal distal incompleta.

Tot i que es desconeixen amb precisió els mecanismes fisiopatològics que desencadenen alguns dels signes i símptomes característics de la HFHNC, es creu que l'elevada concentració de Ca^{2+} a la pre-orina més enllà de la TAL podria provocar la generació de cristalls intratubulars, responsables d'episodis de nefrolitiasi²¹⁹. Per altra banda, pel que fa a la nefrocalcinosi medul·lar bilateral (present en el 100 % de pacients), donat que el dipòsit de Ca^{2+} a l'interstici medul·lar no pot derivar del transport d'aquest a la TAL, l'únic mecanisme plausible és el transport transcel·lular al TC a la franja interna de la medul·la en conseqüència a les altes concentracions de Ca^{2+} presents al lumen tubular²¹⁹. La nefropatia túbul-intersticial medul·lar causada per la nefrocalcinosi desencadena defectes en la secreció de H^+ al TC medul·lar –procés estimulat addicionalment per l'activació de la CaSR de les cèl·lules del TC en conseqüència a la hipercalcúria²²⁰– i en el cúmul de NH_4^+ a l'interstici medul·lar –també afavorit pel deficient transport paracel·lular a la TAL–, essent els responsables de l'acidosis tubular renal distal incompleta²²¹. Aquesta acidosis tubular distal incompleta, que dona lloc a un defecte en l'acidificació de l'orina,

podria estar relacionada amb la hipocitratúria present en molts pacients amb HFHNC¹⁹⁰, el que, alhora, comporta un augment del risc de nefrolitiasi²²², tot i que es desconeix amb certesa el mecanisme implicat. També s'hipotetitza que la nefropatia túbul-intersticial medul·lar és la responsable de la hipostenúria (incapacitat de concentrar l'orina) donant lloc a la poliúria (i la conseqüent polidípsia)²²³. Addicionalment, s'ha relacionat també l'activació de la CaSR de les cèl·lules del TC amb una disminució en l'expressió de l'aquaporina-2, responsable de la reabsorció d'aigua en aquesta regió de la nefrona²²⁰, contribuint també a la poliúria. En conseqüència, la relativa hipovolèmia i l'associada resposta neurohumoral desencadenada podrien ser les responsables dels estats hiperuricèmics presents en alguns pacients⁵. Per altra banda, la pèrdua urinària massiva de Ca^{2+} i Mg^{2+} , així com la incapacitat de concentrar l'orina, podrien estar implicades en el retràs en el creixement –també present en altres trastorns tubular hereditaris– que pot ser rectificat amb un correcte control de la calciúria²²⁴.

A nivell histològic renal, en pacients amb HFHNC s'han evidenciat dipòsits de calci, esclerosi glomerular, presència de glomèruls immadurs, atròfia tubular i fibrosi intersticial de grau variable¹⁹⁴. En conjunt, totes aquestes alteracions renals desencadenen el desenvolupament de la CKD i, finalment, la FR.

En alguns pacients, la simptomatologia ocular pot constituir l'única manifestació aparent de la malaltia i conduir al diagnòstic de la HFHNC. La claudina-19 (juntament amb la claudina-3) s'expressa també a les cèl·lules epitelials del pigment de la retina (cèl·lules RPE)¹⁵⁰. Aquest epiteli constitueix l'anomenada barrera hemato-retiniana exterior i es localitza a la part posterior de les cèl·lules fotoreceptores, essent essencial la relació entre ambdós tipus cel·lulars per una correcta capacitat visual²²⁵. El complex claudina-3/19 a les cèl·lules RPE no formen únicament les TJ, sinó que també modulen l'expressió gènica i activen la via de senyalització AKT, implicada en múltiples processos cel·lulars com la supervivència, el creixement i la migració cel·lular²²⁶. En models cel·lulars s'ha observat que la mutació p.G20D en homozigosi a *CLDN19*

impedeix la formació de les *eyecups* (vesícules a partir de les quals es formen la retina i la capa pigmentada de l'ull), evidenciant l'expressió d'aquesta en estadiatges molt inicials del desenvolupament i la diferenciació ocular. També es va detectar una reducció en l'expressió de factors neurotròfics de creixement i la retenció de la claudina-19 en vesícules citoplasmàtiques. Addicionalment, es va identificar que la mutació p.G20D a *CLDN19* en heterozigosi actuava com a dominant negatiu impeding que la forma *wild type* (WT) arribés a la membrana cel·lular. Al mateix treball, en models murins amb la mateixa mutació, es va detectar l'apoptosi dels fotoreceptors, una desorganització de les cèl·lules bipolars de la retina i una pèrdua de la funció de la mateixa. Cal destacar que en tots els sistemes estudiats es va observar una reducció en l'expressió del gen *RPE65*, que codifica per un enzim que genera el metabòlit 11-*cis*-retinal, indispensable pel funcionament de la rodopsina i, per tant, per una correcta visió¹⁵⁰. Així doncs, els efectes pleiotròpics de la claudina-19 podrien explicar els múltiples defectes en el desenvolupament ocular que pateixen la majoria dels pacients amb mutacions al gen *CLDN19* –tot i que no en tots–, entre els que s'inclouen la discapacitat visual severa, displàsia macular (anomenada també coloboma macular) –una lesió fibròtica a la màcula²²⁷–, miopia magna (miopia severa), nistagme horitzontal, corioretinitis i calcificacions cornials^{142,182} (Figura 13). En canvi, només en una minoria de pacients amb mutacions al gen *CLDN16* s'han descrit alteracions oculars lleus com miopia o astigmatisme^{183,190,194}.

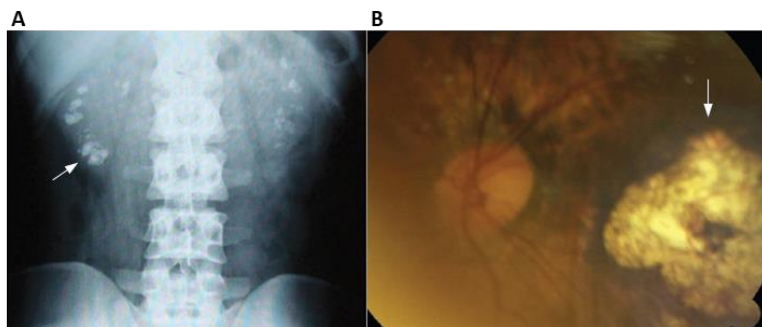


Figura 13. Nefrocalcinosi medul·lar bilateral (A) i coloboma macular (B). Imatges obtingudes per radiografia frontal (A) i funduscòpia ocular. Les fletxes senyalitzen els dipòsits de calci i la lesió macular respectivament. Adaptada de²²⁸.

4.3.1. VARIABILITAT FENOTÍPICA

Existeix una àmplia variabilitat fenotípica entre els pacients amb HFHNC, tant a nivell renal com ocular. En alguns casos, aquesta variabilitat és present també entre pacients que presenten les mateixes mutacions causants de la malaltia, incús entre individus d'una mateixa família, principalment entre germans/es^{194,206,208}. Algunes de les diferències fenotípiques descrites a la literatura inclouen l'edat de debut clínic, la recurrència d'ITUs i nefrolitiasi, l'edat en la que els pacients desenvolupen la FR –als 13,5 i 37 anys en el cas d'una parella de germans¹⁹⁴– i la presència i tipus d'alteracions oculars^{174,194,198,229,230}.

En alguns estudis es constata una major prevalença i severitat de la malaltia en pacients de sexe femení^{185,208}, el que condueix a suggerir que podria tractar-se –juntament amb la presència d'episodis repetits d'ITUs²²⁸– de factors de risc pel desenvolupament de CKD²³¹. Tot i que el fenotip renal dels pacients amb HFHNC és indistingible entre aquells que presenten mutacions als gens *CLDN16* o *CLDN19*, s'ha evidenciat que els pacients amb variant patogèniques a *CLDN19* tenen un major risc de progressió a la CKD avançada i que progressen a la FR més precoçment¹⁸⁵.

Malgrat el nombre limitat de pacients descrits a la literatura, s'ha reportat una correlació genotip-fenotip. La severitat del fenotip en pacients amb variants patogèniques a *CLDN16* està relacionada amb el tipus de mutació. S'ha demostrat que la pèrdua completa de funció dels dos al·lels comporta un pitjor pronòstic renal, donant lloc al desenvolupament precoç de la FR; mentre que la presència de funció residual en almenys un dels dos al·lels del mateix gen, confereix un alentiment de la progressió a la FR¹⁸⁴. Per altra banda, Müller *et al.* van descriure la mutació c.908C>G (p.T233R) al gen *CLDN16*, localitzada al domini PDZ de la proteïna, que comporta la pèrdua d'interacció d'aquesta amb la ZO-1. Els pacients –de dues famílies no relacionades– amb aquesta mutació presentaren un fenotip d'HFHNC més lleu al descrit prèviament (funció renal estable, remissió de la hipercalciúria i reversió o estabilització del grau de nefrocalcinosi). En aquest treball es va mostrar que la claudina-16 portadora

d'aquesta mutació es localitza a les TJ però, per manca d'interacció amb la ZO-1, s'internalitza als lisosomes. D'aquesta manera, es va suggerir que durant un període de temps curt, la proteïna podria estar correctament localitzada i essent completament funcional¹⁴⁸.

En quant als pacients amb mutacions al gen *CLDN19*, l'alta prevalença de la mutació p.G20D –inclús en homozigosi– ha dificultat la realització d'estudis de correlació genotip-fenotip. Cal esmentar però, que entre pacients homozigots per aquesta mutació existeix una gran variabilitat fenotípica tant a nivell del grau d'afectació ocular com en l'evolució de la malaltia renal²⁰⁸.

4.4. DIAGNÒSTIC

Tot i que existeixen múltiples trastorns hereditaris en els que el transport del Ca^{2+} i Mg^{2+} en resulten alterats, les característiques clíniques, els paràmetres bioquímics i el patró d'herència, són claus per distingir-los^{100,232,233}. En la HFHNC, aquestes característiques inclouen la hipomagnesèmia, la hipermagnesúria, la hipercalciúria amb normocalcèmia, la nefrocalcinosi bilateral, la CKD –que en molts casos es manifesta des de la infància– i l'herència de caràcter autosòmic recessiu¹⁴³. A més, en pacients amb mutacions al gen *CLDN19*, la presència de les alteracions oculars prototípiques de la malaltia (miopia severa, lesió macular i nistagmes) també són motiu de sospita clínica de l'entitat, ja que també es solen manifestar en estadiatges inicials de la malaltia^{185,207,208}. És important mencionar que nivells normals de Mg^{2+} sèric no exclouen la HFHNC^{190,208,234} ja que la presència de CKD pot normalitzar aquest paràmetre²³⁵. En aquests casos, l'estudi de l' EF_{Mg} i de l' EF_{Ca} (excreció fraccionada de Ca^{2+}), que es mantenen elevats de manera independent als nivells sèrics, són de gran utilitat¹⁹⁰. L'edat de diagnòstic clínic és molt variable, oscil·lant des dels pocs mesos de vida fins la tercera dècada, essent l'edat mitjana de diagnòstic molt dispar segons l'estudi, des dels 3,5¹⁸³ als 15,2¹⁸² anys.

El diagnòstic diferencial inclou fonamentalment altres tubulopaties de causa genètica associades amb hipercalciúria i nefrocalcinosi, principalment l'acidosi tubular renal distal i, menys freqüentment, la síndrome de Bartter o la malaltia de Dent, els fenotips de les quals són diferents i en destaca l'absència d'hipopotassèmia en els pacients amb HFHNC^{173,181}. En l'acidosi tubular distal, la correcció de l'acidosi metabòlica normalitza la magnesiúria i la calciúria dels pacients, a diferència de la HFHNC, en la que aquests paràmetres, tot i el tractament adient, persisteixen elevats, el que facilita el diagnòstic diferencial²³⁶.

Per tal de confirmar la sospita clínica d'HFHNC és imprescindible identificar les mutacions en ambdós al·lels dels gens *CLDN16* o *CLDN19*. L'anàlisi genètica es realitza principalment mitjançant la seqüenciació bidireccional dels exons i de les corresponents regions intròniques flanquejants^{185,194,208,216}. Per l'estudi de grans delecions o insercions s'utilitza la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa quantitativa fluorescent de múltiples fragments (QMPSF, *quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments*)^{185,216}. No obstant, tenint en compte l'origen geogràfic del cas i la presència o no dels defectes oculars prototípics, l'estudi podria iniciar-se per l'anàlisi directe –mitjançant el sistema múltiple *SNaPshot*®– de les mutacions p.L151F i p.A139V al gen *CLDN16* i la p.G20D a *CLDN19*, altament freqüents en determinades regions geogràfiques¹⁴³. El diagnòstic genètic, a més de confirmar la malaltia, permet realitzar un consell genètic familiar i, inclús, el diagnòstic prenatal¹⁴³.

4.5. TRACTAMENT

Actualment no existeix cap tractament específic per aquesta malaltia, ni unes guies mèdiques consensuades pel tractament de l'entitat, així com ningun assaig clínic que condueixi a cap opció terapèutica. Així doncs, el tractament actual és bàsicament de suport. Els pacients amb HFHNC reben suplementació oral de Mg²⁺ i diürètics de tipus tiazides en monoteràpia o combinats amb diürètics tipus amilorida (inhibidors del canal ENaC), per tal de reduir l'excreció

urinària de Ca^{2+} ^{182,185,194,208}. L'ús d'aquests diürètics es basa en la reducció en la reabsorció de Na^+ al TCD, que comporta una disminució del volum extracel·lular conseqüent a la pèrdua massiva d'aigua i Na^+ . Aquesta condició desencadena un augment en la reabsorció proximal de Ca^{2+} com a mecanisme compensatori²³⁷. Tot i que molts pacients amb HFHNC no responen a la teràpia amb tiazides^{182,185,194,208}, en alguns estudis longitudinals sí que s'observa l'efecte hipocalciúric, tot i que sense cap canvi en l'evolució de la funció renal^{190,224,238}. En molts casos, també s'indica el tractament amb citrat potàssic per prevenir la formació de cristalls d'oxalat càlcic^{190,193,239}. Per altra banda, el dèficit de calcitriol és un tret recurrent en pacients amb CKD i, donat que és un factor de risc per desenvolupar hiperparatiroidisme secundari, molts pacients reben suplementació de vitamina D^{174,196,240}. Tot i que s'ha mostrat que el manteniment dels nivells sèrics de calcitriol dins del rang de normalitat atenua la progressió de la CKD en pacients pediàtrics²⁴¹, la suplementació vitamínica resulta controvertida ja que podria afavorir la nefrolitiasi¹⁴³. Per aquest motiu, es recomana un estret monitoratge dels pacients per evitar assolir uns nivells elevats de calcitriol plasmàtic.

Recentment, assajos en models cel·lulars i animals han permès l'estudi de molècules que podrien ser efectives pel tractament de la HFHNC. En línies cel·lulars MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) portadores de la mutació p.D97S a *CLDN16*, en la que la proteïna queda retinguda al compartiment endosomal i presenta una estabilitat inferior a la forma WT, s'ha identificat un agent antimalàric (primaquina) capaç d'augmentar l'estabilitat de la proteïna claudina-16, alhora que la localització a la membrana cel·lular¹³⁹. Al mateix tipus cel·lular portador de la mutació p.Y207* a *CLDN16*, que comporta la retenció de la proteïna als lisosomes, la inhibició de l'endocitosi vehiculada per clatrina –tant a través de l'acidificació del citosol com de l'ús de medis hipertònics– va permetre la corregir la distribució de la claudina-16 a la membrana cel·lular²⁰². Actualment, tot i els avenços mencionats, i en absència de tractament específic, l'única alternativa eficaç pel tractament de la disfunció renal en pacients amb HFHNC és la teràpia renal substitutiva quan s'assoleix la FR, ja sigui la diàlisi o

el trasplantament renal. Amb el trasplantament renal l'excreció urinària de Ca^{2+} i Mg^{2+} es normalitza i no es produeix recidiva de la malaltia^{182,234,239,242}. No obstant, les alteracions oculars persisteixen. La miopia magna associada a la HFHNC es pot corregir amb ulleres, lents de contacte, cirurgia làser o implantació de lents artificials; però, no hi ha cap teràpia per la correcció del nistagme o del coloboma macular¹⁴³.

5. MODIFICADORS GENÈTICS DEL FENOTIP

Aproximadament el 80 % de les malalties minoritàries tenen un origen genètic i, la majoria d'elles són monogèniques. Tot i tractar-se de malalties causades per mutacions en un únic gen, la base genètica i la fisiopatologia de moltes d'aquestes malalties segueix essent una incògnita. Inclús en malalties en les que es coneix la causa genètica de la malaltia, el fenotip dels pacients pot ser molt divers –inclús entre membres de la mateixa família– tot i, en alguns casos, compartir la causa genètica de la malaltia²⁴³. Els factors responsables d'aquesta variabilitat fenotípica poden ser múltiples^{244–246}; però, en el cas de malalties en les que hi ha una alta prevalença d'una determinada mutació causant de l'entitat, aquests es redueixen a factors genètics, epigenètics i ambientals²⁴⁷.

En l'última dècada, el nombre d'estudis de factors genètics moduladors del fenotip de malalties ha augmentat considerablement, tot i que només un 24 % d'aquests es focalitzen en malalties minoritàries²⁴³. Els factors genètics moduladors del fenotip es coneixen com "gens modificadors" i es defineixen com una variació en la seqüència d'un gen que altera el fenotip normal d'una malaltia causada per mutacions en un altre gen independent, efecte conegut com epístasi. En general, els efectes dels gens modificadors es poden classificar en 4 grups, en funció de l'aspecte fenotípic que alteren: penetrància, expressivitat, dominància i pleiotropia. La penetrància es defineix com la

proporció d'individus portadors de mutacions causants de malaltia que presenten el fenotip corresponent²⁴⁸. Un exemple modificació de la penetrància és amb la retinitis pigmentosa autosòmica dominant, causada per mutacions al gen *PRPF31*, en la que s'ha observat que una determinada variant gènica a *CNOT3* aboleix les manifestacions clíniques de la malaltia²⁴⁹. Un altre exemple en el que la modificació de la penetrància es posa en manifest en malalties renals, és un treball en el que l'anàlisi de 874 gens en 589.306 genomes va identificar la presència de 13 adults asimptomàtics amb mutacions causants de malalties amb un debut característic a la infància²⁵⁰. El concepte d'expressivitat fa referència a la magnitud del fenotip. La presència d'un gen modificador de l'expressivitat pot modular el curs de la malaltia i la severitat de la mateixa, com és el cas de la síndrome QT-llarga. Els pacients afectes d'aquesta malaltia que presenten una mutació concreta al gen *KCNQ1* (causant de la síndrome), juntament amb un polimorfisme al gen *NOS1AP*, presenten un fenotip molt més sever que aquells no portadors d'aquest polimorfisme²⁵¹. La dominància és una mesura de la dosi gènica necessària per presentar manifestacions clíniques. Aquest concepte té cabuda en malalties recessives en les que els individus heterozigots per la mutació causant de malaltia presenten un fenotip intermedi o diferent al dels homozigots²⁴⁸. Aquesta capacitat de modificar la dominància s'exemplifica amb les mutacions amb pèrdua de funció en un dels al·lells del gen *HAMP*, que comporten que la presència d'un únic al·lel mutat del gen *HFE*, causant d'hemocromatosi –malaltia de caràcter recessiu–, sigui suficient per desenvolupar el fenotip clínic de la malaltia²⁵². Per últim, la modificació de la pleiotropia per part d'un gen modificador consisteix en l'addició d'alguna característica clínica a la malaltia. La combinació de mutacions als gens de la família *BBS* i *MKS1* n'és un clar exemple. Mutacions en cadascun d'aquests gens donen lloc a malalties amb fenotips diferents, i cap d'ells inclou les convulsions. No obstant, els pacients amb mutacions a gens *BBS1*, *-9* i *-10*, i portadors d'una mutació a *MKS1*, a més del fenotip habitual de la malaltia, manifesten també convulsions²⁵³.

La identificació dels efectes modificadors dels gens consisteix en l'estudi de la diversitat genètica de pacients que comparteixen una mateixa malaltia –i a vegades una mateixa mutació causant d'aquesta– però que discerneixen en el fenotip clínic. Existeixen diverses estratègies per la identificació de gens modificadors del fenotip en humans, entre les que s'inclouen les anàlisis comparatives dels perfils d'expressió, els estudis d'associació de tot el genoma (GWAS, *genome-wide association studies*) –o de l'exoma–, i les anàlisis d'associacions familiars. En tots casos, es poden fer de manera dirigida mitjançant la seqüenciació de determinats gens, o mitjançant tècniques *high-throughput* com el la seqüenciació de l'exoma (WES, *whole exome sequencing*) o del genoma (WGS, *whole genome sequencing*)²⁴⁸. L'estudi dels gens modificadors del fenotip ofereix l'oportunitat d'augmentar el coneixement funcional dels gens individuals, de les xarxes en les que actuen i dels fenotips que afecten. A més, poden representar noves dianes terapèutiques per intervenir tant en l'inici com en la progressió de les malalties²⁴⁸.

Pel que fa la presència de gens modificadors en malalties d'origen genètic amb afectació renal, arrel del cas clínic d'un pacient, es va identificar que el gen *PAX2* podria actuar com a modificador del fenotip renal present en pacients amb la síndrome de Nail Patella, causada per mutacions al gen *LMX1B*, en conseqüència d'una expressió defectuosa d'ambdós gens durant la nefrogènesi²⁵⁴. De manera similar, en pacients amb la síndrome de Joubert amb afectació renal, s'ha evidenciat la presència d'una variant d'un únic nucleòtid (SNV, *single nucleotide variant*) a la regió 5'UTR del gen *BSND* (subunitat Barttin de canals de Cl⁻) associada, de manera significativa, amb la severitat de la malaltia renal en una cohort de pacients amb mutacions al gen *CEP290*²⁵⁵.

Tot i així, la malaltia per excel·lència d'estudi de gens modificadors del fenotip és la fibrosi quística, en la que existeix una mutació altament prevalent al gen *CFTR* [c.1521_1523del (p.Phe508del)]²⁵⁶. Aquest podria ser un precedent per l'estudi dels gens modificadors a la HFHNC, ja que, tot i que amb una prevalença molt més baixa, també hi ha una mutació al gen *CLDN19* altament

prevalent (p.G20D). De fet, la sospita de l'existència de gens modificadors a la HFHNC es va posar de manifest l'any 2002 per tal d'explicar la variabilitat fenotípica renal dels pacients amb aquesta malaltia²²⁴.

6. EXOSOMES

La majoria de tipus cel·lulars produeixen i alliberen vesícules extracel·lulars²⁵⁷. Aquestes vesícules extracel·lulars estan formades per una bicapa lipídica, el seu contingut reflexa el de la cèl·lula d'origen²⁵⁸ i són considerades vehicles de comunicació intercel·lular²⁵⁹. En funció de la mida, dels mecanismes de biogènesi i d'alliberació, i de la composició molecular, les vesícules extracel·lulars es classifiquen en 3 grups: les microvesícules (també anomenades micropartícules o ectosomes), que es formen i s'alliberen per evaginació de la membrana plasmàtica i tenen una mida d'entre 100 i 1.000 nm de diàmetre, els exosomes, que mesuren entre 30 i 200 nm i són alliberats a l'espai extracel·lular per fusió dels cossos multivesiculars (MVB, *multivesicular bodies*) que els contenen amb la membrana plasmàtica; i els cossos apoptòtics –vesícules d'entre 50 i 5.000 nm de diàmetre– resultat de la fragmentació cel·lular conseqüent al procés d'apoptosi²⁵⁸. Els exosomes són alliberats constantment i de manera fisiològica i se n'ha descrit la presència a diversos fluids biològics: sang²⁶⁰, líquid seminal²⁶¹, orina²⁶², saliva²⁶³, llet materna²⁶⁴, líquid amniòtic²⁶⁵, líquid ascític²⁶⁶, líquid cefaloraquidi²⁶⁷ i bilis²⁶⁸.

Tot i l'elevat i creixent nombre de publicacions referents a les vesícules extracel·lulars, la terminologia utilitzada per descriure aquestes vesícules no està estandarditzada, el que comporta confusió en la comunitat científica²⁶⁹. Per això, resulta imprescindible definir la nomenclatura utilitzada. En aquest treball s'utilitzarà el terme exosomes per fer referència a les vesícules extracel·lulars de diàmetre d'entre 30 i 200 nm i alliberades per la fusió dels MVBs amb la membrana plasmàtica.

6.1. BIOGÈNESI

Els exosomes es formen a l'interior dels MVB com a resultat de la invaginació de la seva pròpia membrana. Els MVB són un tipus d'endosoma tardà –generat a partir de l'endosoma primerenc– que conté vesícules intraluminals (exosomes) al seu interior i que poden fusionar-se amb els lisosomes i degradar el seu contingut o bé, fusionar-se amb la membrana plasmàtica i alliberar els exosomes a l'espai extracel·lular²⁷⁰. S'ha descrit que la ISGlació (una modificació post-traducciona similar a la ubiquitinització) podria estar implicada en la fusió dels MVB amb els lisosomes i que, per tant, l'absència de ISGlació dirigeix els MVB cap a la via secretora²⁷¹.

Fins el moment, es coneixen dos tipus de mecanismes implicats en la biogènesi dels exosomes: els dependents dels complexos proteics ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) i els independents d'ESCRT^{270,272–274}. En referència a la maquinària ESCRT –que consta de 4 complexos de proteïnes citoplasmàtiques (0-IV)–, en destaquen la proteïna TSG101, involucrada en la formació de les invaginacions²⁷⁵, i el complex Alix-sintenina-sindecà, responsable de la invaginació i l'escissió de les vesícules de la membrana del MVB per esdevenir exosomes individuals²⁷⁶. Els mecanismes independents de ESCRT coneguts inclouen diferents tipus de molècules, d'entre els que s'hi troben lípids com les ceramides²⁷⁷, l'àcid lisobifosfatídic²⁷⁸ i el colesterol²⁷⁹, que semblen estar involucrats en la invaginació de la membrana dels MVB.

6.2. COMPOSICIÓ

El contingut dels exosomes és heterogeni, específic i dinàmic, ja que existeixen diversos mecanismes que en determinen les molècules que s'inclouen als exosomes^{274,280}. A més, el contingut exosomal està estretament relacionat amb el tipus i l'estat fisiològic o metabòlic de la cèl·lula d'origen²⁷². Cal mencionar que les limitacions tècniques existents en l'àmbit dels exosomes

impossibilita el coneixement del contingut d'aquests amb precisió ja que, per exemple, estudis del contingut exosomal a partir d'exosomes aïllats per immuno-selecció (que comporta la selecció d'una subpoblació d'exosomes) dóna lloc un biaix en l'anàlisi²⁷².

Els exosomes contenen proteïnes i aminoàcids, diversos tipus d'RNA, DNA i metabòlits citoplasmàtics²⁷⁴ (Figura 14). Pel que fa al contingut proteic, s'han descrit dues subpoblacions: aquelles pròpies del tipus cel·lular d'origen dels exosomes, de naturalesa molt variable, i les que estan relacionades amb la biogènesi dels exosomes (TSG101, Alix, CD81, etc.), presents en la majoria de poblacions d'exosomes²⁷². L'ampli espectre d'RNA present als exosomes inclou: RNA missatger (mRNA) –majoritàriament fragmentat i altament enriquit en les regions 3' del mRNA²⁸¹–, microRNA (miRNA) –objecte d'estudi en aquesta tesi–, pre-miRNA, RNA no codificant llarg (lncRNA), Y-RNA, RNA circular, RNA mitocondrial, RNA de transferència, RNAs nuclears petits (snRNA, *short nuclear RNA*), RNAs nucleolars petits (snoRNA, *short nucleolar RNA*) i RNA associat a Piwi (piRNA)²⁷⁴. Per últim, la composició de la membrana lipídica dels exosomes és també característica, ja que està enriquida en *lipid rafts* i, per tant, contenen una alta proporció de colesterol, esfingolípids, glicerofosfolípids i ceramides²⁷⁷.

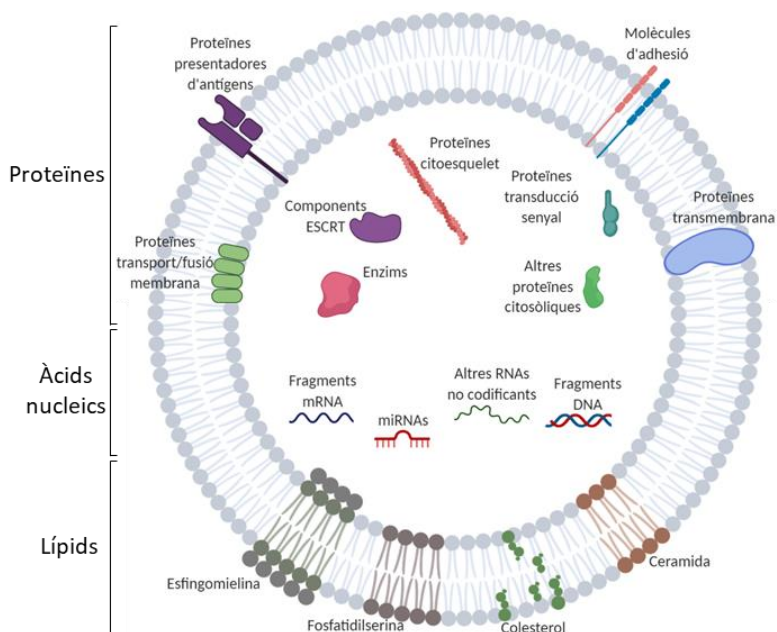


Figura 14. Contingut general dels exosomes. Representació de la composició dels exosomes tant a nivell de les molècules contingudes al seu interior com la característica composició lipídica de la membrana.

6.3. ALLIBERAMENT I INTERNALITZACIÓ

Per que es produeixi l'alliberació a l'espai extracel·lular dels exosomes continguts en els MVB es requereix del transport intracel·lular dels MVB des del citosol a la membrana plasmàtica. De manera similar al transport endocític, s'han identificat proteïnes de la família de les Rab-GTPases (Rab7, Rab11, Rab27a/b, Rab35) implicades en el tràfic intracel·lular dels MVB²⁸²⁻²⁸⁶. Una vegada els exosomes arriben a la membrana plasmàtica, per dur a terme la fusió d'aquesta amb la membrana dels MVB i, per tant, la secreció dels exosomes a l'espai extracel·lular, es requereix de les proteïnes SNARE (VAMP7, YKT6 i SNAP23)²⁸⁷⁻²⁹¹.

Els exosomes alliberats al medi extracel·lular, per exercir un efecte en la cèl·lula receptora, han de ser internalitzats. Aquest procés d'internalització dels exosomes amb la cèl·lula receptora es pot produir a través de 2 sistemes: la interacció d'un lligand present als exosomes amb un receptor de la cèl·lula

diana, o bé, per la internalització dels exosomes a la cèl·lula receptora. Aquesta última estratègia es desconeix si té lloc de manera dirigida o si és un procés inespecífic²⁸², però els mecanismes descrits per la internalització dels exosomes a la cèl·lula receptora inclouen la micropinocitosi²⁹², la fagocitosi²⁹³ i l'endocitosi, dependent i independent de clatrina^{292,294–296}. Els exosomes internalitzats a la cèl·lula receptora –i continguts en els endosomes– poden ser processats per la via lisosomal, reciclats i alliberats de nou a l'espai extracel·lular o bé fusionats amb la membrana endosomal i alliberats al citosol. Es desconeix el mecanisme implicat en aquest últim procés, però sembla ser independent a les proteïnes SNARE²⁸². A més, s'ha descrit també la transferència directa del contingut exosomal al nucli²⁹⁷ i al reticle endoplasmàtic²⁹⁸ gràcies al contacte directe entre aquests orgànuls i el endosomes. Paral·lelament, també s'ha reportat la possibilitat que els exosomes no s'arribin a internalitzar a la cèl·lula receptora sinó que la membrana d'ambdues estructures es fusionin i se n'alliberi el contingut exosomal al citosol de la cèl·lula receptora²⁷².

6.4. FUNCIONS DELS EXOSOMES

Actualment, la funció dels exosomes com a vehicles mediadors de la comunicació intercel·lular és indiscutible²⁷⁴. En condicions fisiològiques, també se'ls atribueix la capacitat d'induir efectes tolerogènics, actuant com vesícules presentadores d'antígens²⁹⁹, de contribuir en processos biològics com l'apoptosi, el tràfic de proteïnes, l'angiogènesi, la inflamació i la coagulació^{274,300}. A més, en el camp de la biologia del desenvolupament, els exosomes s'han descrit com vehicles de morfògens, exercint un paper important en el patró d'expressió tissular^{301,302}.

Actualment, però, la recerca en els exosomes no es limita al coneixement de la seva funció en condicions fisiològiques, sinó que són de gran interès en estats patològics. En el camp de les malalties renals, els exosomes urinaris són considerats una font no invasiva d'informació del que succeeix al ronyó, més

concretament, a cada tipus cel·lular de la nefrona, ja que s'ha detectat en l'orina la presència d'exosomes provinents de cadascun dels tipus cel·lulars que componen la nefrona²⁶². A més, s'ha demostrat l'existència de comunicació entre diverses regions de la nefrona, més concretament, que les cèl·lules del túbul distal i del túbul col·lector són capaces d'internalitzar exosomes alliberats per les cèl·lules del túbul proximal³⁰³. És per això que l'estudi dels exosomes urinaris com a font de biomarcadors de malalties renals ha augmentat considerablement en els últims anys^{304,305}.

6.5. AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ EXOSOMES URINARIS

L'aïllament exclusiu d'exosomes urinaris és complex degut al solapament en les propietats físico-químiques entre els exosomes i d'altres vesícules extracel·lulars²⁵⁸. Actualment, tot i que s'han desenvolupat diverses estratègies per l'aïllament d'exosomes urinaris, no existeix cap mètode estandaritzat i de referència consensuat per la comunitat científica. Els mètodes utilitzats són la centrifugació diferencial, la cromatografia d'exclusió per mida, el gradient de densitat de sucrosa, Percoll o iodixanol, la captura per immuno-afinitat, la ultrafiltració, la diàlisi hidrostàtica i la precipitació basada en polímers³⁰⁶.

La centrifugació diferencial és el mètode més utilitzat³⁰⁷ i consisteix en la centrifugació seqüencial a velocitats creixents. Tot i ser una única estratègia, existeixen múltiples mètodes que varien tant en el temps com en la velocitat de cadascuna de les centrifugacions. La primera centrifugació –d'entre 10 i 40 min a $300-3.000 \times g$ ³⁰⁸⁻³¹³– permet eliminar-ne les cèl·lules i les restes cel·lulars; seguidament, se'n precipiten les microvesícules – centrifugant 15-20 min a $10.000-17.000 \times g$ ^{309,311,314-321} i, finalment, es sedimenten els exosomes a velocitats d'entre $100.000 \times g$ i $200.000 \times g$ durant 1-24 h^{311,312,315,318,320,322,323}. A més, també existeix controvèrsia en la temperatura de processament de les mostres, que rau d'entre els 4 °C i els 37 °C^{308,314,316,317}. Addicionalment, en alguns casos també s'hi pot aplicar un cribratge de la mida de les vesícules

mitjançant la filtració de la mostra a través d'un filtre amb porus de $0,22 \mu\text{m}$ ^{308,311,315,318,322,323}. L'orina, fisiològicament, conté la proteïna THP, que forma xarxes que atrapen exosomes i precipita a la centrifugació de velocitat mitja. Per aquest motiu, es recomana l'ús d'agents reductors com el ditiotreitòl (DTT) –10 min a 37°C ^{312,314,322} o 2 min a 95°C ^{316,324}– o detergents zwiterònics, per trencar aquestes xarxes i alliberar-ne els exosomes atrapats.

Cal mencionar que, tot i que en molts estudis s'utilitza el terme exosomes per referir-se a la fracció precipitada després de la ultracentrifugació a $100.000\text{-}200.000 \times g$, el precipitat obtingut no conté únicament exosomes, sinó que també hi ha presents vesícules de diàmetre superior i hi poden precipitar proteïnes³⁰⁶. Per aquest motiu, en aquest treball s'utilitzarà el terme *urinary exosome-like vesicles* (uEVs) per fer referència a aquesta fracció. Cal tenir en compte que en diversos articles científics, s'utilitza el terme "EV" per definir el conjunt de vesícules extracel·lulars.

En situacions patològiques, en els que l'orina conté una alta quantitat de proteïna (proteïnúria), la centrifugació diferencial no és eficient ja que pot comportar la precipitació de proteïnes solubles. Per aquest motiu, es combina aquest mètode amb la cromatografia d'exclusió per mida o el gradient de densitat de sucrosa, Percoll o iodixanol, que consisteixen en la seleccionar les vesícules en funció de la mida o la densitat ($1,13\text{-}1,19 \text{ g/mL}$ ²⁵⁸), que és diferent –tot i que amb solapament– de la d'altres vesícules extracel·lulars³⁰⁶. L'aïllament dels exosomes urinaris per immuno-afinitat permet simultàniament la captura i la caracterització d'aquests. No obstant, l'absència de biomarcadors exosomal específics comporta la selecció d'una (o varies, en funció del nombre de biomarcadors emprats) subpoblació d'exosomes i que l'eficiència de la tècnica quedi subjecte als marcadors proteics emprats³⁰⁹. La ultrafiltració consisteix en processar l'orina a través de membranes (normalment de poliètersulfona) amb una mida dels porus determinada que permet el pas de partícules amb pes inferior als 100 kDa ³²⁵. Aquest sistema permet aïllar els exosomes urinaris amb una eficiència similar a la centrifugació diferencial, però una subpoblació

d'exosomes –els que contenen les proteïnes APQ2 i TSG101– poden quedar adherits a la membrana, pel que només se n'aïlla una subpoblació d'exosomes³⁰⁶. A més, aquest sistema també comporta l'aïllament de proteïnes solubles³²⁶. Recentment s'ha desenvolupat la tècnica de la diàlisi hidrostàtica, que consisteix en combinar la centrifugació diferencial amb la filtració de l'orina a través d'una membrana de diàlisi que permet el pas de partícules de fins a 1.000 kDa³²⁷. Per últim, s'han desenvolupat múltiples productes comercials que permeten la precipitació basada en polímers dels exosomes urinaris. Aquests sistemes permeten un ràpid processament de les mostres, però no són suficientment específics ja que hi co-precipiten altres vesícules³⁰⁶.

En funció de les molècules exosomals objectes d'estudi (DNA, RNA o proteïnes) es poden aplicar tractament amb DNases^{315,321,323}, RNases^{313,315,323} o inhibidors de proteases^{308,316,317,322,324}, per així eliminar els àcids nucleics extravesculars i impedir-ne la degradació de les proteïnes exosomals.

Degut a l'absència de mètodes d'aïllament d'exosomes estandarditzats ni de biomarcadors específics, resulta imprescindible una caracterització exhaustiva de la fracció exosomal aïllada. Per això, la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) va publicar l'any 2014 unes recomanacions³²⁸, que l'any 2018 va actualitzar³²⁹. Aquestes recomanacions inclouen la detecció de 3 o més proteïnes associades a exosomes i d'una no associada, i l'ús d'almenys dues tècniques complementàries per caracteritzar la mida i forma de les vesícules.

7. miRNAs

Els miRNAs són una família d'RNAs petits, d'entre 18 i 25 nucleòtids de longitud, no codificants, altament conservats entre espècies i que tenen un paper crucial en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular. Els miRNAs regulen, a nivell postranscripcional, l'expressió gènica dels seus gens diana modulant l'estabilitat de l'mRNA i/o la traducció a proteïna³³⁰.

7.1. BIOGÈNESIS

A nivell genòmic, les seqüències que codifiquen per miRNAs –individuals o en tàndem– es localitzen tant en regions intròniques o exòniques de gens codificants (sota el promotor del propi gen codificant o d'un promotor propi) com en regions intergèniques (sota el seu propi promotor). Donat que majoritàriament els miRNAs són codificats per regions intròniques, es considera que són principalment transcrits per la RNA polimerasa II i, en menys mesura, per la RNA polimerasa III³³⁰.

El producte de la transcripció de les regions gèniques que contenen els miRNAs es coneix com el precursor primari llarg (pri-miRNA), amb l'extrem 5' encapsulat i el 3' poliadenilat que, mitjançant dues escissions enzimàtiques seqüencials, dóna lloc al miRNA madur. En primer lloc, l'enzim Drosha (un tipus d'RNasa III nuclear) juntament amb el cofactor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) escindeixen ambdós extrems del pri-miRNA generant el pre-miRNA, que és una llarga estructura *stem-loop* d'aproximadament 70 nucleòtids amb un fosfat a l'extrem 5'. No obstant, s'han descrit vies de processament dels pri-miRNAs alternatives al complex Drosha/DGCR8, anomenades vies no canòniques. Concretament, existeix un conjunt de miRNAs intrònics (anomenats mirtrons), el pre-miRNA dels quals es generen per l'acció directa de l'spliceosoma en el processament de l'mRNA que els conté. També existeix un conjunt de pre-miRNAs que presenten la modificació 7-

metilguanosa a l'extrem 5', que són transcrits directament com a tal. Tant per la via canònica com en el cas dels mirtrons, els pre-miRNAs són exportats a citoplasma a través del complex exportina-5 i Ran-GTP; mentre que els pre-miRNAs amb l'extrem 5' modificat (7-metilguanosa), són exportats a través de l'exportina-1. Al citoplasma, que és on té lloc la maduració final del miRNA, la proteïna Dicer (una RNAsa III) –que forma un complex amb la TRBP (*transactivation response element RNA-binding protein*)– escindeix el *loop* i dona lloc a un dúplex de 2 miRNAs madurs, d'entre 19 i 23 nucleòtids. D'aquest dúplex de miRNAs madurs, el miRNA que s'origina de l'extrem 5' del pre-miRNA s'anomena 5p; mentre que el que es genera de l'extrem 3' rep el nom de 3p^{330,331}. Del dúplex de miRNAs, tot i que amb múltiples excepcions, només una cadena actua com a miRNA, mentre que l'altra és degradada per Ago2, l'enzim catalític del complex RISC (*RNA-induced silencing complex*)³³⁰⁻³³⁴ (Figura 15).

7.2. MECANISME D'ACCIÓ

El complex RISC amb el miRNA incorporat és l'entitat que, ja sigui per degradació de l'mRNA diana o per inhibició de la traducció d'aquest, regula l'expressió proteica. L'especificitat del complex miRNA-RISC per determinats mRNAs ve determinada per la complementarietat entre un fragment de 2 a 8 nucleòtids de la seqüència de l'extrem 5' del miRNA (anomenada *seed sequence*), amb la seqüència 3' UTR (*untranslated region*), 5' UTR –tot i que en menor freqüència– o regions codificants de l'mRNA [seqüències anomenades MRE (*miRNA response element*)]^{330,331,333}. Si la complementarietat és completa, l'mRNA és degradat per l'activitat endonucleasa de la proteïna Ago2; mentre que si no ho és –que és el més freqüent³³⁵–, s'impedeix la traducció de l'mRNA, ja sigui per repressió de la traducció, per desadenilació de l'mRNA o per eliminació de l'encapsulament de l'extrem 5' de l'mRNA^{330,331} (Figura 15). Malgrat s'ha descrit que la unió del complex miRNA-RISC a regions promotores d'un gen podria induir-ne la transcripció³³⁶, es requereixen més evidències per comprendre aquest model d'interacció.

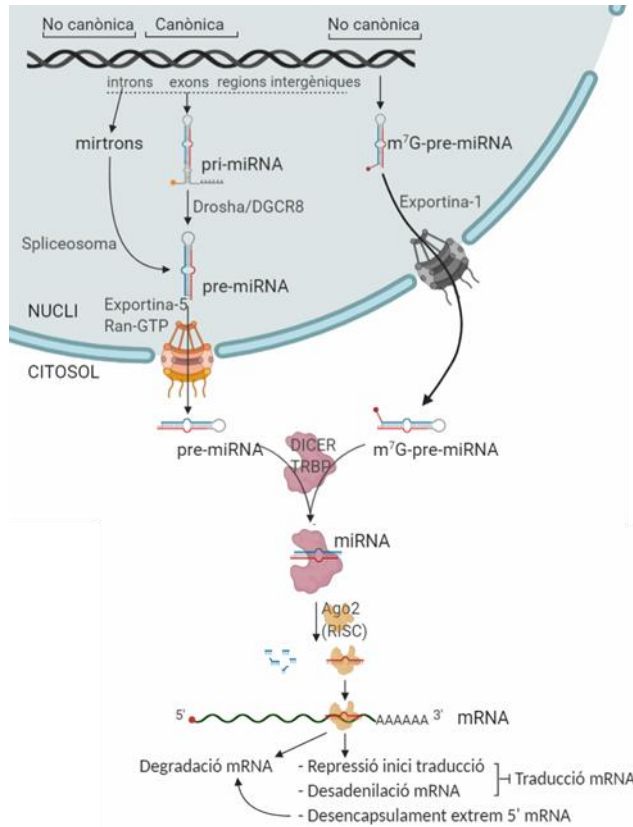


Figura 15. Biogènesi i mecanisme d'acció dels miRNAs. La via canònica de la biogènesi dels miRNAs s'inicia amb la generació del pri-miRNA a partir de la transcripció de regions intròniques, exòniques o intergèniques. El complex proteic format per Drosha i DGCR8 hidrolitza el pri-miRNA generant el pre-miRNA, que és exportat a citoplasma. Els mirtrons, codificats únicament per regions intròniques, i els m⁷G-pre-miRNAs són exportats també a citoplasma. Els pre-miRNAs citosòlics són processats pel complex RISC, que conté la proteïna Ago2, per donar lloc als miRNAs madurs (3p i 5p). El complex miRNA madur – RISC s'uneix al mRNA diana per complementarietat i, per diferents estratègies, inhibeixen la traducció de l'mRNA o promouen la degradació del mateix.

La presència de múltiples MRE en un mateix mRNA, juntament amb la baixa necessitat de complementarietat necessària entre el miRNA i l'mRNA, i els pocs nucleòtids del miRNA implicats en aquest aparellament, fa que un mateix miRNA tingui capacitat d'interaccionar amb diversos mRNAs, alhora que un mateix mRNA pugui ser inhibit per varis miRNAs³³¹. Per aquest motiu, l'ús de bases de dades és imprescindible per relacionar els miRNAs i els mRNAs.

7.2.1. BASES DE DADES MIRNA-MRNA

L'augment creixent en l'estudi dels miRNAs ha posat de manifest la necessitat de disposar de bases de dades que recopilin el coneixement disponible en quant a la interacció miRNA-mRNA. Actualment, existeixen múltiples bases de dades, essent "miRbase" la de referència i la més actualitzada. D'entre aquelles que contenen dades sobre els mRNAs diana, n'hi ha que inclouen informació d'interaccions miRNA-mRNA validades experimentalment (TarBase i miRTarBase), aquelles que contenen les interaccions miRNA-mRNA predites computacionalment (microT-CDS, microT, mirmap, miRanda), en la que s'utilitzen diferents algorismes predictors, i bases de dades mixtes (miRecords i miRWalk). Cal mencionar que la validació experimental no sempre garanteix una certesa absoluta de la interacció, ja que aquelles interaccions identificades amb tècniques d'alt rendiment i que no han estat validades amb una altra tècnica més sensible i específica, podrien no ser reals.

7.3. MIRNA EXOSOMAL

La recerca en l'estudi del miRNAs exosomals ha augmentat considerablement en els últims anys³⁰⁷. Existeixen treballs en els que es demostra que el patró de miRNAs continguts als exosomes no és una representació proporcional i fidedigna del contingut de la cèl·lula d'origen, suggerint que els miRNAs poden ser incorporats als exosomes de manera selectiva. Actualment, s'han identificat –tot i que se'n desconeixen els detalls– 2 mecanismes de selecció i incorporació dels miRNAs als exosomes: per proteïnes d'unió a RNA i per proteïnes de membrana³³⁷. Dins del primer grup, s'ha descrit la unió, a través d'una seqüència específica del miRNA, de ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies (hnRNP, *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins*) –hnRNPA2B1, hnRNPA1 i hnRNP-Q³³⁸⁻³⁴⁰, la implicació d'Ago2 (que també protegeix els miRNAs de la degradació per RNAses³⁴¹) a

través de la via de senyalització MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)³⁴², les proteïnes YBX-1 (*Y-Box Binding Protein 1*)^{343,344}, MEX3C (*RNA-binding E3 ubiquitin-protein ligase MEX3C*) –possiblement a través de la interacció amb Ago2³⁴⁵ i MVP (*Major vault protein*)³⁴⁶. Al grup de proteïnes de membrana implicades en la incorporació selectiva de miRNAs als exosomes –així com en la biogènesi exosomal– hi ha la caveolina-1, implicada en el tràfic intracel·lular dels complexos hnRNP A2B1-miRNAs als exosomes³⁴⁷, la proteïna nSMase2 (*Neural Sphingomyelinase 2 Neural*)^{277,348} i la proteïna Vps4A (*Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 4*)^{349,350}.

7.4. MI RNA D'EXOSOMES URINARIS EN MALALTIA RENAL

Els exosomes urinaris permeten disposar d'informació dels esdeveniments moleculars i cel·lulars de la nefrona, així com dels processos fisiopatològics associats a malalties renals, d'una manera no invasiva²⁶². Diversos estudis realitzats posicionen els miRNAs exosomals com a molècules de gran utilitat en el diagnòstic en fase inicial de determinades malalties renals³⁵¹⁻³⁵³. Tot i que també s'han identificat miRNAs lliures presents a l'orina com a biomarcadors de malaltia renal³⁵⁴⁻³⁵⁷, els exosomes confereixen un sistema de protecció de les molècules contingudes enfront enzims de degradació presents a l'orina³⁰⁵.

En humans, s'han identificat miRNAs en exosomes urinaris implicats en processos tant crucials en la malaltia renal com són la fibrosi renal³¹⁰, la insuficiència renal^{310,352} i la insuficiència renal crònica avançada (eGFR < 30 mL/min/1,73m²)³⁵⁶. També s'ha associat la desregulació de determinats miRNAs d'exosomes urinaris amb malalties amb afectació renal com la nefropatia diabètica³⁵⁸⁻³⁶², la nefritis lúpica^{310,363,364}, la nefropatia per Immunoglobulines A³⁶⁵, la glomeruloesclerosi focal i segmentària³⁶⁶, i la poliquistosi renal autosòmica dominant (PQRAD)³⁶⁷. Un dels avantatges d'identificar miRNAs com a biomarcadors de patologies és que aquests poden ser utilitzats no només com a diana terapèutica, sinó també com a

tractament³⁶⁸. En l'actualitat existeix un assaig clínic en el que s'utilitzen molècules anti-miRNA (concretament anti-miR-21, al que s'ha atribuït implicació en processos fibròtics³⁶⁹), pel tractament de la síndrome d'Alport, una malaltia glomerular renal³⁷⁰.

Així doncs, davant l'absència d'indicació clínica de biòpsia renal que permeti analitzar els processos biològics desregulats en una malaltia –com és el cas de la HFHNC–, així com per identificar nous biomarcadors i dianes terapèutiques, l'anàlisi del contingut dels exosomes urinaris, com a reflex del que succeeix a les cèl·lules renals, és una aproximació utilitzada i acceptada.

JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESI

La HFHNC és una malaltia minoritària i severa amb progressió inexorable a la CKD i FR, però amb una àmplia variabilitat fenotípica entre els pacients, inclús entre aquells amb la mateixa mutació causant de la malaltia, així com entre els membres d'una mateixa família. S'han suggerit múltiples factors que poden explicar la variabilitat fenotípica en malalties renals hereditàries: el tipus de mutacions, l'heterogeneïtat genètica, la presència de gens modificadors, la regulació epigenètica, la inactivació a l'atzar del cromosoma X, el mosaïcisme i els factors ambientals²⁴⁴. No obstant, en el cas de la HFHNC, l'homogeneïtat genotípica dels pacients amb HFHNC amb la mutació p.G20D en homozigosi a *CLDN19* i, alhora, l'heterogeneïtat en les manifestacions clíniques evidencia –juntament amb el patró d'herència que presenta– que, únicament la presència de gens modificadors, la regulació epigenètica i la presència de factors ambientals podrien explicar la variabilitat fenotípica dels pacients. Per aquest motiu, davant l'absència d'estudis que engloben aquests conceptes en el context de la HFHNC, aquest treball s'ha focalitzat en els dos primers factors en una cohort de pacients afectes d'HFHNC: la presència de gens modificadors del fenotip i l'estudi de la regulació epigenètica mitjançant l'anàlisi del contingut en miRNAs dels exosomes urinaris.

Així doncs, la hipòtesi d'aquesta tesi doctoral és:

“Variants gèniques no causants d'HFHNC i l'expressió diferencial de miRNAs als uEVs determinen la variabilitat fenotípica dels pacients amb HFHNC”.

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral és identificar factors genètics i epigenètics implicats en la progressió de la HFHNC, així com conèixer la fisiopatologia renal de la malaltia.

Per tal d'assolir aquesta fita, s'han desenvolupat els següents objectius específics:

1. Descriure les característiques genètiques, clíniques i demogràfiques de la cohort d'estudi.
2. Identificar variants genètiques que correlacionin amb la progressió diferencial de la malaltia renal.
3. Determinar l'expressió diferencial dels miRNAs continguts als exosomes urinaris per conèixer la fisiopatologia de la HFHNC i identificar potencials biomarcadors de pronòstic clínic.

MATERIALS I MÈTODES

1. PACIENTS

Per la realització d'aquest estudi observacional s'han recollert les dades clíniques i bioquímiques, així com mostres de sang i d'orina de pacients afectes d'HFHNC i individus controls (germans/es san/es de pacients amb HFHNC inclosos en la cohort). Tots els pacients, o els seus tutors, van signar el consentiment informat abans de la participació a l'estudi. Els pacients més grans de 12 anys també van aportar el seu consentiment. Aquest estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica del Vall d'Hebron Institut de Recerca (PR(AMI)280/2015) (veure certificat d'aprovació a l'annex 1).

Els pacients són atesos als corresponents centres hospitalaris regionals, on se'ls fa el seguiment mèdic i reben l'adequat tractament conservador. La inclusió d'aquests individus va ser possible gràcies a la difusió del projecte a través de la Societat Espanyola de Nefrologia (SEN), l'Associació Espanyola de Nefrologia Pediàtrica (AENP) i l'associació de pacients afectes d'hipomagnesèmies, Hipofam. Els criteris d'inclusió van ser el diagnòstic d'HFHNC i disposar del consentiment (i assentament en el cas dels pacients d'entre 12 i 18 anys) informat (Annex 2). Les dades clíniques i bioquímiques facilitades pels nefròlegs responsables o recollertes de la base de dades RenalTube²¹⁷ van ser analitzades retrospectivament. La informació mèdica recopilada incloïa la data de diagnòstic d'HFHNC, si havia patit algun ITU que requerís ingrés hospitalari, si patia algun tipus d'afectació ocular, el seguiment anual de la funció renal i, en cas que hagués desenvolupat FR, a quina edat. A més, es van sol·licitar els valors analítics tant del moment del diagnòstic com de l'últim seguiment mèdic, coincident amb el moment de la inclusió de l'individu en l'estudi (Annex 3).

Les característiques clíniques i genètiques d'algun dels pacients inclosos en la cohort d'estudi havien estat reportades prèviament^{196,208}.

1.1. DADES CLÍNiques

Les variables clíniques disponibles dels individus inclosos en la cohort d'estudi van ser analitzades retrospectivament. Les dades corresponents a variables contínues es van expressar com la mitjana i la desviació estàndard (SD, *standard deviation*) sempre que tinguessin una distribució normal – determinada amb el test *Shapiro-Wilk* –, mentre que, del contrari, es va mostrar la mediana i el rang interquartílic (IQR, *Interquartile range*). Les anàlisis comparatives de variables quantitatives van ser realitzades, en funció del nombre de grups a comparar, amb el test T-Student o ANOVA aplicant les correccions per comparacions múltiples de Bonferroni. El temps de supervivència renal lliure de CKD estadiatge 3 –segons les guies K/DOQI 2002³⁷¹– es va estimar des de la data de naixement fins CKD l'estadiatge 3 utilitzant el mètode de Kaplan-Meier, considerant com a punt final la primera mesura del eGFR < 60 mL/min/1,73m². En cas dels pacients que no havien assolit CKD estadiatge 3, les dades corresponents a l'últim seguiment mèdic disponible van ser censurades. Les corbes de supervivència entre diferents subgrups van ser comparades utilitzant el test Log-Rank. Per avaluar la relació entre la progressió renal i la presència d'anomalies oculars es va aplicar la correlació de Pearson. El llinar de CKD estadiatge 3 va ser determinat perquè, una vegada s'assoleix aquest greu de malaltia renal, la progressió d'aquesta és més severa, i perquè coincidia amb el criteri emprat en un treball previ¹⁸⁵.

L'avaluació del creixement dels pacients es va realitzar mitjançant el càlcul de *Z-score* utilitzant, com a referència, les taules de creixement de la població pediàtrica espanyola³⁷² [$Z = (\text{alçada pacient} - \text{alçada mitjana població de l'edat}) / \text{SD de l'alçada de la població de l'edat}$].

Cal mencionar que, en relació a les dades referents a l'últim seguiment clínic, en aquest treball només es van considerar els pacients que no havien progressat a FR, definit com el moment en que els pacients han iniciat tractament renal substitutiu, ja sigui diàlisi o trasplantament renal.

Es va considerar significança estadística p-valors < 0,05. Les anàlisis estadístiques i les gràfiques van ser realitzades amb l'SPSS versió 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) i el GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA), respectivament.

1.1.1. ESTIMACIÓ DE LA PÈRDUA ANUAL DE FUNCIO RENAL

Amb la finalitat d'identificar factors associats amb la progressió de la CKD cap a la FR, es van classificar els pacients en funció de l'evolució de la malaltia renal al llarg del temps. Per això, de cada pacient, i per a tots els punts de seguiments disponibles, es va calcular l'eGFR (*estimated GFR*) utilitzant la fórmula de *Schwartz* modificada³⁷³ en edats pediàtriques, i la fórmula *Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI)³⁷⁴ en adults. Els valors d'eGFR calculats es van traçar envers l'edat del pacient a cada moment del seguiment clínic i, el pendent de les rectes de regressió generades per cada pacient, va ser considerat la pèrdua d'eGFR anual. Els pacients es van classificar els pacients en 3 grups: els pacients amb progressió renal ràpida, amb un pendent de la recta de regressió ≥ -10 , el grup amb progressió renal moderada, amb un pendent de la recta de regressió d'entre -10 i 0 ; i el grup de pacients amb progressió renal lenta, que incloïa aquells pacients amb un pendent de la recta de regressió positiva (> 0).

2. SEQÜENCIACIÓ MASSIVA D'EXOMES

2.1. PROCESSAMENT DE MOSTRES DE SANG

L'obtenció de les mostres de sang dels individus de la cohort d'estudi es va realitzar segons el procediment estàndard. La sang es va recollir en tubs BD Vacutainer® amb EDTA K2. Les mostres de sang total es van mantenir un màxim de 36 h a 4 °C fins procedir amb l'aïllament del DNA genòmic.

2.2. MANIPULACIÓ DEL DNA GENÒMIC

2.2.1. EXTRACCIÓ

L'extracció de DNA de sang perifèrica dels individus inclosos en la cohort d'estudi es va realitzar amb el *Gentra Puregene Blood kit*® (#158467, Qiagen), seguint les instruccions del producte. Concretament, es va afegir 3 mL de solució de lisi dels glòbuls vermells per cada mil·lilitre de sang. Després d'homogeneïtzar, incubar 10 min i centrifugar-ho, al precipitat s'hi va afegir 1 mL de solució de lisi cel·lular que conté detergents aniònics i estabilitzadors del DNA que inhibeixen l'activitat de les DNAses. Una vegada homogeneïtzat químicament i mecànicament, es van afegir 333 µL de solució de precipitació de proteïnes i, després de mesclar-ho, es va centrifugar. El sobrenedant es va mesclar amb 1 mL d'isopropanol 100 %, moment en el que el DNA genòmic (gDNA) es feia visible, i es va precipitar i netejar amb etanol 70 % (preparat amb aigua milliQ lliure de DNAses). Finalment, després d'eliminar tot l'etanol, es va dissoldre el gDNA en 100 µL d'aigua milliQ lliure de DNAses i es va incubar 1 h a 65 °C per completar-ne la hidratació. Totes les centrifugacions es van realitzar a temperatura ambient. En funció del volum de sang inicial, es van escalar els volums de cada reactiu.

De cada individu es van realitzar dues extraccions de gDNA independents a partir de la mateixa mostra de sang, obtenint dues al·iquotes de gDNA de cadascú. Les mostres de gDNA es van emmagatzemar a -80 °C fins el seu ús.

2.2.2. QUANTIFICACIÓ

La concentració i puresa del gDNA obtingut es va mesurar, a partir d'1 µL de gDNA, per espectrofotometria amb el *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific). La puresa del DNA es va determinar amb els ratis d'absorbància 260 nm/280 nm i 260 nm/230 nm, considerant com a vàlids valors superiors a 2 i d'entre 1,8 i 2,2, respectivament.

2.3. SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA

La seqüenciació i l'anàlisi de l'exoma es va realitzar al Centre de Regulació Genòmica - Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CRG-CNAG, Barcelona, Espanya).

2.3.1. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

Les mostres de gDNA per enviar al CRG-CNAG es varen preparar a 100 ng/µL en aigua milliQ lliure de DNAses, obtenint una quantitat total de 4 µg de gDNA. Totes les mostres van ser identificades amb el sistema de codificació pel centre CRG-CNAG, el qual va ser associat al codi assignat prèviament a cada individu amb la corresponent informació personal i clínica.

Al centre seqüenciador, les mostres van ser sotmeses a un exhaustiu control de qualitat. Primerament, el DNA es va quantificar de nou amb el mètode fluorimètric *Qubit BR* (#Q32850, ThermoFisher Scientific), sistema altament selectiu per la quantificació específica de DNA de cadena doble (dsDNA, *doubled stranded DNA*). A més a més, es va realitzar una electroforesi en gel d'agarosa de 50 ng de DNA per determinar-ne la integritat del mateix i,

finalment, de cada mostra es va amplificar, mitjançant PCR (*polymerase chain reaction*), un fragment dels gens GAPDH i AMELX i/o AMELY. Aquests 2 últims gens es situen als cromosomes X i Y, respectivament, i difereixen en el nombre de nucleòtids que els conformen. En base a aquestes diferències, la visualització dels productes d'amplificació en un gel d'agarosa, a més de comprovar que la mostra no contenia inhibidors de la polimerasa, va permetre verificar el sexe dels individus i així, indirectament, corroborar les dades d'identificació de les mostres, introduïdes manualment al sistema informàtic.

Les mostres que van passar el control de qualitat van ser processades, les que no el varen superar, van ser reemplaçades per noves mostres obtingudes de l'altra extracció de gDNA.

2.3.2. REACCIÓ DE SEQÜENCIACIÓ

Per realitzar l'enriquiment complet de l'exoma es va utilitzar el kit *SureSelect^{XT} Human All Exon V5* (#5190-6210, Agilent Technologies), que permet analitzar un total de 335.765 exons pertinents a 21.058 gens. Més detalladament, tal com s'esquematitza a la figura 16, 4 µg de gDNA es van sonicar amb l'aparell *LE220 Focused-ultrasonicator* (Covaris), obtenint fragments d'entre 100 i 300 pb, que van ser purificats amb el kit *AMPure XP beads* (#A63882, Beckman Coulter Genomics). Posteriorment, es van reparar els extrems del DNA fragmentat, es van adenilar i finalment es van lligar als adaptadors de seqüenciació. Utilitzant el kit *Herculase II fusion DNA polymerase* (#600679, Agilent Technologies), les mostres es van amplificar amb 6 cicles de PCR i el producte, mitjançant l'*Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 7500 chip* (Agilent Technologies), es va quantificar i sotmetre a un control de qualitat per confirmar que la longitud dels fragments que conformaven la llibreria era d'entre 200 i 350 pb. Una vegada passat el control de qualitat, les mostres es van hibridar durant 24 h a 65 °C (#2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems). Després de rentar el producte hibridat, i utilitzant el kit *SureSelectXT Indexes*, cada mostra

es va amplificar amb 12 cicles de PCR amb la finalitat d'afegir les etiquetes índex úniques i poder seqüenciar múltiples mostres simultàniament.

Finalment, la seqüenciació de cada *pool* de llibreries es va dur a terme utilitzant el sistema *TruSeq SBS Kit v3* en l'instrument *HiSeq2500* (Illumina) a partir dels dos extrems de cada fragment de DNA (*paired-end*), amb longituds de lectura de 101 pb i amb una profunditat de cobertura de 90x. L'anàlisi de les imatges, l'assignació de les bases i l'avaluació de la qualitat es van processar utilitzant el programa *Real Time Analysis*, RTA 1.13.48, (Illumina, Inc), seguit per la generació dels arxius FASTQ de seqüències mitjançant el programa CASAVA (Illumina).

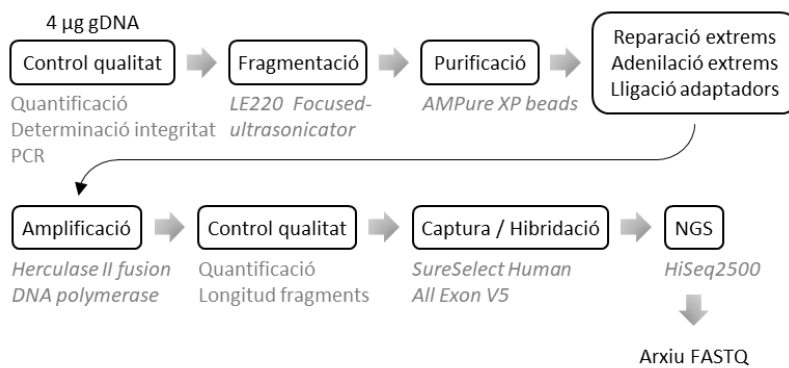


Figura 16. Mètode utilitzat per seqüenciar els exomes. NGS, *Next generation sequencing*.

2.4. ANÀLISI BIOINFORMÀTICA

L'anàlisi bioinformàtic i la prioritització de variants gèniques es va realitzar al CRG-CNAG seguint el *pipeline* detallat a la figura 17. Les lectures obtingudes per seqüenciació, disponibles en format FASTQ, es van alinear amb la seqüència de referència del genoma humà GRCh37 (hg19) amb seqüències *decoy* (Broad Institute)³⁷⁵ mitjançant el software BWA 0.7.12.³⁷⁵ Els alineaments es van processar amb el *Picard tools* v1.110³⁷⁶ per afegir grups de lectures, seleccionar lectures aparellades (i que mapessin de manera única sobre el genoma), i

eliminar duplicats de PCR. El paquet de software *Genome Analysis Tool Kit* (GATK 3.6)³⁷⁷ es va utilitzar per realinear les lectures al voltant dels *indels* i recalibrar el valor de qualitat de les bases. La crida de variants es va realitzar mitjançant el programa *HaplotypeCaller* de GATK. A les variants obtingudes es van afegir anotacions funcionals mitjançant el programa *snpEff*, amb la base de dades GRCh37.75^{378,379}, que prediu l'impacte funcional de cadascuna de les variants gèniques. Mitjançant l'eina SnpSift³⁸⁰, i a partir de la informació recopilada de la base de dades dbNSFP v2.8, es van afegir anotacions de freqüència poblacional, *scores* de conservació i predictors de quant deletèries eren les variants. Finalment, es van afegir també anotacions d'altres fonts com gnomAD, ExAc³⁸¹ i ClinVar³⁸².

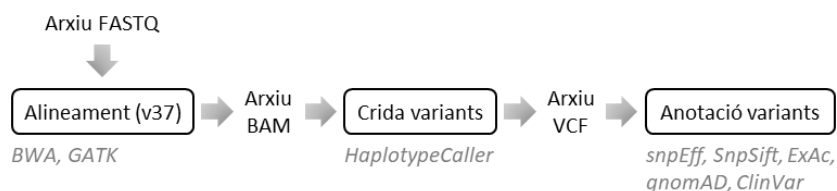


Figura 17. Pipeline utilitzat per l'anàlisi bioinformàtic de la seqüenciació dels exomes.

2.5. ANÀLISI BIOESTADÍSTICA

Per identificar variants gèniques associades al fenotip renal –progrèssió renal ràpida, moderada i lenta– dels pacients amb HFHNC inclosos en la cohort d'estudi, es va realitzar l'anàlisi bioestadística de les dades obtingudes de la seqüenciació dels exomes dels pacients. Tenint en compte que per cada variant gènica hi ha 3 genotips possibles [homozigot per l'al·lel de referència (R/R), heterozigot (R/A) i homozigot per l'al·lel alternatiu (A/A)], per a cadascuna de les variants identificades en la seqüenciació es va aplicar el diagrama detallat a la figura 18 per tal d'identificar les variants gèniques potencialment modificadores del fenotip. Inicialment, es va determinar si existia una distribució diferencial de la freqüència de pacients amb els 3 possibles genotips entre els

3 grups de pacients d'estudi (progressió renal ràpida, moderada i lenta) mitjançant taules de freqüències 3x3 i aplicant-hi el test exacte de Fisher (Figura 18A). D'entre les variants seleccionades (p -valor $< 0,05$), es van identificar aquelles per les quals els grups de progressió renal ràpida i lenta es diferenciaven de la resta de pacients amb taules de contingència 3x2 i aplicant-hi el test exacte de Fisher (Figura 18B). Seguidament, per les variants resultants d'aquest segon criteri (p -valor $< 0,05$), es va determinar, seguint la mateixa metodologia, si existien diferències en la distribució dels 3 possibles genotips entre els grups de pacients amb progressió renal ràpida en comparació amb els de progressió renal lenta (Figura 18C). D'aquesta manera es van identificar les variants associades de manera diferencial entre els dos grups de progressió renal més extrems. Amb les variants seleccionades (p -valor $< 0,05$), per tal de conèixer l'associació de cada genotip de cada variant amb cada grup de pacients estudiat, es van calcular les *odds ratio* (OR) i els corresponents intervals de confiança (Figura 19). En aquest cas, l'OR determina el "risc" de pertànyer a cada grup de pacients en funció del genotip, per tant, permet determinar si un genotip determinat d'una variant té un efecte "protector" o "nociu" envers el fenotip renal. Aquests càlculs es van realitzar mitjançant taules de contingència 2x2. En aquest cas, per limitacions tècniques, l'estudi es va centrar en els genotips homozigots per cada variant, és a dir, es va determinar l'associació entre presentar l'al·lel de referència o l'al·lel alternatiu en homozigosi i pertànyer al grup de progressió renal ràpida o lenta (Figura 18D). Donat que en moltes variants la freqüència de pacients amb un determinat genotip era de 0 en algun dels grups de pacients i impedia el càlcul de l'OR, es va aplicar la correcció de Haldane³⁸³ i Anscombe³⁸⁴, que consisteix en sumar el valor de 0,5 a cada casella de la taula de contingència. D'aquesta manera es va poder calcular l'OR de tots els genotips de cada variant gènica per a cada grup de pacients. Finalment, es van seleccionar les variants per les que l'OR va resultar significatiu, és a dir, que l'interval de confiança no incloïa el valor 1.

A. Variants en les que algun genotip es distribueix diferencialment entre grups:

TEST EXACTE FISHER			
Genotip	Progressió renal		
	Ràpida	Moderada	Lenta
RR			
RA			
AA			

↓ p<0,05

B. Variants per les que la freqüència d'algun genotip és diferent al grup de progressió renal ràpida i lenta en comparació amb la resta:

TEST EXACTE FISHER			TEST EXACTE FISHER		
Genotip	Progressió renal		Genotip	Progressió renal	
	Ràpida	Moderada + Lenta		Lenta	Moderada + Ràpida
RR			RR		
RA			RA		
AA			AA		

↓ p<0,05

C. Variants en les que la freqüència de cada genotip es distribueix diferent entre el grup de progressió renal ràpida i lenta:

TEST EXACTE FISHER		
Genotip	Progressió renal	
	Ràpida	Lenta
RR		
RA		
AA		

↓ p<0,05

D. Genotip de cada variant que, en homocigosi, s'associa al grup de progressió ràpida o lenta: ODDS RATIO (Correcció de Haldane-Anscombe)

ODDS RATIO (Correcció de Haldane-Anscombe)					
Genotip	Progressió renal		Genotip	Progressió renal	
	Ràpida	Lenta		Ràpida	Lenta
RR			AA		
RA + AA			RA + RR		
OR > 1 → Genotip RR nociu OR < 1 → Genotip RR protector			OR > 1 → Genotip AA nociu OR < 1 → Genotip AA protector		

Figura 18. Diagrama utilitzat per identificar variants gèniques associades a la progressió renal ràpida i lenta. R: Al·lel de referència; A: al·lel alternatiu.

	GRUP 1	GRUP 2
CONDICIÓ 1	a	b
CONDICIÓ 2	c	d

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

$$IC = OR \cdot e^{\pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}}$$

Figura 19. Fórmules utilitzades per calcular l'odds ratio (OR) i el corresponent interval de confiança (IC). Per aplicar la correcció de Haldane-Anscombe es va sumar 0,5 al valor de cada casella de la taula de contingència (a, b, c, i d).

3. AÏLLAMENT D'UEVS

L'orina amb les que es va treballar durant tot l'estudi va ser recol·lectada en recipients estèrils i conservades a, aproximadament, 4 °C un màxim de 36 h, fins el moment en que arribaven al laboratori i eren processades immediatament.

Degut a la poliúria que pateixen els pacients amb HFHNC, es van haver d'utilitzar grans volums de mostra de partida. Per aquest motiu, es va descartar l'ús de cap producte comercial per l'aïllament dels exosomes urinaris i es va optar per la centrifugació diferencial que, a més de ser la tècnica de referència, permet utilitzar volums de mostra il·limitats.

3.1. ESTABLIMENT DEL MÈTODE

L'establiment i l'optimització del mètode d'aïllament d'uevs es va realitzar a partir de mostres d'orina de 7 individus sans (4 dones i 3 homes), mitjançant la tècnica de centrifugació diferencial (Figura 20A).

Es van recol·lectar 500 mL d'orina i es va afegir 1 µL/mL d'orina de còctel inhibidor de proteases (PIC, *protease inhibitor cocktail*) (#S8820 Sigma-Aldrich). Després d'homogeneïtzar-ho, la mostra es va centrifugar 10 min a 2.500 $\times g$ per eliminar-ne les restes cel·lulars. Posteriorment, es van precipitar els fragments cel·lulars, les cèl·lules apoptòtiques i les microvesícules mitjançant una centrifugació de 15 min a 17.000 $\times g$. El sobrenedant resultant (SN0) es va

mantenir en gel, mentre que el precipitat (P0) es va sotmetre al tractament amb una solució de DTT (#A2948, AppliChem) a 200 mg/mL per tal d'alliberar-ne els exosomes retinguts a les xarxes proteiques de THP. Aquest tractament es va testar en dues condicions diferents: 95 °C durant 2 min, i 37 °C durant 10 min amb agitació cada 2 min. Ambdós precipitats tractats amb DTT es varen centrifugar durant 20 min a 17.000 xg i els sobrenedants resultants (SNa i SNb) van ser ultracentrifugats (Sorvall WX90; rotor AH629) a 100.000 xg durant 2 h, obtenint els precipitats P2 i P3, respectivament.

Els 500 mL de SN0 es va dividir en 5 alíquotes de 100 mL que varen ser processades seguint diferents procediments: ultracentrifugació a 100.000 xg durant 2 h del SN0, el que va donar lloc al precipitat 1 (P1); ultracentrifugació a 100.000 xg durant 2 h del SN0 combinat amb el SNb, el que va generar el precipitat 4 (P4); filtratge del SN0 a través d'un filtre de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) amb porus de 0,22 μm (#SLGS033SS, Millipore) i posterior ultracentrifugació a 100.000 xg durant 2 h, el que va produir el precipitat 5 (P5); doble ultracentrifugació del SN0 –la segona amb PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, i 1,8 mM KH₂PO₄)– a 100.000 xg durant 2 h, generant el precipitat 6 (P6) i; ultracentrifugació a 200.000 xg durant 1 h del SN0, que va donar lloc al precipitat 7 (P7). Totes les centrifugacions es van realitzar a 4 °C i els precipitats obtinguts es varen dissoldre en 150 μL de PBS 1x fred i pre-filtrat per un porus de 0,22 μm . Les suspensions d'uEVs van ser emmagatzemades a -80 °C fins el posterior ús.

3.2. PROCESSAMENT MOSTRES DE PACIENTS

Tal i com es va determinar a la fase d'optimització del mètode d'aïllament d'uEVs, les mostres d'orina del individu amb ronyons nadius funcionals de la cohort d'estudi es van processar de la mateixa manera que es va obtenir el P4, incloent alguna modificació (Figura 20B). Més detalladament, 300 mL d'orina de cada individu van ser homogeneïtzats amb PIC (1 $\mu L/mL$ d'orina),

centrifugats a $2.500 \times g$ durant 10 min i, el sobrenedant resultant, es va centrifugar 15 min a $17.000 \times g$. El sobrenedant es va reservar a 4°C mentre que el precipitat resultant va ser tractat amb DTT (200 mg/mL), incubat 10 min a 37°C i centrifugat durant 20 min a $17.000 \times g$. Aquest sobrenedant es va mesclar amb l'obtingut de la centrifugació prèvia i ultracentrifugat a $100.000 \times g$ durant 2 h. Per tal d'eliminar l'RNA extravesicular present a la mostra, es va incubar el precipitat resultant amb $16 \mu\text{g}$ d'RNAsa A/mL de suspensió exosomal (#158924, Qiagen). Després de 15 min d'incubació a temperatura ambient, les mostres van ser finalment ultracentrifugades a $200.000 \times g$ durant 1 h. Els uEVs precipitats es va dissoldre en $200 \mu\text{L}$ de PBS 1x fred i pre-filtrat per un porus de $0,22 \mu\text{m}$. Les suspensions d'uEVs van ser emmagatzemades a -80°C fins el seu ús.

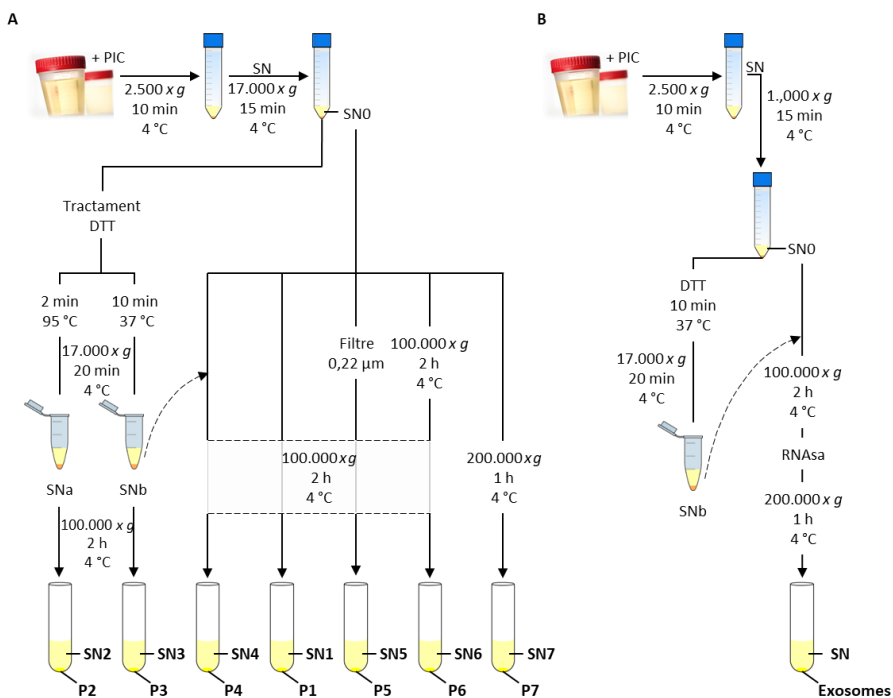


Figura 20. Procediments per l'aïllament d'uEVs. (A) Representació esquemàtica dels protocols emprats per l'aïllament d'uEVs. (B) Protocol utilitzat per aïllar els uEVs de la cohort d'estudi. PIC: Còctel inhibidor de proteases; DTT: ditiotreitol; SN: Sobrenedant; P: Precipitat.

4. CARACTERITZACIÓ DELS uEVs

La caracterització dels uEVs es va realitzar seguint les recomanacions de la ISEV publicades l'any 2014³²⁸, que incloïen l'ús de 3 tècniques complementàries.

4.1. NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS

La quantificació i la distribució de la mida dels uEVs aïllats es va analitzar mitjançant la tècnica *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC), Universitat Autònoma de Barcelona, Espanya. Les mesures es van realitzar amb l'aparell Nanosight NS300 (Malvern Instruments) que utilitza la dispersió de la llum i el moviment Brownià de les partícules en suspensió per obtenir la mida –dins del rang comprès entre 10 i 2.000 nm– i la concentració d'aquestes mitjançant llum làser. Aquests paràmetres es van enregistrar al programa NTA v3.1 (NanoSight Ltd., UK) en format de vídeo amb una càmera d'alta sensibilitat sCMOS i els ajustos de *track length* i *blur* en automàtic, que va determinar la mida de les partícules mitjançant la fórmula d'Stokes-Einstein³⁷⁵.

Per realitzar l'anàlisi, es van diluir 5 µL de les mostres d'uEVs en PBS 1x fins obtenir concentracions d'entre 10⁷ i 10⁹ nanopartícules/mL. La mesura de cada mostra es va realitzar a temperatura ambient, per triplicat i amb 25 fotogrames per segon. Amb les dades obtingudes es van calcular les mitjanes i les desviacions estàndard de cada mostra.

4.2. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ CRIOGENICA

La visualització dels uEVs aïllats es va realitzar mitjançant microscòpia electrònica de transmissió criogènica (cryo-TEM, *Cryogenic Transmission Electron Microscopy*), al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de

Barcelona, Espanya. L'aparell utilitzat va ser el microscopi electrònic de transmissió *JEOL JEM-2011* juntament amb la cambra de criopreparació *Leica EM CPC* (Leica Biosystems).

Alíquotes de 4 μ L de suspensió exosomal es van dipositar a les reixetes *QUANTIFOIL® Holey Carbon 400* (Electron Microscopy Science). La preparació es va introduir a la cambra de criopreparació *Leica EM CPC* i es va submergir en età líquid, a -179 °C, per tal de vitrificar la mostra i, immediatament, en nitrogen líquid per mantenir-la a baixes temperatures. Les preparacions, ja a temperatures pròximes als -196 °C, es varen transferir al microscopi per la seva visualització a un voltatge d'acceleració de 200 kV constants.

4.3. WESTERN-BLOT

El *western-blot* és una tècnica àmpliament utilitzada per detectar específicament determinades proteïnes presents en una barreja complexa d'aquestes. Es tracta d'una tècnica semi-quantitativa en la que les proteïnes desnaturalitzades es separen pel seu pes molecular i es transfereixen a una membrana per la seva visualització amb l'ús d'anticossos específics.

4.3.1. EXTRACCIÓ PROTEÏNES

Per tal de disposar del contingut proteic dels uEVs aïllats, es va realitzar la lisi d'aquests amb el tampó de lisi RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) a concentració 2x [300 mM NaCl (#PA146994, Panreac), 2 mM EDTA (#ED2SS, Sigma-Aldrich) pH 8,0, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 (#A2264, Panreac), 2 % NP-40 (#74385, Sigma-Aldrich), 1 % desoxicolat de sodi (#106504, Merck), 0,2 % SDS (#A2572, Panreac), i complementat amb PIC (1:100), Na_3VO_4 (#S6508, Sigma-Aldrich) (1:100) i NaF (#S7920, Sigma-Aldrich) (1:500)].

Per lisar 30 μ L d'uEVs es va afegir RIPA 2x a la suspensió exosomal (1:1 v/v) i es va incubar la mescla a 4 °C en rotació constant durant 1 h. Una vegada

finalitzat aquest període, les mostres es van sotmetre a ultrasons, realitzant 5 cicles de 5 segons cadascun a una amplitud màxima de 100 per disgregar les membranes lipídiques. Finalment, es van centrifugar les mostres 15 min a $13.000 \times g$ a 4°C , i el sobrenedant es va emmagatzemar a -20°C fins el seu ús.

4.3.2. IMMUNODETECCIÓ

Per la detecció de les proteïnes associades (i no associades) al exosomes, es van utilitzar gels de poliacrilamida al 10 % i 15 % amb un gruix d'1,5 mm, preparats segons es detalla a la Taula 2.

Taula 2. Components dels gels de poliacrilamida al 10 % i 15 %.

Component	Gel	Gel <i>Separating</i>	
	<i>Stacking</i>	10 %	15 %
30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida (#A1672, Panreac)	0,39 mL	2,5 mL	3,75 mL
4X 0,5 M Tris-HCl/ 0,4 % SDS pH 6.8	0,75 mL	-	-
4X 1,5 M Tris-HCl/ 0,4 % SDS pH 8.8	-	1,87 mL	1,87 mL
Aigua MilliQ	1,83 mL	3,12 mL	1,87 mL
10 % persulfat amònic (#A1142, Panreac)	30 μL	50 μL	50 μL
TEMED (#T9281, Sigma-Aldrich)	6 μL	5 μL	5 μL

Als 60 μL de lisat d'uEVs es va afegir el corresponent volum de tampó de càrrega Laemmli 4x (#1610747, Bio-Rad) per obtenir una concentració final 1x.

Les mostres, i 5 μL de marcador de pes molecular (#161-0363, Biorad), es van carregar als gels col·locats al sistema d'electroforesi vertical Mini-PROTEAN® (#1652960, Bio-Rad) immersos en tampó d'electroforesi [25 mM Tris, 0,2 M glicina (#A1067, Panreac) i 0,1 % SDS] i es van sotmetre a un voltatge constant de 100 V. Posteriorment, les proteïnes es van transferir a membranes de PVDF i porus de 0,22 μm (#ISEQ00010, Millipore) activades amb metanol 100 % (#A3493, Panreac) i immerses en tampó de transferència [50 mM Tris, 40 mM glicina, 0,04 % (v/v) SDS i 20 % (v/v) metanol]. La transferència es va realitzar a 100 V constants durant 1 h. Finalment, les membranes es van incubar

amb 25 mL de solució bloqueig [5 % llet desnatada i deshidratada dissolta en PBS-Tween [PBS-T, PBS 1x, 0,1 % Tween® 20 (#A4974, Panreac)] 1 h en agitació i a temperatura ambient i, per últim, es van incubar amb els anticossos primaris específics (Taula 3) a 4 °C en rotació constant durant la nit.

Taula 3. Anticossos primaris utilitzats per *western-blot*.

Anticòs	Espècie	Epítóp	Diluent	Dilució	Referència
Alix	Conill	450-550	Solució bloqueig	1:500	Ab76608; Abcam
TSG101	Ratolí	167-374		1:500	Ab83; Abcam
CD81	Ratolí	90-210		1:1000	sc-166028; Santa Cruz
GRP78	Conill	C-term		1:1000	Ab21685; Abcam

Després de la incubació amb els anticossos primaris i de fer 3 rentats de 5 min en agitació constant amb PBS-Tween, les membranes es van incubar amb els corresponents anticossos secundaris conjugats amb HRP (*horseradish peroxidase*) (Taula 4) durant 1 h en rotació a temperatura ambient. Finalment, després de realitzar de nou 3 rentats, es van incubar amb el substrat de l'enzim *HRP Immobilon Forte* (#WBLUF0100, Merck™) durant 5 min i, amb l'instrument *Odyssey® Fc Imaging System* (LI-COR Biosciences), es van exposar 5 min pel canal quimioluminiscent i 30 segons pel canal visible de 600 nm.

Taula 4. Anticossos secundaris utilitzats per *western-blot*.

Anticòs	Diluent	Dilució	Referència
Ig Conill	Solució bloqueig	1:5000	P0448; Dako
Ig Ratolí		1:5000	P0260; Dako

5. MANIPULACIÓ RNA D'UEVS

5.1. EXTRACCIÓ

Per tal de determinar el mètode més eficaç per realitzar les extraccions de l'RNA contingut als uEVs, es van testar 5 productes comercials diferents a partir de 100 µL d'uEVs aïllats de mostra d'orina d'un pacient afecte d'HFHNC: *miRNeasy Mini kit* (#217004, Qiagen), *miRCURY™ RNA Isolation Kit - Cell & Plant kit* (#300110, Exiqon), *Allprep DNA/RNA/miRNA Universal kit* (Allprep) (#80224, Qiagen), *TRIZOL LS* (#10296010, Life Technologies) i *TRIZOL* (#15596026, Life Technologies). La diferència entre els dos últims és que el *TRIZOL LS* està indicat per mostres líquides, ja que es troba doblement concentrat respecte el *TRIZOL*, indicat per mostres sòlides.

En tots els casos es van seguir les instruccions del fabricant i, amb els productes *TRIZOL* i *TRIZOL LS* es van utilitzar 10 µg de glicogen (#10901393001, Roche) per visualitzar l'RNA precipitat. Tots els RNAs es van eluir en 30 µL d'aigua lliure d'RNAses.

L'extracció de l'RNA contingut als uEVs de la cohort d'estudi es va realitzar a partir de 100 µL de suspensió d'uEVs utilitzant el *miRCURY™ RNA Isolation Kit - Cell & Plant kit* seguint les instruccions del producte. Per tal de monitoritzar l'eficiència del procediment, es va afegir un oligonucleòtid d'RNA exogen (*spike-in*), ath-miR159a i, una vegada finalitzada l'extracció de l'RNA, es van afegir 3 *spike-ins* més a diferents concentracions finals (Taula 5).

Taula 5. *Spike-ins* afegits als uEVs⁽¹⁾ i a l'RNA exosomal⁽²⁾.

miRNA	Espècie	Seqüència	Concentració
ath-miR159a ⁽¹⁾	A. thaliana	5'-UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA-3'	10 pM
cel-miR-238-3p ⁽²⁾		5'-UUUGUACUCCGAUGCCAUUCAGA-3'	1 pM
cel-miR-55-3p ⁽²⁾	C. elegans	5'-UACCCGUUAAGUUUCUGCUGAG-3'	5 pM
cel-miR-39-3p ⁽²⁾		5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'	10 pM

5.2. QUANTIFICACIÓ

Per quantificar l'RNA extret de les mostres d'uEVs es va utilitzar l'instrument *BioAnalyzer 2100* (#G2939BA, Agilent Technologies), i els xips emprats van ser el *RNA 6000 Pico Kit* (#5067- 1513, Agilent Technologies), amb una sensibilitat de 50 pg d'RNA total, i l'*Small RNA Kit* (#5067- 1548, Agilent Technologies) que, amb la mateixa sensibilitat, analitza únicament els RNAs d'entre 6 i 150 nucleòtids. Ambdós xips contenen un conjunt de capil·lars interconnectats que permeten la separació electroforètica de l'RNA en funció de la longitud, obtenint, no només la quantitat total d'RNA, sinó també la mida d'aquest.

En ambdós casos, es va col·locar 1 µL de mostra d'RNA al xip corresponent i els resultats es van obtenir mitjançant el programa *2100 Expert Software*.

5.3. RETROTRANSCRIPCIÓ I PCR QUANTITATIVA

La RT-qPCR (*quantitative reverse transcription-PCR*) és una tècnica que consta de dues reaccions consecutives: la retrotranscripció, mitjançant la qual, a partir de molècules d'RNA de cadena simple, es generen els corresponents DNA complementaris (cDNA), i la qPCR amb la que s'amplifica i quantifica, de manera relativa, i mitjançant fluorescència, el producte de l'amplificació del cDNA d'una seqüència específica. És el mètode utilitzat per quantificar l'expressió gènica de manera dirigida i, alhora, el mètode de referència per validar els resultats obtinguts de l'anàlisi per *microarrays*.

5.3.1. ESTABLIMENT DEL MÈTODE

Amb la finalitat de determinar si el perfil d'expressió de miRNAs d'uEVs era dependent del mètode d'extracció d'RNA emprat, es va analitzar l'expressió de 5 miRNAs en cadascun dels RNAs d'uEVs obtinguts amb els diferents mètodes d'extracció testats. Els miRNAs escollits, en base a la seva presència en exosomes urinaris³¹², van ser el miR-200c-3p (#204482, Exiqon), miR-103a-3p (#204063, Exiqon), miR-let7b-5p (#204750, Exiqon), miR-99a-5p (#204521,

Exiqon) i el miR-10b-5p (#205637, Exiqon), juntament amb el control exogen Unisp6. Per dur a terme aquesta determinació, es va utilitzar el producte comercial *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR* (#203351, Exiqon), que utilitza la tecnologia LNA™ (*Locked nucleic acids*). Els LNA són nucleòtids modificats en els que l'estructura de la ribosa està bloquejada en la conformació ideal per que es produeixin les interaccions de Watson-Crick. La presència d'aquests LNAs a un oligonucleòtid comporta un augment de la temperatura d'hibridació (2-8 °C/LNA), el que li confereix una alta estabilitat tèrmica i un augment de la sensibilitat i especificitat³⁸⁵. Aquest producte utilitza el mètode de tinció SYBR Green, que és un colorant fluorescent que, en produir-se la unió específica a molècules de dsDNA, emet fluorescència. D'aquesta manera, a mesura que augmenta el número de molècules de dsDNA (producte de la reacció de PCR) augmenta la fluorescència emesa. Amb aquest sistema, la precisió de la quantificació del gen d'interès depèn exclusivament de l'especificitat dels *primers* utilitzats per l'amplificació.

Seguint les instruccions del fabricant, es van sotmetre 4 ng d'RNA (segons la quantificació del Bioanalyzer-Picochip) a la reacció de retrotranscripció i els cDNAs resultants es va emmagatzemar a -20 °C. La reacció de qPCR es va dur a terme a partir de 4 µL d'una dilució 1:40 del cDNA obtingut prèviament i segons les indicacions del producte.

5.4. MICROARRAYS

Els *microarrays* de miRNA exosomal es van realitzar a la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) del VHIR utilitzant el *GeneChip miRNA 4.0 Array* (Affymetrix). Es tracta d'un *array* multiespècie, que engloba el 100 % de les seqüències descrites a la base de dades miRBase v.20³⁸⁶, i que conté 6.599 sondes humanes. D'aquestes, 2.758 corresponen a miRNAs madurs, 2.025 a pre-miRNAs i 1.996 snoRNAs i scaRNAs (*Small Cajal body-specific RNAs*).

El procés de realització dels *arrays* de miRNAs comprèn diversos passos esquematitzats a la figura 21. Inicialment, es van afegir 2 μL de *RNA Spike Control Oligos* i 5 μL de *Poly A Tailing Master Mix* (3x *Reaction Buffer*, 7,5mM MnCl_2 , 1 μL d'*ATP Mix* 1:500 en Tris 1mM i 1 μL de *PAP Enzyme*) als 8 μL d'RNA d'uEVs, i es van incubar 15 min a 37 °C. Als 15 μL d'RNA poliadenilat es van afegir 4 μL de 5X *FlashTag Biotin HSR Ligation Mix* i 2 μL de *T4 DNA Ligase*. Després d'incubar-ho 30 min a 25 °C es va aturar la reacció afegint 2,5 μL de *HSR Stop Solution*. Dels 23,5 μL resultants, 2 μL es van destinar a realitzar l'*ELOSA Quality Control Assay* –que és una tècnica colorimètrica mitjançant la qual es verifica una correcta reacció de lligació– i, amb els 21,5 μL restants, es va procedir amb el procés d'hibridació: es van afegir 110,5 μL d'*Hybridization Cocktail* (1x *Hybridization Mix*, 4 % *Formamide*, 9,7 % *DMSO*, 1x *Hybridization Controls*, 50 pM *Control Oligo B2* i 3,7 μL d'aigua *nuclease-free*) i es va incubar 5 min a 99 °C i 5 min a 45 °C. D'aquests 132 μL de reacció, 130 μL es van injectar al *microarray* i es hibridar durant 40 h a 48 °C i a 60 rpm al *Affymetrix gene Chip Hybridization oven 640* (Affymetrix). Una vegada finalitzada la hibridació, es va col·locar el *microarray* a la *GeneChip® Fluidics Station 450* (Affymetrix) i, de manera automatitzada, es van dur a terme els múltiples rentats i el procés de tinció. Finalment, els *microarrays* van ser escanejats amb el *GeneChip Scanner 3000 7G* (Affymetrix) utilitzant el *GeneChip Command Console Software* (Affymetrix), el que va proporcionar els arxius “.cel”.

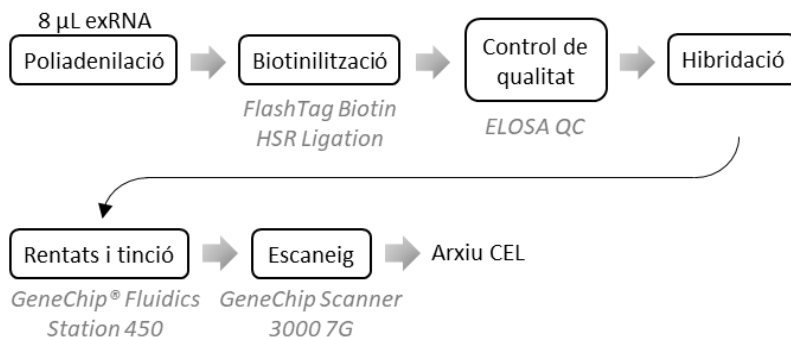


Figura 21. Procediment utilitzat per realitzar els microarrays de miRNA dels uEVs.

5.4.1. ANÀLISI BIOINFORMÀTICA

L'anàlisi bioinformàtic dels *microarrays* es va realitzar a la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica (UEB) del VHIR utilitzant el programari R v.3.5.2.³⁸⁷.

Els valors d'expressió obtinguts dels arxius .cel van ser sotmesos a un control de qualitat amb el *Package arrayQualityMetrics*³⁸⁸, que inclou: i) diagrama de caixa (*boxplot*) de la intensitat del *microarray* de cada mostra; ii) anàlisi dels components principals (PCA, *principal components analysis*), que proporciona la distribució de les mostres i; iii) *heatmap* per determinar-ne la distància entre cadascuna de les mostres en funció de l'agrupació jeràrquica (*hierarchical clustering*) de les mateixes. Per tal de disposar de dades comparables entre sí i eliminar-ne biaixos tècnics, les dades es van processar utilitzant el mètode RMA (*Robust Multi-array Average Algorithm*)³⁸⁹, que consta de 3 nivells de processament: correcció de fons, normalització i filtratge. Les dades normalitzades van ser sotmeses de nou al control de qualitat prèviament mencionat. Donat que el *GeneChip miRNA 4.0 array* conté sondes de diversos organismes, es van seleccionar únicament les humanes per les posteriors anàlisis.

5.4.2. ANÀLISI BIOESTADÍSTICA

L'anàlisi bioestadística de les dades per la selecció dels miRNAs diferencialment expressats es va dur a terme seguint un model d'anàlisi lineal amb les modificacions empíriques de Bayes per l'estimació de les variàncies³⁹⁰, una tècnica similar a l'anàlisi ANOVA, però específica per dades de *microarray*. Per tal de reduir la probabilitat de cometre error de tipus I (fals positiu) conseqüent a la realització de comparacions múltiples, es van calcular els p-valors ajustats seguint el mètode de Benjamini-Hochberg³⁹¹. Els paràmetres obtinguts van ser el LogFC (*fold change* en escala log₂) entre les condicions comparades i l'estadístic B (B), que indica el logaritme de la probabilitat que el miRNA estigui diferencialment expressat respecte que no ho estigui. Tot i la

presència de sondes per la detecció de diferents tipus d'RNA al *microarray*, les anàlisis posteriors es van realitzar únicament amb els miRNAs madurs.

Les comparacions realitzades i els conjunts de criteris bioestadístics utilitzats per analitzar els *microarrays* de miRNAs dels uEVs es detallen a la Taula 6.

Taula 6. Comparacions i criteris bioestadístics utilitzats per l'anàlisi de les dades dels microarrays de miRNAs d'uEVs.

Comparació	Conjunt de criteris
Pacients vs. controls	LogFC > 1
Pacients <i>CLDN19</i> p.G20D vs. controls	Adj.p-val < 0,05
Pacients sexe masculí vs. femení	B > 0
Pacients progressió renal moderada vs. lenta	LogFC > 1
Pacients <i>CLDN19</i> p.G20D progressió renal moderada vs. lenta	p-val < 0,01

L'anàlisi de la dispersió de les dades obtingudes al *microarray* dels *spike-ins* exògens presents a les mostres es va realitzar calculant els coeficients de variació (CV) [CV = (desviació estàndard/mitjana)*100].

5.4.3. VALIDACIÓ PER RT-QPCR

Com s'ha mencionat prèviament, els resultats obtinguts de tècniques d'alt rendiment, com el *microarray*, precisen de validació amb una tècnica dirigida. Per això, a les mostres d'RNA dels uEVs de la cohort d'estudi es van analitzar determinats miRNAs per RT-qPCR.

La retrotranscripció de l'RNA d'uEVs de la cohort d'estudi es va dur a terme amb el producte *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (#A28007, Applied Biosystems), que inclou diverses reaccions fins obtenir el cDNA de l'RNA: poliadenilació, lligació d'uns adaptadors, retrotranscripció i amplificació del cDNA. Seguint les instruccions del producte, es van utilitzar 3,7 µL d'RNA

d'uEVs de cada individu i, els productes de la reacció, es van emmagatzemar a -20 °C fins el seu ús.

Les qPCRs per la validació tècnica dels resultats obtinguts per *microarrays* de miRNA es van realitzar utilitzant el suport *TaqMan Array Cards* (#A34723, Applied Biosystems), també coneguts com *TaqMan Low Density Array Cards* (TLDA) o *TaqMan Microfluidic Cards*. Aquest sistema, en comparació a la realització de diverses qPCRs individuals, permet l'execució simultània de múltiples qPCRs, reduint d'aquesta manera la manipulació (i, per tant, la probabilitat d'error) i el volum de mostra necessari.

A les TLDA es van incloure un total de 26 miRNAs (Taula 7), dels quals, 4 corresponien als *spike-ins* exògens afegits, i 10 havien estat considerats diferencialment expressats en les comparacions realitzades de les anàlisis dels resultats dels *microarrays* dels miRNAs dels uEVs. Els 12 miRNAs restants inclosos a les TLDA eren aliens a l'estudi.

Taula 7. miRNAs d'estudi inclosos a la TLDA.

miRNAs inclosos a la TLDA			
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-489-3p	hsa-miR-3620-5p
hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-500a-3p	ath-miR159a
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-500a-5p	cel-miR-39-3p
hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-502-3p	cel-miR-55-3p
hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-152-3p	hsa-miR-532-5p	cel-miR-238-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-548a-3p	
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-619-5p	

5.4.3.1. ANÀLISI BIOESTADÍSTICA

Els resultats obtinguts de les qPCRs de les TLDA es van analitzar amb el *software Cloud* de *Thermofisher* utilitzant el mètode C_{RT} (*relative threshold cycle*) que, a diferència del mètode tradicional C_T (*threshold cycle*) en el que el C_T és estàtic, analitza a cada reacció la corba d'amplificació i en determina el C_{RT} (paràmetre homòleg al C_T). L'ús d'aquest mètode està indicat quan s'utilitzen

sistemes amb volums de reacció molt baixos, com és el cas de les TLDA. Degut a l'absència de cap miRNA endogen amb expressió constant que pogués ser utilitzat com a control endogen, els valors de C_{RT} de cada reacció es van normalitzar mitjançant el mètode de normalització global³⁹². Aquest sistema consisteix en calcular la mitjana dels C_{RT} de tots els miRNAs per cada mostra ($C_{RT\ norm}$) i considerar-ho com un reflex del contingut total d'RNA. Aplicant aquest factor i els subsegüents càlculs (Figura 22) es va obtenir el valor RQ (*Relative Quantification*) per cada individu de cada grup, en comparar-ho amb el grup de referència de cada comparació. Les dades obtingudes es van analitzar aplicant-hi el test estadístic no paramètric Mann-Whitney, ja que no es complien els requisits per aplicar-hi un test paramètric (normalitat, homoscedasticitat i número d'individus > 30). Es van considerar valors significatius aquells que presentaven un p-valor < 0,05.

$$\Delta C_{RT} = C_{RT\ miRNA} - C_{RT\ norm}$$
$$\Delta\Delta C_{RT} = \Delta C_{RT\ grup\ estudi} - \Delta C_{RT\ grup\ referència}$$
$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_{RT}}$$

Figura 22. Fórmules utilitzades per analitzar les qPCR de les TLDA.

6. ANÀLISI BIOLÒGICA MIARNAS

6.1. PREDICCIÓ DIANES DELS MIRNAS

Una vegada establerts els criteris estadístics per determinar els miRNAs diferencialment expressats en les diverses comparacions realitzades, i donat que les bases de dades que vinculen directament els miRNAs amb processos biològics són limitades i amb escassa informació disponible, es van cercar els mRNAs –i, indirectament, les proteïnes i gens– diana dels miRNAs.

Per realitzar aquesta tasca, es van utilitzar dues bases de dades que contenen dades validades, és a dir, aquells mRNAs que s'ha demostrat empíricament que estan regulats per determinats miRNAs: TarBase v.8.0³⁹³ i miRTarBase v.7.0³⁹⁴.

6.2. BIOLOGIA DE SISTEMES

Per tal d'identificar els processos biològics representats pels mRNAs diana dels miRNAs es va utilitzar un model matemàtic basat en biologia de sistemes. Aquesta tasca la va desenvolupar *Anaxomics Biotech S.L.* (Barcelona, Espanya) mitjançant la tecnologia *Therapeutic Performance Mapping System*, TPMS, (*Anaxomics Biotech*, Barcelona, Espanya)^{395–397}. Aquesta tecnologia consisteix en la integració del coneixement biològic, farmacològic i mèdic en un model matemàtic, generant una xarxa proteica artificial (ANN, *artificial neural networks*), que simula la fisiologia humana *in silico*. La metodologia aplicada en aquest treball va consistir en la caracterització molecular de la HFHNC, la generació del model matemàtic, el maneig de les dades i, finalment, l'anàlisi d'aquestes. A continuació es detallen cadascun dels processos realitzats.

Caracterització molecular de la HFHNC – Per determinar els processos fisiopatològics relacionats amb la HFHNC es va realitzar una exhaustiva cerca bibliogràfica, seguit de la identificació de les proteïnes implicades directament

en cadascun d'aquests processos. Aquesta revisió es va desenvolupar utilitzant diverses estratègies: compilació manual de la literatura disponible, cerca de conjunts definits de proteïnes al *Gene Ontology (GO) Consortium database*^{398,399}, i cerca de vies de senyalització definides a la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*⁴⁰⁰. A més, en alguns dels processos biològics es va realitzar un nou cribratge, incloent únicament aquelles proteïnes de s'expressaven a teixit renal segons les bases de dades *Uniprot*⁴⁰¹ i *The Human Protein Atlas (THPA)*⁴⁰².

Generació del model matemàtic – El model matemàtic, que comprenia tot el proteoma, es va generar a partir de les dades disponibles d'interactòmica, senyalització cel·lular, metabolòmica i regulació de l'expressió gènica, obtingudes de bases de dades públiques i privades: KEGG⁴⁰⁰, BioGRID⁴⁰³, IntAct⁴⁰⁴, REACTOME⁴⁰⁵, TRRUST⁴⁰⁶ i HPRD⁴⁰⁷, així com de la revisió manual de la literatura científica. Aquestes dades es van complementar amb informació funcional de les proteïnes (participació en processos patològics o si són dianes terapèutiques o biomarcadors), reforçant així les connexions entre les proteïnes del model. Aleshores, es va procedir a "entrenar" el model amb una col·lecció de dades públiques que contenen informació sobre respostes moleculars conegudes en resposta a un estímul també conegut. Amb aquesta estratègia, i mitjançant l'ús d'intel·ligència artificial, el model va ser capaç de quantificar la relació de cada proteïna amb els diversos processos biològics estudiats, és a dir, estimar quin impacte té cada proteïna en cadascun dels processos biològics.

- o Maneig de les dades – Donat que la informació obtinguda de les bases de dades van ser els gens regulats pels miRNAs diferencialment expressats, i que Anaxomics treballa amb proteïnes i els corresponents identificadors d'*Uniprot*, es va confeccionar el llistat de proteïnes seguint els criteris desglossats a la Figura 23.

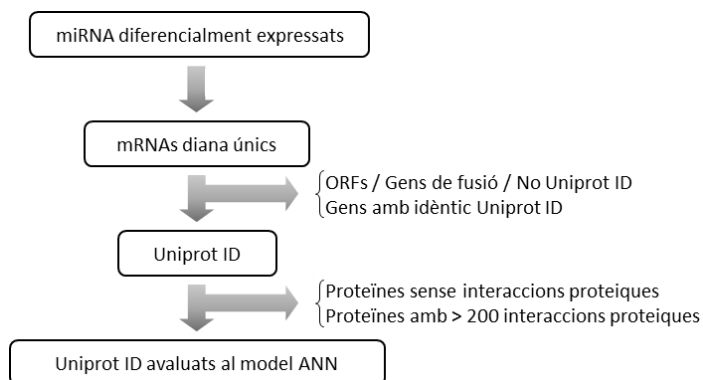


Figura 23. Algorisme per seleccionar les proteïnes regulades pels miRNAs i incorporar-les a la xarxa proteica artificial (ANN).

o Anàlisi de les dades – Una vegada es va disposar del model matemàtic dissenyat i entrenat, i les dades objectes d’estudi complien les requisits necessaris, es va procedir a l’anàlisi d’aquestes. Més concretament, es va realitzar una predicció, mitjançant ANN, de la potencial associació entre cada proteïna i cadascun dels processos biològics definits, assignant un valor numèric a la relació de cada proteïna amb la malaltia i amb cadascun dels processos biològics estudiats. L’estratègia emprada va permetre assignar als valors d’ANN un p-valor estimat (Taula 8).

Taula 8. Estratificació de les puntuacions ANN.

Puntuació ANN (%)	Relació amb procés biològic	p-valor estimat
≥ 78	Alta	< 0,05
70-78	Mitja-Alta	0,05-0,1
38-70	Mitja	0,1-0,25
≤ 37	Baixa/nul·la	> 0,25

Els resultats obtinguts es van representar utilitzant com a subjecte d’anàlisi tant els miRNAs com les corresponents proteïnes diana. En la primera aproximació, per tal de prioritzar els miRNAs diferencialment expressats a cada comparació en funció del grau d’implicació amb els processos biològics

estudiats, es van integrar els resultats obtenint una única puntuació. Per això, es va comptabilitzar el número de proteïnes diana de cada miRNA implicades en cadascun dels processos biològics amb una puntuació ANN > 70 % (amb un p-valor estimat < 0,1). Per donar major importància a les proteïnes amb una relació alta amb cadascun dels processos biològics (p-valor estimat < 0,05) respecte aquelles que tenien una relació mitja/alta (p-valor 0,1-0,05) es va aplicar la següent aproximació: Puntuació global miRNA = 2*(nº proteïnes-relació alta) + 1*(nº proteïnes relació-mitja/alta). Per realitzar l'anàlisi de les dades amb les proteïnes corresponents als mRNAs diana dels miRNAs, per a cada comparació es va representar el nombre de mRNAs amb una puntuació ANN > 78 (p-valor estimat < 0,05), mostrant d'aquesta manera, els processos biològics més rellevants implicats en cadascuna de les comparacions realitzades.

RESULTATS

1. DESCRIPCIÓ DE LA COHORT D'ESTUDI

Els resultats mostrats en aquest apartat es troben actualment en revisió a la revista *Journal of Nephrology* per tal de ser publicats (Annex 4).

1.1. DADES DEMOGRÀFIQUES

La cohort d'estudi va incloure un total de 30 pacients (14 homes i 16 dones) –incloent 8 parelles de germans– que pertanyien a 22 famílies aparentment no relacionades i 6 individus controls, provinents de 12 centres hospitalaris diferents de l'estat espanyol (Taula 9). Del total de les famílies incloses a la cohort, 21 eren caucàsiques i una tenia ancestres llatins. El 56 % dels pacients (n = 17) tenien algun altre cas d'HFHNC a la família –principalment germans–, mentre que els 13 pacients restants, representaven el cas índex, sense antecedents familiars de la malaltia.

Taula 9. Centre hospitalari d'origen dels individus de la cohort d'estudi.

Centre hospitalari	Pacients/Controls (n)
Hospital Universitari Vall d'Hebron	5/3
Hospital General Universitario Santa Lucía	1/0
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña	1/1
Hospital Infantil Universitario Niño Jesús	1/2
Hospital Infantil Miguel Servet	5/0
Hospital Universitario Cruces	6/0
Hospital Universitari Son Espases	2/0
Hospital Universitario Reina Sofía	1/0
Hospital Infantil La Paz	2/0
Hospital Virgen del Camino	2/0
Hospital de Terrassa	2/0
Hospital Universitario Virgen del Rocío	2/0

1.1. DADES GENÈTIQUES

Tots els pacients inclosos en la cohort de descobriment estaven prèviament diagnosticats genèticament d'HFHNC mitjançant seqüenciació directa pel mètode de Sanger de les regions exòniques i les intròniques flanquejants dels gens *CLDN16* i/o *CLDN19*. En el cas de 2 pacients (germanes), amb l'estratègia de diagnòstic emprada, només es va poder identificar una única mutació en un dels al·lels del gen *CLDN19*.

En total, 3 pacients –pertinents a 2 famílies diferents– estaven diagnosticats amb variants patogèniques al gen *CLDN16*, mentre que els 27 pacients restants presentaven mutacions a *CLDN19*. D'aquests 27 pacients, el 74 % (n = 20) eren homozigots per la mutació hispànica c.59G>A; p.G20D, mentre que els altres eren heterozigots per aquesta mutació o presentaven altres variants patogèniques en homozigosi en aquest mateix gen (Figura 24).

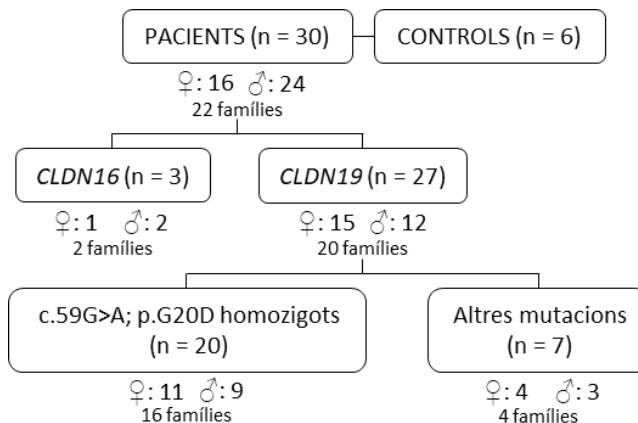


Figura 24. Característiques genètiques dels pacients inclosos a la cohort d'estudi.

1.2. DADES CLÍNIQUES

Al moment del diagnòstic clínic, l'edat mediana dels pacients era de 1,71 (0,67-6,04) anys (8 pacients tenien menys d'1 any de vida) i la creatinina sèrica dels pacients dels que es disposava de dades (n = 20) va ser de $0,63 \pm 0,38$ mg/dL, amb un eGFR de $69,52 \pm 16,94$ mL/min/1,73m². Els signes i símptomes que van conduir al diagnòstic clínic van ser la poliúria (30,4 %), les anomalies oculars (21,7 %), els vòmits (17,4 %), i els ITUs (17,4 %). En el 13 % dels casos, el diagnòstic va ser conseqüent a un cribratge familiar degut a la presència d'antecedents familiars de la malaltia (Figura 25). Tot i que 5 pacients van ser diagnosticats per un creixement deficient, tenint en compte les dades disponibles del conjunt de la cohort d'estudi al moment del diagnòstic, l'alçada i el pes es trobaven dins de la normalitat amb un *Z-score* de -0,02 (-1,00-0,69). Cap pacient va néixer de manera prematura.

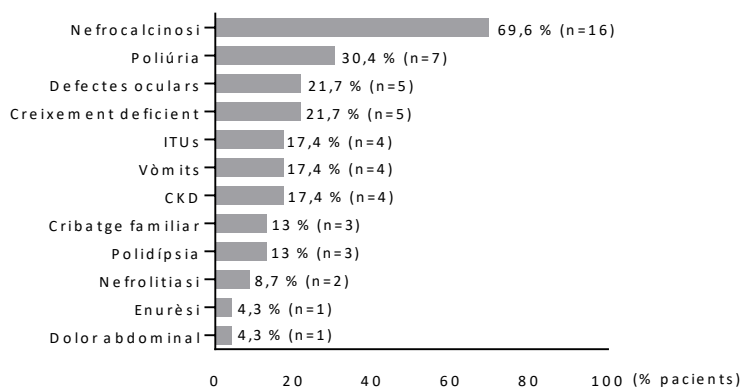


Figura 25. Signes i símptomes que van conduir al diagnòstic d'HFHNC.

Al diagnòstic clínic, el paràmetre analític més destacable va ser la presència d'hipomagnesèmia aïllada moderada en el 69 % dels pacients, sense alteracions en el potassi i calci sèrics, ni en el balanç àcid-base. A més, en alguns casos, es va observar una elevació de la PTH sèrica tot i presentar valors normals d'eGFR o CKD lleu. Característicament, les anàlisis d'orina mostraren una severa

hipercalciúria i hipermagnesúria, evidenciant la pèrdua urinària d'ambdós cations. A la Taula 10 es mostren els paràmetres bioquímics al moment del diagnòstic dels pacients dels que es va disposar de dades.

Taula 10. Paràmetres bioquímics al moment del diagnòstic d'HFHNC.

	N	Valors	Valors de referència ^{174,228}
Creatinina, mg/dL	20	0,63±0,38	Segons edat ⁴⁰⁸
eGFR ^a , mL/min/1,73m ²	19	69,52±16,94	>80
PTH ^b , pg/mL	12	113,25±49,44	12-88
pH venós	11	7,37±0,06	7,35-7,45
Bicarbonat sèric, mmol/L	11	23,4±2,56	22-32
Potassi sèric, mmol/L	13	4,62±0,45	3,3-5
Sodi sèric, mmol/L	13	140,04±3,06	136-145
Clorur sèric, mmol/L	12	105,08±4,38	95-110
Calci total sèric, mg/dL	13	10,18±0,60	8,8-10,6
Fosfat sèric, mg/dL	13	5,07±0,67	Segons edat ⁴⁰⁹
Magnesi sèric, mg/dL (% pacients amb hipomagnesèmia)	13	1,47±0,17 (69%)	1,6-2,6
Àcid úric sèric, mg/dL	12	6,37±2,10	2,6-6
U _{Ca} /C _r ^c , mg/mg	14	0,71±0,41	0,9-2,2
U _{Mg} /C _r ^d , mg/mg	11	0,31±0,18	0,1-2,2
FE _{Mg} ^e , %	10	11,34±3,84	< 4

^aeGFR, *estimated glomerular filtrate rate*; ^bPTH, hormona paratiroide; ^cU_{Ca}/C_r, rati calci/creatinina urinari; ^dU_{Mg}/C_r, rati magnesi/creatinina urinari; ^eFE_{Mg}, excreció fraccionada de magnesi.

A l'últim seguiment mèdic disponible (moment de la inclusió dels individus a l'estudi), 10 pacients havien progressat a FR –tots ells amb trasplantament renal–, amb una edat mediana de 7,5 (1,6-26,2) anys i van ser exclosos de les anàlisis que fan referència a l'últim seguiment. Els 20 pacients restants, amb els ronyons natius funcionals, és a dir, que no havien desenvolupat FR, tenien l'edat de 12,63±5,40 anys i el temps de seguiment des del diagnòstic era de 8,34±4,30 anys. D'entre aquests, el 78,6 % (n = 11) dels que es disposava de dades persistien amb hipomagnesèmia d'origen renal (Mg²⁺ sèric 1,38±0,27 mg/dL), amb un valor de mitjana del rati U_{Mg}/C_r de 0,21±0,10 mg/mg i una augmentada FE_{Mg} de 21,10±14,35 %, tot i el baix Mg²⁺ sèric. A més, la majoria també presentaven una pèrdua urinària de calci elevada, amb una mitjana del rati U_{Ca}/C_r

de $0,29 \pm 0,13$ mg/mg ($n = 10$, 71 %). En definitiva, el fenotip clínic de la malaltia al debut clínic es va caracteritzar per hipomagnesèmia lleu amb hipercalciúria i hipermagnesúria severes, essent els nivells de l'última molt elevats pels nivells sèrics de Mg^{2+} . Cal destacar l'absència d'anomalies de la calcèmia i d'altres electròlits.

Cap dels pacients havia patit episodis de tetània, rampes musculars, debilitat ni raquitisme. L'únic esdeveniment destacable va ser un pacient que havia patit convulsions recurrents (febrils i no febrils). Altres manifestacions observades en 9 pacients van ser ITUs que van requerir d'ingrés hospitalari, dels quals, 3 pacients (1 dona i 2 homes) han patit episodis recurrents del mateix.

1.3. PROGRESSIÓ DE LA FUNCIÓ RENAL

La progressió de la funció renal dels pacients inclosos en la cohort es va realitzar utilitzant el moment en que els pacients havien assolit CKD estadiatge 3 (< 60 mL/min/ $1,73m^2$). L'anàlisi de la supervivència renal lliure de CKD estadiatge 3 va mostrar que als 5, 10 i 20 anys, el 40 %, 50 % i el 80 % dels pacients, respectivament, havien desenvolupat CKD estadiatge 3, tal com es descriu a la Figura 26.

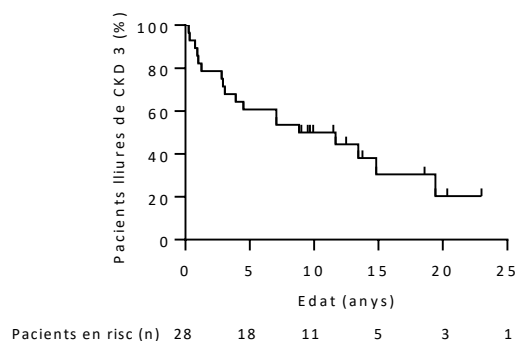


Figura 26. Supervivència renal lliure de CKD estadiatge 3.

En relació al sexe, es va observar que els pacients de sexe femení tendien a desenvolupar CDK estadiatge 3 abans que els de sexe masculí ($p = 0,6$) (Figura 27). Específicament, a l'edat de 2 anys, la supervivència renal lliure de CDK estadiatge 3 era del 92 % en homes i del 64 % en dones, mentre que als 10 anys d'edat, el 57 % dels homes i el 35 % de les dones no havien progressat a CDK estadiatge 3.

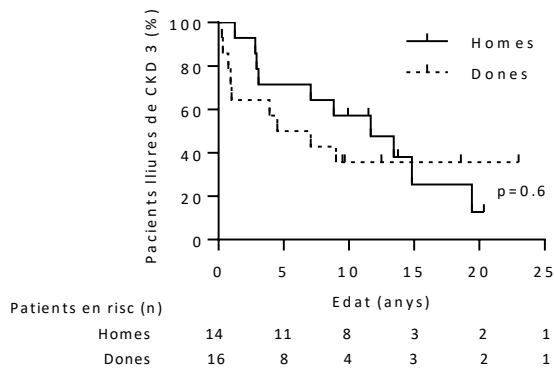


Figura 27. Comparació de la supervivència renal lliure de CDK estadiatge 3 entre pacients homes i dones.

Per altra banda, considerant únicament els pacients amb mutacions al gen *CLDN19*, no es van observar diferències en l'evolució a CDK estadiatge 3 en funció del genotip. Així doncs, en els pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* en comparació amb aquells que presentaven altres mutacions al mateix gen, la CKD va progressar de manera similar ($p = 0,7$) (Figura 28). El baix nombre de pacients amb mutacions a *CLDN16* inclosos en la cohort va impossibilitar la realització d'aquests tipus d'anàlisi així com la comparació entre els pacients amb mutacions en ambdós gens.

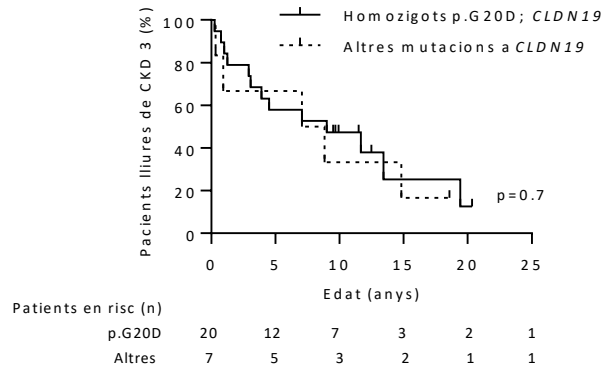


Figura 28. Comparació de la supervivència renal lliure de CKD estadiatge 3 entre pacients homozigots p.G20D i altres mutacions a *CLDN19*.

Davant l'absència de cap correlació genotip-fenotip i amb la finalitat d'identificar algun paràmetre analític que correlacionessin amb la severitat del fenotip renal, es van classificar els pacients en funció de la progressió de la funció renal (ràpida, moderada i lenta) (Taula 11). El grup de progressió renal ràpida, amb una pèrdua anual d'eGFR de $39,6 \pm 27,18$ mL/min/1,73m², estava íntegrament format per pacients amb mutacions al gen *CLDN19* (n = 6; 4 dones), tots heterozigots, excepte 2 pacients que eren homozigots per la mutació p.G20D. En canvi, al grup de pacients amb progressió renal moderada (n = 17), la majoria eren homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* (n = 12) i, un dels pacients presentava mutacions al gen *CLDN16*. Per últim, el grup de pacients amb progressió renal lenta (n = 7) estava format per 4 pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*, 1 pacient amb altres variants patogèniques al mateix gen i 2 pacients amb mutacions a *CLDN16*.

Taula 11. Classificació dels pacients segons la progressió de la malaltia renal.

Progressió renal	Pendent regressió	Funció renal	Pacients (n)
Ràpida	≤ -10	Disminució ≥ 10 mL/min/1,73m ² /any	6
Moderada	-10 a 0	Disminució < 10 mL/min/1,73m ² /any	17
Lenta	> 0	Estable	7

La comparació dels paràmetres bioquímics entre els pacients inclosos en els diferents grups de progressió renal va permetre identificar que els nivells sèrics de PTH al moment del diagnòstic eren significativament més elevats en el grup de progressió renal ràpida en comparació amb el de progressió renal lenta 155,25±23,98 vs. 67,1±34,75 pg/mL, respectivament (p = 0,02), tot i presentar similars eGFR entre ambdós grups (Taula 12). Malgrat que la pèrdua urinària de Ca²⁺ i Mg²⁺ al diagnòstic van ser també superiors al grup de progressió renal ràpida, aquestes diferències no van ser significatives.

Taula 12. Paràmetres bioquímics dels pacients amb HFHNC al diagnòstic en funció de la progressió de la malaltia renal. Comparació entre els pacients amb progressió renal ràpida (disminució d'eGFR > 10 mL/min/1,73m²/any), moderada (pèrdua d'eGFR <10 mL/min/1,73m²/any) i lenta (funció renal estable).

	Ràpida	Moderada	Lenta	p
Edat, anys	0,3 (0,1-0,8)	1,7 (0,7-4,1)	5,1 (1,8-6,2)	0,07
Creatinina sèrica, mg/dL	0,5±0,1	0,8±0,5	0,6±0,1	0,3
eGFR ^a , mL/min/1,73m ² (Mediana (IQR))	68,2±31,9 (60 (43,5-101,2))	67,5±14,3 (65 (54,6-82,4))	74,6±6,2 (74,8 (68,7-80,5))	0,8
[% pacients eGFR < 90]	[83]	[94]	[100]	
PTH ^b , pg/mL	155,4±23,9	117,4±44,3	67,1±34,8	0,02*
pH venós	7,38±0,07	7,35±0,05	7,37±0,1	0,8
Bicarbonat sèric, mmol/L	22,7±1,9	22,1±2,6	26,0±1,2	0,1
Potassi sèric, mmol/L	4,8±0,5	4,6±0,5	4,4±0,3	0,3
Sodi sèric, mmol/L	141,7±3,8	140,0±2,5	138,0±1,5	0,2
Clorur sèric, mmol/L	107,0±6,4	104,3±2,1	103,0±1,0	0,4
Calci total sèric, mg/dL	10,2±0,6	10,3±0,8	10,2±0,6	0,9
Fosfat sèric, mg/dL	5,6±0,7	4,7±0,5	4,8±0,5	0,06
Magnesi sèric, mg/dL	1,5±0,2	1,4±0,1	1,5±0,1	0,3
Àcid úric sèric, mg/dL	5,7±2,2	7,1±2,8	6,5±0,8	0,6
U _{Ca/Cr} ^c , mg/mg	0,89±0,61	0,62±0,29	0,58±0,19	0,5
U _{Mg/Cr} ^d , mg/mg	0,42±0,19	0,19±0,02	0,22±0,13	0,2
FE _{Mg} ^e , %	12,2±4,7	12,0±3,3	8,4±3,7	0,5

Valors expressats com mitjana±DE, excepte l'edat, expressada com mediana (IQR).

* Diferències significatives entre el grup amb progressió renal ràpida i lenta.

^aeGFR, *estimated glomerular filtrate rate*; ^bPTH, hormona paratiroide; ^cU_{Ca/Cr}, calci/creatinina urinari;

^dU_{Mg/Cr}, magnesi/creatinina urinari; ^eFE_{Mg}, excreció fraccionada de magnesi.

Al grup de progressió renal ràpida, 5 dels 6 pacients (83,3 %) havien desenvolupat FR abans dels 4 anys d'edat, essent una mostra molt severa

d'expressió de la malaltia. Al grup amb progressió renal moderada, amb una disminució d'eGFR anual de $3,36 \pm 1,82$ mL/min/1,73m², 5 dels 12 pacients (41,6 %) també havien desenvolupat FR a l'edat mitjana de $23,1 \pm 9,9$ anys. Tal com s'esperava, per la pròpia definició del grup, cap dels pacients inclosos a la categoria progressió renal lenta havien arribat a FR durant el temps de seguiment estudiat i mantenien la funció renal estable.

1.4. MANIFESTACIONS OCULARS

L'estudi de l'afectació ocular en els pacients inclosos en la cohort d'estudi va revelar que, tal com s'esperava, la majoria de pacients amb mutacions al gen *CLDN19* manifestaven alteracions oculars. Del total de pacients dels que es disposava de dades oftalmològiques, 15 (60 %) eren afectes de miopia magna, coloboma macular i/o nistagmes, anomalies ocular prototípiques de la HFHNC. Dels 10 pacients restants amb mutacions a *CLDN19*, el 20 % (n = 5) manifestaven altres alteracions oftalmològiques com miopia lleu o astigmatisme, i els 5 restants no van presentar cap tipus d'afectació ocular, així com els 3 pacients amb mutacions al gen *CLDN16*. No es va observar cap correlació entre l'afectació ocular prototípica i la progressió de la malaltia renal (p = 0,41).

1.5. VARIABILITAT FENOTÍPICA INTRAFAMILIAR

En algunes famílies, la comparació entre germans afectes de la mateixa malaltia van revelar importants diferències fenotípiques tant en l'evolució de la malaltia renal com en les manifestacions oculars. En aquest treball, donat que només hi havia una parella de germans amb mutacions al gen *CLDN16*, i ambdós presentaren clíniques molt similars, es va dirigir el focus en els germans amb mutacions al gen *CLDN19*. Tal com es mostra a la taula 13, la variabilitat intrafamiliar en la cohort d'estudi va ser rellevant en alguns casos. Per exemple,

a la família F1 i F7, els germans més joves (P2 i P14 respectivament) van desenvolupar FR a edats molt primerenques de la vida i presentaren una afectació ocular lleu. En canvi, els corresponents germans més grans (P1 i P13), en el moment de l'estudi, als 18 i 11 anys respectivament, mantenien la funció renal nativa, tot i que manifestaven l'afectació oftalmològica prototípica de la HFHNC (miopia magna, coloboma macular i/o nistagme) des del moment del diagnòstic clínic. Per altra banda, els pacients pertanyents a les famílies F2, F3 i F4 mantenien els ronyons nadius funcionals, tot i que, curiosament, els germans grans, en el moment de l'estudi, presentaven eGFRs més elevats que els corresponents germans petits. En contraposició, les germanes de la família F5 (P9 i P10) presentaven un similar i sever fenotip renal i absència d'afectació ocular; mentre que en les pacients de la família F6 el fenotip renal va ser també similar entre elles, però més lleu, arribant a desenvolupar FR a l'edat adulta.

Taula 13. Característiques clíniques de germans pacients d'HFHNC amb mutacions a *CLDN19* al diagnòstic i a l'últim seguiment.

	Família 1		Família 2		Família 3		Família 4		Família 5		Família 6		Família 7	
Pacient	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Sexe	H	D	D	H	H	H	D	D	D	D	D	D	H	H
Edat diagnòstica ^a	9,2	0,3	3,6	1,6	8,6	5,2	5,1	1,9	0,9	0,3	< 1	2	3,9	0,8
Motius diagnòstics	PU AO	CF	CF	PU	-	AO CKD	-	PU PD NC CD	ITU	CKD NC	NC	-	PU PD ITU NC	-
eGFR diagnòstic	60	46	85,5	90	67	55	78	63	56	64	N/D	N/D	0,9 ^b	0,5 ^b
Edat actual ^a	18,5	9,1	18,5	1,7	15,1	11,7	9,7	7,3	12,9	9,3	45,9	36,3	11,3	10,4
eGFR actual	47	N/A	61,5	27	87	54	79	41	N/A	N/A	N/A	N/A	22,4	N/A
Edat FR ^a	N/A	1,5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1,5	1,8	29,9	25,4	N/A	3,6
Anomalies oculars	MM CM	M AS	M	N M	MM	MM	-	-	-	-	MM CM N	M AS	CM	A M

H: Home; D: Dona; M: Miopia; AS: Astigmatisme; MM: Miopia magna; CM: Coloboma macular; N: Nistagme; CKD: *Chronic Kidney Disease*; CF: Cribratge familiar; CD: Creixement deficient; NC: Nefrocalcinosis; PU: poliúria; PD: Polidipsia; AO: Anomalies oculars; ITU: Infecció del tracte urinari; eGFR: *Estimated glomerular filtration rate*; FR: Fallida renal
N/A: No aplica; N/D: No determinat.

^aEdat expressada en anys, ^bCreatinina sèrica expressada en mg/dL.

2. GENS MODIFICADORS DEL FENOTIP

La seqüenciació dels exomes dels individus inclosos en la cohort d'estudi va permetre, en primera instància, corroborar el diagnòstic genètic prèviament definit de cadascun dels pacients. No obstant, en les dues pacients de les que únicament s'havia identificat, mitjançant la seqüenciació per Sanger, mutacions en un dels al·lells a *CLDN19*, no es va poder identificar cap altra variant patogènica en aquest mateix gen, pel que no va ser possible completar el diagnòstic genètic.

Per altra banda, i com objectiu d'aquesta tesi, l'anàlisi de les dades obtingudes de la seqüenciació dels exomes dels pacients amb HFHNC va revelar la presència de diverses variants genètiques en homozigosi associades, de manera significativa, amb els fenotips de progressió renal ràpida i lenta, establerts prèviament. A la taula 14 es detalla cadascuna d'aquestes variants, en tots casos SNVs, i els corresponents OR calculats amb els intervals de confiança del 95 %. Tenint en compte el total de pacients ($n = 30$), es van identificar 29 variants per les que la presència en homozigosi de l'al·lel de referència (R) s'associava amb un dels dos fenotips renals, essent 10 les associades a la progressió ràpida [$OR (R/R) > 1$], i 19 a la progressió renal lenta [$OR (R/R) < 1$]. De manera contrària, l'homozigosi de l'al·lel alternatiu (A) de 6 SNVs es va associar amb la progressió renal ràpida [$OR (A/A) > 1$], mentre que 15 amb la progressió renal lenta [$OR (A/A) < 1$]. Dels 43 SNVs associats a algun dels fenotips en el global de pacients, cal destacar-ne 7, pels que l'al·lel de referència i l'al·lel alternatiu en homozigosi s'associaren amb la progressió renal ràpida i lenta, respectivament; és a dir, que genotips oposats es van associar amb fenotips oposats, podent tractar-se doncs, de variants gèniques "protectores" d'una malaltia renal més severa.

Taula 14. Odds ratio dels genotips homozigots de les SNVs potencialment modificadores del fenotip envers la progressió renal ràpida en la HFHNC.

SNV (Al·lel referència / alternatiu)	OR (IC 95%)				Freqüència AA població sana ¹
	Tots els pacients		Pacients p.G20D		
	R/R – Progressió ràpida	A/A – Progressió ràpida	R/R – Progressió ràpida	A/A – Progressió ràpida	
rs56128713 (G/A)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,000
rs2285215 (C/T)	-	0,04 (0,001-0,89)	-	-	0,372
rs2072041 (T/C)	-	0,04 (0,001-0,89)	-	-	0,371
rs146207613 (ATCTTTT/A)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,079
rs16825625 (A/G)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,008
rs11207827 (T/C)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,066
rs16830136 (G/A)	-	0,02 (0,001-0,52)	-	-	0,367
rs4664475 (T/C)	-	0,02 (0,001-0,52)	-	-	0,354
rs60806638 (G/C)	-	0,02 (0,001-0,52)	-	-	0,329
rs3806672 (C/G)	-	55 (1,86-1622)	-	-	0,176
rs2290303 (G/A)	-	55 (1,86-1622)	-	-	0,185
rs322113 (T/C)	-	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,827
rs2301745 (C/T)	55 (1,86-1622,7)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,307
rs78007324 (T/C)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,021
rs2125739 (T/C)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,052
rs1214748 (G/A)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,085
rs1214749 (G/A)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,086
rs2233437 (G/A)	-	55 (1,86-1622)	-	-	0,187
rs325001 (C/T)	-	55 (1,86-1622)	-	-	0,287
rs167772 (C/T)	-	55 (1,86-1622)	-	-	0,286
rs12207056 (C/T)	55 (1,86-1622)	-	-	-	0,117
rs1050171 (G/A)	-	0,005 (0,0001-0,3)	-	0,01 (0,0002-0,77)	0,288
rs3133974 (G/T)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,083
rs77765166 (T/C)	0,02 (0,001-0,52)	-	-	-	0,000
rs28364958 (G/A)	0,01 (0,0001-0,3)	-	-	-	0,058
rs57510763 (C/T)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,227
rs67800134 (A/G)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,218
rs138319019 (T/TCTTG)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,214
rs7963279 (C/T)	0,02 (0,001-0,52)	-	-	-	0,082
rs886528 (A/G)	0,02 (0,001-0,52)	-	-	-	0,174
rs7199993 (A/G)	-	55 (1,86-1622)	-	-	0,388
rs11860456 (A/C)	195 (3,37-11285)	-	-	-	0,077
rs2242273 (C/T)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	-	0,015
rs11259996 (G/C)	-	-	81 (1,3-5046)	-	0,273
rs11880140 (A/G)	-	-	81 (1,3-5046)	-	0,347
rs3869579 (G/A)	55 (1,86-1622,7)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,289
rs4079367 (C/T)	55 (1,86-1622,7)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,285
rs56081734 (A/C)	55 (1,86-1622,7)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,290
rs71336844 (TC/T)	0,04 (0,001-0,96)	-	-	-	0,049
rs3752207 (A/C)	-	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,450
rs251684 (T/C)	27 (1,04-698,8)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,385
rs251683 (G/T)	27 (1,04-698,8)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,379
rs2821 (C/A)	55 (1,86-1622,7)	0,02 (0,001-0,54)	-	-	0,119
rs6088857 (G/C)	56,33 (1,92-1655)	-	-	-	0,112
rs2255858 (T/C)	0,02 (0,001-0,52)	-	-	-	0,139

¹Calculat a partir de les dades disponibles a gnomAD³⁸¹ [nº d'individus homozigots AA/(nº d'al·lels totals/2)]. SNV: *single nucleotide variant*; OR: *Odds Ratio*; IC 95%: interval de confiança del 95 %; R/R: Al·lel de referència en homozigosi. A/A: Al·lel alternatiu en homozigosi.

De totes les variants gèniques (en homozigosi) associades als fenotips renals més extrems identificades en el total de pacients, l'SNV rs1050171 també va resultar significatiu en l'anàlisi de les dades del subgrup de pacients amb la mutació p.G20D en homozigosi al gen *CLDN19*. En aquest conjunt de pacients, genèticament homogenis pel que fa etiopatogènia de la HFHNC, es van identificar, a més, 2 SNVs (rs11259996 i rs11880140) pels que l'al·lel de referència en homozigosi es va associar amb una progressió renal ràpida.

Tots els SNVs pels que es va identificar una associació entre l'al·lel alternatiu en homozigosi i algun dels dos grups de pacients afectes d'HFHNC (progressió renal ràpida i lenta), presentaven una prevalença mitja/alta en la població general sense cap patologia mendeliana pediàtrica, indicant que aquest genotip com a tal no era patogènic. En les variants en les que la prevalença poblacional de l'al·lel alternatiu en homozigosi era de 0 (rs56128713 i rs77765166) –o propera a aquest valor–, suggerint ser una possible causa de patologia, resulta important mencionar que cap dels pacients inclosos en la cohort presentava aquest genotip.

Pel que fa la localització gènica de les variants i l'efecte de cadascuna d'elles (Taula 15), la majoria dels SNVs es trobaven en regions intròniques (n = 24), tot i que 3 d'elles es localitzaven properes a les regions d'*splicing*, pel que, els algorismes predictors de l'efecte de les variants, van suggerir un possible efecte en aquest procés. La segona conseqüència més prevalent dels SNVs va ser l'efecte sinònim (n = 13), havent-hi una d'elles en les que es va estimar una possible alteració de de l'estructura que podria comportar canvis en les interaccions pròpies de la proteïna. Finalment, l'efecte d'algunes de les variants gèniques van comportar un canvi d'aminoàcid (variants *missense*, n = 5), i alteracions de la seqüència *upstream* o *downstream* d'algun gen (n = 3).

Taula 15. Descripció i efecte funcional de les SNVs seleccionats.

SNV	Gen	Nomenclatura variant	Efecte variant
rs56128713	<i>PDE4DIP</i>	NM_022359:c.233+655C>T	Variant intrònica
rs2285215	<i>TNN</i>	NM_022093:c.2789C>T, p.(Pro930Leu)	Variant <i>missense</i>
rs2072041		NM_022093:c.2914+41T>C	Variant intrònica
rs146207613	<i>IPO9</i>	NM_018085:c.226-36_226-31delTTTCTT	Variant intrònica
rs16825625	<i>GJA9</i>	NM_030772:c.1164T>C, p.(Arg388Arg)	Variant sinònima
rs11207827	<i>PATJ</i>	NM_176877:c.369T>C, p.(Ile123Ile)	Variant sinònima
rs16830136	<i>NEB</i>	NM_004543:c.22800+32C>T	Variant intrònica
rs4664475		NM_004543:c.21585A>G, p.(Thr7195Thr)	Variant sinònima
rs60806638		NM_004543:c.21522+78C>G	Variant intrònica
rs3806672	<i>TLL3</i>	NM_001025930:c.859+13C>G	Variant intrònica
rs2290303		NM_001025930:c.1761G>A, p.(Gln587Gln)	Variant sinònima
rs322113	<i>COL6A5</i>	NM_153264:c.6969T>C, p.(Ile232Ile)	Variant sinònima
rs2301745	<i>SORCS2</i>	NM_020777:c.2869+28C>T	Variant intrònica
rs78007324	<i>FER</i>	NM_005246:c.2204-8T>C	Variant <i>splicing</i> / intrònica
rs2125739	<i>ABCC10</i>	NM_001198934:c.2843T>C, p.(Ile948Thr)	Variant <i>missense</i> / <i>splicing</i>
rs1214748	<i>DLK2</i>	NM_206539:c.738C>T, p.(Thr246Thr)	Variant sinònima
rs1214749		NM_206539:c.696C>T, p.(His232His)	Variant sinònima
rs2233437	<i>NFKBIE</i>	NM_004556:c.780+26C>T	Variant intrònica
rs325001	<i>AARS2</i>	NM_020745:c.2146-24G>T	Variant intrònica
rs167772		NM_020745:c.243+6G>A	Variant <i>splicing</i> / intrònica
rs12207056	<i>MCM3</i>	NM_002388:c.1677-64G>C	Variant intrònica
rs1050171	<i>EGFR</i>	NM_005228:c.2361G>A, p.(Gln787Gln)	Variant sinònima / interacció estructural
rs3133974	<i>RBM12B</i>	NM_203390:c.1941C>A, p.(Pro647Pro)	Variant sinònima
rs77765166	<i>PRSS3</i>	NM_007343:c.243T>C, p.(Ile81Ile)	Variant sinònima
rs28364958	<i>CDK20</i>	NM_001039803:c.564-44C>T	Variant intrònica
rs57510763	<i>KNDC1</i>	NM_152643:c.612C>T, p.(Phe204Phe)	Variant sinònima
rs67800134		NM_152643:c.625+21A>G	Variant intrònica
rs138319019		NM_152643:c.625+32_625+33insTTGC	Variant intrònica
rs7963279	<i>SLCO1C1</i>	NM_017435:c.441C>T, p.(Ser147Ser)	Variant sinònima
rs886528	<i>CREBBP</i>	NM_004380:c.3251-2583T>C	Variant intrònica
rs7199993	<i>ZC3H7A</i>	NM_014153:c.1719+4T>C	Variant <i>splicing</i> / intrònica
rs11860456	<i>CES5A</i>	NM_001143685:c.1611T>G, p.(Asp537Glu)	Variant <i>missense</i>
rs2242273	<i>MTCL1</i>	NM_015210:c.*8C>T	Variant <i>downstream</i>
rs11259996	<i>ARHGEF18</i>	NM_015318:c.1668-46G>C	Variant intrònica
rs11880140		NM_015318:c.*2986A>G	Variant <i>downstream</i>
rs3869579	<i>CYP2A7</i>	NM_000764:c.931C>T, p.(Arg311Cys)	Variant <i>missense</i>
rs4079367		NM_000764:c.118-13259C>T	Variant intrònica
rs56081734		NM_000764:c.457T>G, p.(Ser153Ala)	Variant <i>missense</i>
rs71336844	<i>PSG5</i>	NM_002781:c.430+35delG	Variant intrònica
rs3752207	<i>HIF3A</i>	NM_152795:c.878-58A>C	Variant intrònica
rs251684	<i>PLA2G4C</i>	NM_003706:c.510A>G, p.(Pro170Pro)	Variant sinònima
rs251683		NM_003706:c.448-12C>T	Variant intrònica
rs2821	<i>CHGB</i>	NM_001819:c.*84C>A	Variant 3' UTR
rs6088857	<i>COX4I2</i>	NM_032609:c.1-57G>C	Variant intrònica
rs2255858	<i>SETD4</i>	NM_017438:c.1064+121A>G	Variant intrònica

SNV: Single nucleotide variant.

Del total de les 45 variants gèniques identificades –localitzades en 33 gens diferents–, van resultar especialment rellevants les situades als gens *EGFR* i *PATJ*, per la implicació d'aquests en la regulació de la reabsorció de Mg^{2+} al túbul distal de la nefrona i en la formació de les TJ, respectivament.

3. PATRÓ D'EXPRESSIONI DE MIRNAS D'UEVS

3.1. ESTABLIMENT DEL MÈTODE D'AÏLLAMENT D'UEVS I D'EXTRACCIÓ D'RNA

Els resultats obtinguts van donar lloc a una publicació (Annex 5)

Per tal de dur a terme l'aïllament dels uEVs dels individus de la cohort d'estudi d'una manera eficient i robusta, prèviament es va optimitzar el mètode de centrifugació diferencial. Per dur a terme aquesta tasca, es va sotmetre el mateix volum d'orina d'individus sans a diversos procediments i variants del mateix mètode de centrifugació diferencial (Figura 20) i, els uEVs obtinguts, es van caracteritzar amb 3 tècniques complementàries, per tal de determinar quin era el mètode més adient.

El primer objectiu va ser determinar a quina temperatura i durant quin temps d'incubació s'alliberaven més uEVs atrapats a les xarxes de THP. Les imatges obtingudes per cryo-TEM (Figura 29A) mostraren una major puresa en el P3 en comparació amb el P2, suggerint que el tractament amb DTT durant 10 min a 37 °C permetia una major despolimerització de les xarxes de THP que el tractament a 95 °C durant 2 min. No obstant, amb la tècnica NTA la quantificació dels uEVs va ser major en el P2 que en el P3 (Figura 29B). L'anàlisi realitzat per *western-blot* va mostrar absència de detecció d'ambdós marcadors associats a exosomes emprats (TSG101 i Alix) (Figura 29E), degut a la baixa quantitat d'uEVs que s'esperava de l'alliberació d'aquests de les xarxes de THP. En conjunt, aquests resultats van suggerir una sobrequantificació dels uEVs al P2 relacionada, possiblement, a les impureses observades per cryo-TEM.

Posteriorment, es va analitzar si la recuperació dels exosomes atrapats en les xarxes de THP augmentava la quantitat final d'uEVs aïllats. Per això, es va mesclar el SNb amb el SN0 i es van precipitar els uEVs, obtenint el precipitat P4. Els resultats obtinguts per cryo-TEM i NTA van mostrar que el P4 contenia una major quantitat d'uEVs en comparació amb el P1 (uEVs aïllats sense l'adició del SNb) (Figura 29A i C). L'anàlisi qualitatiu i semiquantitatiu realitzat per *western-blot* va permetre validar les dades prèvies ja que la intensitat en la detecció de TSG101 i Alix va ser major al P4 que al P1 (Figura 29E). Els perfils de la mida dels uEVs obtinguts els diferents procediments (P1, P4-P7), amb l'anàlisi per NTA, van revelar que la moda de la mida es trobava dins del rang del esperat en tots els casos, i que el precipitat P5 (SN0 filtrat), contenia una major quantitat de d'uEVs, seguit del P4, el P6 (doble centrifugació del SN0) i el P7 (centrifugació de l'SN0 a més velocitat) (Figura 29C i D). Aquests resultats concordaven amb la visualització dels uEVs per cryo-TEM, excepte en el cas del P5, en el que es va observar la presència d'impureses, possiblement conseqüent al procés de filtratge, disminuint així la puresa de la mostra en comparació amb les altres (Figura 29A). La immunodetecció de les proteïnes associades a exosomes TSG101 i Alix van corroborar els resultats de la quantificació obtinguda per NTA, tot i que el pes molecular de la banda d'Alix observada al P5 era lleugerament superior al de les altres mostres. L'absència de detecció de marcadors exosomals als sobrenedants SN1, SN3, SN5 i SN7 va posar de manifest l'eficàcia en la precipitació dels uEVs en tots els procediments (Figura 29E).

En conjunt, les dades obtingudes van permetre determinar que el protocol que incloïa la ultracentrifugació a $100.000 \times g$ durant 2 h del SN0 mesclat amb el SNb era el més adient per la validació del mètode amb mostra d'orina d'un pacient amb HFHNC, a partir de 300 mL d'orina. La quantitat d'uEVs precipitats es va avaluar de manera semi-quantitativa mitjançant la immunodetecció de TSG101 i Alix, i els resultats mostraren una intensitat de detecció similar a l'obtinguda en els resultats previs (Figura 29F). Així doncs, es va determinar que el volum de mostra de partida era el correcte i que el protocol emprat proporcionava els resultats necessaris pels subsegüents anàlisis.

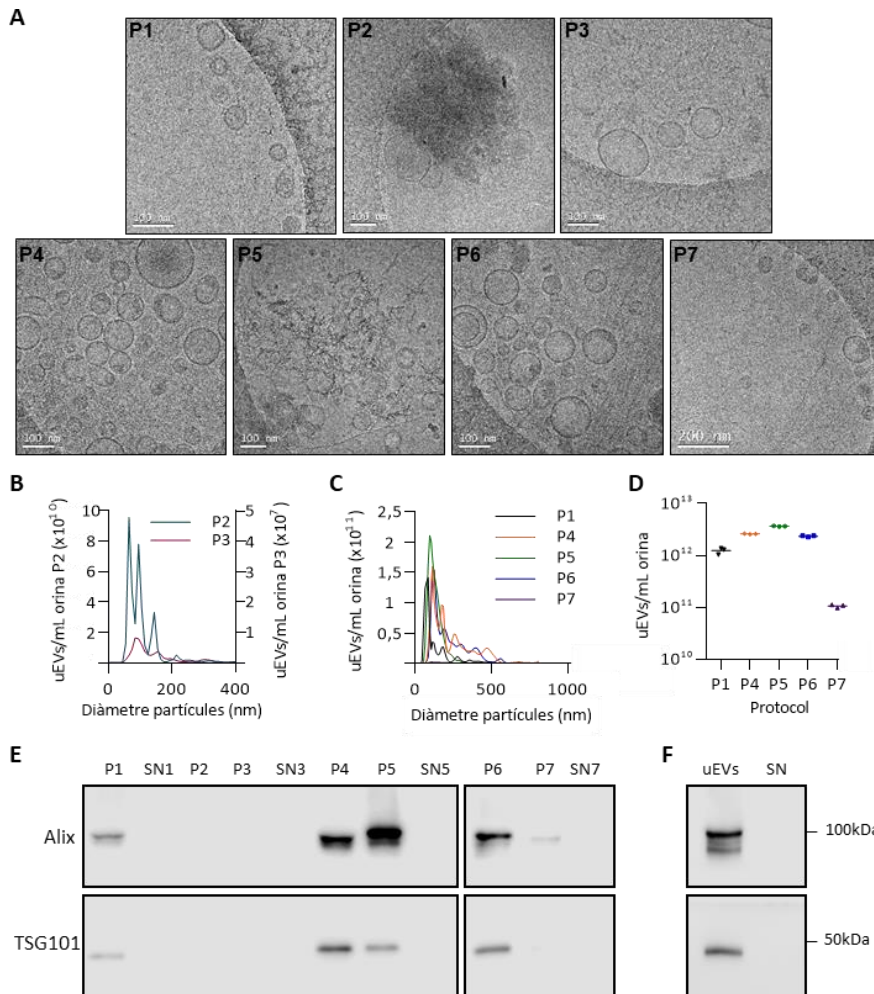


Figura 29. Caracterització dels uEVs aïllats amb diferents procediments. (A) Imatges representatives dels uEVs obtinguts amb els diferents procediments, mitjançant cryo-TEM. La barra d'escala correspon al 100 nm, excepte al P7 que és de 200 nm. (B) Resultats per NTA dels uEVs recuperats de les xarxes de THP amb el tractament amb DTT. El P2 conté més uEVs que el P3, que podrien correspondre amb les impureses observades. (C) Quantificació i patró de la mida, per NTA, dels uEVs obtinguts dels diferents protocols testats. En tots els casos la moda de la mida és dins del rang esperat. Tot i que el major pic s'observa al P5, podria tractar-se de les impureses observades per cryo-TEM. (D) Quantificacions absolutes dels uEVs. El P5, seguit del P4 i el P6 contenen més uEVs. Les dades expressades consisteixen en els triplicats de mesura per NTA. (E) Immunodetecció d'Alix i TSG101 per *western-blot* de 20 μ L d'uEVs obtinguts de 100 mL d'orina control. (F) *Western-blot* de 20 μ L d'uEVs aïllats a partir de 300 mL d'orina d'un pacient amb HFHNC, seguint el protocol P4. S'observa una forta intensitat de detecció d'Alix i TSG101, indicant la presència d'exosomes al precipitat i l'absència d'aquests al sobrenedant.

De manera anàloga al mètode per l'aïllament dels uEVs, es va determinar també quin sistema d'extracció de l'RNA contingut als uEVs proporcionava un millor rendiment. Per realitzar l'estudi comparatiu, es van sotmetre 100 µL d'uEVs aïllats de 300 mL d'orina d'un pacient amb HFHNC, a cadascun dels 5 mètodes d'extracció d'RNA: *miRNeasy*, *miRCURY*, *Allprep*, *TRIzol LS* i *TRIzol*. Els resultats, segons les quantificacions obtingudes amb l'*Agilent 2100 Bioanalyzer-Picochip*, mostraren una major eficàcia del sistema *miRCURY*, seguit del *TRIzol LS* (Figura 30A). En concordança amb la longitud dels RNAs característicament continguts als exosomes, l'electroferograma obtingut de l'RNA extret amb el sistema *miRCURY* (Figura 30B), presentà un enriquiment en RNAs de mida curta i una baixa quantitat d'RNAs ribosomals (18s i 28s).

Finalment, per tal d'avaluar si el mètode d'extracció d'RNA era determinant a l'hora de definir el perfil d'expressió d'aquests miRNAs, es van analitzar l'expressió de 5 miRNAs. Donat que, en tots casos, els perfils d'expressió de tots els miRNAs va ser similar (Figura 30C), es va determinar que el mètode d'extracció no tenia cap efecte en el perfil de miRNAs. La uniformitat dels nivells del control exogen Unisp6 en cadascun dels procediments van ser d'utilitat per validar l'absència de biaix tècnic en els assajos.

Per tant, es va considerar que el procediment P4 d'obtenció d'uEVs i l'extracció de l'RNA contingut amb el producte *miRCURY* eren els procediments que proporcionaven un millor rendiment i, per tant, la metodologia a aplicar a les mostres de la cohort d'estudi.

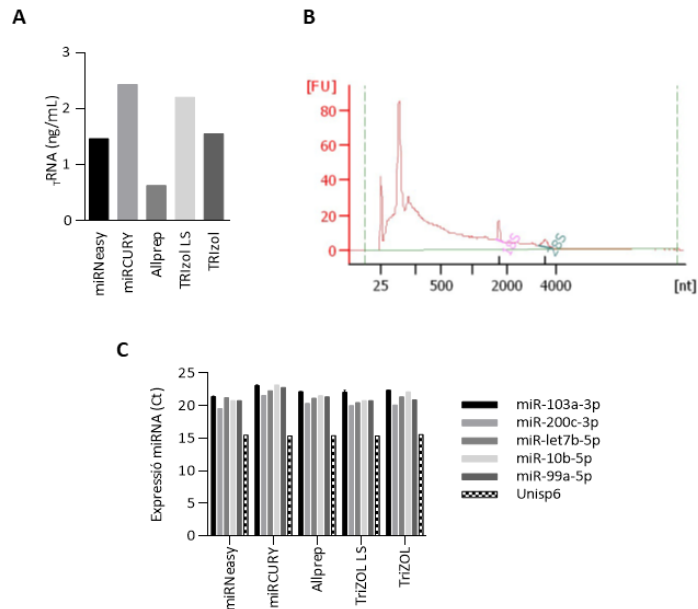


Figura 30. Caracterització dels RNAs d'uEVs extrets mitjançant diferents mètodes. (A) Quantificació absoluta de l'RNA, mitjançant el sistema Bioanalyzer-Picochip, obtingut dels 5 mètodes d'extracció testats. Amb el miRCURY i el TRizol LS es van obtenir majors quantitats d'RNA. (B) Electroferograma representatiu dels RNAs obtinguts amb els diferents mètodes. La presència majoritària d'RNAs curts i la baixa proporció d'RNAs ribosomals (18s i 28s) mostren el perfil característic de l'RNA exosomal. (C) Perfil d'expressió, per RT-qPCR, dels miRNAs continguts als uEVs amb els 5 mètodes d'extracció d'RNA testats. El patró d'expressió de tots els miRNAs és consistent, independentment del mètode d'extracció de l'RNA.

3.2. CARACTERITZACIÓ DELS uEVs DE LA COHORT D'ESTUDI

Després de realitzar l'aïllament d'uEVs de tots els individus de la cohort d'estudi seguint la metodologia prèviament establerta i optimitzada, es va procedir a avaluar-ne la puresa, la quantitat i la naturalesa d'aquests. A la Figura 31A es mostren unes imatges representatives de la visualització dels uEVs mitjançant cryo-TEM, a diferents escales per tal de disposar d'una visió global i detallada de les preparacions. Com es pot apreciar, no es varen observar impureses i, aparentment, les mostres corresponents al grup control contienien una major quantitat d'uEVs que en les dels pacients. Aquesta apreciació va concordar amb la quantificació absoluta d'uEVs obtinguda per NTA (Figura 31B i C) on, tot i que sense significança estadística, la concentració d'uEVs/mL

d'orina dels pacients era més baixa que en els controls. Cal destacar la gran variabilitat interpersonal en els individus controls respecte els pacients en relació a la quantitat d'uEVs present a l'orina. A més, aquesta tècnica també va permetre comprovar que, tal com s'esperava, la moda de la mida dels uEVs aïllats era inferior als 200 nm. De manera complementària, es va confirmar la presència d'exosomes als uEVs a través de la detecció, per *western-blot*, de 3 marcadors proteics associats a aquests (Alix, TSG101 i CD81), així com a un marcador proteic característic de reticle endoplasmàtic (Grp78), per tal de comprovar l'absència d'estructures intracel·lulars a les suspensions d'uEVs. Els resultats obtinguts (Figura 31D) mostraren la presència i l'absència dels marcadors exosomals en les mostres d'uEVs i en els sobrenedants (SN), respectivament. Cal mencionar que, degut a l'absència de marcadors específics d'exosomes, es recomana la detecció de diverses proteïnes, ja que la proporció de cada marcador és variable. És per aquest motiu que als uEVs del pacient 1 no es va observar cap banda corresponent a TSG101, tot i que sí que es varen detectar Alix i CD81. La línia cel·lular HepG2 es va utilitzar com a control positiu per la detecció de Grp78 ja que, com s'esperava, aquest marcador no es va observar a cap de les preparacions d'uEVs, confirmant l'absència de contaminació de les mostres amb vesícules intracel·lulars. A més, donat que al *western-blot* hi ha el mateix volum de mostra d'uEVs (i SN) de cadascun dels individus, pot ser considerada una tècnica semiquantitativa, i corroborar, una vegada més, una major quantitat d'uEVs a les mostres dels individus controls respecte els pacients.

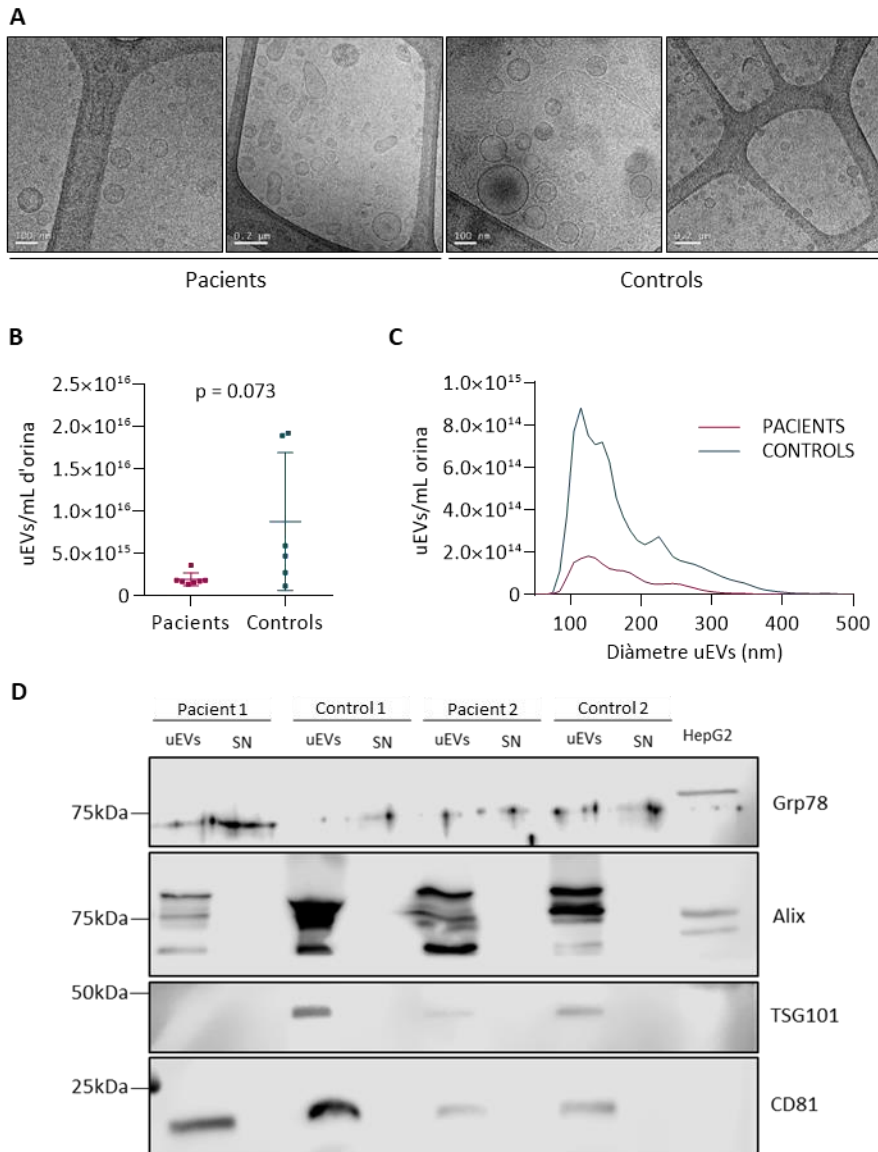


Figura 31. Caracterització dels uEVs aïllats de la cohort d'estudi. (A) Imatges representatives de l'anàlisi, mitjançant cryo-TEM, dels uEVs aïllats. (B) Quantificació absoluta d'uEVs aïllats. En concordança amb les imatges obtingudes per cryo-TEM, els individus controls contenen una major quantitat d'uEVs/mL d'orina. Tot i així, no es van trobar diferències significatives. (C) Perfil de la mida dels uEVs aïllats per NTA. La major part dels uEVs es troben en el rang de mida esperat (50-200 nm). (D) Immunodetecció dels marcadors associats a exosomes (Alix, TSG101 i CD81), tots tres presents als uEVs de tots els individus (excepte TSG101 al primer carril) i absents als sobredants (SN), i de Grp78, marcador característic de reticle endoplasmàtic i absent en els exosomes. La línia cel·lular HepG2 es va utilitzar com a control positiu de Grp78.

3.3. CARACTERITZACIÓ DE L'RNA D'úEVs DE LA COHORT D'ESTUDI

Una vegada aïllats tots els exosomes de la cohort, es va procedir a realitzar l'extracció de l'RNA contingut amb el *kit miRCURY*, tal com s'havia establert prèviament. Abans, però, als 100 µL d'úEVs de partida, s'hi va afegir l'*spike-in* exogen ath-miR159a a concentració final 10 pM per tal de poder monitoritzar l'eficiència de l'extracció de l'RNA.

La quantificació i caracterització de l'RNA extret dels uEVs es va realitzar, inicialment, amb el *Bioanalyzer-Picochip*. Els resultats obtinguts van ser quantificacions d'RNA molt disperses i amb els perfils de mida de l'RNA considerablement divergents entre ells (Figura 32). Per aquest motiu, es van analitzar totes les mostres amb el *Bioanalyzer-Small RNA kit*. Els resultats mostraren, de nou, patrons de mida diferents (Figura 32), fent coincidir que les mostres amb un perfil inusual al *Bioanalyzer-Picochip*, també resultaren amb un patró atípic amb el *Bioanalyzer-Small RNA*. Característicament, les mostres en les que la quantitat d'RNA obtinguda pel *Bioanalyzer-Picochip* eren de l'ordre de magnitud esperat (≤ 5.000 pg/µL), corresponien al "perfil 1" dels patrons del *Bioanalyzer*, mentre que les mostres amb un alt contingut en RNA (fins a 33.000 pg/µL) corresponien als patrons de mida de l'RNA exemplificat com "perfil 2" a la figura 32.

Els resultats obtinguts mostraren una clara absència de fiabilitat, robustesa i uniformitat en la quantificació de l'RNA entre les mostres. Per aquest motiu i, donat que els volums d'orina processada, de resuspensió dels uEVs, d'úEVs a partir dels quals es va fer l'extracció d'RNA i de suspensió de l'RNA van ser els mateixos per a tots els individus inclosos en la cohort, es va utilitzar el mateix volum d'RNA (8 µL) per la realització dels *microarrays*.

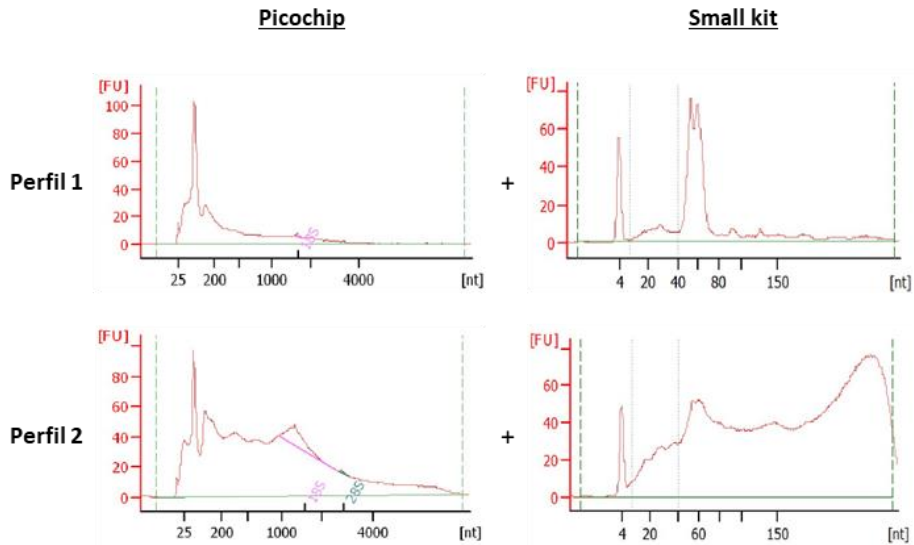


Figura 32. Caracterització dels RNAs d'uEVs extrets de la cohort d'estudi. *Tipus de perfils de mida dels RNAs extrets dels uEVs identificats en les mostres dels individus de la cohort d'estudi. El perfil 1 mostra els patrons esperats, amb RNAs de mida curta; mentre que al perfil 2 s'observa la presència d'RNAs llargs amb ambdós sistemes emprats.*

3.4. VALIDACIÓ TÈCNICA DELS *MICROARRAYS*

Per tal de conèixer la validesa tècnica dels procediments realitzats fins aquest punt, i amb les dades resultants dels *microarrays* ja normalitzades amb el mètode RMA, es van analitzar els nivells d'intensitat detectats als *microarrays* de cadascun dels *spike-ins* exògens afegits als uEVs i a l'RNA abans de la realització dels *microarrays* (Figura 33). Els resultats obtinguts mostraren una baixa detecció del ath-miR159a –afegit als 100 μ L d'uEVs a concentració final de 10 pM–, així com un CV molt elevat (42,9 %), el que reflexa que l'eficiència del procés d'extracció de l'RNA va ser inferior al 100 % i variable entre mostres. En referència als 3 *spike-ins* restants, afegits a les mostres d'RNA a diferents concentracions [cel-miR-238-3p (1 pM), cel-miR-55-3p (5 pM) i cel-miR-39-3p (10 pM)], les intensitats de detecció observades van ser creixents, de la mateixa manera que la concentració dels mateixos. Pel que fa a la dispersió de les dades, els CVs van disminuir a mesura que la intensitat relativa de detecció

augmentava (15,8 %, 13,9 % i 6,4 %, respectivament), suggerint una major precisió en la detecció de miRNAs que hi són presents a altes concentracions.

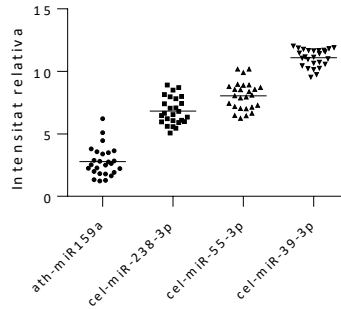


Figura 33. Intensitat relativa de detecció dels spike-ins exògens al microarray. L'ath-miR159a es va afegir a 100 μ L d'uEVs a concentració final 10 pM; els cel-miR-238-3p, cel-miR-55-3p i cel-miR-39-3p van ser adicionats a l'RNA a 1, 5 i 10 pM, respectivament.

Donat que les dades obtingudes dels *microarray* requereixen de la validació mitjançant una altra tècnica, alguns dels resultats obtinguts es van comprovar per RT-qPCR. Els resultats confirmaren la desregulació d'alguns miRNAs en les comparacions pacients vs. controls i pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* vs. controls. Tot i que en alguns miRNAs (miR-99a-5p i miR-619-5p) no es va assolir la significança estadística, sí que es va observar un tendència a la infraexpressió i la sobreexpressió, respectivament, obtinguda als *microarrays* (Figura 34).

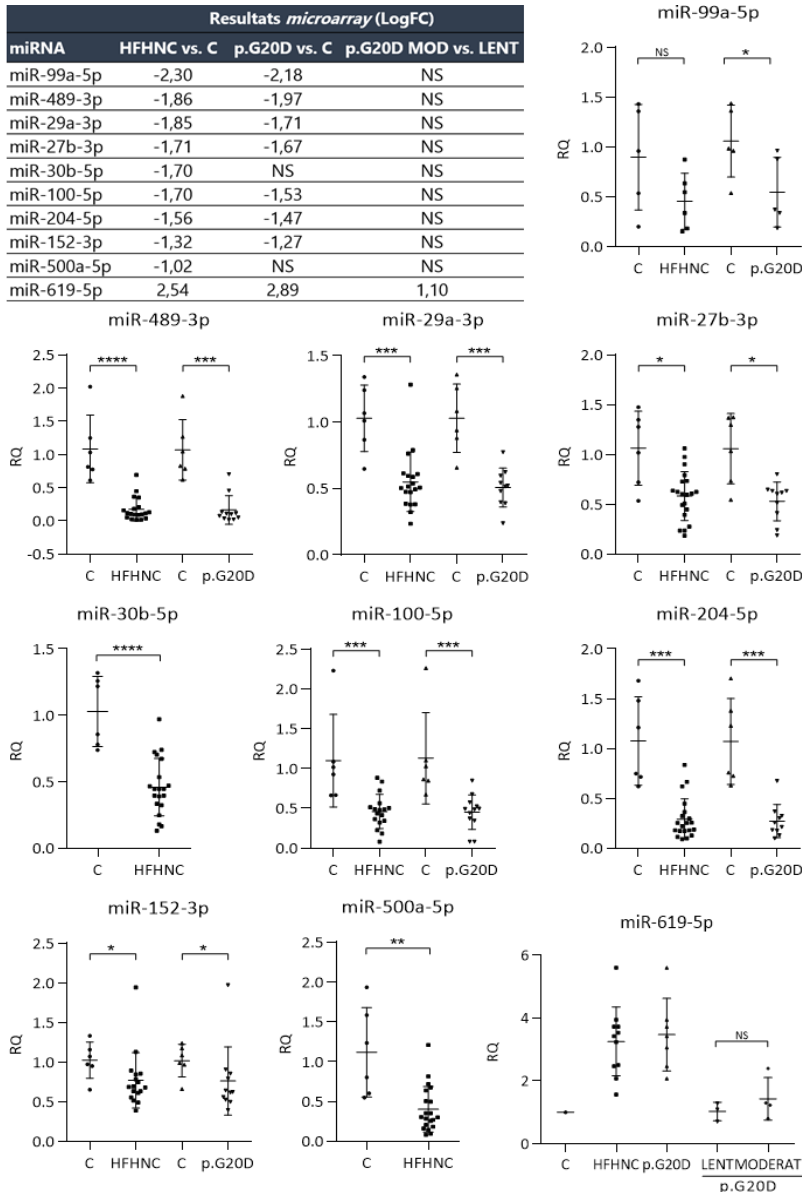


Figura 34. Validació dels resultats dels microarrays de miRNA d'uEVs de la cohort d'estudi mitjançant RT-qPCR. Quantificació relativa (RQ) de miRNAs en les mostres d'RNA d'uEVs de la cohort d'estudi. En general, el patró d'expressió dels miRNAs concorda amb els obtinguts per microarrays. Les dades van ser normalitzades respecte el grup control (C) o el de progressió renal lenta "lent". Les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana. Anàlisi realitzat amb el test Mann-Whitney. La taula superior mostra els logFC de cadascun dels miRNAs validats segons els resultats obtinguts als *microarrays*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, NS: no significatiu.

3.5. MODELITZACIÓ *IN SILICO* DE LA HFHNC

Segons l'estratègia detallada a l'apartat de Materials i Mètodes, es va realitzar una modelització *in silico* de la HFHNC. Amb la informació disponible a la literatura, es van identificar 9 processos biològics estretament relacionats amb la malaltia objecte d'estudi. El resultat d'identificar les proteïnes relacionades amb cadascun d'aquests processos biològics va proporcionar un total de 449 proteïnes efectores úniques (Taula 16), a partir de les quals es va generar el model matemàtic de la HFHNC.

Taula 16. Processos biològics emprats per la caracterització de la HFHNC.

Processos biològics	Proteïnes (n)	Estratègia emprada
Estrès de reticle endoplasmàtic (RE)	151	Literatura; GO; Expressió renal
Unions Hermètiques (TJ)	103	GO; KEGG; Expressió renal
Cristal·lització i proteïnes de la matriu òssia (BMPs)	47	Literatura
Nefrocalcinosi	19	Literatura
Nefritis túbul-intersticial	6	Literatura
Fibrosi renal	41	Literatura
Acidosi tubular distal	16	KEGG; Expressió renal
Metabolisme de la vitamina D	14	GO
Transportadors de Mg²⁺ i Ca²⁺	66	Literatura

3.6. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DE MIRNAS D'úEVs

3.6.1. EFECTE DE LA MALALTIA

Amb la finalitat d'identificar la signatura de miRNAs d'úEVs pròpia de la HFHNC, es va comparar l'expressió d'aquests obtinguda de l'anàlisi dels *microarrays* entre els pacients amb els ronyons nadius funcionals (n = 20) i els individus control (n = 6) inclosos en la cohort. Per tal de visualitzar globalment l'expressió diferencial de miRNAs, es va generar un *heatmap* aplicant-hi els criteris estadístics p-valor < 0,05 i logFC > |1| (Figura 35). Al *heatmap*, tot i que

les mostres dels pacients no s'agrupen conjuntament, sí que s'hi van apreciar franges en les que el patró d'expressió entre pacients i controls era diferent, indicatiu de la presència de diferències entre ambdós grups comparats.

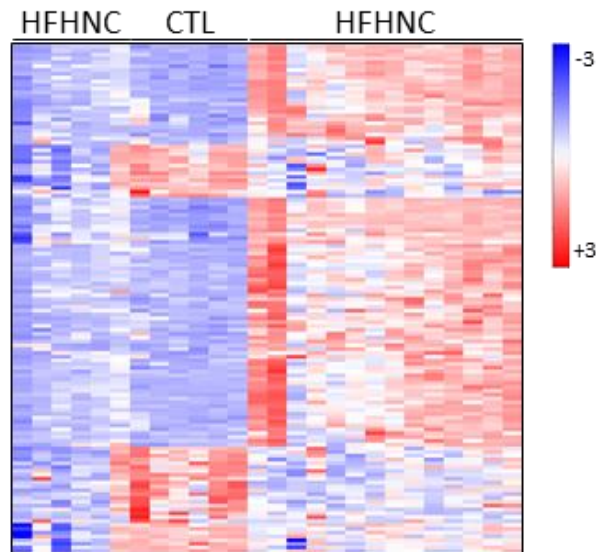


Figura 35. Heatmap de la comparació pacients (HFHNC) vs. individus controls (CTL). La barra lateral indica el gradient de l'expressió relativa de cada miRNA (files) a cada individu (columnes). Els criteris bioestadístics aplicats van ser p -valor $< 0,05$ i $\log FC > |1|$.

A l'hora d'analitzar la significança biològica dels miRNAs diferencialment expressats entre pacients i controls, es van restringir els criteris bioestadístics a un p -valor ajustat $< 0,05$, $\log FC > |1|$ i $B > 0$, obtenint un total de 24 miRNAs diferencialment expressats (Taula 17).

Taula 17. miRNAs diferencialment expressats en pacients vs. controls. Criteris bioestadístics aplicats: p-valor ajustat < 0,05, logFC > |1| i B > 0.

miRNAs infraexpressats			miRNAs sobreexpressats		
miRNA	logFC	adj.P.Val	miRNA	logFC	adj.P.Val
miR-4454	-2,79	3,94E-03	miR-8071	4,13	3,05E-02
miR-99a-5p	-2,30	3,94E-03	miR-297	4,12	1,53E-02
miR-489-3p	-1,86	8,53E-05	miR-6877-3p	3,69	2,00E-02
miR-29a-3p	-1,85	9,78E-05	miR-6875-3p	3,35	1,82E-02
miR-27b-3p	-1,71	2,00E-02	miR-4502	3,21	3,09E-02
miR-30b-5p	-1,70	4,64E-02	miR-4440	3,15	3,71E-02
miR-100-5p	-1,70	1,82E-02	miR-4701-3p	2,92	4,64E-02
miR-204-5p	-1,56	6,16E-06	miR-595	2,91	3,71E-02
miR-30e-5p	-1,36	1,69E-02	miR-6754-3p	2,54	4,98E-02
miR-152-3p	-1,32	1,82E-02	miR-619-5p	2,54	1,82E-02
miR-664a-5p	-1,14	1,69E-02	miR-4793-3p	2,53	4,64E-02
miR-500a-5p	-1,02	3,05E-02	miR-1972	2,29	3,64E-02

Les anàlisis de significança biològica dels miRNAs desregulats en els pacients afectes d'HFHNC es va realitzar a partir dels mRNAs (i, per defecte, les proteïnes) diana d'aquests. El nombre d'interaccions miRNA-mRNA de cada miRNA es troba detallat a l'annex 6.

Amb el total de proteïnes regulades pels miRNAs diferencialment expressats entre pacients i controls (n = 7.059) i, després d'aplicar l'algoritme il·lustrat a la figura 23, 6.490 proteïnes van ser objecte d'estudi. Les proteïnes relacionades amb cadascun dels processos biològics amb un p-valor estimat < 0,05 (annex 7), va permetre identificar quins d'aquests es trobaven més alterats en els pacients amb HFHNC (Figura 36). Concretament, cal destacar el gran nombre de proteïnes implicades en el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺ (28 %) i en la fibrosi renal (22 %), dos processos biològics crucials en la fisiopatologia de la HFHNC. En menys mesura, tot i que no menyspreable, també s'han associat un 15 % de les proteïnes amb l'acidosi tubular distal, que és una manifestació clínica comú en els pacients amb HFHNC. En contraposició, la contribució de les proteïnes diana dels miRNAs en la nefrocalcinosi –procés fisiopatològic present en el 100 % dels pacients– va resultar ser molt baixa (1 %).

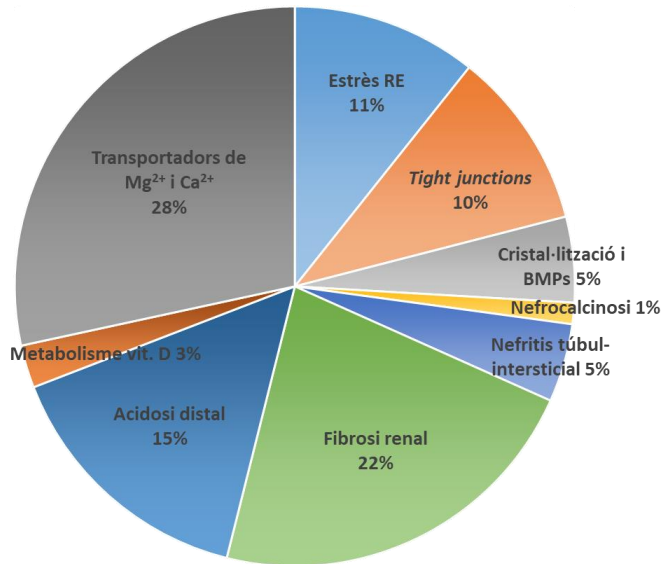


Figura 36. Contribució dels mRNAs diana del miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients i controls en els processos biològics característics de la HFHNC. RE: Reticle endoplasmàtic, BMPs: *bone morphogenetic proteins*.

A través de l'estudi de la implicació de cada proteïna en dels processos biològics estudiats, es van analitzar els miRNAs com a entitat. Aquesta aproximació va permetre identificar els miRNAs diferencialment expressats, aquells que estaven més relacionats amb els processos biològics estudiats i, conseqüentment, amb la fisiopatologia de la HFHNC. En aquest cas, es van utilitzar el nombre de proteïnes amb un p-valor estimat $< 0,1$ aplicant-hi la metodologia mencionada prèviament. D'entre els miRNAs infraexpressats, en destaquen el miR-27b-3p, amb una alta relació (aproximadament 80 proteïnes) amb el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺ i amb l'acidosi, i més de 60 proteïnes relacionades amb la fibrosi renal i les TJ. El miR-30b-5p i el miR-29a-3p principalment es van relacionar amb els mateixos processos que el miR-27b-3p, tot i que amb un nombre menor de proteïnes relacionades amb cada procés biològic. Pel que fa els miRNAs sobreexpressats en pacients amb HFHNC, el miR-4793-3p va destacar per l'alta implicació en el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺, seguit de l'acidosi tubular distal i les TJ. El miR-619-5p es va relacionar en major mesura amb el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺ i, de manera similar, amb l'acidosi i la

fibrosi renal. Aquest últim procés va ser identificat com el més rellevant pel miR-595 (Figura 37).

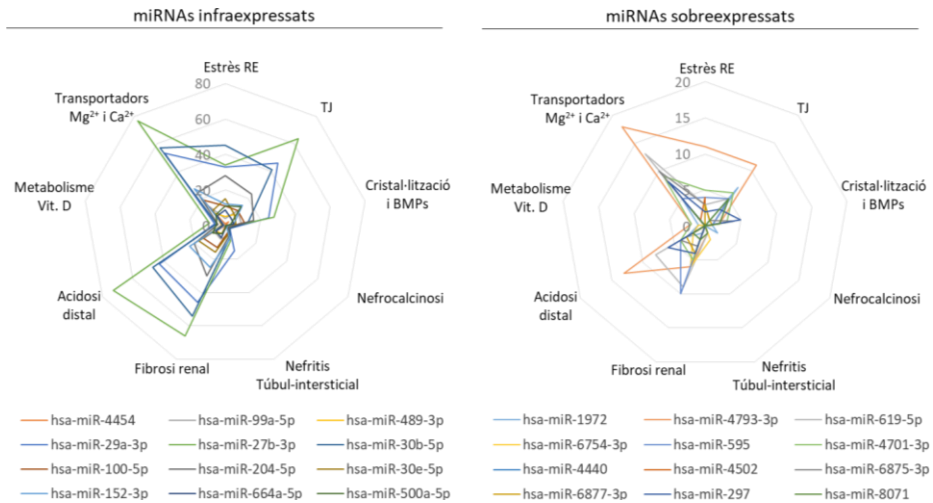


Figura 37. Diagrama radial de la contribució dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients d'HFHNC vs. controls en els processos biològics característics de la HFHNC. RE: Reticle endoplasmàtic, TJ: *tight junctions*, BMPs: *bone morphogenetic proteins*.

Tot i que els processos biològics més representats pels miRNAs infra- i sobreexpressats eren els mateixos, cal destacar la diferència en l'escala d'ambdós gràfics, el que suggereix que el balanç final podria ser l'efecte de la infraexpressió dels miRNAs implicats en aquests processos.

3.6.2. EFECTE DEL GENOTIP

Una vegada analitzats els miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients afectes d'HFHNC i controls, i donades les característiques de la cohort, en la que hi ha una gran proporció de pacients homozigots per la mutació p.G20D al gen *CLDN19*, es va procedir a comparar aquest subgrup de pacients (n = 12) amb el mateix grup control (n = 6). Seguint el mateix procediment que en el cas anterior, es va realitzar el *heatmap* d'aquesta comparació utilitzant els

mateixos criteris bioestadístics (p -valor $< 0,05$, $\logFC > |1|$ i $B > 0$) (Figura 38) i, de nou, els pacients es van jerarquitzar en 2 grups. Malgrat això, es va poder observar una franja de miRNAs (regió inferior del *heatmap*) amb un patró clarament diferenciat entre els pacients homozigots per la mutació p.G20D al gen *CLDN19* i els controls.

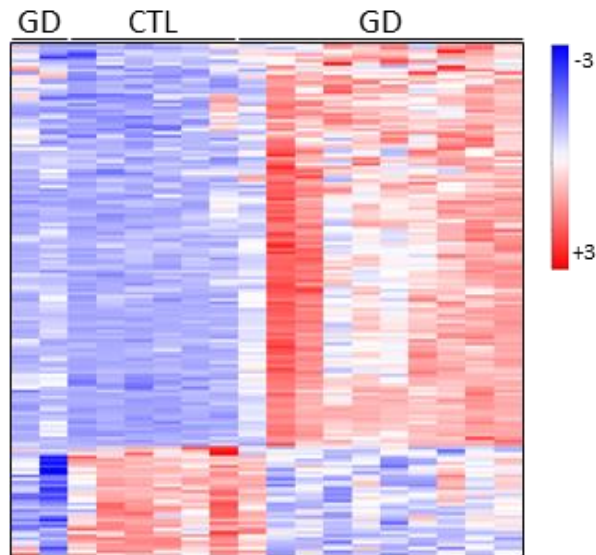


Figura 38. Heatmap de la comparació pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* (GD) vs. individus controls (CTL). La barra lateral indica el gradient de l'expressió relativa de cada miRNA (files) a cada individu (columna). Els criteris bioestadístics aplicats van ser p -valor $< 0,05$ i $\logFC > |1|$.

Per tal d'analitzar la significança biològica dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats en aquesta nova comparació, es van aplicar criteris bioestadístics més restrictius (p -valor ajustat $< 0,05$, $\logFC > |1|$ i $B > 0$), obtenint així un total de 43 miRNAs diferencialment expressats i detallats a la Taula 18.

Taula 18. miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients amb HFHNC homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* i controls. Criteris bioestadístics aplicats: p-valor ajustat < 0,05, logFC > |1| i B > 0.

miRNAs infraexpressats			miRNAs sobreexpressats		
miRNA	logFC	adj.P.Val	miRNA	logFC	adj.P.Val
miR-4454	-2,82	2,55E-03	miR-297	4,64	1,42E-03
miR-99a-5p	-2,18	6,94E-03	miR-8071	4,61	4,19E-03
miR-489-3p	-1,97	1,54E-04	miR-6877-3p	4,03	7,35E-03
miR-29a-3p	-1,71	2,07E-04	miR-6875-3p	3,76	6,94E-03
miR-27b-3p	-1,67	2,00E-02	miR-4502	3,65	4,21E-03
miR-100-5p	-1,53	2,73E-02	miR-4440	3,54	1,31E-02
miR-204-5p	-1,46	1,21E-04	miR-6753-3p	3,31	1,70E-02
miR-30e-5p	-1,27	2,40E-02	miR-3907	3,28	1,31E-02
miR-152-3p	-1,27	2,72E-02	miR-595	3,25	1,12E-02
miR-664a-5p	-1,13	2,15E-02	miR-4701-3p	3,09	2,54E-02
			miR-6754-3p	2,98	8,99E-03
			miR-4793-3p	2,96	6,94E-03
			miR-619-5p	2,89	3,44E-03
			miR-3064-5p	2,83	2,10E-02
			miR-1910-5p	2,79	1,92E-02
			miR-4685-3p	2,63	6,94E-03
			miR-1972	2,54	1,97E-02
			miR-7114-5p	2,44	3,28E-02
			miR-4436b-5p	2,39	2,40E-02
			miR-6799-5p	2,36	1,25E-02
			miR-6741-5p	2,34	2,27E-02
			miR-185-3p	2,34	1,18E-02
			miR-1183	2,30	3,30E-02
			miR-3149	2,29	2,40E-02
			miR-7844-5p	2,24	1,74E-02
			miR-6849-5p	2,24	2,15E-02
			miR-1306-3p	2,14	3,28E-02
			miR-670-5p	1,94	2,40E-02
			miR-6772-3p	1,62	2,40E-02
			miR-4708-5p	1,34	2,73E-02
			miR-1273f	1,32	3,28E-02
			miR-6893-3p	1,30	2,40E-02
			miR-1299	1,20	3,28E-02

De la mateixa manera que en la comparació anterior (pacients vs. controls), per analitzar els processos biològics en els que aquests miRNAs estaven implicats, es van utilitzar els mRNAs diana, obtenint un total de 7.701 mRNAs. El nombre de proteïnes regulades per cada miRNA es detalla a l'annex 6.

A aquest total d'mRNAs diana dels miRNAs diferencialment expressats s'hi va aplicar l'algoritme detallat a la figura 23, resultant-ne un total de 7.023 proteïnes, posteriorment avaluades amb la tecnologia ANN. La proporció de proteïnes regulades pels miRNAs diferencialment expressats entre els pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* i els individus controls en cada procés biològic estudiat (p-valor estimat < 0,05) van coincidir amb els obtinguts en la comparació pacients vs. controls (Figura 39). Tot i tractar-se d'un subconjunt d'individus inclosos en la comparació prèvia, el nombre de miRNAs diferencialment expressats va ser substancialment superior el que, *a priori*, es podria associar amb un augment del nombre de proteïnes diana. No obstant, donat que un mateix mRNA pot estar regulat per múltiples miRNAs, la diferència del nombre de proteïnes estudiades en ambdues comparacions va ser d'unes 700, i no van comportar canvis substancials en el perfil de processos biològics representats. Així doncs, els processos biològics amb una major proporció de proteïnes altament implicades van ser els "transportadors de Mg²⁺ i Ca²⁺" i la "fibrosi renal". Les proteïnes implicades en cadascun dels processos biològics amb un p-valor < 0,05 es detallen a l'annex 7.

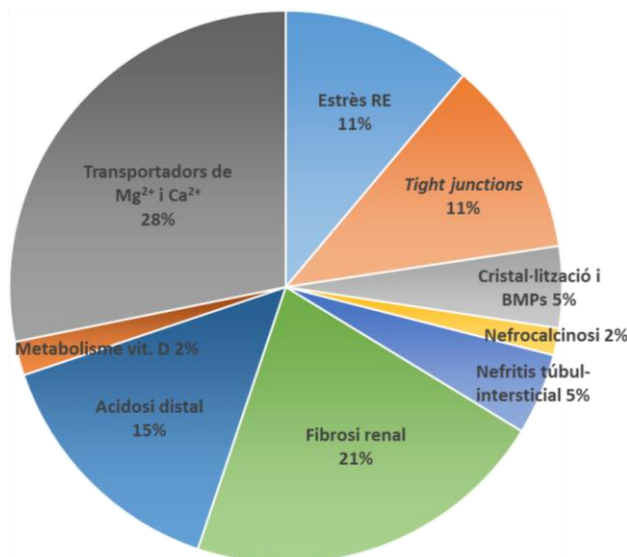


Figura 39. Contribució dels mRNAs diana dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots p.G20D a *CLDN19* i controls en els processos biològics característics de la HFHNC. RE: Reticle endoplasmàtic, BMPs: *bone morphogenetic proteins*.

El nombre de proteïnes diana de cada miRNA relacionades amb els processos biològics estudiats amb un p-valor estimat < 0,1 es va utilitzar per avaluar els miRNAs com a entitat. Tal com es mostra a la figura 40, el miR-27b-3p, seguit del miR-29a-3p, van ser els miRNAs sobreexpressats al grup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* que presentaren una major contribució en els processos biològics relacionats amb la HFHNC, essent el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺, l'acidosi tubular distal, la fibrosi renal i les TJ, els més destacats. En relació als miRNAs infraexpressats en el grup d'estudi, el miR-185-3p va destacar per la seva implicació en el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺, mentre que el miR-6799-5p per la relació amb els processos involucrats en l'acidosi tubular distal. No obstant, cal mencionar de nou la diferència en l'escala dels gràfics representats a la figura 40, el que va suggerir que la implicació dels miRNAs infraexpressats en cadascun dels processos biològics estudiats era superior al dels miRNAs sobreexpressats.

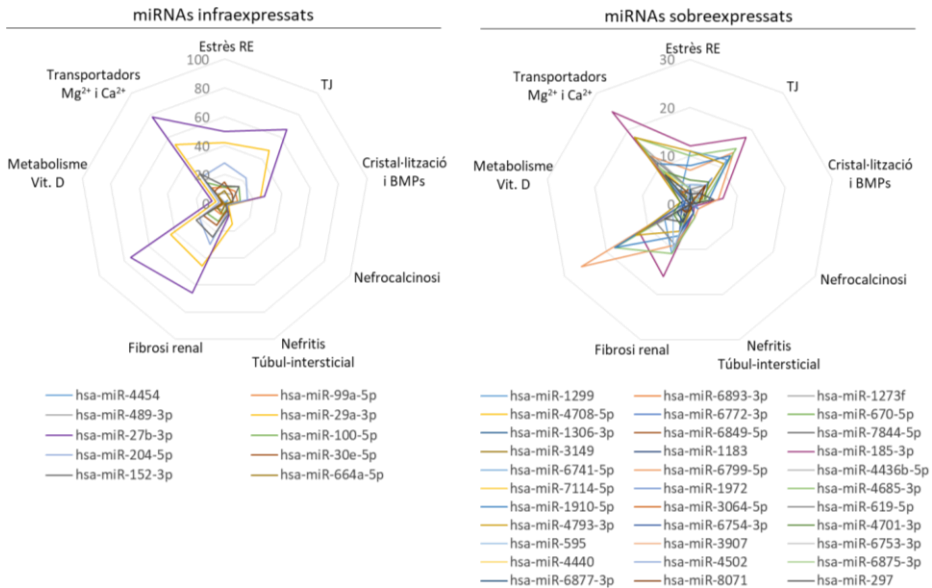


Figura 40. Diagrama radial de la contribució dels miRNAs d'UEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots per la mutació p.G20D al gen *CLDN19* vs. controls en els processos biològics característics de la HFHNC. RE: Reticle endoplasmàtic, TJ: *tight junctions*, BMPs: *bone morphogenetic proteins*.

3.6.3. EFECTE DEL SEXE

Les diferències en l'evolució de la malaltia renal entre pacients homes i dones observades en la cohort d'estudi, en la que dels 10 pacients que havien desenvolupat FR, 8 eren dones, van conduir a realitzar la comparació del perfil d'expressió de miRNAs dels uEVs entre els pacients d'ambdós sexes. El *heatmap* resultant d'aquesta comparació, aplicant-hi els criteris bioestadístics $p\text{-valor} < 0,05$ i $\log\text{FC} > |1|$ (Figura 41) va mostrar una absència de distribució dels pacients d'ambdós sexes, el que, a l'aplicar-hi uns criteris bioestadístics més restrictius ($p\text{-valor ajustat} < 0,05$, $\log\text{FC} > |1|$ i $B > 0$) es va traduir en la identificació d'un únic miRNA infraexpressat en els pacients de sexe masculí: el miR-1915-5p, amb un $\log\text{FC}$ de -2,76 i un $p\text{-valor ajustat}$ de 0,0077.

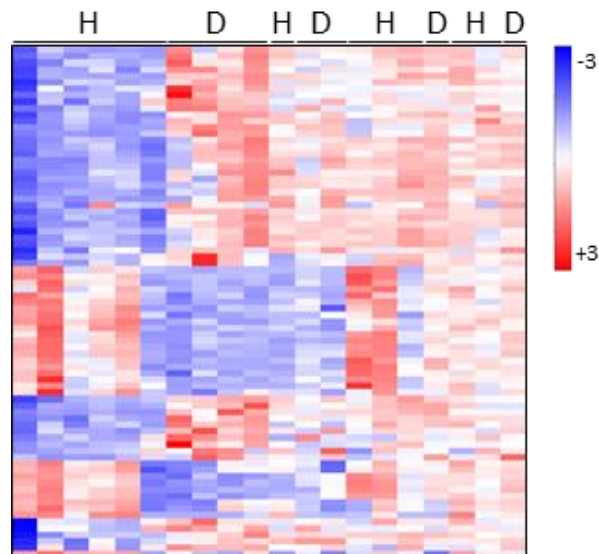


Figura 41. Heatmap de la comparació pacients home (H) vs. dona (D). La barra lateral indica el gradient de l'expressió relativa de cada miRNA (files) a cada pacient (columna). Els criteris bioestadístics aplicats van ser $p\text{-valor} < 0,05$ i $\log\text{FC} > |1|$.

Com en els casos anteriors, els mRNAs diana del miR-1915-5p es van obtenir de les bases de dades TarBase v.8.0 i miRTarBase v.7.0 (Annex 6). Dels 184 mRNAs diana, un total de 172 proteïnes van ser sotmeses a l'anàlisi realitzat

per Anaxomics. En aquest cas, únicament 4 proteïnes es van relacionar de manera significativa (p-valor estimat < 0,05) amb alguns dels processos biològics estudiats (Taula 19, Annex 7).

Taula 19. Proteïnes codificades per mRNAs diana del miR-1915-5p altament relacionades amb els processos biològics estudiats. P-valor estimat < 0,05.

Proteïna	Procés biològic
SIAH1	Estrès RE
UBXN4	
STK11	Fibrosi renal
EIF4G1	Acidosi tubular distal

3.6.4. EFECTE DEL FENOTIP RENAL

L'accentuada divergència en la severitat de l'afectació renal dels pacients amb HFHNC va permetre classificar-los en funció de la disminució anual de l'eGFR: progressió renal ràpida, moderada i lenta (Taula 11) i comparar-ne el perfil d'expressió de miRNAs d'uEVs.

La representació en *heatmaps* de les dades obtingudes dels *microarrays* (Figura 42) va permetre observar que, tot i que el global de tots els pacients no es distribuïen en funció del grup al que pertanyien, en l'anàlisi de les dades del subgrup de pacient homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* sí que es van estratificar segons el grup al que pertanyien. No obstant, cal destacar que aquesta agrupació va col·locar el grup "progressió renal lenta" entre els pacients amb progressió renal ràpida i el grup amb progressió renal moderada. Aquest fet és rellevant, tot i que no es pot extreure cap conclusió degut a la presència d'un únic individu en un dels grups, ja que els 5 pacients restants d'aquest grup havien desenvolupat FR i eren portadors d'un trasplantament renal, pel que van ser exclosos de l'anàlisi de l'expressió dels miRNAs d'uEVs.

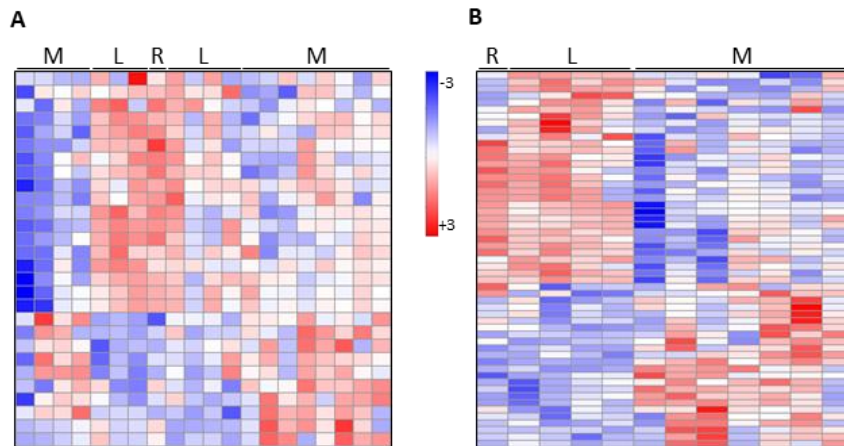


Figura 42. Heatmaps de les comparacions (A) pacients amb progressió renal ràpida (R), moderada (M) i lenta (L) en els pacients inclosos en la cohort i (B) el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. La barra central indica el gradient de l'expressió relativa de cada miRNA (files) a cada mostra (columnes). Els criteris bioestadístics aplicats van ser p-valor < 0,05 i logFC > |0,5|.

A les Taules 20 i 21 es detallen els miRNAs d'uEVs diferencialment expressats (p-valor < 0,05 i logFC > |1|) entre pacients amb progressió renal moderada i lenta i la mateixa comparació amb el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. El total d'mRNAs diana d'aquests miRNAs (1.100 en la comparació que incloïa tots els pacients; i 4.972 en la que feia referència als pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*) van ser extrets de les bases de dades TarBase v.8.0 i miRTarBase v.7.0 i el detall del nombre de mRNAs diana de cada miRNA es resumeix a l'annex 6.

Taula 20. miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre el total de pacients amb progressió renal moderada vs. lenta. Criteris bioestadístics aplicats: p-valor < 0,05, logFC > |1|.

miRNAs infraexpressats			miRNAs sobreexpressats		
miRNA	logFC	P.Value	miRNA	logFC	P.Value
miR-204-3p	-1,61	3,53E-03	miR-5189-3p	1,92	6,26E-04
miR-500a-3p	-1,54	2,23E-03			
miR-502-3p	-1,36	9,96E-04			

Taula 21. miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* amb progressió renal moderada vs. lenta. Criteris bioestadístics aplicats: p-valor < 0,05, logFC > |1|.

miRNAs infraexpressats			miRNAs sobreexpressats		
miRNA	logFC	P.Value	miRNA	logFC	P.Value
miR-502-3p	-1,48	2,89E-03	miR-5189-3p	2,21	6,82E-04
miR-501-3p	-1,34	4,06E-03	miR-6511b-5p	1,36	7,35E-03
miR-20a-5p	-1,28	1,61E-03	miR-619-5p	1,10	5,78E-03
miR-106a-5p	-1,27	9,75E-03			
miR-17-5p	-1,13	3,52E-03			

Els mRNAs diana dels miRNAs diferencialment expressats es van sotmetre a l'algorisme mencionat a la figura 23 i se'n van obtenir un total de 1.032 proteïnes diana dels miRNAs en la comparació pacients amb progressió renal moderada vs. lenta i 4.586 en la mateixa comparació del subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. Aquest total de proteïnes es van analitzar mitjançant ANN per conèixer la contribució de cadascuna d'aquestes en els processos biològics estudiats.

La inclusió de tots els pacients a l'anàlisi va permetre identificar, de nou, que els processos biològics més representats per les proteïnes diana dels miRNAs amb un p-valor estimat < 0,05 eren el transport de Mg^{2+} i Ca^{2+} (22 %), la fibrosi renal (22 %) i l'acidosi tubular distal (16 %) (Annex 7). En aquest cas, la implicació de les proteïnes en l'estrès de RE va ser més rellevant que en les comparacions realitzades prèviament (20 %) (Figura 43A). Cal destacar l'absència de proteïnes significativament relacionades amb el metabolisme de la vitamina D, tot i que això no exclou una implicació menys intensa i robusta. Per altra banda, l'anàlisi de la contribució de cada miRNA diferencialment expressat en cadascun dels processos biològics (Figura 43B) va mostrar una important implicació del miR-502-3p en els processos biològics estudiats, seguit del miR-500a-3p, tot i que en menys mesura.

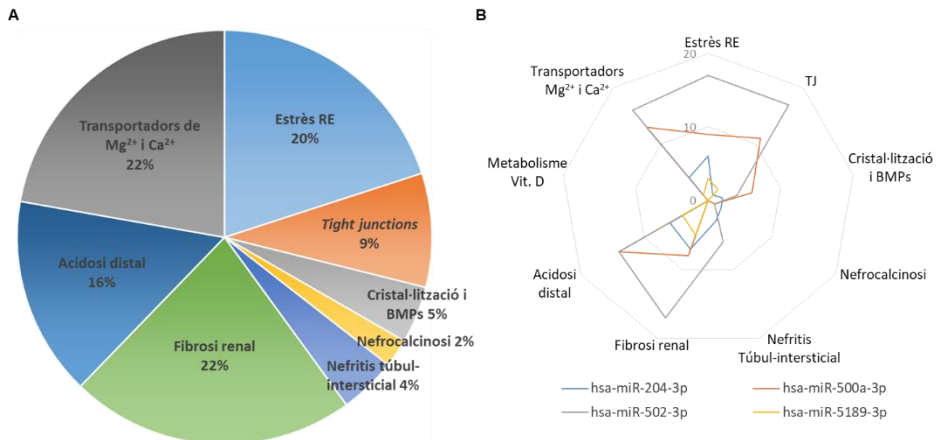


Figura 43. Contribució als processos biològics característics de la HFHNC dels (A) mRNAs diana dels miRNAs d'úEVs diferencialment expressats entre pacients amb progressió renal moderada vs. lenta, i (B) dels miRNAs. RE: Reticle endoplasmàtic, TJ: *tight junctions*, BMPs: *bone morphogenetic proteins*.

Pel que fa a la comparació dels pacients amb progressió renal moderada i lenta del subgrup d'individus homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*, l'estudi de la relació entre els processos biològics i els gens regulats pels miRNAs diferencialment expressats (p-valor estimat < 0,05) va mostrar un perfil similar a la comparació realitzada amb tots els pacients (Figura 44A). No obstant, es va poder observar un augment de contribució en el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺, així com en la fibrosi renal i les TJ, alhora que una reducció en els processos relacionats amb l'acidosi tubular distal i, el més destacat, en l'estrès de RE. El conjunt de proteïnes significativament relacionades amb cada procés biològic es detalla a l'annex 7. En relació a la contribució dels miRNA a cadascun dels processos biològics (Figura 44B), es va poder detectar una alta implicació del miR-20a-5p, seguit del miR-17-5p i el miR-106a-5p en el transport de Mg²⁺ i Ca²⁺ i la fibrosi renal. Resulta important mencionar, en aquest cas, que el miR-502-3p, destacat en la comparació entre pacients amb progressió renal moderada vs. lenta, en aquest cas, tot i estar també diferencialment expressat, la contribució d'aquest en els processos biològics, en comparació amb altres miRNAs diferencialment expressats, va resultar ser molt menor.

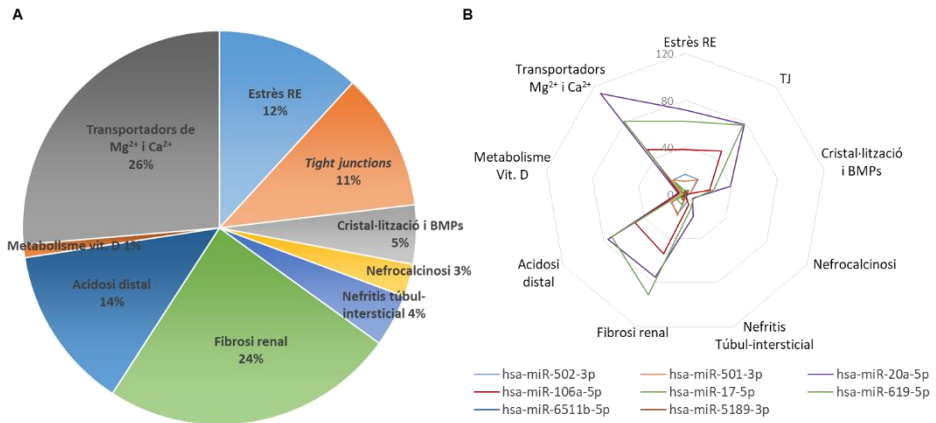


Figura 44. Contribució als processos biològics característics de la HFNC dels (A) mRNAs diana dels miRNAs d'uEVs diferencialment expressats entre pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* amb progressió renal moderada vs. lenta, i (B) dels miRNAs. RE: Reticle endoplasmàtic, TJ: *tíght junctions*, BMPs: *bone morphogenetic proteins*.

DISCUSSIÓ

La HFHNC és una malaltia minoritària causada per mutacions als gens *CLDN16*¹⁴¹ o *CLDN19*¹⁴², que codifiquen per la claudina-16 i la claudina-19, respectivament. Les claudines són proteïnes que formen les TJ i, concretament, el complex format per les claudines-16/19 regula el transport iònic paracel·lular, especialment de Ca^{2+} i Mg^{2+} , a la TAL¹²⁷. Els pacients afectes d'HFHNC presenten una destacable hipercalciúria i hipermagnesúria, acompanyada en la majoria de casos amb hipomagnesèmia, i desenvolupen CKD que progressa a FR, requerint teràpia renal substitutiva¹⁴³. Addicionalment, alguns pacients amb mutacions al gen *CLDN19* (també expressat a l'epiteli de la retina¹⁴²), desenvolupen afectacions oculars severes¹⁴².

A dia d'avui, existeixen nombrosos estudis que reporten les característiques clíniques i genètiques de pacients amb HFHNC, així com múltiples casos individuals i familiars^{142,148,183–185,190,194,208}. No obstant, la majoria d'aquests inclouen pacients amb mutacions al gen *CLDN16*, mentre que el nombre de publicacions que comprenen cohorts de pacients amb mutacions a *CLDN19* és molt inferior. Cal destacar la presència de la mutació p.G20D a *CLDN19*, que és altament prevalent a la regió mediterrània i, en aproximadament el 80 % dels casos es troba en homozigosi²⁰⁸. Tot i l'alta homogeneïtat genètica present entre els pacients afectes d'HFHNC, s'observa un ampli rang fenotípic de severitat clínica^{174,194,198,229,230}, inclús entre individus d'una mateixa família^{194,206,208}. Aquest fet posa de manifest l'existència i la implicació de mecanismes epigenètics, modificadors genètics o ambientals, encara desconeguts, que podrien estar modulant la progressió de la malaltia.

Davant l'absència d'estudis d'HFHNC més enllà de la genètica causant de la malaltia i la descripció clínica dels pacients, aquest treball s'ha focalitzat en identificar factors genètics i epigenètics que podrien estar implicats en la progressió de la HFHNC. Per dur a terme aquest objectiu, en una cohort de 30 pacients amb HFHNC i 6 individus controls, s'han cercat variants gèniques potencialment modificadores del fenotip i s'ha analitzat el patró d'expressió dels miRNAs continguts als uEVs.

1. CARACTERÍSTIQUES DE LA COHORT D'ESTUDI

El pilar fonamental d'aquesta tesi ha estat la col·lecció de mostres biològiques i de dades clíniques i genètiques d'un total de 30 pacients afectes d'HFHNC i 6 individus controls (germans sans de pacients).

La procedència geogràfica dels pacients inclosos en la cohort, ha comportat una alta prevalença de pacients amb mutacions al gen *CLDN19* (90 %, n = 27). D'aquests, el 74 % (n = 20) presentaren la mutació p.G20D en homozigosi, essent dades similars a les reportades prèviament, en les que es van identificar un 80% dels pacients homozigots per la mutació p.G20D²⁰⁸. La lleugera major prevalença de la malaltia en individus de sexe femení reportada prèviament, amb un rang d'entre el 56 i el 61 %^{184,185,194,208}, s'ha reflectit també en aquesta cohort, amb un 53 % de dones afectes d'HFHNC.

En relació a les dades clíniques disponibles dels pacients de la cohort d'estudi, la majoria van ser diagnosticats durant la infància. L'edat del diagnòstic clínic –1,71 (0,67-6,04) anys– va ser similar a la reportada en un estudi [0,8 (0,27-3,45) anys]¹⁴², però substancialment anterior a la d'un altre treball publicat [7 (3-14) i 10 (1-21) anys pels pacients amb mutacions a *CLDN16* i *CLDN19*, respectivament]¹⁸⁵.

Consistent amb la literatura^{182,183,185,190,194,239}, les manifestacions clíniques al moment del diagnòstic de la cohort d'estudi, van incloure la poliúria, un creixement deficient, ITU i nefrolitiasi. En alguns pacients, les anomalies oculars prototípiques de la HFHNC, la detecció de la nefrocalcinosi medul·lar bilateral, o la presència d'antecedents familiars (13 % dels casos) van ser també motius que van incentivar la sospita clínica i van conduir al diagnòstic. Al moment del diagnòstic, va resultar destacable la presència, en general, d'hipomagnesèmia associada a la pèrdua urinària de Mg^{2+} i Ca^{2+} , tot i que en el 30 % de pacients, el Mg^{2+} sèric es trobava dins del rang fisiològic, concepte descrit prèviament i que podria estar relacionat amb la disfunció renal ja present al moment del diagnòstic o amb el menor eGFR present de manera fisiològica en els infants¹⁷³.

També es van detectar valors elevats de PTH sèrica –en relació l'eGFR–, tal com s'havia reportat prèviament^{190,234}. En conjunt, aquests resultats posen en evidència que la detecció d'una hipomagnesèmia lleu, inclús l'absència d'aquesta, no descarten la HFHNC, així com que la detecció d'hipercalciúria i hipermagnesúria severa poden ser motius de sospita clínica d'aquesta entitat. Addicionalment, la presència de nefrocalcinosi medul·lar bilateral i/o d'anomalies oculars també són elements claus per la presumpció d'HFHNC.

En el moment de la realització d'aquest treball, 10 pacients havien desenvolupat FR a una edat mediana de 7,5 (1,6-26,2) anys. Aquest ampli rang d'edat concorda amb les dades publicades prèviament d'altres cohorts de pacients amb HFHNC^{182,184,185,194,208,239} i sustenta la gran variabilitat en quant a la pèrdua de funció renal al llarg del temps entre pacients.

A diferència d'una publicació en la que es determina que els pacients amb mutacions al gen *CLDN19* tenen un risc més elevat de progressar a CKD estadiatge 3, així com una pitjor supervivència renal que els pacients amb mutacions al gen *CLDN16*⁸⁵, en aquest treball no s'ha pogut realitzar aquest anàlisi degut al baix nombre de pacients amb mutacions a *CLDN16*. Per altra banda, l'alta prevalença de la mutació p.G20D en homozigosi a la cohort d'estudi, també ha impossibilitat analitzar si l'efecte de les diferents mutacions a *CLDN19* tenia alguna implicació en el pronòstic de la malaltia, tal com s'havia descrit amb la *CLDN16*, en la que la presència d'almenys un al·lel amb funció residual retarda l'edat de FR¹⁸⁴. Tot i així, en la mateixa línia de recerca, s'ha estudiat si els pacients homozigots per la mutació p.G20D tenien diferent pronòstic, en quant a la malaltia renal, que aquells que presentaven aquesta mateixa mutació en heterozigosi o altres variants patogèniques al mateix gen, observant-se absència de correlació. És important emfatitzar que, més enllà d'aquests treballs mencionats, no s'ha reportat cap estudi de factors de risc i/o predictors de progressió de la malaltia renal en pacients amb HFHNC.

En aquest treball, l'evidència de l'existència de factors que modulen la progressió de la malaltia es posa en especial manifest en l'estudi de germans

afectes d'HFHNC amb diferent fenotip clínic, ja que en els pacients inclosos a la cohort no s'ha detectat cap retràs en el diagnòstic ni diferència en l'assistència mèdica que poguessin explicar aquestes diferències. S'han reportat diversos treballs en els que es mostra l'heterogeneïtat fenotípica entre germans amb la mateix genotip causant de malaltia^{174,194,198,207,208,229,230}. No obstant, la cohort d'aquest treball és una de les que conté un major nombre de parelles de germans amb mutacions al gen *CLDN19* descrita fins el moment: un total de 8. En dues famílies (famílies 5 i 6) els fenotips renals van ser similars entre germans; no obstant, es van poder evidenciar diferències en les famílies 1 i 7, en les que el germà més petit va patir una progressió a FR molt precoç, mentre que els corresponents germans grans, encara mantenien els seus ronyons funcionals i estables durant el temps de seguiment. Aquestes dades evidencien que la perduda de funció renal més accelerada per part d'un dels germans, en comparació amb l'altre, no estava relacionada amb un retràs en el diagnòstic de la malaltia. Curiosament, en aquestes dues famílies, el pacient amb una pitjor progressió de la malaltia renal va manifestar alteracions oculars lleus, en comparació amb els respectius germans grans.

Per primera vegada, en aquest treball s'ha estudiat l'existència de factors no genètics predictors de la progressió de la malaltia renal en pacients amb HFHNC. Més concretament, es va analitzar la progressió a CKD estadiatge 3 (temps fins desenvolupar eGFR < 60 mL/min/1,73m²) en funció del sexe. Tot i que sense significança estadística, possiblement degut al baix nombre de pacients estudiats, es va observar una tendència que les pacients de sexe femení desenvolupaven CKD estadiatge 3 abans que els pacients de sexe masculí. Concretament, a la primerenca edat de 2 anys, el percentatge de dones que no havien desenvolupat CKD estadiatge 3 era molt inferior al dels homes (64 % i 92 %, respectivament). A més, resulta destacable que, amb un temps de seguiment clínic de 8,34±4,30 anys, i en base a la classificació dels pacients realitzada en aquest treball en funció de la progressió de la malaltia renal, el nombre de dones presents al subgrup de pacients amb progressió renal ràpida

(amb una disminució de l'eGFR de $39,6 \pm 27,18$ mL/min/1,73m²/any) va duplicar el d'homes, malgrat tenir una edat similar al diagnòstic i d'inici de tractament.

Pel que fa al sistema de classificació dels pacients aplicat en aquest treball, en funció de la pèrdua anual d'eGFR, prèviament s'havia descrit que pacients amb mutacions al gen *CLDN16* presentaven una pèrdua anual de funció renal d'entre $7,3 \pm 2,3$ i $3,0 \pm 1,9$ mL/min/1,73m², essent més agreujada la disminució de l'eGFR en aquells portadors mutacions amb pèrdua de funció en ambdós al·lels¹⁸⁴. En un altre treball en el que es mostra el cas d'un únic pacient amb variants patogèniques a *CLDN16*, es referencia una pèrdua de funció renal al llarg del temps de $2,5$ mL/min/1,73m²/any, trobant-se augmentada fins a valors de $4,3$ mL/min/1,73m²/any en el període previ al desenvolupament de FR⁴¹⁰. En relació als pacients amb mutacions a *CLDN19*, no hi ha cap treball que descriu aquest paràmetre. No obstant, resulta evident que alguns dels valors de pèrdua anual d'eGFR determinats en aquest treball (per exemple, el grup de progressió renal ràpida) es trobaven per sobre dels valors descrits a la literatura.

Per altra banda, s'ha identificat també una correlació negativa entre els nivells sèrics de PTH al moment del diagnòstic i la progressió de la CKD, detectant uns nivells superiors de PTH en el grup de progressió renal ràpida, en comparació amb els del grup de progressió renal lenta ($p = 0,02$), inclús amb valors d'eGFR similars entre ambdós grups. L'elevació dels nivells de PTH sèrics en relació amb la funció renal, inclús amb valors d'eGFR normals, s'havia reportat prèviament en pacients amb HFHNC^{177,182}. Es creu que l'elevació d'aquest paràmetre podria estar associada a l'acidosi tubular distal o ser conseqüència d'una hipocalcèmia severa^{184,211}. De fet, en dos estudis previs es van observar –sense cap anàlisi estadística– uns elevats nivells de PTH precisament en aquells pacients amb un pitjor evolució de la malaltia renal^{184,185}. De manera complementària, resulta plausible especular que alteracions en el metabolisme d'altres minerals també podrien explicar les diferències fenotípiques entre pacients. Per això, en aquest treball s'han estudiat les dades bioquímiques disponibles, dels quals, paràmetres com la creatinina i el fosfat

sèrics, amb uns valors de referència dependents de l'edat, requereixen una especial atenció. Els valors de creatinina sèrica al moment del diagnòstic dels pacients inclosos al grup de progressió renal ràpida són substancialment elevats en relació a l'edat d'aquests⁴⁰⁸, el que evidencia un grau de CKD des del moment del diagnòstic i des dels inicis de la vida. Per altra banda, els nivells de fòsfat sèric, lleugerament superiors al grup de progressió renal ràpida, podrien ser deguts a l'augment fisiològic d'aquest paràmetre en pacients menors d'1 any d'edat⁴⁰⁹, el que *a priori*, no tindria cap rellevància clínica.

L'expressió del gen *CLDN19* a l'epiteli pigmentat de la retina fa que els pacients amb mutacions en aquest gen tinguin afectació ocular, tot i que amb penetrància incompleta, ja que no tots ells en presenten^{142,207,208,210,211}. En aquest sentit, el 60 % dels pacients amb mutacions al gen *CLDN19* inclosos en la cohort d'estudi van manifestar les alteracions oculars prototípiques (displàsia macular, la miopia magna i el nistagme¹⁴²). Aquesta proporció de pacients amb afectació ocular es lleugerament inferior a la reportada prèviament^{142,185,208}. Cal mencionar, però, que les diferències observades en quant a l'afectació ocular i renal entre els germans inclosos en aquesta cohort, suggereix que els mecanismes fisiopatològics a cada òrgan són diferents ja que no es va poder establir cap correlació entre la presència d'anomalies oculars prototípiques de la HFHNC i l'evolució de la malaltia renal.

2. GENS MODIFICADORS DEL FENOTIP

L'àmplia variabilitat fenotípica entre els pacients afectes d'HFHNC, inclús entre aquells que comparteixen la causa genètica de la malaltia i entre germans, posa de manifest la presència d'altres factors que influeixen en la progressió de la disfunció renal. En aquest cas, l'estudi s'ha focalitzat en la identificació de gens moduladors del fenotip.

El primer aspecte a esmentar és l'estratègia emprada i l'anàlisi bioestadística aplicada. L'ús de tecnologies *high-throughput*, com la seqüenciació massiva de l'exoma, a diferència de l'anàlisi individual de determinats gens, permet l'anàlisi de la totalitat de les regions codificants del genoma; no obstant, l'anàlisi de les dades generades és considerablement més complexa⁴¹¹. En aquest treball, per limitacions tècniques, l'estudi s'ha focalitzat en l'anàlisi d'associació de variants gèniques en homozigosi amb els fenotips renals més extrems (progressió renal ràpida i lenta). No obstant, resulta evident que la presència, en heterozigosi, d'una variant gènica també podria ser la responsable de la variabilitat fenotípica⁴¹². És més, és possible que els factors genètics que condueixen al desenvolupament d'una malaltia renal més o menys severa no sigui únicament la variació en un gen, sinó la combinació d'SNVs a diversos gens, com s'ha descrit en altres patologies com la fibrosi quística⁴¹³.

Cal tenir en compte, però, que l'extens grau de variabilitat genètica, combinada amb la propietat coneguda o prevista dels gens modificadors (variants amb efectes modestos, no necessàriament minoritaris en la població, i que també poden afectar regions no codificants), dificulta la identificació d'aquests en petites cohorts de pacients, que és característic de les malalties minoritàries⁴¹¹. Tot i així, els resultats obtinguts en aquest treball evidencien la presència de diverses variants gèniques (en homozigosi) associades a la progressió renal ràpida i lenta en els pacients afectes d'HFHNC. D'entre les SNVs identificades, per les funcions biològiques dels gens on es troben localitzades, en destaquen la rs2125739 (al gen *ABCC10*), la rs11207827 (al gen

PATJ) i la rs1050171 (a *EGFR*). A continuació es detalla la funció d'aquests gens i la possible implicació amb la HFHNC.

El gen *ABCC10*, que codifica pel transportador *ATP binding cassette subfamily C member 10*, s'expressa a ronyó⁴⁰². En aquest treball s'ha associat l'al·lel de referència en homozigosi de la SNV rs2125739 amb el fenotip renal de progressió lenta, mentre que l'al·lel alternatiu s'havia relacionat amb una resposta diferencial als efectes nefrotòxics de l'antiviral tenofovir, essent un factor de risc per desenvolupar disfunció tubular renal en resposta a aquest fàrmac⁴¹⁴. No obstant, aquestes dades no s'han pogut replicar en cap altre estudi^{415,416}. Tot i que en el present treball, i en base a la informació disponible a la base de dades emprada³⁸¹, s'ha classificat l'efecte d'aquesta variant gènica com una variant *missense*, per la localització gènica al tercer nucleòtid de l'inici de l'exó 12 del gen *ABCC10*, s'ha descrit que, en base a la predicció bioinformàtica, aquesta variant es localitza en un putatiu lloc d'*splicing*, podent generar una proteïna defectuosa⁴¹⁴. Si així fos, aquest esdeveniment podria explicar la baixa prevalença d'individus homozigots per l'al·lel alternatiu en la població general (2,7 %) i que en cap pacient inclòs en aquest estudi s'ha detectat aquest genotip. Per altra banda, també s'ha relacionat la presència d'aquesta variant gènica amb la neutropènia produïda pel fàrmac docetaxel en el tractament de càncer de pulmó⁴¹⁷, pel que per la naturalesa i funcionalitat de la proteïna codificada pel gen *ABCC10* un canvi en la funcionalitat d'aquesta podria desencadenar a una resposta diferencial a algun fàrmac àmpliament utilitzat pel tractament de suport rebut pels pacients afectes d'HFHNC.

Pel que fa la variant rs1050171, la localització gènica al gen *EGFR* va resultar especialment rellevant. Com s'ha mencionat a la introducció d'aquesta tesi, l'EGFR –localitzat a la membrana basolateral de les cèl·lules del DCT– regula positivament la reabsorció de Mg^{2+} mitjançant la modulació del transportador TRPM6¹⁰⁸. Més concretament, el domini tirosina quinasa de l'EGFR activa la via de senyalització MAPK, augmenta l'activitat i la presència de TRPM6 a la membrana plasmàtica¹⁰³. Amb aquesta informació, resulta important destacar

que l'SNV rs1050171 –el genotip homozigot per l'al·lel alternatiu del qual s'ha associat amb una progressió renal lenta dels pacients amb HFHNC– es localitza precisament en el domini tirosina quinasa de l'EGFR⁴⁰¹. Tot i tractar-se d'una variant sinònima, s'ha descrit que aquest tipus de SNVs també poden modificar la transcripció, l'*splicing*, el plegament de la proteïna, l'estabilitat de l'mRNA, així com de modular el procés de traducció degut a la preferència d'ús dels diferents codons que codifiquen pel mateix aminoàcid (procés conegut com *codon bias*)⁴¹⁸. De fet, existeixen múltiples exemples en els que una variant sinònima és capaç de modular la progressió d'una malaltia causada per mutacions en altres gens, inclús, esser la causant del trastorn⁴¹⁹. Tot i que sense ser estrictament una variant genètica moduladora del fenotip d'una malaltia, ni causant d'aquesta, al gen *CLDN14* –implicat en la modulació de l'activitat del complex claudina-16/19 a la TAL– es va identificar l'SNV rs219780, amb un efecte sinònim en la proteïna i considerablement freqüent en la població general, altament associada amb la nefrolitiasi i, alhora, amb una reducció de la densitat mineral òssia¹⁵⁹. En la mateixa línia, en un estudi amb 225 pacients en tractament amb diàlisi, es van associar 8 SNVs com putatius predictors de d'inflamació en aquests individus⁴²⁰. Cal mencionar, però, que en aquest cas és l'al·lel alternatiu en homozigosi el que s'ha associat amb una progressió lenta de la malaltia renal, pel que la presència d'aquest SNV podria comportar una regulació positiva de l'mRNA o la proteïna EGFR. En cas que així fos, els pacients amb HFHNC portadors de la variant c.2361G>A en homozigosi, presentarien un augment en l'expressió d'EGFR que donaria lloc a una major regulació positiva del transportador TRPM6 i, per tant, un augment en la reabsorció de Mg²⁺ al TCD. En aquesta línia, tot i que amb divergències, en models cel·lulars de carcinoma de cèl·lula escamosa de cap i coll es va observar un augment en el temps de vida mitja de l'mRNA d'EGFR –tot i que no de proteïna– a les línies cel·lulars amb genotip heterozigot a la variant rs1050171, en comparació amb les línies cel·lulars portadores de l'al·lel de referència en homozigosi⁴²¹. Emfatitzant la hipòtesi mencionada, en els pacients inclosos en la cohort d'estudi, l'excreció urinària de Mg²⁺ al moment del diagnòstic de la HFHNC, tot

i que sense significança estadística, era superior en els individus amb progressió ràpida en comparació amb els de progressió lenta (FE_{Mg} : $12,2 \pm 4,7$ i $8,4 \pm 3,7$ %, respectivament).

Més enllà de la HFHNC, aquesta variant ha estat associada significativament amb la susceptibilitat al rebuig agut del trasplantament renal⁴²². També, fora de l'àmbit renal, s'ha suggerit que l'al·lel alternatiu en homozigosi o heterozigosi podria estar influenciant positivament la resposta al fàrmac gefitinib, utilitzat com a tractament al càncer de pulmó de cèl·lula no-clara⁴²³, i que, en pacients amb càncer colorectal metastàtic, aquells que presentaven l'al·lel de referència en homozigosi en la variant rs1050171 tenien una millor resposta al tractament amb inhibidors d'EGFR⁴²⁴. Tot i que no existeixen dades suficients per determinar l'efecte de la variant gènica rs1050171 al gen *EGFR*, els nombrosos estudis realitzats dels polimorfismes en aquest gen posen de manifest la seva rellevància i, juntament amb la implicació de l'EGFR en la homeòstasi del Mg^{2+} , postulen aquesta variant gènica com a objecte de futurs estudis.

Un dels gens més rellevants en els que s'ha identificat una variant gènica en la que l'al·lel de referència en homozigosi s'ha associat a la progressió renal lenta en pacients afectes d'HFHNC va ser *PATJ*. El gen *PATJ*, expressat als túbuls renals, codifica per la proteïna PATJ (també anomenada hINADL), que forma part de les TJ. Com s'ha mencionat breument a la introducció, les TJ estan formades per proteïnes TM i proteïnes adaptadores¹¹⁸, essent PATJ una d'aquestes últimes. Les TJ, a més de segellar lateralment les cèl·lules epitelials, són les responsables de determinar i mantenir la polaritat apico-basal cel·lular, procés essencial pel desenvolupament i funció renal⁴²⁵. Més detalladament, a les TJ, la proteïna TM Crb3 –la isoforma predominant a ronyó de la família de Crb⁴²⁶– interacciona directament amb PALS1^{427–429}, i aquesta amb PATJ⁴³⁰.

El complex Crb3/PALS1/PATJ és crucial en la generació de la polaritat cel·lular durant el desenvolupament embrionari. S'ha detectat expressió dels 3 gens en models murins a nivell pre-implantacional i en l'estadiatge de 8 cèl·lules de l'embrió, moment en el qual Crb3 i Pals1 es situen a la membrana apical, i

PATJ al voltant de les TJ⁴³¹. Addicionalment, s'ha relacionat el complex proteic Crb3/PALS1/PATJ amb diversos processos biològics com la via de senyalització mTOR⁴³² i amb la via Hippo, per la qual, una disfunció del complex proteic dona lloc a un augment en la proliferació, supervivència i migració cel·lular⁴³³. També s'ha determinat que un dèficit de PALS1 altera la polaritat cel·lular⁴³⁴ i induïx el desenvolupament de quists renals en totes les regions de la nefrona excepte a la TAL⁴²⁵. Resulta important destacar que la presència de quists renal és un signe que, tot i que en rares ocasions, s'ha observat en pacients amb HFHNC¹⁹⁴. Per altra banda, s'ha descrit que la proteïna MUPP1 (*Multiple PDZ domain protein*), una proteïna molt similar a PATJ estructuralment i funcionalment⁴³⁵, interacciona directament amb ZO-3⁴³⁶ i la claudina-1⁴³⁷, pel que resulta plausible extrapolar-ho a PATJ, connectant així les proteïnes estructurals de les TJ amb les proteïnes adaptadores d'aquestes estructures. Cal mencionar que el domini d'interacció de la claudina-1 a MUPP1 és molt conservat a les altres claudines, pel que, possiblement, també tingui capacitat d'interaccionar amb altres claudines. En la mateixa línia, MUPP1 interacciona amb Kir4.2, subunitat d'un canal de K⁺ localitzat a la membrana basolateral de les cèl·lules del TCD, reduint la presència del canal a la membrana plasmàtica i, per tant, la reabsorció de K⁺⁴³⁸. Així doncs, de manera homòloga, es podria hipotetitzar que PATJ podria modular també la presència de Kir4.2 a la membrana plasmàtica. S'han descrit diverses interaccions entre PATJ i proteïnes implicades en malalties renals, com la poliquistina-2 (responsable de la PQRAD)⁴³⁹ i les nefroquistines 1 i 4 (causants de la nefronoptisi)⁴⁴⁰. També s'ha detectat la interacció amb p114RhoGEF (*Rho guanine nucleotide exchange factor 18*)⁴⁴¹, proteïna codificada pel gen *ARHGEF18*, que resulta especialment interessant ja que en aquest mateix treball s'han identificat dues variants gèniques a *ARHGEF18*, en les que l'al·lel de referència en homozigosi s'associava a la progressió renal ràpida en els pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. Finalment, a nivell clínic, s'ha associat una menor expressió de PATJ amb un pitjor pronòstic dels pacients amb càncer renal de cèl·lula clara, possiblement, degut a

l'activació de la via de senyalització MAPK i d'un augment en la proliferació cel·lular, segons els resultats obtinguts en models *in vitro*⁴⁴².

Malauradament, no existeixen dades que relacionin l'SNV identificat en aquest treball (rs11207827) pel que, l'al·lel de referència en homozigosi es va associar amb la progressió lenta de la malaltia renal, amb dades clíniques, fisiològiques o fisiopatològiques. No obstant, degut a la importància indiscutible de la proteïna PATJ en el manteniment de l'estructura epitelial del túbul renal i en el desenvolupament embrionari deixa entreveure que, una alteració en aquests –tot i sense pèrdua de funció– podria desencadenar múltiples alteracions durant la nefrogènesi, el que podria explicar parcialment la ràpida evolució a FR (als pocs mesos o anys de vida) d'alguns dels pacients afectes d'HFHNC.

En un estudi previ, es va descriure que, en models animals d'HFHNC (*knock-out* pel gen *CLDN16*) es produïa una sobreexpressió dels gens *TRPV5*, *TRPM6*, *S100G*, *CNNM2* i *ATP13A4* –tots ells relacionats amb l'homeòstasi del Ca^{2+} o el Mg^{2+} – als que se'ls va atribuir el desenvolupament de mecanismes compensatoris per explicar l'absència de nefrocalcinosi en aquests models animals⁴⁴³. Resultava plausible, doncs, hipotetitzar que variants gèniques en aquests gens que modifiquessin l'abundància de les proteïnes resultants o que comportessin un guany de funció d'aquestes, podrien modular la progressió de la malaltia renal. En aquest treball, però, no s'ha identificat cap SNV en homozigosi en aquests gens associada als fenotips renals estudiats.

Tot i que es disposen de les dades clíniques oftalmològiques dels pacients amb mutacions al gen *CLDN19*, l'estudi de variants gèniques associades a la presència o no de l'afectació ocular prototípica no s'ha pogut incloure en aquest treball i es realitzarà posteriorment.

3. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DELS miRNAs D'UEVs

L'anàlisi de mostres d'orina és insubstituïble com a mètode no invasiu pel diagnòstic i seguiment de malalties, particularment per les malalties renals. No obstant, l'orina és un fluid biològic altament dinàmic i la composició d'aquesta és variable³⁰⁶. Davant l'absència d'indicació clínica de biòpsia renal en moltes patologies –com és el cas de la HFHNC–, que proporcionaria informació directa de la fisiopatologia renal, els exosomes es consideren una valuosa font d'informació dels processos biològics que tenen lloc al teixit renal (entre d'altres), ja que són vesícules altament estables³¹⁷ i protegeixen el seu contingut de l'acció d'RNAses i proteases presents a l'orina^{444,445}. A diferència de la biòpsia de teixit renal, un procediment invasiu i costós que permet l'obtenció d'una mostra parcial de l'òrgan, els exosomes proporcionen una representació completa de tot el sistema urinari, el que els ha convertit en un camp de descobriment de biomarcadors de múltiples malalties renals^{446–448}.

Per aquests motius, un dels objectius d'aquest treball va ser determinar el patró d'expressió de miRNAs en uEVs de la cohort d'estudi (20 pacients afectes d'HFHNC amb els ronyons nadius funcionals i 6 individus controls) alhora com identificar els processos biològics en els que aquests miRNAs estaven implicats.

En patologies com la HFHNC, en la que els pacients manifesten incapacitat de la concentració de l'orina i, per tant, la poliúria, el volum d'orina de partida per obtenir una quantitat suficient d'exosomes pels subsegüents anàlisis ha de ser superior a la que es podria utilitzar en individus sans, pel que l'ús de productes comercials per l'aïllament d'exosomes no estava indicat. Així doncs, es va utilitzar la centrifugació diferencial, considerada la tècnica de referència per l'aïllament d'exosomes fins el moment, que permet utilitzar volums il·limitats d'orina. Malgrat ser la tècnica més utilitzada, hi ha reportades diverses metodologies basades en la centrifugació diferencial^{311,312,314,315,449–451}, cap d'elles consensuades ni establertes, que proporcionin una informació robusta de la quantitat i puresa dels uEVs aïllats. Per aquest motiu es van testar diverses

variants en els protocols disponibles i, a cadascun dels procediments subjectes d'avaluació, es van aïllar els uEVs i se'n va avaluar la morfologia, la mida, la quantitat i la naturalesa dels uEVs aïllats mitjançant les tècniques cryo-TEM, NTA i *western-blot*. Aquesta estratègia va permetre finalment establir el protocol que va proporcionar un major rendiment de la tècnica, així com el millor mètode per realitzar l'extracció de l'RNA contingut als uEVs.

El primer aspecte que es va contemplar va ser la normalització de la manipulació pre-clínica de les mostres. En malalties rares, com la HFHNC, en la que el nombre de pacients és molt baix i aquests es troben distribuïts de manera dispersa per la geografia, es requereix del transport de les mostres abans d'aïllar-ne els uEVs. La presència de cèl·lules i restes cel·lulars a l'orina fa que la congelació de la mostra prèvia a l'eliminació d'aquests components comporti l'alliberació del contingut cel·lular i, per tant, esser un factor que pot comportar una alteració en els resultats. Per aquesta raó, i tot i que en estudis previs es recomanava congelar les mostres d'orina a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per disminuir la pèrdua de proteïnes associades a exosomes³¹⁷, es va decidir mantenir-les a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant, aproximadament 24 h fins el seu processament, per tal de mimetitzar el temps i la temperatura de transport de les mateixes. Els resultats obtinguts per cryo-TEM van mostrar que aquestes condicions de conservació de l'orina mantenien intacta l'estructura dels uEVs, validant així el sistema de recollida de les mostres.

En condicions fisiològiques, la quantitat de proteïna present a l'orina és molt baixa; no obstant, la proteïna majoritària és la THP, que forma unes xarxes que atrapen exosomes i altres vesícules extracel·lulars⁴⁵². La disrupció d'aquestes xarxes es realitza habitualment a través del tractament amb agents reductors com el DTT que, tot i que s'ha descrit que només augmenta lleugerament el nombre d'uEVs aïllats i que això no es tradueix en una major quantitat d'RNA extret³⁰⁶, és un procediment que en l'actualitat es segueix aplicant a les mostres d'orina. En testar algunes de les diferents recomanacions en quant a les condicions (temperatura i temps) del tractament^{312,314,316,322,453,454},

els resultats obtinguts van mostrar que la incubació a 37 °C durant 10 min era, indiscutiblement, la condició que proporcionava una major puresa d'uEVs, alhora que una quantitat raonable dels mateixos. El disseny de l'estudi realitzat no va permetre determinar si la recuperació dels uEVs atrapats a les xarxes de THP augmentaven la quantitat d'RNA extret, però sí que es va observar un augment considerable en el nombre d'uEVs aïllats, en comparació a la mostra a la que no s'hi van afegir. Per aquest motiu es va considerar important la incorporació d'aquest pas al mètode. Paral·lelament, es va descartar el filtratge de la mostra a través d'un filtre de de 0,22 µm, procediment realitzar en múltiples treballs^{268,455-457}, ja que l'anàlisi per cryo-TEM va mostrar una gran quantitat d'impureses als uEVs obtinguts, probablement alliberades pel filtre o com a conseqüència de la ruptura dels uEVs per la pressió del procés de filtratge, donant lloc a la sobre-quantificació per NTA. Per últim, l'avaluació de diferents velocitats i temps d'ultracentrifugació de la mostra va confirmar que sotmetre les mostres a 100.000 *x g* durant 2 h era més efectiu que a 200.000 *x g* durant 1 h. En tots els procediments d'aïllament d'uEVs testats es va confirmar l'eficàcia de la ultracentrifugació mitjançant *western-blot*, ja que no es van detectar les proteïnes associades a exosomes (TSG101 i Alix) als sobrenedants. En conjunt, amb els resultats obtinguts, es va determinar el protocol idoni per processar l'orina diluïda dels pacients amb HFHNC, adaptant el protocol a 300 mL d'orina inicial. La detecció de marcadors associats a exosomes va indicar que la quantitat de mostra de partida era suficient per obtenir un bon rendiment de la tècnica.

Per altra banda, l'ús de diferents mètodes d'extracció de l'RNA dels uEVs i la subsegüent anàlisi de l'expressió de 5 miRNAs va permetre determinar que el *miRCURY kit* va proporcionar una major quantitat d'RNA, així com que el perfil d'expressió dels miRNAs era independent al mètode d'extracció emprat.

Per tant, amb a tècnica ja optimitzada, es va realitzar l'aïllament dels uEVs de les mostres d'orina de la cohort d'estudi i l'extracció de l'RNA contingut en

els mateixos. La caracterització dels uEVs aïllats, de nou, es va realitzar amb les tècniques complementàries cryo-TEM, NTA i *western-blot*.

Un factor crucial als estudis dels uEVs és la normalització de les dades obtingudes de la quantificació dels uEVs aïllats. En alguns treballs es recomana l'ús dels valors de creatinina urinària^{316,317} o de la quantitat de THP present a l'orina³¹⁴ com a factors normalitzadors. No obstant, en el cas de mostres provinents de pacients amb patologies renals, en els que precisament l'excreció de creatinina es troba alterada, l'ús d'aquest paràmetre podria no ser el més adient⁴⁵⁸. De la mateixa manera, i particularment en la HFHNC –el defecte principal de la qual es localitza a la TAL, que és la porció de la nefrona que secreta la THP– l'ús de la THP urinària com a factor de normalització podria comportar biaixos en els resultats. Tot i que les recomanacions actualitzades de la ISEV recomanen la determinació dels nivells de creatinina urinària, a més del volum d'orina de partida³²⁹, en aquest treball, per les raons abans mencionades, únicament s'ha determinat el volum d'orina inicial, paràmetre respecte el qual s'ha normalitzat la quantificació dels uEVs obtinguda per NTA. Alhora, partir del mateix volum d'orina, resuspendre els uEVs en el mateix volum i l'ús el mateix volum d'uEVs per detectar-ne els marcadors associats a exosomes, va permetre considerar la tècnica de *western-blot* com un mètode semi-quantitatiu, ja que, tot i que de manera menys objectiva que el NTA, va corroborar que els pacients amb HFHNC secretaven menys uEVs/exosomes per unitat de volum d'orina que els individus controls. Aquesta reducció en el nombre d'uEVs secretats en els pacients podria ser artefactual degut al factor de normalització emprat per la quantificació (mL d'orina), ja que els pacients presenten una important poliúria i, per tant, els uEVs aïllats en valors absoluts –uEVs en orina de 24 h, per exemple– podria equiparar-se als dels individus control, o bé, com a conseqüència de la disfunció de les cèl·lules de la TAL. S'ha especulat que la retenció d'exosomes a les xarxes proteiques de THP podria ser una limitació per la internalització dels d'aquests amb les cèl·lules de les regions més distals de la nefrona⁴⁴⁷. Així doncs, en el cas que la disfunció de les cèl·lules de la TAL, comportés una menor secreció de THP (aspecte no estudiat fins el moment), es

podria traduir en una major disponibilitat dels exosomes per fusionar-se amb les cèl·lules de la porció distal i col·lectora de la nefrona i, en conseqüència, una menor quantitat d'aquests a l'orina. Tot i així, per confirmar o refutar aquesta hipòtesi, seria imprescindible determinar la quantitat de THP a les mostres d'orina, alhora que comprovar que, efectivament, els pacients excreten diàriament menys uEVs que els individus controls. També s'han descrit altres factors que influeixen en la quantitat d'uEVs alliberats i, possiblement, en el contingut d'aquests, com el moment de recollida de la mostra d'orina, l'alimentació i l'estat hormonal de l'individu, i la pràctica prèvia d'exercici físic³¹⁷. Tot i així, en aquest treball no s'han pogut considerar aquests factors ja que un augment en la restricció dels criteris d'inclusió, sumat a la baixa prevalença de la HFHNC, reduiria el nombre d'individus inclosos en l'estudi i en dificultaria l'execució.

En relació als *microarrays* dels miRNAs, una limitació important va ser la quantificació de l'RNA extret dels uEVs dels individus inclosos a la cohort d'estudi. En l'estudi previ realitzat per l'optimització i establiment del mètode, els RNAs extrets dels uEVs van mostrar perfils similars, enriquits en la fracció d'RNAs curts. No obstant, l'anàlisi de la mida de l'RNA extret dels uEVs de les mostres dels individus de la cohort d'estudi, no van resultar en perfils homogenis. La disparitat en els resultats obtinguts, tot i emprar diferents tècniques de quantificació de l'RNA (*Bioanalyzer Picochip* i *Bioanalyzer Small Kit*), va impossibilitar una quantificació precisa d'aquest. A més, cal mencionar que les recomanacions d'RNA necessari per l'ús de *microarrays*, rau entre els 130 ng – 1000 ng d'RNA total⁴⁵⁹. En general, els valors obtinguts de la quantificació de l'RNA d'uEVs evidenciaven la impossibilitat d'assolir les quantitats requerides. Per aquest motiu, i tenint en compte que s'havia definit que el contingut de miRNAs en mostres d'RNA de teixit humà es trobava entre el 0,5 i el 9 %⁴⁶⁰, es va estimar que la quantitat de miRNAs continguts en 130 ng d'RNA total era d'entre 0,65-5 ng; mentre que en 1000 ng d'RNA total, la quantitat de miRNA variava entre els 11,7 ng i els 90 ng. Amb aquestes valors i els obtinguts mitjançant el *Bioanalyzer Picochip* de les mostres d'RNA d'uEVs

–altament enriquit en miRNAs⁴⁶¹–, es va considerar factible la realització dels *microarrays* de miRNA.

El procés de normalització dels resultats d'expressió dels miRNAs mitjançant *microarrays*, tot i la incorporació d'*spike-ins* exògens, es va realitzar utilitzant el mètode RMA per recomanació de la unitat de bioestadística. Tot així, l'anàlisi de l'expressió dels *spike-ins* exògens afegits als *microarrays* van evidenciar que la variabilitat en la detecció dels *spike-ins* era inversament proporcional a la concentració d'aquests. Aquest fet podria ser degut a una imprecisió tècnica a l'hora d'addicionar-los a la mostra, o bé a una limitació en la sensibilitat de la pròpia tècnica que podria conferir una major dispersió de les dades.

En relació a la validació tècnica dels resultats per *microarray* mitjançant RT-qPCR, existeixen diversos treballs en els que les dades són normalitzades tant per *spike-ins* exògens^{462–464} com per snRNAs endògens^{310,363,465}. Tot i així, l'ús dels *spike-ins* exògens com a normalitzadors es va considerar inadequat ja que únicament reflectia la qualitat de la manipulació de la mostra, i no el contingut d'RNA en cadascuna de les mostres⁴⁶⁶. De la mateixa manera, es va descartar també l'ús de snRNAs (per exemple, l'RNU6) com a normalitzador endogen ja que, al tractar-se d'altres entitats diferents als miRNAs, tenen diferent biogènesi, processament, especificitat en el patró d'expressió i longitud, motiu pel qual el seu comportament en l'extracció, la retrotranscripció i l'amplificació per PCR podria divergir del dels miRNAs^{466–469}. Per totes aquestes raons, les dades de RT-qPCR es van normalitzar seguint la mateixa estratègia que amb els *microarrays*, mitjançant la normalització global. En general, l'expressió diferencial dels miRNAs analitzats per RT-qPCR van corroborar els resultats obtinguts per *microarrays*. No obstant, la pèrdua de significança estadística en els miRNAs miR-99-5p en la comparació pacients vs. control podria ser deguda a l'absència d'amplificació d'aquest miRNA en algunes de les mostres, el que va comportar un nombre inferior de rèpliques i, per tant, menys potència estadística. En aquest mateix sentit, a les comparacions pacients

vs. controls i pacients homozigots p.G20D *CLDN19* vs. controls, el miR-619-5p només es va poder quantificar en un individu control, el que va impossibilitar realitzar cap anàlisi estadística.

L'anàlisi bioinformàtica i bioestadística dels resultats dels *microarrays* va revelar la presència d'un gran nombre de miRNAs (n = 24) desregulats característics de la HFHNC (pacients vs. controls); no obstant, en la comparació pacients *CLDN19* homozigots p.G20D vs. controls, el número de miRNAs diferencialment expressats va ser molt superior (n = 43). Aquesta divergència, tot i tractar-se d'un subgrup de pacients inclosos en la primera comparació, podria ser deguda a la major homogeneïtat de la cohort, el que reduiria la variabilitat conseqüent al tipus de mutació (*splicing*, *frameshift*, *missense*, etc) i, conseqüentment, proporciona un sistema més sensible per la detecció de les diferències. No obstant, aquest augment en el nombre de miRNAs desregulats també podria ser un reflex de les conseqüències, a nivell cel·lular, de la pròpia mutació p.G20D al gen *CLDN19*, el que no seria pròpiament característic de la HFHNC. A continuació, es realitza una revisió de les dades descrites a la literatura d'alguns dels miRNAs diferencialment expressats identificats en aquest treball.

Pel que fa als miRNAs diferencialment expressats associats a la malaltia que han resultat més rellevants en els processos biològics estudiats i dels que hi ha informació a la literatura, en destaquen el miR-27b-3p, el miR-30b-5p, el miR-29a-3p i el miR-185-3p. La infraexpressió del miR-27b-3p havia estat prèviament relacionada amb processos fibròtics renals. Més concretament, en mostres de teixit renal de pacients amb diabetis mellitus tipus 2 (DM2), no només es va trobar infraexpressat, sinó que, juntament amb el miR-1288-3p, es va correlacionar amb un major grau de fibrosi renal en nefropatia diabètica⁴⁷⁰. De fet, el miR-27b-3p ha estat considerat com un potencial biomarcador circulant de la nefropatia associada a la DM2⁴⁷¹, així com de la retinopatia diabètica en la diabetis mellitus de tipus 1 (DM1)⁴⁷². També s'ha descrit que el miR-27b-3p, a través de la regulació de MMP13 –una metal·loproteasa que

degrada la matriu extracel·lular–, actua com a mediador de la fibrosi renal⁴⁷³. En mostres de teixit renal amb dany renal agut, la infraexpressió d'aquest miRNA, i la subsegüent sobreexpressió del receptor de la proteïna oncostatina-M (una citocina alliberada en processos inflamatoris crònics) ha mostrat disminuir la recuperació enfront el dany⁴⁷⁴. Així doncs, resulta evident la implicació del miR-27b-3p i, més concretament la seva infraexpressió, amb processos fibròtics renals, el que podria conduir a la disfunció renal dels pacients amb HFHNC. El fet que el miR-27b-3p també es trobi infraexpressat en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*, emfatitza la importància d'aquest miRNA en la fisiopatologia de la HFHNC.

El miR-30b-5p també ha estat relacionat amb malaltia renal. Més concretament, igual que en aquest treball, es va trobar infraexpressat en exosomes urinaris de pacients amb nefropatia diabètica per DM2 en comparació amb pacients amb malaltia renal crònica causada per altres patologies⁴⁷⁵, així com en models animals amb dany renal agut⁴⁷⁶. A més, tant en mostres de teixit de carcinoma renal com en models cel·lulars de la mateixa patologia, el miR-30b-5p es va trobar infraexpressat, promovent la proliferació, la invasió, la migració cel·lular i la transició epiteli-mesènquima⁴⁷⁷.

Els membres de la família dels miR-29 (miR-29a, -b i -c) es relacionen amb processos fibròtics en diferents òrgans, incloent el ronyó^{478–481}, indicació per la que s'ha suggerit com a potencial diana terapèutica⁴⁸². Concretament el miR-29a-3p, infraexpressat en els pacients afectes d'HFHNC i en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* segons els resultats obtinguts en aquest treball, s'ha trobat infraexpressat en plasma d'individus amb nefropatia diabètica per DM1⁴⁸³, així com en els túbuls renals (tot i que no a glomèrul) de rates hipertenses induïdes amb angiotensina-II⁴⁸⁴. A més, una disminució dels nivells sèrics del miR-29a-3p s'ha relacionat amb la severitat del dany renal agut⁴⁸⁵. De manera similar, s'ha descrit també que els nivells sèrics de miR-29a-3p (entre d'altres) eren significativament inferiors en pacients amb proteïnúria que posteriorment van perdre la funció renal, en comparació amb

aquells que van mantenir la funció renal estable durant el període de seguiment i amb els individus controls sense proteïnúria, determinant que el miR-29a-3p protegia contra la pèrdua de funció renal i era un marcador de pronòstic⁴⁸⁶. Tot i que al miR-29a-3p se li han atribuït funcions pro- i anti-fibròtiques, a través de la inhibició de la via TGF- β 1⁴⁸¹ i l'activació de la via PI3K/Akt⁴⁸⁷, respectivament, en un model animal diabètic i *knock-down* pel gen que codifica pel miR-29a, es va observar una disminució en l'expressió de la nefrina, que va desencadenar en proteïnúria, i un augment en els processos apoptòtics dels podòcits així com en la disfunció renal⁴⁸⁸. Tots aquests processos assignats al miR-29a-3p i les conseqüències de la seva infraexpressió podrien contribuir en la progressió de la malaltia renal en els pacients amb HFHNC.

El miR-185-3p, sobreexpressat en els pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* en comparació amb els controls, s'ha descrit com a inhibidor de la resposta inflammatòria i al dany per estrès oxidatiu. A més, la sobreexpressió d'aquest sembla millorar la funció renal en models murins de diabetis mellitus⁴⁸⁹. En base a aquests resultats previs, la sobreexpressió del miR-185-3p en el context de la HFHNC, podria ser un mecanisme compensatori desencadenat per la disfunció de les cèl·lules renals per evitar, tot i que sense èxit, el desencadenament de la nefritis túbul-intersticial.

En relació als miRNAs diferencialment expressats identificats entre els pacients amb progressió renal moderada i lenta, el miR-502-3p es també troba infraexpressat en teixit tumoral, tant en càncer renal de cèl·lula clara⁴⁹⁰, com de carcinoma papil·lar renal de tipus 1⁴⁹¹ en comparació amb teixit sa. Els miRNAs miR-502-3p i miR-500a-3p –tots dos infraexpressats en els pacients amb evolució renal moderada a la cohort d'estudi– semblen tenir efectes contraris en quant a l'activació de la via STAT3: mentre que el miR-502-3p inhibeix la proliferació, migració i invasió de cèl·lules de carcinoma hepatocel·lular, i n'augmenta l'apoptosi de les mateixes, mitjançant la inhibició de la via STAT3⁴⁹², el miR-500a-3p regula positivament la via JAK/STAT3⁴⁹³. A més, en pacients amb necrosi tubular aguda induïda, en comparació amb el teixit renal normal,

el miR-500a-3p també es va trobar infraexpressat⁴⁹⁴, el que suggereix la implicació d'aquest miRNA en processos histopatològics no desitjats i que podrien estar involucrats en el pitjor pronòstic renal de la HFHNC.

Pel que fa als miRNAs infraexpressats entre els pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* amb progressió renal moderada vs. lenta, s'ha descrit que el miR-20a-5p també s'infraexpressa sota condicions d'hipòxia, tant en models murins^{495,496} com cel·lulars⁴⁹⁵. El miR-17-5p, secretat a través d'exosomes per línies cel·lulars de càncer renal⁴⁹⁷, s'ha identificat una menor expressió en sèrum de pacients amb CKD, en comparació amb individus sense disfunció renal⁴⁹⁸. Cal mencionar que aquest miRNA està codificat per un clúster de miRNAs anomenat miR-17/92, que està altament relacionat amb el desenvolupament renal⁴⁹⁹, el que no descarta que, durant el desenvolupament, la regulació epigenètica tingui un paper crucial en el pronòstic de la HFHNC, tot i que es requereix d'estudis més complexes per determinar-ho. Per últim, el miR-106a-5p s'ha identificat infraexpressat en pacients amb CKD⁴⁹⁸, en teixit renal i models cel·lulars de càncer renal⁵⁰⁰, en un model animal de PQRAD, modulant la formació dels quists⁵⁰¹, i en pacients amb glomerulonefritis proliferativa mesangial en comparació tant al grup control (individus sans) com als pacients amb nefropatia membranosa⁵⁰². Aquestes dades atribueixen al miR-106a-5p una possible implicació en processos que podrien estar relacionats amb la fisiopatologia renal de la HFHNC.

Degut a la manca de coneixement i de bases de dades que proporcionin informació sobre les vies metabòliques en les que un determinat miRNA es troba implicat sense fer el pas de la identificació dels seus mRNAs diana, en aquest treball es van identificar les molècules diana de cadascun dels miRNAs a partir de bases de dades amb informació sobre la relació miRNA-mRNA validada experimentalment. Els mRNAs diana dels miRNAs diferencialment expressats en cadascuna de les comparacions estudiades es van analitzar utilitzant tècniques de biologia de sistemes amb l'ús d'intel·ligència artificial. Inicialment, es va generar un model *in silico* de la HFHNC a través de la

descripció molecular de diversos processos biològics relacionats amb la malaltia d'estudi: estrès de RE, TJ, cristal·lització i BMPs, nefrocalcinosi, nefritis túbul-intersticial, fibrosi renal, acidosi tubular distal, metabolisme de la vitamina D i transport de Mg^{2+} i Ca^{2+} . Posteriorment, es va utilitzar aquest model per estimar el grau d'implicació de cada mRNA/proteïna diana dels miRNAs diferencialment expressats en cadascun d'aquests processos biològics, obtenint així un p-valor estimat associat al grau d'associació de cada proteïna en cada procés biològic. És important mencionar que aquesta estratègia permet, no només evidenciar les relacions proteiques ja conegudes, sinó també identificar noves possibles associacions entre proteïnes i processos biològics³⁹⁶. Un dels inconvenients de treballar amb miRNAs és que, tot i que, en general, regulen negativament l'expressió gènica, el fet que un mateix mRNA estigui regulat per diferents miRNAs, que poden estar sobreexpressats o infraexpressats, impedeix conèixer l'efecte final sobre un determinat gen. És per això que resulta difícil determinar en quin sentit (activació o repressió) es troben desregulades les vies metabòliques o els processos biològics.

Els resultats obtinguts van mostrar una alta similitud en el nombre de proteïnes diana dels miRNAs desregulats en els pacients i en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* (comparats amb el grup control) associades a cadascun dels processos biològics (p-valor < 0,05), essent el transport de Mg^{2+} i Ca^{2+} i la fibrosi renal els més representats. L'alta implicació de les proteïnes diana dels miRNAs en aquests processos biològics resulta coherent ja que s'ha descrit que els pacients amb HFHNC desenvolupen fibrosi renal¹⁹⁴, alhora que presenten una desregulació de l'homeòstasi del Mg^{2+} i Ca^{2+} ¹⁷⁵. Cal mencionar, però, que per les raons mencionats prèviament que podrien explicar l'augment en el nombre de miRNAs desregulats en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*, hagués estat raonable una major implicació de les proteïnes en estrès de RE (en comparació amb la comparació pacients vs. controls), ja que el defecte primari que provoca aquesta mutació és la retenció de la proteïna a RE, fet que pot desencadenar estrès de RE⁵⁰³, mentre que en la cohort sencera de pacients, hi ha altres

mutacions amb altres conseqüències a nivell proteic. Mentre que el nombre de proteïnes diana dels miRNAs diferencialment expressats entre pacients amb progressió renal moderada i lenta, va mostrar una alta proporció d'aquestes involucrades en el transport de Mg^{2+} i Ca^{2+} , la fibrosi renal i l'estrès de RE, aquest mateix anàlisi realitzat amb el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* va resultar en una dràstica reducció en la proporció de proteïnes relacionades amb l'estrès de RE, i un augment dels altres dos processos biològics mencionats. El fet que el subgrup de pacients estudiats presentessin, en conjunt, una major homogeneïtat genotípica, suggereix que els canvis que s'observen podrien ser més robustos que en l'estudi de la totalitat de la cohort, on la variabilitat interpersonal és major, aspecte que recolzat per l'augment en el nombre de miRNAs desregulats i de proteïnes regulades per aquests altament relacionades amb cada procés biològic. No obstant, aquests canvis, poden ser deguts, com s'ha mencionat prèviament, a conseqüències cel·lulars específiques de la mutació p.G20D a *CLDN19*.

A continuació, es detallen algunes de les proteïnes diana del miRNAs diferencialment expressats i amb una implicació significativa amb els processos biològics relacionats amb la fisiopatologia de la HFHNC i la possible relació amb aquesta.

Al procés biològic "estrès de RE", hi trobem la proteïna PPP3R1 (*Calcineurin subunit B type 1*, CNB), diana de miRNAs infraexpressats en pacients amb HFHNC (i el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*) i sobreexpressats en els pacients amb progressió renal moderada, tot i que en el subgrup d'individus homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* regulada en ambdós sentits. S'ha descrit que la CNB actua per restaurar l'homeòstasi del RE immediatament després de l'inici de l'estrès de RE⁵⁰⁴. Per altra banda, un estudi va associar un augment de CNB (entre d'altres) –conseqüents a la deficiència de miRNAs de la família miR-30– amb dany als podòcits⁵⁰⁵, el que podria desencadenar un dany renal global. Per altra banda, la proteïna XBP1 (*X-box-binding protein 1*), regulada positivament en els pacients afectes d'HFHNC

i en aquells amb progressió renal moderada, és un factor de transcripció que s'activa i actua com a resposta adaptativa a l'estrès de RE, contribuint en la degradació o el plegament de proteïnes acumulades al RE⁵⁰⁶. La regulació positiva de proteïnes implicades en mitigar l'estrès de RE en pacients, en comparació amb els controls, podria reflectir la presència d'un estrès de RE en les cèl·lules renals i, per tant, podria ser una font, no només de biomarcadors, sinó també de dianes terapèutiques. La regulació negativa de la CNB en els pacients amb progressió renal moderada (i positiva en els pacients amb progressió renal lenta) podria ser conseqüència de la incapacitat d'activar aquesta via restauradora i, per tant, contribuir a una pitjor evolució de la malaltia.

La proteïna GPR37 (*Prostanoid receptor GPR37*), regulada positivament en els pacients amb HFHNC, es va associar amb l'estrès de RE, tot i que no existeixin referències bibliogràfiques al respecte. No obstant, s'ha descrit la seva presència a les cèl·lules del túbul proximal, on desenvolupa un paper, encara desconegut, en la reabsorció de Na⁺⁵⁰⁷. En el cas de la HFHNC, podria actuar com a mecanisme conseqüent a la desregulació en la reabsorció de soluts a les regions distals de la nefrona i a la subsegüent incapacitat de generar el gradient intersticial de Na⁺, imprescindible pel procés de concentració de l'orina i que es troba alterat en els pacients amb HFHNC.

SIAH1 (*E3 ubiquitin-protein ligase SIAH1*), com el seu nom indica, és una E3 ubiquitina lligasa, que s'ha identificat regulada positivament en els pacients afectes d'HFHNC (i en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*), així com en pacients de sexe masculí. SIAH1 actua sobre la proteïna HIPK2 (*homeodomain-interacting-protein kinase 2*), que és un regulador positiu de la fibrosi renal⁵⁰⁸, i la inhibició d'aquesta podria mitigar la progressió de la fibrosi renal⁵⁰⁹. Així doncs, tot i l'absència d'implicació en processos relacionats amb l'estrès de RE, SIAH1 té un paper repressor de la fibrosi renal, que podria explicar la menor severitat en la progressió de la malaltia renal en els pacients de sexe masculí respecte les dones. No obstant,

resulta sorprenent que en els pacients afectes d'HFHNC es trobi regulada positivament, podent-se tractar d'un intent de reduir el procés fibròtic altament actiu en els pacients.

El factor de transcripció AP1, codificat pel gen *JUN*, s'ha trobat regulat positivament en els pacients afectes d'HFHNC (mentre que en el subgrup d'homozigots p.G20D es troba regulat en ambdós sentits), així com en els pacients homozigots p.G20D amb progressió renal moderada. AP1 està implicat tant en estrès de RE –essent un factor necessari per la inducció de l'estrès de RE i que s'estimula per presència d'aquest, generant una retroalimentació positiva⁵¹⁰– com en la nefritis túbul-intersticial. En relació a aquest últim procés, AP1, juntament amb altres proteïnes, activen la transcripció en resposta de l'estimulació per TGF- β ⁵¹¹, considerada una citocina anti-inflamatòria durant els processos de reparació del dany renal, i un element clau en la regulació de la inflamació renal, amb un paper pro-fibròtic⁵¹². De fet, recentment, s'han correlacionat positivament els elevats nivells de TGF- β , i l'activació renal de la via mediada pel mateix, amb la severitat de la CKD⁵¹³. AP1 –juntament amb NF- κ B– han estat postulades com a biomarcadors de la progressió de la malaltia renal⁵¹⁴. En la mateixa direcció, els resultats obtinguts en aquest treball mostraren una regulació positiva de NFKB1 (subunitat p50 de NF- κ B) –relacionada amb la nefritis túbul-intersticial i amb la fibrosi renal– en els pacients amb HFHNC, tant globalment com en el subgrup d'homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. La via de senyalització NF- κ B és el mecanisme principal que desencadena la inflamació i la fibrosi renal a través de la regulació de citocines inflamatòries, molècules d'adhesió i enzims pro-inflamatoris^{515,516}. Dins de la família de proteïnes NF- κ B, hi ha la proteïna RelA⁵¹⁵, també regulada positivament en els pacients amb HFHNC i, en ambdós sentits, en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*. Globalment, aquestes dades suggereixen el paper rellevant dels miRNAs en el l'evident procés inflamatori renal present en els pacients amb HFHNC. Addicionalment, la regulació positiva d'IL-6 en els pacients amb progressió renal moderada (així com en el total de pacients) podria desencadenar l'activació indirecta de la via

NF- κ B⁵¹⁷, contribuint així a una major nefritis túbul-intersticial i, en conseqüència, a un pitjor pronòstic de la malaltia renal.

Pel que fa a les proteïnes relacionades amb la fibrosi renal, més enllà de la ja mencionada NF- κ B, hi trobem també la β -catenina (codificada pel gen *CTNNB1*), implicada en la via de senyalització Wnt/ β -catenina. Aquesta via es relaciona amb el desenvolupament d'òrgans, l'homeòstasi dels teixits i la reparació del dany tissular, i es troba activada en una gran varietat de malalties renals. Malgrat existeixen dades que li atribueixen un paper promotor de la reparació del dany renal, les evidències que la via Wnt/ β -catenina s'associa amb el desenvolupament de lesions fibròtiques renals són creixents⁵¹⁸. Així doncs, la regulació positiva de la β -catenina en els pacients afectes d'HFHNC, i en aquells homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* amb evolució renal moderada, podria correlacionar amb el grau de fibrosi renal, en cas que aquesta fos superior que els pacients amb una progressió renal lenta (dada no descrita).

Una altra proteïna relacionada amb la fibrosi renal és el TGF- α (l·ligand d'EGFR), els nivells de la qual augmenten enfront el dany renal⁵¹⁹. En un model animal, es va observar aquest augment després d'una reducció en el nombre de nefrones i previ al desenvolupament de fibrosi renal⁵²⁰. La regulació positiva del TGF- α en els pacients amb HFHNC podria estar relacionada amb el dany renal crònic present, així com amb el procés fibròtic adjacent. Per aquest motiu, la detecció de TGF- α a l'orina⁵²¹ podria ser útil per l'estudi d'aquesta molècula com a putatiu biomarcador diagnòstic no invasiu de la HFHNC.

La glicoproteïna CD44, regulada positivament en els pacients amb HFHNC, tot i que en el subgrup d'homozigots per la mutació p.G20D està regulada en ambdós sentits, es relaciona tant en el procés de fibrosi renal com en el de cristal·lització i BMPs. La CD44 s'expressa únicament en el context de dany renal i, essent també un l·ligand d'EGFR, entre d'altres, es troba implicada en el procés fibròtic⁵²². Per altra banda, CD44, en cèl·lules en proliferació, s'expressa a la membrana apical, on té capacitat de captar i adherir cristalls d'oxalat càlcic a la superfície cel·lular⁵²³. Tot i que a l'epiteli intacte i diferenciat (no proliferant) no

s'hi haurien de poder adherir cristalls, podria succeir que, enfront el dany renal i un intent de reparar-lo, les cèl·lules tubulars proliferessin i, per tant, adquirissin la capacitat de dipositar cristalls d'oxalat càlcic. A més, cal tenir present que, durant el desenvolupament renal, aquest procés també podria produir-se, contribuint al desenvolupament de la nefrocalcinosi, ja és present des del moment del diagnòstic. En relació a aquest mateix procés biològic –i també a la nefrocalcinosi–, s'ha identificat la quimiocina CCL2 regulada positivament en els pacients amb HFHNC, així com en aquells homozigots per la mutació p.G20D amb progressió renal moderada. CCL2 és un potent factor quimiotàctic per monòcits en processos inflamatoris i de dany tissular⁵²³. L'expressió de CCL2 a les cèl·lules epitelials renals en resposta a l'exposició a oxalat i a cristalls d'oxalat càlcic indica l'existència d'una estreta relació entre el procés inflamatori i la nefrolitiasi⁵²⁴. De fet, s'ha descrit que els pacients amb hiperoxalúria primària de tipus 1 –una malaltia renal caracteritzada per la producció excessiva d'oxalat i amb nefrolitiasis recurrents– secreten una major quantitat de CCL2 a l'orina que els individus control⁵²⁵. En els pacients amb HFHNC, l'expressió elevada de CCL2 podria produir-se en resposta als dipòsits de calci propis de la nefrocalcinosi (present en el 100 % de pacients) i contribuir així a la nefritis túbul-intersticial que desencadena en fibrosi renal.

Resulta inevitable destacar l'alta implicació de la fibronectina-1 (FN1) en 3 dels processos biològics estudiats: Cristal·lització i BMPs, nefrocalcinosi i fibrosi renal. La fibronectina-1 és una proteïna que es secreta i acumula a l'interstici renal en conseqüència de la fibrosi⁵²², essencial per la mineralització dels osteoblasts⁵²⁶ i considerada un inhibidor de la formació de cristalls d'oxalat càlcic ja que n'impedeix l'adhesió i l'endocitosi d'aquests a les cèl·lules tubulars⁵²⁷. Així doncs, la regulació positiva de la FN1 en els individus afectes d'HFHNC podria ser una conseqüència directa del procés de fibrosi renal que es troba actiu constitutivament en aquests pacients.

En l'anàlisi per biologia de sistemes de l'expressió diferencial de miRNAs en uEVs realitzat també es van identificar proteïnes relacionades amb les unions

cel·lulars, més concretament de les TJ, defecte primari de la HFHNC. Entre aquestes, hi ha la TJP1 o ZO-1, que és un component d'aquestes estructures i actua com a proteïna adaptadora d'unió al citoesquelet. La interacció directa amb, almenys, la claudina-16, i la presència d'una variant patogènica en aquesta que impedeix la interacció amb ZO-1 posa de manifest la importància de la complexa estructura de les TJ pel seu correcte funcionament¹⁴⁸. La regulació positiva de la ZO-1 en els pacients amb HFHNC amb progressió renal moderada (en el global de pacients i en aquells homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*) podria tractar-se d'un intent de restaurar les TJ alterades per l'absència de claudina-16 o -19 funcionals. De manera anàloga, la regulació positiva de la ja mencionada β -catenina, podria tenir el mateix efecte en aquest procés.

D'entre les proteïnes altament relacionades amb el procés biològic "metabolisme de la vitamina D", per moltes d'elles, com la YAP1 (*yes-associated protein 1*) i SNCA (*α -sinuclein*), regulades positivament en els pacients amb HFHNC i en aquells homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* amb progressió renal moderada, no existeixen dades que les relacionin amb aquest procés biològic, sinó amb la recuperació enfront el dany renal i la fibrosi renal, respectivament^{528,529}. No obstant, la proteïna STAT1, regulada positivament en els pacients amb HFHNC, però negativament en aquells homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*, s'ha observat que interacciona amb el receptor de la vitamina D⁵³⁰ i que un augment en l'activitat d'STAT1 sembla tenir un efecte negatiu en la funció renal⁵³¹. La contrarietat en la regulació d'aquesta proteïna en el global de pacients estudiats i en el subgrup homogeni genèticament, posa de manifest la necessitat d'un estudi més detallat i profund dels nivells i l'activitat funcional d'STAT1 en aquests individus.

De manera similar al procés biològic recentment mencionat, en l'acidosi tubular distal, per la majoria de les proteïnes, com la EIF4G1 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 1*) –relacionada amb l'estrès de RE⁵³²–, i TBC1D15 (*TBC1 Domain Family Member 15*) –involucrada en el transport

endosomal⁵³³–, no s’han relacionat amb l’acidosi tubular distal. No obstant, s’ha descrit que la deficiència de ATG5 (*Autophagy protein 5*) desencadena una acidosi metabòlica severa degut a una alteració en l’estructura i la funció mitocondrial –òrganul indispensable per l’aminogènesi–⁵³⁴. En els pacients afectes d’HFHNC, aquesta proteïna es troba regulada positivament, el que podria tractar-se d’un mecanisme compensatori enfront l’acidosi renal distal incompleta que manifesten alguns dels pacients. Pel que fa a la proteïna RAB11A, associada a l’acidosi tubular distal i regulada positivament a la HFHNC i als pacients amb progressió renal moderada, s’ha co-localitzat amb els transportadors de Ca^{2+} TRPV5 i TRPV6 en vesícules intracel·lulars properes a la membrana plasmàtica modulant negativament la presència d’aquests a la membrana cel·lular i disminuint-ne la reabsorció cel·lular de Ca^{2+} ⁵³⁵. Així doncs, la regulació negativa de RAB11A en els pacients amb progressió renal lenta podria traduir-se en un augment en la presència de TRPV5 i TRPV6 a la membrana plasmàtica de les cèl·lules del túbul distal i, per tant, esser un mecanisme compensatori per intentar reduir la pèrdua urinària massiva de Ca^{2+} . De fet, un efecte compensatori similar ja s’havia observat en models animals *knock-down* pel gen *Cldn16*, en els que es va detectar un augment en l’expressió de TRPV5 i altres transportadors de Ca^{2+} i Mg^{2+} ⁴⁴³. Seguint amb les proteïnes altament relacionades amb el transport d’aquests dos cations divalents, i amb la mateixa hipòtesi de tractar-se de mecanismes compensatoris enfront la pèrdua urinària massiva de Ca^{2+} i Mg^{2+} , s’han identificat positivament regulats els gens relacionats amb el transport de Mg^{2+} –mutacions en els quals desencadenen hipomagnesèmia– *SLC41A3* (*Solute Carrier Family 41 Member 3*), altament expressat a TCD⁵³⁶, el *FAM111A* (*family with sequence similarity 111 member A*), del que es desconeix la funció⁵³⁷, i *MAGT1* (*Magnesium Transporter 1*), que és un transportador de Mg^{2+} que s’expressa de manera ubiqua¹⁰⁰. Un altre transportador, en aquest cas de Ca^{2+} , positivament regulat en els pacients amb HFHNC és el *SLC4A4* (*Solute Carrier Family 4 Member 4*). Aquest canal s’ha relacionat amb el transport de Ca^{2+} durant la mineralització de l’enamel⁵³⁸. Resulta important destacar aquesta regulació ja que s’han descrit

casos d'HFHNC amb malformacions a l'ename¹⁵³ i, tot i que el context d'aquest treball és a nivell renal, podria ser interessant estudiar l'estat del miR-30b-5p (el miRNA que regula SLC4A4) a nivell sistèmic o, directament els nivells d'expressió del propi gen a nivell tissular. Altres transportadors inicialment relacionats amb el transport de Ca^{2+} i Mg^{2+} i regulats positivament en els pacients amb HFHNC, tot i que a la literatura es relacionin amb altres processos, són el SLC4A1 (*solute carrier family 4 member 1*), el ATP6V1G2 (*ATPase H⁺ Transporting V1 Subunit G2*) i el ATP2B4 (*ATPase Plasma Membrane Ca²⁺ Transporting 4* o PMCA4). Més concretament, el SLC4A1 i ATP6V1G2 estan implicats en el metabolisme àcid-base i es podrien relacionar més directament amb l'acidosi tubular distal^{539,540}, mentre que el PMCA4 que, en efecte, és un transportador basolateral de Ca^{2+} expressat a TCD, podria estar altament relacionat amb la nefrocalcinosi, ja que extreu el Ca^{2+} intracel·lular a l'interstici renal⁵⁴¹. Per últim, destacar la regulació negativa de la CLDN4 (claudina-14), que s'expressa a túbul distal i col·lector, en els pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19* i, més concretament, en aquells amb una progressió de la malaltia renal més severa. Aquest esdeveniment podria ser una conseqüència directa de la desestructuració de l'epiteli tubular degut a la fibrosi renal i, en conseqüència, un factor de mal pronòstic renal.

Les dades generades a partir de l'anàlisi de l'expressió diferencial dels miRNAs continguts en els uEVs de 20 pacients afectes d'HFHNC (i 6 individus controls) poden explicar, parcialment, no només la fisiopatologia de la malaltia, sinó també aquelles vies de senyalització cel·lular i processos biològics que podrien participar en la divergència fenotípica dels pacients amb HFHNC, inclús entre aquells que comparteixen la mutació causant de la malaltia p.G20D a *CLDN19*. Així doncs, aquestes dades podrien ser l'inici per la identificació de biomarcadors de pronòstic de la HFHNC, així com per proporcionar noves dianes terapèutiques que permetin modular la severitat de la malaltia i, en el millor dels casos, curar-la.

Resulta imprescindible relacionar els resultats obtinguts en l'estudi de gens modificadors del fenotip amb els gens diana dels miRNAs diferencialment expressats en funció de la progressió de la malaltia renal. En aquest sentit, en destaquen els gens *RBM12B* i *ARHGEF18*, pels que l'al·lel de referència en homozigosi de 2 SNVs es van associar a una progressió renal més lenta en el total de pacients, i 1 amb la progressió més ràpida de la malaltia renal en el subgrup de pacients homozigots per la mutació p.G20D a *CLDN19*; i que en l'anàlisi d'expressió de miRNAs d'uEVs es van trobar regulats positivament en els pacients amb progressió renal moderada i altament implicats en algun procés biològic característic de la HFHNC. Tot i que, els grups de pacients comparats en ambdues aproximacions (genètica i epigenètica) no són exactament els mateixos, ja que el grup de progressió ràpida va ser exclòs de l'anàlisi d'expressió de miRNAs d'uEVs, la convergència dels resultats obtinguts podrien suggerir una relació entre la variant gènica i la regulació epigenètica de l'expressió d'aquests gens. No obstant, en cap dels 2 gens, les seqüències MRE reconegudes pels miRNAs diferencialment expressats que els regulen, coincideixen amb la localització de la variant gènica identificada⁵⁴², pel que, *a priori*, no sembla haver-hi cap associació entre les dades obtingudes mitjançant les dues estratègies complementàries.

És important mencionar que aquest treball no està exempt de limitacions. La naturalesa de l'estudi (retrospectiu i multicèntric) limita la disponibilitat total de les dades dels pacients i que explica la manca d'informació d'alguns d'ells, així com el baix nombre d'individus inclosos a la cohort degut a la baixa prevalença de la malaltia. No obstant, és important esmentar que aquesta cohort inclou la majoria de pacients espanyols amb coneixement de diagnòstic d'HFHNC. Per altra banda, com s'ha mencionat prèviament, el tipus d'anàlisi bioestadística realitzat amb les dades obtingudes de la seqüenciació dels exomes es podria considerar una primera aproximació, doncs es requereix una anàlisi més detallada, en la que es contemplin les variants en heterozigosi i la

combinació de diverses variants gèniques. És a dir, que el que determini el fenotip renal no sigui un únic SNV en un gen, sinó que sigui un haplotip compost per diverses variants gèniques –possiblement en heterozigosi– les que estiguin associades a un fenotip renal concret. Pel que fa l'estudi d'expressió dels miRNAs d'uEVs, l'absència de pacients amb progressió renal ràpida amb els ronyons nadius funcionals i, per tant, de mostres d'orina vàlides per aquest anàlisi, impedeix la identificació de factors epigenètics associats a un pronòstic renal més sever. Per altra banda, els uEVs, tot i ser possiblement la millor font no invasiva d'informació dels processos renals, són producte de l'activitat cel·lular del conjunt de cèl·lules renals, així com de la resta de constituents de l'aparell urinari. Per aquest motiu, no és possible conèixer l'origen dels uEVs –i, per tant, del seu contingut–, essent un possible biaix no controlat en l'estudi. Per finalitzar, és important destacar que treballar amb miRNAs, tot i que l'estudi d'aquests ha augmentat molt en els últims anys, complica substancialment l'anàlisi de les dades, ja que la identificació dels mRNAs diana d'aquests és possiblement, en alguns casos, poc acurada.

Pel que fa la translació de les dades obtingudes en aquesta tesi a la pràctica clínica, és cert que, amb les eines terapèutiques actualment disponibles, identificar els pacients afectes d'HFHNC que progressaran més o menys ràpidament cap a la fallida renal, és quelcom important, però insuficient per introduir un canvi en el seguiment dels pacients. No obstant, aquest treball proporciona, no només eines per estratificar els pacients, sinó que també un augment en el coneixement de la fisiopatologia i possibles dianes terapèutiques. Concretament, l'estudi dels gens modificadors del fenotip, a més de permetre identificar biomarcadors genètics de pronòstic, permet determinar els processos implicats en la divergència fenotípica. Més enllà de considerar els gens on es localitzen les SNVs com a dianes terapèutiques, amb l'estudi dels mecanismes cel·lulars i biològics en que les variants en aquests gens incideixen en la progressió de la malaltia, es podrien identificar altres molècules

downstream d'aquests amb una acció més directa i focalitzada en la modulació del fenotip renal. Per altra banda, la identificació, mitjançant l'estudi dels factors epigenètics, dels mecanismes fisiopatogènics –desconeguts fins el moment– i les seves implicacions en l'evolució de la malaltia són d'especial rellevància a l'hora de d'incrementar el coneixement de la HFHNC i, per tant, cercar dianes terapèutiques curatives, i no pal·liatives o de suport. Es podria deduir que els mecanismes que involucren el transport de Ca^{2+} i Mg^{2+} (i possiblement d'altres ions) i l'equilibri àcid-base podrien ser esdeveniments adaptatius o compensatoris per tal de minimitzar la pèrdua urinària d'ambdós cations i, per tant, mecanismes de caire protector, pel que possiblement, l'objectiu d'una teràpia amb aquestes dianes hauria de consistir en una estimulació d'aquests i no un bloqueig farmacològic. No obstant, els mecanismes fisiopatològics identificats i relacionats amb la fibrosi renal, la cristal·lització i la disfunció de les TJ com a tal, amb les seves conseqüències en la senyalització i polarització cel·lular, es podrien interpretar com a mecanismes fisiopatogènics de lesió renal, essent processos biològics amb potencial com a diana terapèutica.

Per últim, esmentar que el treball presentat en aquesta tesi configura l'inici de l'estudi de la HFHNC i que, és imprescindible validar els resultats obtinguts dels pacients inclosos en aquesta primera cohort de descobriment en una de nova i independent. Pel que fa a les variants gèniques moduladores del fenotip, seria interessant determinar si les hipòtesis establertes a partir dels resultats obtinguts són certes i estudiar els mecanismes subjacents pels que aquestes variants gèniques podrien modificar el curs de la malaltia renal. A més, també resultaria adient realitzar un estudi longitudinal dels nivells d'expressió dels miRNAs d'uEVs en els pacients inclosos en la primera cohort d'estudi per tal de confirmar que les troballes són mantingudes en el temps i no conseqüència d'altres factors presents en l'individu en el moment de la recollida de l'orina en l'estudi. A més, per tal de realitzar una translació de l'ús dels miRNAs dels uEVs com a biomarcadors de la malaltia i de la progressió d'aquesta d'aquests

resultats a la pràctica clínica, és indispensable optimitzar una tècnica més ràpida, directa i senzilla per aïllar els uEVs i determinar els nivells d'expressió dels possibles biomarcadors. En paral·lel, també pot ser interessant generar un model cel·lular (o inclús, animal) de la HFHNC amb la finalitat, no només de corroborar algunes de les troballes identificades en les mostres biològiques, sinó per testar fàrmacs que poguessin corregir alguns defectes cel·lulars conseqüents al defecte de la claudina-16 o -19 i, per tant, modular d'alguna manera l'evolució de la malaltia i, en el millor dels casos, curar-la.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Les principals conclusions derivades del treball descrit en aquesta tesi són:

1. La cohort d'estudi corrobora la variabilitat en la progressió de la malaltia renal en els pacients amb HFHNC.
2. Per primera vegada, en aquest treball s'han observat que els nivells de PTH sèrica al diagnòstic clínic correlaciona amb una pitjor evolució de la malaltia renal i, per tant, podria ser un biomarcador pronòstic.
3. No hi ha relació entre la severitat de les afectacions renals i la presència d'anomalies oculars en els pacients amb mutacions al gen *CLDN19*.
4. La seqüenciació dels exomes dels pacients afectes d'HFHNC ha permès identificar 45 SNVs en homozigosi associades amb la progressió ràpida o lenta de la malaltia renal. D'entre aquestes, per la funció fisiològica dels gens on es localitzen, en destaquen la rs11207827 (a *PATJ*) i la rs1050171 (a *EGFR*).
5. El mètode per l'aïllament d'uEVs establert mitjançant centrifugació diferencial és eficient i el perfil de miRNAs continguts és independent al mètode d'extracció d'RNA.
6. Aparentment, els pacients afectes d'HFHNC secreten menys uEVs que els individus control.
7. Les dades generades a partir de l'anàlisi de l'expressió diferencial dels miRNAs continguts als uEVs de pacients afectes d'HFHNC i controls poden explicar, parcialment, la fisiopatologia de la malaltia així com determinar les vies de senyalització cel·lular i processos biològics que podrien participar en la divergència fenotípica dels pacients amb HFHNC, inclús entre aquells que comparteixen la mutació causant de la malaltia p.G20D a *CLDN19*.

8. L'anàlisi per biologia de sistemes, ha permès determinar que la fibrosi renal, el transport de Ca^{2+} i Mg^{2+} i, en menys mesura, l'estrès de RE i l'acidosi tubular distal són els processos biològics en els que els mRNAs diana dels miRNAs diferencialment expressats hi tenen un major implicació.
9. Les dades obtingudes en aquest treball permetran identificar biomarcadors de progressió de la HFHNC, així com noves dianes terapèutiques per modular la severitat de la malaltia i, en el millor dels casos, curar-la.

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

1. Amerman EC. The Urinary System. In: *Human Anatomy & Physiology*. 2nd ed. Pearson; 2014.
2. Eaton DC, Pooler J. *Vander's Renal Physiology*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2013.
3. Aragoncillo Saúco I, Barat Cascante A, Cannata Ortiz PJ, et al. *Manual CTO de Medicina y Cirugía: Nefrología*. 10th ed. Madrid: CTO EDITORIAL; 2018.
4. Pannabecker TL. Structure and function of the thin limbs of the loop of henle. *Compr Physiol*. 2012;2(3):2063-2086. doi:10.1002/cphy.c110019
5. Mount DB. Thick ascending limb of the loop of henle. *J Am Soc Nephrol*. 2014;9(11):1974-1986. doi:10.2215/CJN.04480413
6. Turner N, Lamrre N, Goldsmith DJ, Winearls CG, Himmelfarb J, Remuzzi G. *Clinical Nephrology*. Vol 1. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2016.
7. Curthoys NP, Moe OW. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(9):1627-1638. doi:10.2215/CJN.10391012
8. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
9. Collazo R, Fan L, Hu MC, Zhao H, Wiederkehr MR, Moe OW. Acute regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis. *J Biol Chem*. 2000;275(41):31601-31608. doi:10.1074/jbc.M000600200
10. Pan W, Borovac J, Spicer Z, et al. The epithelial sodium/proton exchanger, NHE3, is necessary for renal and intestinal calcium (re)absorption. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2012;302(8):943-956. doi:10.1152/ajprenal.00504.2010
11. Feehally J, Floege J, Tonelli M, Johnson R. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 6th ed. Elsevier Inc.; 2018.
12. Betts JG, Desaix P, Johnson E, et al. *Anatomy and Physiology*. Houston, Texas: OpenStax; 2017.
13. Imai M, Tsuruoka S, Yoshitomi K, Taniguchi J, Suzuki M, Muto S. Morphological and functional heterogeneity of the thick ascending limb of Henle's loop. *Clin Exp Nephrol*. 1999;3(1):9-17. doi:10.1007/s101570050002
14. Allen F, Tisher CC. Morphology of the ascending thick limb of Henle. *Kidney Int*. 1976;9(1):8-22. doi:10.1038/ki.1976.2
15. Tsuruoka S, Koseki C, Muto S, Tabei K, Imai M. Axial heterogeneity of potassium transport across hamster thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1994;267(1 36-1).
16. Yoshitomi K, Kondo Y, Imai M. Evidence for conductive Cl⁻ pathways across the cell membranes of the thin ascending limb of Henle's loop. *J Clin Invest*. 1988;82(3):866-871. doi:10.1172/JCI113691
17. Jung JY, Song JH, Li C, et al. Expression of epidermal growth factor in the developing rat kidney. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2005;288(1 57-1):227-235. doi:10.1152/ajprenal.00058.2004
18. Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA, Knepper MA. Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1998;275(6 44-6):885-893.
19. Lake BB, Chen S, Hoshi M, et al. A single-nucleus RNA-sequencing pipeline to decipher the molecular anatomy and pathophysiology of human kidneys. *Nat Commun*. 2019;10(1):1-

15. doi:10.1038/s41467-019-10861-2
20. Zacchia M, Capolongo G, Rinaldi L, Capasso G. The importance of the thick ascending limb of Henle ' s loop in renal physiology and pathophysiology. *Int J Nephrol Renov Dis* 2018; 2018;11:81-92.
21. Bankir L, Figueres L, Prot-Bertoye C, et al. Medullary and Cortical Thick Ascending Limb: Similarities and Differences. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2020;318(2):422-442. doi:10.1152/ajprenal.00261.2019
22. Carota I, Theilig F, Oppermann M, et al. Localization and functional characterization of the human NKCC2 isoforms. *Acta Physiol*. 2010;199(3):327-337. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02099.x
23. Hebert SC, Mount DB, Gamba G. Molecular physiology of cation-coupled Cl cotransport: the SLC12 family. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2004;447(5):580-593. doi:10.1007/s00424-003-1066-3
24. Giménez I, Isenring P, Forbush B. Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions. *J Biol Chem*. 2002;277(11):8767-8771. doi:10.1074/jbc.C200021200
25. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, Di Pietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*. 1996;13(2):183-188.
26. Olinger E, Houillier P, Devuyst O. Claudins: a tale of interactions in the thick ascending limb. *Kidney Int*. 2018;93(3):535-537. doi:10.1016/j.kint.2017.09.032
27. De Jesus Ferreira MC, Héliès-Toussaint C, Imbert-Teboul M, et al. Co-expression of a Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca²⁺-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney: Inhibition of hormone-dependent camp accumulation by extracellular Ca²⁺. *J Biol Chem*. 1998;273(24):15192-15202. doi:10.1074/jbc.273.24.15192
28. Doucet A, Féraille E. Sodium-Potassium-Adenosinetriphosphatase-Dependent Sodium Transport in the Kidney: Hormonal Control. *Physiol Rev*. 2001;81(1):345-418.
29. Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2011;301:1143-1159. doi:10.1152/ajprenal.00396.2011
30. Hebert SC. Calcium and salinity sensing by the thick ascending limb: A journey from mammals to fish and back again. *Kidney Int*. 2004;66(Supplement 91):28-33. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.09105.x
31. Hebert SC, Andreoli TE. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1984;246(6):F745-F756. doi:10.1152/ajprenal.1984.246.6.F745
32. Simon DB, Mansfield TA, Nelson-Williams C, et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet*. 1997;17(2):171-178. doi:10.1038/ng1097-171
33. Palmer BF. Regulation of Potassium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;10(6):1050-1060. doi:10.2215/CJN.08580813
34. Zacchia M, Abategiovanni ML, Stratigis S, Capasso G. Potassium: From Physiology to Clinical. *Kidney Dis*. 2016;2(2):72-79. doi:10.1159/000446268
35. Dimke H, Schnermann J. Axial and cellular heterogeneity in electrolyte transport pathways along the thick ascending limb. *Acta Physiol*. 2018;223(1):1-17. doi:10.1111/apha.13057
36. Di Stefano A, Roinel N, de Rouffignac C, Wittner M. Transepithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport in the cortical thick ascending limb of henle's loop of the mouse is a voltage-dependent process. *Ren Physiol Biochem*. 1993;16(4):157-166. doi:10.1159/000173762
37. Bourdeau JE, Burg MB. Voltage dependence of calcium transport in the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1979;236(4):357-364. doi:10.1152/ajprenal.1979.236.4.f357

38. Mandon B, Siga E, Roinel N, de Rouffignac C. Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ transport in the cortical and medullary thick ascending limb of the rat nephron: influence of transepithelial voltage. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1993;424(5-6):558-560. doi:10.1007/BF00374924
39. Hou J, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19(5):483-488. doi:10.1038/nature13314.A
40. Milatz S, Himmerkus N, Wulfmeyer VC, et al. Mosaic expression of claudins in thick ascending limbs of Henle results in spatial separation of paracellular Na⁺ and Mg²⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(2):E219-E227. doi:10.1073/pnas.1611684114
41. Burg MB, Green N. Function of the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1973;224(3).
42. Greger R. Cation selectivity of the isolated perfused cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1981;390(1):30-37. doi:10.1007/BF00582707
43. Brown EM, Katz C, Butters R, Kifor O. Polyarginine, polylysine, and protamine mimic the effects of high extracellular calcium concentrations on dispersed n;bovine parathyroid cells. *J Bone Miner Res*. 1991;6(11).
44. Ho C, Conner DA, Pollak MR, et al. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat Genet*. 1995;11(4):389-394.
45. Pollak MR, Brown EM, Estep HL, et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca²⁺-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*. 1994;8(3):303-307.
46. Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DEC. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat*. 2000;16(4):281-296. doi:10.1002/1098-1004(200010)16:4<281::AID-HUMU1>3.0.CO;2-A
47. Pearce SHS, Williamson C, Kifor O, et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med*. 1996;335(15):1115-1122. doi:10.1056/NEJM199610103351505
48. Gong Y, Renigunta V, Himmerkus N, et al. Claudin-14 regulates renal Ca⁺⁺ transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J*. 2012;31(8):1999-2012. doi:10.1038/emboj.2012.49
49. Wang D, An S, Wang W, Giff JCMC, Ferreri NR. CaR-mediated COX-2 expression in primary cultured mTAL cells. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2001;281(4):658-664.
50. Gu RM, Yang L, Zhang Y, et al. CYP-omega-hydroxylation-dependent metabolites of arachidonic acid inhibit the basolateral 10 pS chloride channel in the rat thick ascending limb. *Kidney Int*. 2009;76(8):849-856. doi:10.1038/ki.2009.287
51. Bailly C. Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int Suppl*. 1998;65:S29-35.
52. Lupp A, Klenk C, Ro C, Evert M, Mawrin C, Schulz S. Immunohistochemical identification of the PTHR1 parathyroid hormone receptor in normal and neoplastic human tissues. *Eur J Endocrinol*. 2010;162(5):979-986. doi:10.1530/EJE-09-0821
53. Chabardts D, Gagnan-brunette M, Imbert-teboul M, et al. Adenylate cyclase responsiveness to hormones in various portions of the human nephron. *J Clin Invest*. 1980;65(2):439-448.
54. Brown M. Extracellular Ca²⁺ Sensing , Regulation of Parathyroid Cell Function , and Role of Ca²⁺ + and Other Ions as Extracellular (First) Messengers. *Physiol Rev*. 1991;71(2):371-411.
55. Nechama M, Ben-dov IZ, Silver J, Naveh-many T. Regulation of PTH mRNA stability by the calcimimetic R568 and the phosphorus binder lanthanum carbonate in CKD. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009;296(4):795-800. doi:10.1152/ajprenal.90625.2008.
56. Sato T, Courbebaisse M, Ide N, et al. Parathyroid hormone controls paracellular Ca²⁺

- transport in the thick ascending limb by regulating the tight-junction protein Claudin14. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(16):3344-3353. doi:10.1073/pnas.1616733114
57. Di Stefano A, Wittner M, Nitschke R, et al. Effects of parathyroid hormone and calcitonin on Na⁺, Cl⁻, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse kidney. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1990;417(2):161-167. doi:10.1007/BF00370694
 58. Feher J. Mechanism of Concentration and Dilution of Urine. In: *Quantitative Human Physiology*. 2nd ed. London: Elsevier Inc.; 2017:730-739. doi:10.1016/B978-0-12-800883-6.00073-2
 59. Capasso G, Unwin R, Giebisch G. Role of the loop of Henle in urinary acidification. *Kidney Int Suppl*. 1991;33:S33-5.
 60. Paillard M. H⁺ and HCO₃⁻ transporters in the medullary thick ascending limb of the kidney: molecular mechanisms, function and regulation. *Kidney Int Suppl*. 1998;65:S36-41.
 61. Wang T, Hropot M, Aronson PS, Giebisch G. Role of NHE isoforms in mediating bicarbonate reabsorption along the nephron. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2001;281:1117-1122.
 62. Capasso G, Unwin R, Rizzo M, Pica A, Giebisch G. Bicarbonate transport along the loop of Henle: molecular mechanisms and regulation. *J Nephrol*. 2002;15 Suppl 5:S88-96.
 63. Odgaard E, Jakobsen JK, Frische S, et al. Basolateral Na⁺-dependent HCO₃⁻ transporter NBCn1-mediated HCO₃⁻ influx in rat medullary thick ascending limb. *J Physiol*. 2004;15(555):205-218. doi:10.1113/jphysiol.2003.046474
 64. Capasso G, Unwin R, Ciani F, et al. Bicarbonate Transport Along the Loop of Henle II. Effects of Acid-Base, Dietary, and Neurohumoral Determinants. *J Clin Invest*. 1994;94(2):830-838.
 65. Good DW, Knepper MA, Burg MB. Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1984;247(1 Pt2):35-44.
 66. Bourgeois S, Meer L Van, Wootla B, et al. NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1895-1904. doi:10.1172/JCI36581.lateral
 67. Lee S, Lee HJ, Yang HS, Thornell IM, Bevenssee MO, Choi I. Sodium – bicarbonate cotransporter NBCn1 in the kidney medullary thick ascending limb cell line is upregulated under acidic conditions and enhances ammonium transport. *Exp Physiol*. 2010;95(9):926-937. doi:10.1113/expphysiol.2010.053967
 68. Weiner ID, Mitch WE, Sands JM. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(8):1444-1458. doi:10.2215/CJN.10311013
 69. Cabral PD, Herrera M. Membrane-associated aquaporin-1 facilitates osmotically driven water flux across the basolateral membrane of the thick ascending limb. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2012;303(5):621-629. doi:10.1152/ajprenal.00268.2012
 70. Bachmann S, Metzger R, Bunnemann B. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry*. 1990;94(5):517-523. doi:10.1007/BF00272616
 71. Bachmann S, Koeppen-Hagemann I, Kriz W. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry. *Histochemistry*. 1985;83(6):531-538. doi:10.1007/BF00492456
 72. Peach RJ, Day WA, Ellingsen PJ, McGiven AR. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall protein in human kidney using immunogold electron microscopy. *Histochem J*. 1988;20(3):156-164. doi:10.1007/BF01746679
 73. Rampoldi L, Scolari F, Amoroso A, Ghiggeri G, Devuyst O. The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): From tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011;80(4):338-347. doi:10.1038/ki.2011.134
 74. Mutig K, Kahl T, Saritas T, et al. Activation of the bumetanide-sensitive Na⁺,K⁺, 2Cl⁻

- Cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *J Biol Chem.* 2011;286(34):30200-30210. doi:10.1074/jbc.M111.222968
75. Renigunta A, Renigunta V, Saritas T, Decher N, Mutig K, Waldegger S. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J Biol Chem.* 2011;286(3):2224-2235. doi:10.1074/jbc.M110.149880
76. Hart TC, Gorry MC, Hart PS, et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet.* 2002;39(12):882-892. doi:10.1136/jmg.39.12.882
77. Trudu M, Janas S, Lanzani C, et al. Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression. *Nat Med.* 2013;19(12):1655-1660. doi:10.1038/nm.3384
78. McCormick JA, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Compr Physiol.* 2015;5(1):45-98. doi:10.1002/cphy.c140002
79. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet.* 1996;12(1):24-30. doi:10.1038/ng0196-24
80. Kashgarian M, Biemesderfer D, Caplan M, Forbush B. Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: Immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int.* 1985;28(6):899-913. doi:10.1038/ki.1985.216
81. Lourdel S, Paulais M, Cluzeaud F, et al. An inward rectifier K⁺ channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: Similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *J Physiol.* 2002;538(Pt 2):391-404. doi:10.1113/jphysiol.2001.012961
82. Scholl UI, Choi M, Liu T, et al. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(14):5842-5847.
83. Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, et al. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med.* 2009;360(19):1960-1970. doi:10.1056/NEJMoa0810276
84. Ellison DH, Velazquez H, Wright FS. Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 1987;253(3 Pt2):546-554. doi:10.1152/ajprenal.1987.253.3.f546
85. Lourdel S, Paulais M, Marvao P, Nissant A, Teulon J. A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: A candidate Cl⁻-K⁺ channel. *J Gen Physiol.* 2003;121(4):287-300. doi:10.1085/jgp.200208737
86. Velázquez H, Silva T. Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: Expression in distal convoluted tubule. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2003;285(1):49-58. doi:10.1152/ajprenal.00389.2002
87. Subramanya AR, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(1):2147-2163. doi:10.1002/cphy.c140002
88. Giebisch G. Renal potassium transport: Mechanisms and regulation. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 1998;274(5):817-833. doi:10.1152/ajprenal.1998.274.5.f817
89. Hoenderop JG, Van Der Kemp AW, Hartog A, et al. Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia. *J Biol Chem.* 1999;274(13):8375-8378. doi:10.1074/jbc.274.13.8375
90. Stauffer TP, Guerini D, Carafoli E. Tissue Distribution of the Four Gene Products of the Plasma Membrane Ca Pump. *J Biol Chem.* 1995;270(20):12184-12190. doi:10.1074/jbc.270.20.12184
91. Ramachandran C, Brunette MG. The renal Na⁺/Ca²⁺ exchange system is located exclusively in the distal tubule. *Biochem J.* 1989;257(1):259-264. doi:10.1042/bj2570259
92. Cha SK, Wu T, Huang C-L. Protein kinase C inhibits caveolae-mediated endocytosis of

- TRPV5. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2008;294(5):1212-1221. doi:10.1152/ajprenal.00007.2008
93. De Groot T, Lee K, Langeslag M, et al. Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(8):1693-1704. doi:10.1681/ASN.2008080873
94. Theofan G, Nguyen AP, Norman AW. Regulation of calbindin-D(28K) gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is correlated to receptor occupancy. *J Biol Chem.* 1986;261(36):16943-16947.
95. Van De Graaf SFJ, Boullart I, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 by 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 and dietary Ca²⁺. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1-5):303-308. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.03.029
96. Hsu YJ, Dimke H, Schoeber JPH, et al. Testosterone increases urinary calcium excretion and inhibits expression of renal calcium transport proteins. *Kidney Int.* 2010;77(7):601-608. doi:10.1038/ki.2009.522
97. Van Abel M, Hoenderop JGJ, Dardenne O, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaCl in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(8):2102-2109. doi:10.1097/01.ASN.0000022423.34922.2A
98. Dick IM, Liu J, Prince RL. Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;212(1-2):11-18. doi:10.1016/j.mce.2003.09.028
99. Hsu YJ, Dimke H, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Calcitonin-stimulated renal Ca²⁺ reabsorption occurs independently of TRPV5. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(5):1428-1435. doi:10.1093/ndt/gfp645
100. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol Rev.* 2015;95(1):1-46. doi:10.1152/physrev.00012.2014
101. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet.* 2002;31(2):166-170. doi:10.1038/ng889
102. Stuijver M, Lainez S, Will C, et al. CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg²⁺ handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am J Hum Genet.* 2011;88(3):333-343. doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.005
103. Thebault S, Alexander RT, Tiel Groenestege WM, Hoenderop JG, Bindels RJ. EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(1):78-85. doi:10.1681/ASN.2008030327
104. Nair A V., Hoherb B, Verkaart S, et al. Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(28):11324-11329. doi:10.1073/pnas.1113811109
105. Nie M, Bal MS, Liu J, et al. Uromodulin regulates renal magnesium homeostasis through the ion channel transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6). *J Biol Chem.* 2018;293(42):16488-16502. doi:10.1074/jbc.RA118.003950
106. Groenestege WMT, Hoenderop JG, van den Heuvel LP, Knoers NVAM, Bindels RJ. The Epithelial Mg²⁺ Channel Transient Receptor Potential Melastatin 6 Is Regulated by Dietary Mg²⁺ Content and Estrogens. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4):1035-1043. doi:10.1681/ASN.2005070700
107. Thébault S, Cao G, Venselaar H, Xi Q, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. Role of the α -kinase domain in transient receptor potential melastatin 6 channel and regulation by intracellular ATP. *J Biol Chem.* 2008;283(29):19999-20007. doi:10.1074/jbc.M800167200
108. Groenestege WMT, Thébault S, Van Der Wijst J, et al. Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2260-2267. doi:10.1172/JCI31680

109. Nijenhuis T, Vallon V, van der Kemp AWCM, Löffing J, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1651-1658. doi:10.1172/JCI24134
110. Staruschenko A. Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct. *Compr Physiol*. 2012;2(2):1541-1584. doi:10.1002/cphy.c110052
111. Lashhab R, Ullah AKMS, Cordat E. Renal collecting duct physiology and pathophysiology. *Biochem cell Biol*. 2019;97(3):234-242. doi:10.1139/bcb-2018-0192
112. Kim J, Kim YH, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM. Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(1):1-12.
113. Wall SM, Davis BS, Hassell KA, Mehta P, Park SJ. In rat t1mCD, NH₄⁺ uptake by Na⁺-K⁺-ATPase is critical to net acid secretion during chronic hypokalemia. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1999;277(6 46-6). doi:10.1152/ajprenal.1999.277.6.f866
114. Wall SM, Fischer MP, Mehta P, Hassell KA, Park SJ. Contribution of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 to Cl⁻ secretion in rat OMCD. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2001;280(5):913-921.
115. Lee Hamm L, Nakhoul N, Hering-Smith KS. Acid-base homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(12):2232-2242. doi:10.2215/CJN.07400715
116. Sands JM, Naruse M, Baum M, et al. Apical Extracellular Calcium / Polyvalent Cation-sensing Receptor Regulates Vasopressin-elicited Water Permeability in Rat Kidney Inner Medullary Collecting Duct. *J Clin Invest*. 1997;99(6):1399-1405.
117. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología Molecular de La Célula*. 5th editio. Omega S.A.; 2010.
118. Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*. 2012;2(3):1819-1852. doi:10.1002/cphy.c110045
119. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol*. 2009;10:235. doi:10.1186/gb-2006-7-3-211
120. Gong Y, Hou J. Claudins in barrier and transport function—the kidney. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2016;469(1):105-113. doi:10.1007/s00424-016-1906-6
121. Colegio OR, Itallie C V., Rahner C, Anderson JM. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2003;284(6):C1346-C1354. doi:10.1152/ajpcell.00547.2002
122. Khairallah H, Andaloussi J El, Simard A, et al. Claudin-7, -16 and -19 during mouse kidney development. *Tissue Barriers*. 2014;2(4):e964547.
123. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, et al. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J Fed Am Soc Exp Biol*. 2008;22(1):146-158. doi:10.1096/fj.07-8319com
124. Yu ASL. Claudins and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(1):11-19. doi:10.1681/ASN.2014030284
125. Kirk A, Campbell S, Bass P, Mason J, Collins J. Differential expression of claudin tight junction proteins in the human cortical nephron. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(7):2107-2119. doi:10.1093/ndt/gfq006
126. Hadj-rabia S, Brideau G, Al-sarraj Y, et al. Multiplex epithelium dysfunction due to CLDN10 mutation: the HELIX syndrome. *Genet Med*. 2018;20(2):190-201. doi:10.1038/gim.2017.71
127. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, et al. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(36):15350-15355. doi:10.1073/pnas.0907724106
128. Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, et al. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta*.

- 2010;1798(11):2048-2057. doi:10.1016/j.bbamem.2010.07.014
129. Prot-Bertoye C, Houillier P. Claudins in renal physiology and pathology. *Genes (Basel)*. 2020;11(290):1-30. doi:10.1007/s00467-011-1824-y
 130. Itallie CM Van, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2006;291(6):1288-1299. doi:10.1152/ajprenal.00138.2006.
 131. Gunzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, et al. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci*. 2009;122(10):1507-1517. doi:10.1242/jcs.040113
 132. Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest*. 2008;118(2):619-628. doi:10.1172/JCI33970
 133. Gong Y, Renigunta V, Zhou Y, et al. Biochemical and biophysical analyses of tight junction permeability made of claudin-16 and claudin-19 dimerization. *Mol Biol Cell*. 2015;26(24):4333-4346. doi:10.1091/mbc.E15-06-0422
 134. Hou J, Paul DL, Goodenough D a. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci*. 2005;118(21):5109-5118. doi:10.1242/jcs.02631
 135. Hou J, Shan Q, Wang T, et al. Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Biol Chem*. 2007;282(23):17114-17122. doi:10.1074/jbc.M700632200
 136. Ikari A, Matsumoto S, Harada H, et al. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci*. 2006;119(9):1781-1789. doi:10.1242/jcs.02901
 137. Breiderhoff T, Himmerkus N, Drewell H, et al. Deletion of claudin-10 rescues claudin-16-deficient mice from hypomagnesemia and hypercalciuria. *Kidney Int*. 2017:1-9. doi:10.1016/j.kint.2017.08.029
 138. Jaya Kausalya P, Amasheh S, Günzel D, et al. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest*. 2006;116(4):878-891. doi:10.1172/JCI26323
 139. Marunaka K, Fujii N, Kimura T, et al. Rescue of tight junctional localization of a claudin-16 mutant D97S by antimalarial medicine primaquine in Madin-Darby canine kidney cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):9647. doi:10.1038/s41598-019-46250-4
 140. Günzel D, Amasheh S, Pfaffenbach S, et al. Claudin-16 affects transcellular Cl⁻ secretion in MDCK cells. *J Physiol*. 2009;587(15):3777-3793. doi:10.1113/jphysiol.2009.173401
 141. Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg²⁺ Resorption. *Science (80-)*. 1999;285(5424):103-106. doi:10.1126/science.285.5424.103
 142. Konrad M, Seelow D, Pandey A V, et al. Mutations in the Tight-Junction Gene Claudin 19 (CLDN19) Are Associated with Renal Magnesium Wasting , Renal Failure , and Severe Ocular Involvement. *Am J Hum Genet*. 2006;79(5):949-957.
 143. Claverie-Martin F. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: clinical and molecular characteristics. *Clin Kidney J*. 2015:1-9. doi:10.1093/ckj/sfv081
 144. Kriegs JO, Homann V, Kinne-Saffran E, Kinne RKH. Identification and subcellular localization of paracellin-1 (claudin-16) in human salivary glands. *Histochem Cell Biol*. 2007;128(1):45-53. doi:10.1007/s00418-007-0291-9
 145. Markov AG, Shadrin L V, Veshniakova AI, Amasheh S, Fromm M. The tight junction proteins claudin-2 and -16 expression in mammary epithelium of mice. *Russ Fiziol zhurnal Im IM Sechenova*. 2006;92(11):1382-1386.
 146. Günzel D, Haisch L, Pfaffenbach S, et al. Claudin function in the thick ascending limb of henle's loop. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1165:152-162. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04051.x

147. Ikari A, Hirai N, Shiroma M, et al. Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54826-54832. doi:10.1074/jbc.M406331200
148. Müller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F, et al. A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet.* 2003;73(6):1293-1301. doi:10.1086/380418
149. Ikari A, Ito M, Okude C, et al. Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase a independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway. *J Cell Physiol.* 2007;207(1):12-22. doi:10.1002/JCP
150. Wang S-B, Xu T, Peng S, et al. Disease-associated mutations of claudin-19 disrupt retinal neurogenesis and visual function. *Commun Biol.* 2019;2(1):113. doi:10.1038/s42003-019-0355-0
151. Peng S, Rao VS, Adelman RA, Rizzolo LJ. Claudin-19 and the barrier properties of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(3):1392-1403. doi:10.1167/iovs.10-5984
152. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, et al. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: A lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005;169(3):527-538. doi:10.1083/jcb.200501154
153. Bardet C, Courson F, Wu Y, et al. Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation. *J Bone Miner Res.* 2016;31(3):498-513. doi:10.1002/jbmr.2726
154. Yamaguti PM, Neves F de AR, Hotton D, et al. Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. *J Med Genet.* 2017;54(1):26-37. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103956
155. Plain A, Wulfmeyer VC, Milatz S, et al. Corticomedullary difference in the effects of dietary Ca²⁺ on tight junction properties in thick ascending limbs of Henle's loop. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2016;468(2):293-303. doi:10.1007/s00424-015-1748-7
156. Ben-yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, et al. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet.* 2003;12(16):2049-2061. doi:10.1093/hmg/ddg210
157. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, et al. Mutations in the Gene Encoding Tight Junction Claudin-14 Cause Autosomal Recessive Deafness DFNB29. *Cell.* 2001;104(1):165-172.
158. Duran D, Zeng X, Jin SC, et al. Mutations in Chromatin Modifier and Ephrin Signaling Genes in Vein of Galen Malformation. *Neuron.* 2019;101(3):429-443.e4. doi:10.1016/j.neuron.2018.11.041
159. Thorleifsson G, Holm H, Edvardsson V, et al. Sequence variants in the CLDN14 gene associate with kidney stones and bone mineral density. *Nat Publ Gr.* 2009;41(8):926-930. doi:10.1038/ng.404
160. Husain SM, Sibley CP. Magnesium and pregnancy. *Miner Electrolyte Metab.* 1993;19(4-5):296-307.
161. Al Alawi AM, Majoni SW, Falhammar H. Magnesium and Human Health: Perspectives and Research Directions. *Int J Endocrinol.* 2018;2018:1-17. doi:10.1155/2018/9041694
162. Seo JW, Park TJ. Magnesium metabolism. *Electrolyte Blood Press.* 2008;6:86-95. doi:10.1136/bmj.2.5350.130
163. Quamme GA, Dirks JH. Magnesium metabolism. In: Maxwell M, Kleeman CR, Naims R, eds. *Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism.* 4th ed. New York: McGraw-Hill Education; 1987:297-316.
164. Gums JG. Clinical significance of magnesium: a review. *Drug Intell Clin Pharm.* 1987;21(3):240-246. doi:10.1177/106002808702100301
165. Jukarainen E. Plasma magnesium levels during the first five days of life. *Acta Paediatr Scand*

- Suppl.* 1971;222:1-58.
166. Schlingmann KP, Konrad M. Mechanisms and Disorders of Magnesium Metabolism. In: *Seldin and Geibisch's The Kidney*. Vol 2. 5th ed. Elsevier Inc; 2013:2139-2165. doi:10.1016/B978-0-12-381462-3.00061-6
 167. Kroll MH, Elin RJ. Relationships between magnesium and protein concentrations in serum. *Clin Chem.* 1985;31(2):244-246.
 168. Ariceta G. Magnesium and infant health. In: Ross Watson R, Grimble G, Preedy VR, Zibadi S, eds. *Nutrition in Infancy*. 1st ed. New York: Humana Press; 2013:417-428.
 169. U.S. Department of health and human service, U.S. Department of agriculture. 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th edition. 2015.
 170. Elin RJ. Assessment of magnesium status. *Clin Chem.* 1987;33(11):1965-1970. doi:10.1684/mrh.2010.0213
 171. Ferment O, Touitou Y. Hormonal regulation and metabolic interrelations of magnesium. *Press medicale.* 1988;17(12):584-587.
 172. Quamme GA. Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. *Kidney Int.* 1997;52(5):1180-1195. doi:10.1038/ki.1997.443
 173. Ariceta G, Rodriguez-Soriano J, Vallo A. Renal magnesium handling in infants and children. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 1996;85(9):1019-1023. doi:10.1111/j.1651-2227.1996.tb14209.x
 174. Seeley HH, Loomba-Albrecht LA, Nagel M, Butani L, Bremer AA. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in three siblings having the same genetic lesion but different clinical presentations. *World J Pediatr.* 2012;8(2):177-180. doi:10.1007/s12519-011-0295-3
 175. Manz F, Schärer K, Janka P, Lombeck J. Renal magnesium wasting, incomplete tubular acidosis, hypercalciuria and nephrocalcinosis in siblings. *Eur J Pediatr.* 1978;128:67-79. doi:10.1007/BF00477550
 176. García-Nieto VM, Claverie-Martín F, Loris Pablo C. Hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis. Su historia. *Nefrología.* 2014;34(1):5-10. doi:10.3265/Nefrologia.pre2013.Nov.12230
 177. Michelis MF, Drash AL, Linarelli LG, De Rubertis FR, Davis BB. Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis. *Metabolism.* 1972;21(10):905-920. doi:10.1016/0026-0495(72)90025-X
 178. Meier W, Blumberg A, Imahorn W, De Luca F, Wildberger H, Oetliker O. Idiopathic hypercalciuria with bilateral macular coloboma: a new variant of oculo-renal syndrome. *Helv Paediatr Acta.* 1979;34(3):257-269.
 179. Castrillo J, Rapado A, Traba M, Esbrit P, Hernando L. Nefrocalcinosis con hipomagnesemia. *Nefrología.* 1983;3:159-165.
 180. Azcón P, Pedrero J, Rodríguez Leal A, Campos A, Ortega L. Nefrocalcinosis familiar. *An Esp Pediatr.* 1983;18:343.
 181. Rodríguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M. Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr Nephrol.* 1987;1(3):465-472. doi:10.1007/BF00849255
 182. Praga M, Vara J, González-Parra E, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 1995;47:1419-1425. doi:10.1038/ki.1995.199
 183. Weber S, Hoffmann K, Jeck N, et al. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet.* 2000;8(6):414-422. doi:10.1038/sj.ejhg.5200475
 184. Konrad M, Hou J, Weber S, et al. CLDN16 Genotype Predicts Renal Decline in Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(1):171-181. doi:10.1681/ASN.2007060709

185. Godron A, Harambat J, Boccio V, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: Phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with CLDN16 or CLDN19 mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2012;7(5):801-809. doi:10.2215/CJN.12841211
186. Guran T, Akcay T, Bereket A, et al. Clinical and molecular characterization of Turkish patients with familial hypomagnesaemia: Novel mutations in TRPM6 and CLDN16 genes. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(2):667-673. doi:10.1093/ndt/gfr300
187. Alparslan C, Öncel E, Akbay S, et al. A novel homozygous W99G mutation in CLDN16 gene causing familial hypomagnesemic hypercalciuric nephrocalcinosis in Turkish siblings. *Turk J Pediatr.* 2018;60(1):76-80. doi:10.24953/turkjped.2018.01.011
188. Zhang H, Ling C, Liu X. A novel CLDN16 mutation in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Clin Nephrol.* 2019;92(2):95-97. doi:10.5414/CN109637
189. Hanssen O, Castermans E, Bovy C, et al. Two novel mutations of the CLDN16 gene cause familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Clin Kidney J.* 2014;7(3):282-285. doi:10.1093/ckj/sfu019
190. Sikora P, Zaniew M, Haisch L, et al. Retrospective cohort study of familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis due to CLDN16 mutations. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(4):636-644. doi:10.1093/ndt/gfu374
191. Staiger K, Staiger H, Haas C, et al. Hypomagnesemia and nephrocalcinosis in a patient with two heterozygous mutations in the CLDN16 gene. *J Nephrol.* 2007;20(1):107-110.
192. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, et al. Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* 2001;59(6):2206-2215. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590062206.x
193. Tajima T, Nakae J, Fujieda K. Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(12):1280-1282. doi:10.1007/s00467-003-1304-0
194. Weber S, Schneider L, Peters M, et al. Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(9):1872-1881.
195. Kasapkara CS, Tumer L, Okur I, Hasanoglu A. A novel mutation of the claudin 16 gene in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis mimicking rickets. *Genet Couns.* 2011;22(2):187-192.
196. Perdomo-Ramirez A, Aguirre M, Davitaia T, Ariceta G, Ramos-Trujillo E, Claverie-Martin F. Characterization of two novel mutations in the claudin-16 and claudin-19 genes that cause familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Gene.* 2019;689:227-234. doi:10.1016/j.gene.2018.12.024
197. Margabandhu S, Doshi M. Familial hypomagnesemia, hypercalciuria and nephrocalcinosis with novel mutation. *Indian J Nephrol.* 2018;29:57-61. doi:10.4103/ijn.IJN_323_17
198. Deeb A, Abood SA, Simon J, Dastoor H, Pearce SH, Sayer JA. A novel CLDN16 mutation in a large family with familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *BMC Res Notes.* 2013;6(1):1-7. doi:10.1186/1756-0500-6-527
199. Kutluturk F, Temel B, Uslu B, et al. An unusual patient with hypercalciuria, recurrent nephrolithiasis, hypomagnesemia and G227R mutation of paracellin-1: An unusual patient with hypercalciuria and hypomagnesemia unresponsive to thiazide diuretics. *Horm Res.* 2006;66(4):175-181. doi:10.1159/000094253
200. Kang JH, Choi HJ, Cho HY, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(10):1490-1493. doi:10.1007/s00467-005-1969-7
201. Müller D, Kausalya PJ, Meij IC, Hunziker W. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: Blocking endocytosis restores surface expression of a novel Claudin-

- 16 mutant that lacks the entire C-terminal cytosolic tail. *Hum Mol Genet.* 2006;15(7):1049-1058. doi:10.1093/hmg/ddl020
202. Müller D, Kausalya PJ, Bockenhauer D, et al. Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3076-3079. doi:10.1210/jc.2006-0200
203. Hampson G, Konrad MA, Scoble J. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC): compound heterozygous mutation in the claudin 16 (CLDN16) gene. *BMC Nephrol.* 2008;9:12. doi:10.1186/1471-2369-9-12
204. Sanjad SA, Lu Y, Khoury C, Habbal Z, Lifton RP. Whole exon deletion in human Claudin-16 gene, a novel mutation in familial hypomagnesemia/hypercalciuria/nephrocalcinosis (FHHNC) and sensorineural deafness (SND). *Arch Dis Child.* 2012;97(Suppl 2):A343 LP-A344. doi:10.1136/archdischild-2012-302724.1201
205. Nadarajah L, Khosravi M, Dumitriu S, et al. A novel claudin-16 mutation, severe bone disease, and nephrocalcinosis. *Lancet.* 2014;383(9911):98. doi:10.1016/S0140-6736(13)62673-2
206. Yamaguti PM, Dos Santos PAC, Leal BS, et al. Identification of the first large deletion in the CLDN16 gene in a patient with FHHNC and late-onset of chronic kidney disease: Case report. *BMC Nephrol.* 2015;16(1):1-6. doi:10.1186/s12882-015-0079-4
207. Faguer S, Chauveau D, Cintas P, et al. Renal, ocular, and neuromuscular involvements in patients with CLDN19 mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2011;6(2):355-360. doi:10.2215/CJN.02870310
208. Claverie-Martín F, García-Nieto V, Loris Pablo C, et al. Claudin-19 mutations and clinical phenotype in spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *PLoS One.* 2013;8(1):e53151. doi:10.1371/journal.pone.0053151
209. Sharma S, Place E, Lord K, Leroy BP, Falk MJ, Pradhan M. Claudin 19-based familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in a sibling pair. *Clin Nephrol.* 2016;85 (2016)(06):346-352. doi:10.5414/CN108783
210. Al-shibli A, Konrad M, Altay W, Masri O Al, Al-gazali L, Attrach I Al. Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis (FHHNC): Report of Three Cases with a Novel Mutation in CLDN19 Gene. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2013;24(2):338-344.
211. Yuan T, Pang Q, Xing X, et al. First Report of a Novel Missense CLDN19 Mutations Causing Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis in a Chinese Family. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(4):265-273. doi:10.1007/s00223-014-9951-7
212. Khan AO, Patel N, Ghazi NG, Alzahrani SS, Arold ST, Alkuraya FS. Familial non-syndromic macular pseudocoloboma secondary to homozygous CLDN19 mutation. *Ophthalmic Genet.* 2018;1:1-7. doi:10.1080/13816810.2018.1498528
213. Naeem M, Hussain S, Akhtar N. Mutation in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) and familial hypomagnesemia, hypercalciuria, nephrocalcinosis (FHHNC) and severe ocular disease. *Am J Nephrol.* 2011;34(3):241-248. doi:10.1159/000330854
214. Ekinci Z, Karabaş L, Konrad M. Hypomagnesemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis and ocular findings: A new claudin-19 mutation. *Turk J Pediatr.* 2012;54(2):168-170.
215. Daga A, Majmundar AJ, Braun DA, et al. Whole exome sequencing frequently detects a monogenic cause in early onset nephrolithiasis and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 2018;93(1):204-213. doi:10.1016/j.kint.2017.06.025
216. Claverie-Martín F, Vargas-Poussou R, Müller D, García-Nieto V. Clinical utility gene card for: familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis with/without severe ocular involvement. *Eur J Hum Genet.* 2014:e1-e4. doi:10.1038/ejhg.2014.176
217. Mejía N, Santos F, Claverie-Martín F, García-Nieto V, Ariceta G, Castaño L. RenalTube: A network tool for clinical and genetic diagnosis of primary tubulopathies. *Eur J Pediatr.*

- 2013;172(6):775-780. doi:10.1007/s00431-013-1934-6
218. Madariaga Domínguez L, Aguirre Meñica M, Ariceta Iraola G. Hipomagnesemia renal hereditaria. *Rev española pediatría*. 2011;67(6):347-353.
219. Sayer JA, Carr G, Simmons NL. Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clin Sci*. 2004;106(5):549-561.
220. Renkema KY, Velic A, Dijkman HB, et al. The Calcium-Sensing Receptor Promotes Urinary Acidification to Prevent Nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(8):1705-1713. doi:10.1681/ASN.2008111195
221. Rodriguez-Soriano J, Vallo A. Pathophysiology of the renal acidification defect present in the syndrome of familial hypomagnesaemia-hypercalciuria. *Pediatr Nephrol*. 1994;8(4):431-435.
222. Kok DIKJ, Papapoulos SE, Bijvoet OLM. Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney Int*. 1990;37(1):51-56. doi:10.1038/ki.1990.7
223. Srivastava T, Alon US. Pathophysiology of hypercalciuria in children. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:1659-1673. doi:10.1007/s00467-007-0482-6
224. Wolf MTF, Dötsch J, Konrad M, Böswald M, Rascher W. Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatr Nephrol*. 2002;17:602-608. doi:10.1007/s00467-002-0884-4
225. Klettner AK, Dithmar S. *The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. 1st ed. (Klettner AK, Dithmar S, eds.). Switzerland: Springer; 2020. doi:10.2174/156652410793937813
226. Peng S, Wang S-B, Singh D, et al. Claudin-3 and claudin-19 partially restore native phenotype to ARPE-19 cells via effects on tight junctions and gene expression. *Exp Eye Res*. 2016;151:179-189. doi:10.1016/j.exer.2016.08.021
227. Muñoz de Escalona Rojas J, Quereda Castañeda A, García García O. Utility of optical coherence tomography in a case of bilateral congenital macular coloboma. *Indian J Ophthalmol*. 2016;64(9):683. doi:10.4103/0301-4738.194331
228. Haisch L, Almeida JR, Abreu Da Silva PR, Schlingmann KP, Konrad M. The role of tight junctions in paracellular ion transport in the renal tubule: Lessons learned from a rare inherited tubular disorder. *Am J Kidney Dis*. 2011;57(2):320-330. doi:10.1053/j.ajkd.2010.08.038
229. Arteaga ME, Hunziker W, Teo ASM, Hillmer AM, Mutchinick OM. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: variable phenotypic expression in three affected sisters from Mexican ancestry. *Ren Fail*. 2015;37(1):180-183. doi:10.3109/0886022X.2014.977141
230. Kuwertz-Bröking E, Frund S, Bulla M, Kleta R, August C, Kisters K. Familial hypomagnesemia-hypercalciuria in 2 sibs. *Clin Nephrol*. 2001;56(2):155-161.
231. Peco-Antić A, Konrad M, Miloševski-Lomić G, Dimitrijević N. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: The first four patients in Serbia. *Srp Arh Celok Lek*. 2010;138(5-6):351-355. doi:10.2298/SARH1006351P
232. Khan AA, Sbayi A, Schlingmann KP. Magnesium Homeostasis. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Vol 23. ; 2018:173-178. doi:10.1016/B978-0-12-373884-4.00043-4
233. Stechman MJ, Loh NY, Thakker R V. Genetic causes of hypercalciuric nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(12):2321-2332. doi:10.1007/s00467-008-0807-0
234. Loris Pablo C, Martín de Vicente C, Abio Albero S, Justa Roldán M, Ferrer Novella C. Hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis y asociación con alteraciones oculares. *An Pediatría*. 2004;61(6):502-508. doi:10.1157/13069183
235. Ariceta G, Aguirre M. Tubulopatías en la infancia que progresan hacia la enfermedad renal crónica. *NefroPlus*. 2011;4(1):11-18. doi:10.3265/NefroPlus.pre2011.Feb.10852

236. Ariceta G, Vallo A, Rodriguez-Soriano J. Acidosis increases magnesuria in children with distal renal tubular acidosis. *Pediatr Nephrol*. 2004;19(12):1367-1370. doi:10.1007/s00467-004-1609-7
237. Mensenkamp AR, Hoenderop J, Bindels RJM. Recent advances in renal tubular calcium reabsorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(5):524-529.
238. Zimmermann B, Plank C, Konrad M, et al. Hydrochlorothiazide in CLDN16 mutation. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(8):2127-2132. doi:10.1093/ndt/gfl144
239. Benigno V, Canonica CS, Bettinelli A, Vigier RO Von, Truttmann AC, Bianchetti MG. Hypomagnesaemia – hypercalciuria – nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:605-610.
240. Al-Elq AH. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in 2 sisters. *Saudi Med J*. 2008;29(3):447-451.
241. Shroff R, Aitkenhead H, Costa N, et al. Normal 25-Hydroxyvitamin D Levels Are Associated with Less Proteinuria and Attenuate Renal Failure Progression in Children with CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):314-322. doi:10.1681/ASN.2014090947
242. Almeida JR, Machado G de A, dos Santos MMG, et al. Five years results after intrafamilial kidney post-transplant in a case of familial hypomagnesemia due to a claudin-19 mutation. *J Bras Nefrol*. 2014;36(3):401-405. doi:10.5935/0101-2800.20140057
243. Rahit KMTH, Tarailo-Graovac M. Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes (Basel)*. 2020;11(3). doi:10.3390/genes11030239
244. Ars E, Torra R. Rare diseases, rare presentations: Recognizing atypical inherited kidney disease phenotypes in the age of genomics. *Clin Kidney J*. 2017;10(5):586-593. doi:10.1093/ckj/sfx051
245. Houlston RS, Tomlinson IPM. Modifier genes in humans: Strategies for identification. *Eur J Hum Genet*. 1998;6(1):80-88. doi:10.1038/sj.ejhg.5200156
246. Deltas C. Digenic inheritance and genetic modifiers. *Clin Genet*. 2018;93(3):429-438. doi:10.1111/cge.13150
247. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. *Where Genotype Is Not Predictive of Phenotype: Towards an Understanding of the Molecular Basis of Reduced Penetrance in Human Inherited Disease*. Vol 132.; 2013. doi:10.1007/s00439-013-1331-2
248. Riordan JD, Nadeau JH. From Peas to Disease: Modifier Genes, Network Resilience, and the Genetics of Health. *Am J Hum Genet*. 2017;101(2):177-191. doi:10.1016/j.ajhg.2017.06.004
249. Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS, Rivolta C. CNOT3 Is a Modifier of PRPF31 Mutations in Retinitis Pigmentosa with Incomplete Penetrance. *PLoS Genet*. 2012;8(11). doi:10.1371/journal.pgen.1003040
250. Chen R, Shi L, Hakenberg J, et al. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):531-538. doi:10.1038/nbt.3514
251. Crotti L, Monti MC, Insolia R, et al. NOS1AP is a genetic modifier of the long-QT syndrome. *Circulation*. 2009;120(17):1657-1663. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.879643
252. Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, et al. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet*. 2003;12(17):2241-2247. doi:10.1093/hmg/ddg225
253. Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocèle genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet*. 2008;40(4):443-448. doi:10.1038/ng.97
254. Negrisolo S, Carraro A, Fregonese G, et al. Could the interaction between LMX1B and PAX2 influence the severity of renal symptoms? *Eur J Hum Genet*. 2018;26(11):1708-1712.

- doi:10.1038/s41431-018-0213-4
255. Ramsbottom SA, Thelwall PE, Wood KM, et al. Mouse genetics reveals Barttin as a genetic modifier of Joubert syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(2):1113-1118. doi:10.1073/pnas.1912602117
 256. O'Neal WK, Knowles MR. Cystic Fibrosis Disease Modifiers: Complex Genetics Defines the Phenotypic Diversity in a Monogenic Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018;19(1):201-222. doi:10.1146/annurev-genom-083117-021329
 257. Vlassov A V., Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):940-948. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017
 258. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-593. doi:10.1038/nri2567
 259. Simons M, Raposo G. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21:575-581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007
 260. Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005;17(7):879-887. doi:10.1093/intimm/dxh267
 261. Ronquist G, Brody I. The prostatesome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta*. 1985;822(2):203-218. doi:10.1016/0304-4157(85)90008-5
 262. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(36):13368-13373. doi:10.1073/pnas.0403453101
 263. Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, et al. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):13-23. doi:10.1248/bpb.34.13
 264. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*. 2007;179:1969-1978. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1969
 265. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol*. 2008;79:12-17. doi:10.1016/j.jri.2008.06.001
 266. Andre F, Schartz NEC, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 2002;360:295-305. doi:10.1016/S0140-6736(02)09552-1
 267. Vella LJ, Sharples RA, Lawson V, Masters C, Cappai R, Hill A. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*. 2007;211:582-590. doi:10.1002/path
 268. Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(4):G990-G999. doi:10.1152/ajpgi.00093.2010
 269. Gould SJ, Raposo G. As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2(1). doi:10.3402/jev.v2i0.20389
 270. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(2):193-208. doi:10.1007/s00018-017-2595-9
 271. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms13588
 272. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30(1):255-289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
 273. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;29(1):116-125. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004

274. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* (80-). 2020;367(6478). doi:10.1126/science.aau6977
275. Hurley JH. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010;45(6):463-487. doi:10.3109/10409238.2010.502516
276. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(7):677-685. doi:10.1038/ncb2502
277. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* (80-). 2008;319:1244-1247. doi:10.1126/science.1153124
278. Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, et al. Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization. *Science* (80-). 2004;303(5657):531-534. doi:10.1126/science.1092425
279. Llorente A, van Deurs B, Sandvig K. Cholesterol regulates prostatesome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *Eur J Cell Biol*. 2007;86(7):405-415. doi:10.1016/j.ejcb.2007.05.001
280. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol*. 2014;28:3-13. doi:10.1016/j.semcancer.2014.04.009
281. Batagov AO, Kurochkin I V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct*. 2013;8(1):1-8. doi:10.1186/1745-6150-8-12
282. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17. doi:10.1038/s41556-018-0250-9
283. Jaé N, McEwan DG, Manavski Y, Boon RA, Dimmeler S. Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles. *FEBS Lett*. 2015;589(20 Pt B):3182-3188. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.040
284. Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 12):2505-2515.
285. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):19-30. doi:10.1038/ncb2000
286. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura SI, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol*. 2010;189(2):223-232. doi:10.1083/jcb.200911018
287. Bonifacino JS, Glick BS. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell*. 2004;116(2):153-166. doi:10.1016/S0092-8674(03)01079-1
288. Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB, Colombo MI. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(12):1901-1916. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.011
289. Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, et al. YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(32):51515-51524. doi:10.18632/oncotarget.9862
290. Wei Y, Wang D, Jin F, et al. Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nat Commun*. 2017;8(14041). doi:10.1038/ncomms14041
291. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1036-1045. doi:10.1038/ncb2574
292. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3(1). doi:10.3402/jev.v3.24641

293. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, et al. Exosomes Facilitate Therapeutic Targeting of Oncogenic KRAS in Pancreatic Cancer. *Nature*. 2017;546(7659):498-503. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
294. Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release*. 2017;266(July):100-108. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.019
295. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, et al. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem*. 2013;288(24):17713-17724. doi:10.1074/jbc.M112.445403
296. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1-9. doi:10.1186/s12885-017-3958-1
297. Santos MF, Rappa G, Karbanová J, Kurth T, Corbeil D, Lorico A. VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding protein-related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2018;293(36):13834-13848. doi:10.1074/jbc.RA118.003725
298. Heusermann W, Hean J, Trojer D, et al. Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J Cell Biol*. 2016;213(2):173-184. doi:10.1083/jcb.201506084
299. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic*. 2011;12:1659-1668. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x
300. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci*. 2016;17(170):1-30. doi:10.3390/ijms17020170
301. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1-60. doi:10.3402/jev.v4.27066
302. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol*. 2008;18(5):199-209. doi:10.1016/j.tcb.2008.03.002
303. Gildea JJ, Seaton JE, Victor KG, et al. Exosomal transfer from human renal proximal tubule cells to distal tubule and collecting duct cells. *Clin Biochem*. 2014;47(15):89-94. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.06.018
304. Huebner AR, Somporn P, Benjachat T, et al. Exosomes in urine biomarker discovery. *Adv Exp Med Biol*. 2015;845:43-58. doi:10.1007/978-94-017-9523-4
305. Pomatto MAC, Gai C, Bussolati B, Camussi G. Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology. *Front Mol Biosci*. 2017;4(June):1-22. doi:10.3389/fmolb.2017.00037
306. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(12):731-749. doi:10.1038/nrneph.2017.148
307. Gardiner C, Vizio D Di, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016;5(1). doi:10.3402/jev.v5.32945
308. Channavajjalaa SK, Rossatoa M, Morandini F, et al. Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(3):345-354. doi:10.1515/cclm-2013-0562
309. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. In: *Current Protocols in Cell Biology*; 2006:3.22.1-3.22.29.
310. Lv L-L, Cao Y-H, Ni H-F, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2013;305(8):F1220-F1227. doi:10.1152/ajprenal.00148.2013

311. Sáenz-Cuesta M, Arbelaz A, Oregi A, et al. Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Front Immunol.* 2015;6(50):1-12. doi:10.3389/fimmu.2015.00050
312. Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, Coleman BM, Hill AF. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int.* 2014;86:433-444. doi:10.1038/ki.2013.502
313. Lv LL, Cao Y, Liu D, et al. Isolation and quantification of MicroRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1021-1031. doi:10.7150/ijbs.6100
314. Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* 2010;77(8):736-742. doi:10.1038/ki.2009.550
315. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, et al. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS One.* 2014;9(5):e96094. doi:10.1371/journal.pone.0096094
316. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, et al. Large-Scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):363-379. doi:10.1681/ASN.2008040406
317. Zhou H, Yuen PST, Pisitkun T, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* 2006;69(8):1471-1476. doi:10.1115/1.3071969.Automating
318. Hiemstra TF, Charles PD, Gracia T, et al. Human urinary exosomes as innate immune effectors. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(9):2017-2027. doi:10.1681/ASN.2013101066
319. Lv LL, Cao YH, Pan MM, et al. CD2AP mRNA in urinary exosome as biomarker of kidney disease. *Clin Chim Acta.* 2014;428:26-31. doi:10.1016/j.cca.2013.10.003
320. Bijnsdorp I V., Geldof AA, Lavaei M, Piersma SR, van Moorselaar RJA, Jimenez CR. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. *J Extracell Vesicles.* 2013;2(1):22097. doi:10.3402/jev.v2i0.22097
321. Spanu S, Van Roeyen CRC, Denecke B, Floege J, Mühlfeld AS. Urinary exosomes: A novel means to non-invasively assess changes in renal gene and protein expression. *PLoS One.* 2014;9(10). doi:10.1371/journal.pone.0109631
322. Alvarez ML, Khosroheidari M, Ravi RK, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* 2012;82:1024-1032. doi:10.1038/ki.2012.256
323. Miranda KC, Bond DT, McKee M, et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* 2010;78(2):191-199. doi:10.1038/ki.2010.106
324. Zubiri I, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Proteomic Analysis of Urinary Exosomes in Cardiovascular and Associated Kidney Diseases by Two-Dimensional Electrophoresis and LC-MS/MS. *Methods Mol Biol.* 2013;1000:209-220. doi:10.1007/978-1-62703-405-0
325. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2007;292(5):F1657-F1661. doi:10.1152/ajprenal.00434.2006
326. Gonzales P, Pisitkun T, Knepper MA. Urinary exosomes: Is there a future? *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(6):1799-1801. doi:10.1093/ndt/gfn058
327. Musante L, Tataruch D, Gu D, et al. A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications, and sample banking. *Sci Rep.* 2014;4(7532):1-11. doi:10.1038/srep07532
328. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell vesicles.* 2014;3:26913.

- doi:<http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.26913>
329. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1). doi:10.1080/20013078.2018.1535750
 330. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, maturation, target recognition and regulatory functions. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(3):83-92. doi:10.1093/nar/gkq1027
 331. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:1-12. doi:10.3389/fendo.2018.00402
 332. Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, et al. Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs. *Cell*. 2010;140(1):111-122. doi:10.1016/j.cell.2009.12.023
 333. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell*. 2004;116:281-297.
 334. Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, et al. RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(16):6536-6541. doi:10.1073/pnas.1301620110
 335. Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol Cell*. 2015;59(1):117-124. doi:10.1016/j.molcel.2015.04.027
 336. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS One*. 2013;8(11):4-8. doi:10.1371/journal.pone.0079467
 337. Groot M, Lee H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells*. 2020;9(4):1044. doi:10.3390/cells9041044
 338. Li T, Evdokimov E, Shen RF, et al. Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: A proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(23):8551-8556. doi:10.1073/pnas.0402889101
 339. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:1-10. doi:10.1038/ncomms3980
 340. Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, et al. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep*. 2016;17(3):799-808. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.031
 341. Li L, Zhu D, Huang L, et al. Argonaute 2 Complexes Selectively Protect the Circulating MicroRNAs in Cell-Secreted Microvesicles. *PLoS One*. 2012;7(10):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0046957
 342. McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, et al. KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep*. 2016;15(5):978-987. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.085
 343. Lin F, Zeng Z, Song Y, et al. YBX-1 mediated sorting of miR-133 into hypoxia/reoxygenation-induced EPC-derived exosomes to increase fibroblast angiogenesis and MEndoT. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):1-13. doi:10.1186/s13287-019-1377-8
 344. Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis K V., Ri S, Schekman R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*. 2016;5:1-23. doi:10.7554/eLife.19276
 345. Lu P, Li H, Li N, et al. MEX3C interacts with adaptor-related protein complex 2 and involves in miR-451a exosomal sorting. *PLoS One*. 2017;12(10):1-25. doi:10.1371/journal.pone.0185992
 346. Teng Y, Ren Y, Hu X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun*. 2017;8(14448). doi:10.1038/ncomms14448

347. Lee H, Li C, Zhang Y, Zhang D, Otterbein LE, Jin Y. Caveolin-1 selectively regulates microRNA sorting into microvesicles after noxious stimuli. *J Exp Med*. 2019;216(9):2202-2220. doi:10.1084/jem.20182313
348. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17442-17452. doi:10.1074/jbc.M110.107821
349. Wei J xing, Lv L hong, Wan Y le, et al. Vps4A functions as a tumor suppressor by regulating the secretion and uptake of exosomal microRNAs in human hepatoma cells. *Hepatology*. 2015;61(4):1284-1294. doi:10.1002/hep.27660
350. Jackson CE, Scruggs BS, Schaffer JE, Hanson PI. Effects of Inhibiting VPS4 Support a General Role for ESCRTs in Extracellular Vesicle Biogenesis. *Biophys J*. 2017;113(6):1342-1352. doi:10.1016/j.bpj.2017.05.032
351. Ichii O, Horino T. MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals. *J Toxicol Pathol*. 2018;31(1):23-34. doi:10.1293/tox.2017-0051
352. Khurana R, Ranches G, Schafferer S, et al. Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease. *RNA*. 2017;23:142-152. doi:10.1261/rna.058834.116.
353. Harrill AH, Sanders AP. Urinary MicroRNAs in Environmental Health: Biomarkers of Emergent Kidney Injury and Disease. *Curr Environ Heal Reports*. 2020. doi:10.1007/s40572-020-00271-8
354. Ramachandran K, Saikumar J, Bijol V, et al. Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clin Chem*. 2013;59(12):1742-1752. doi:10.1373/clinchem.2013.210245
355. Szeto CC, Ching-Ha KB, Ka-Bik L, et al. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. *Dis Markers*. 2012;33(3):137-144. doi:10.3233/DMA-2012-0914
356. Muralidharan J, Ramezani A, Hubal M, et al. Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2017;312(6):F982-F991. doi:10.1152/ajprenal.00569.2016
357. Ramezani A, Devaney JM, Cohen S, et al. Circulating and urinary microRNA profile in focal segmental glomerulosclerosis: A pilot study. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(4):394-404. doi:10.1111/eci.12420
358. Eissa S, Matboli M, Aboushahba R, Bekhet MM, Soliman Y. Urinary exosomal microRNA panel unravels novel biomarkers for diagnosis of type 2 diabetic kidney disease. *J Diabetes Complications*. 2016;30(8):1585-1592. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.07.012
359. Delić D, Eisele C, Schmid R, et al. Urinary exosomal miRNA signature in type II diabetic nephropathy patients. *PLoS One*. 2016;11(3):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0150154
360. Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, et al. Urinary exosomal MicroRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2013;8(11):e73798. doi:10.1371/journal.pone.0073798
361. Cardenas-Gonzalez M, Srivastava A, Pavkovic M, et al. Identification, confirmation, and replication of novel urinary microrna biomarkers in lupus nephritis and diabetic nephropathy. *Clin Chem*. 2017;63(9):1515-1526. doi:10.1373/clinchem.2017.274175
362. Eissa S, Matboli M, Bekhet MM. Clinical verification of a novel urinary microRNA panel: 133b, -342 and -30 as biomarkers for diabetic nephropathy identified by bioinformatics analysis. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:92-99. doi:10.1016/j.biopha.2016.06.018
363. Sole C, Cortes-Hernandez J, Felip ML, Vidal M, Ordi-Ros J. MIR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(9):1488-1496. doi:10.1093/ndt/gfv128
364. Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R, Redon J. Increased urinary exosomal micrnas in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*.

- 2015;10(9):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0138618
365. Min QH, Chen XM, Zou YQ, et al. Differential expression of urinary exosomal microRNAs in IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(2):1-9. doi:10.1002/jcla.22226
366. Huang Z, Zhang Y, Zhou J, Zhang Y. Urinary exosomal miR-193a can be a potential biomarker for the diagnosis of primary focal segmental glomerulosclerosis in children. *Biomed Res Int.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/7298160
367. Ben-Dov IZ, Tan YC, Morozov P, et al. Urine microRNA as potential biomarkers of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: Description of miRNA profiles at baseline. *PLoS One.* 2014;9(1):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0086856
368. Petrillo F, Iervolino A, Zacchia M, et al. MicroRNAs in Renal Diseases: A Potential. *Kidney Dis.* 2017;3(3):111-119. doi:10.1159/000481730
369. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest.* 2015;125(1):141-156. doi:10.1172/JCI75852
370. ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT02855268; Study of SAR339375 in Patients With Alport Syndrome (HERA); <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02855268>.
371. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
372. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al. Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte II: Valores de talla, peso e índice de masa corporal desde el nacimiento a la talla adulta. *An Pediatría.* 2008;68(6):552-569. doi:10.1157/13123287
373. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3):629-637. doi:10.1681/ASN.2008030287
374. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-612.
375. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res.* 2010;27(5):796-810. doi:10.1007/s11095-010-0073-2
376. Picard Tools. Picard Tools. <http://broadinstitute.github.io/picard/>.
377. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110
378. Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin).* 2012;6(2):80-92. doi:10.4161/fly.19695
379. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D662-9. doi:10.1093/nar/gku1010
380. Cingolani P, Patel VM, Coon M, et al. Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet.* 2012;3:35. doi:10.3389/fgene.2012.00035
381. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434-443. doi:10.1038/s41586-020-2308-7
382. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067. doi:10.1093/nar/gkx1153

383. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet.* 1956;20(4):309-311.
384. Anscombe F. Biometrika Trust On Estimating Binomial Response Relations. *Biometrika.* 1956;43(3):461-464.
385. Singh SK, Nielsen P, Koshkin A a., Wengel J. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem Commun.* 1998;(4):455-456.
386. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D68-73. doi:10.1093/nar/gkt1181
387. R core team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. *R A Lang Environ Stat Comput R Found Stat Comput Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org>.* 2018.
388. Kauffmann A, Gentleman R, Huber W. arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics.* 2009;25(3):415-416. doi:10.1093/bioinformatics/btn647
389. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003;4(2):249-264. doi:10.1093/biostatistics/4.2.249
390. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3. doi:10.2202/1544-6115.1027
391. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res.* 2001;125(1-2):279-284. doi:10.1016/s0166-4328(01)00297-2
392. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(R64). doi:10.1186/gb-2009-10-6-r64
393. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, et al. DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D239-D245. doi:10.1093/nar/gkx1141
394. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, et al. MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D296-D302. doi:10.1093/nar/gkx1067
395. Jorba G, Aguirre-Plans J, Junet V, et al. TPMS technology to infer biomarkers of macular degeneration prognosis in. *bioRxiv.* 2019:625889.
396. Valls R, Pujol A, Artigas L. Understanding the complexity of biological processes. *White Pap.* 2013.
397. Romeo-Guitart D, Forés J, Herrando-Grabulosa M, et al. Neuroprotective Drug for Nerve Trauma Revealed Using Artificial Intelligence. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-15. doi:10.1038/s41598-018-19767-3
398. Ontology CTG, Ashburner M, Ball CA, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-29. doi:10.1038/75556.Gene
399. Carbon S, Dietze H, Lewis SE, et al. Expansion of the gene ontology knowledgebase and resources: The gene ontology consortium. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D331-D338. doi:10.1093/nar/gkw1108
400. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D353-D361. doi:10.1093/nar/gkw1092
401. Uniprot C. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D204-12. doi:10.1093/nar/gku989

402. Thul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci.* 2018;27(1):233-244. doi:10.1002/pro.3307
403. Chatr-Aryamontri A, Oughtred R, Boucher L, et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D369-D379. doi:10.1093/nar/gkw1102
404. Orchard S, Ammari M, Aranda B, et al. The MIntAct project - IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D358-63. doi:10.1093/nar/gkt1115
405. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D649-D655. doi:10.1093/nar/gkx1132
406. Han H, Cho J-W, Lee S, et al. TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D380-D386. doi:10.1093/nar/gkx1013
407. Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, et al. Human Protein Reference Database - 2009 update. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D767-72. doi:10.1093/nar/gkn892
408. Espinosa Román L. Valoración de la función renal. *Pediatr Integr.* 2017;21(8):549-555.
409. de Kieviet W, Slaats EH, Abeling NG. Pediatric reference values for calcium, magnesium and inorganic phosphorus in serum obtained from Bhattacharya plots for data from unselected patients. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986;24(4):233-242. doi:10.1515/cclm.1986.24.4.233
410. Lu J, Zhao X, Paiardini A, Lang Y, Bottillo I, Shao L. Familial hypomagnesaemia , Hypercalciuria and Nephrocalcinosis associated with a novel mutation of the highly conserved leucine residue 116 of Claudin 16 in a Chinese patient with a delayed diagnosis : a case report. *BMC Nephrol.* 2018;19(181):1-8.
411. Maroilly T, Tarailo-Graovac M. Uncovering Missing Heritability in Rare Diseases. *Genes (Basel).* 2019;10(4):1-18. doi:10.3390/genes10040275
412. Jiang X, Shao Y, Araj FG, et al. Heterozygous Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gene Missense Variants Are Associated With Worse Cardiac Function in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(19):e016799. doi:10.1161/jaha.120.016799
413. Corvol H, Blackman SM, Boëlle P-Y, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun.* 2015;6:8382. doi:10.1038/ncomms9382
414. Pushpakom SP, Liptrott NJ, Rodríguez-Nóvoa S, et al. Genetic variants of ABCC10, a novel tenofovir transporter, are associated with kidney tubular dysfunction. *J Infect Dis.* 2011;204(1):145-153. doi:10.1093/infdis/jir215
415. Salvaggio SE, Giacomelli A, Falvella FS, et al. Clinical and genetic factors associated with kidney tubular dysfunction in a real-life single centre cohort of HIV-positive patients. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1-6. doi:10.1186/s12879-017-2497-3
416. Moss DM, Neary M, Owen A. The role of drug transporters in the kidney: Lessons from tenofovir. *Front Pharmacol.* 2014;5(NOV):1-14. doi:10.3389/fphar.2014.00248
417. Sone K, Oguri T, Uemura T, et al. Genetic variation in the ATP binding cassette transporter ABCC10 is associated with neutropenia for docetaxel in Japanese lung cancer patients cohort. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1-9. doi:10.1186/s12885-019-5438-2
418. Zeng Z, Bromberg Y. Predicting Functional Effects of Synonymous Variants: A Systematic Review and Perspectives. *Front Genet.* 2019;10(October):1-15. doi:10.3389/fgene.2019.00914
419. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(10):683-691. doi:10.1038/nrg3051
420. Luttrupp K, Debowska M, Lukaszuk T, et al. Genotypic and phenotypic predictors of inflammation in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.*

- 2016;31(12):2033-2040. doi:10.1093/ndt/gfw066
421. Nakazaki K, Kato Y, Taguchi T, et al. Heterozygous mutation (G/G→G/A) at nt 2607 of the EGFR gene is closely associated with increases in EGFR copy number and mRNA half life, but impaired EGFR protein synthesis in squamous cell carcinomas of the head and neck - implication for gefitinib effic. *Oncol Lett.* 2010;1(6):1017-1020. doi:10.3892/ol.2010.188
 422. Kim BW, Kim SK, Heo KW, et al. Association between epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor gene polymorphisms and end-stage renal disease and acute renal allograft rejection in a Korean population. *Ren Fail.* 2020;42(1):98-106. doi:10.1080/0886022X.2019.1710535
 423. Ma F, Sun T, Shi Y, et al. Polymorphisms of EGFR predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Gefitinib. *Lung Cancer.* 2009;66(1):114-119. doi:10.1016/j.lungcan.2008.12.025
 424. Bonin S, Donada M, Bussolati G, et al. A synonymous EGFR polymorphism predicting responsiveness to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Tumor Biol.* 2016;37(6):7295-7303. doi:10.1007/s13277-015-4543-3
 425. Weide T, Vollenbröker B, Schulze U, et al. Pals1 haploinsufficiency results in proteinuria and cyst formation. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2093-2107. doi:10.1681/ASN.2016040474
 426. Makarova O, Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene.* 2003;302(1-2):21-29. doi:10.1016/S0378111902010843
 427. Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol.* 2003;5(2):137-142. doi:10.1038/ncb923
 428. Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci.* 2003;116(14):2895-2906. doi:10.1242/jcs.00500
 429. Lemmers C, Médina E, Delgrossi MH, Michel D, Arsanto JP, Le Bivic A. hINAd1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25408-25415. doi:10.1074/jbc.M202196200
 430. Roh MH, Makarova O, Liu CJ, et al. The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of crumbs and discs lost. *J Cell Biol.* 2002;157(1):161-172. doi:10.1083/jcb.200109010
 431. Jiang X, An W, Yang X, et al. Asymmetric distribution of CRUMBS polarity complex proteins from compacted 8-cell to blastocyst stage during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns.* 2018;27:93-98. doi:10.1016/j.gep.2017.11.002
 432. Massey-Harroche D, Delgrossi MH, Lane-Guermonprez L, et al. Evidence for a molecular link between the tuberous sclerosis complex and the Crumbs complex. *Hum Mol Genet.* 2007;16(5):529-536. doi:10.1093/hmg/ddl485
 433. Michgehl U, Pavenstädt H, Vollenbröker B. Cross talk between the Crumbs complex and Hippo signaling in renal epithelial cells. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2017;469(7-8):917-926. doi:10.1007/s00424-017-2004-0
 434. Straight SW, Shin K, Fogg VC, et al. Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell.* 2004;15(4):1981-1990. doi:10.1091/mbc.E03
 435. Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, et al. Similar and Distinct Properties of MUPP1 and Patj, Two Homologous PDZ Domain-Containing Tight-Junction Proteins. *Mol Cell Biol.* 2009;29(9):2372-2389. doi:10.1128/mcb.01505-08
 436. Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem.* 2002;277(30):27501-27509. doi:10.1074/jbc.M201177200

437. Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem.* 2002;277(1):455-461. doi:10.1074/jbc.M109005200
438. Sindic A, Huang C, Chen AP, et al. MUPP1 complexes renal K⁺ channels to alter cell surface expression and whole cell currents. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2009;297(1):36-45. doi:10.1152/ajprenal.90559.2008
439. Duning K, Rosenbusch D, Schlüter MA, et al. Polycystin-2 activity is controlled by transcriptional coactivator with PDZ binding motif and PALS1-associated tight junction protein. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33584-33588. doi:10.1074/jbc.C110.146381
440. Delous M, Hellman NE, Gaudé HM, et al. Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Hum Mol Genet.* 2009;18(24):4711-4723. doi:10.1093/hmg/ddp434
441. Nakajima H, Tanoue T. Lulu2 regulates the circumferential actomyosin tensile system in epithelial cells through p114rhoGEF. *J Cell Biol.* 2011;195(2):245-261. doi:10.1083/jcb.201104118
442. Li P, Lan P, Liu S, Wang Y, Liu P. Cell Polarity Protein Pals1-Associated Tight Junction Expression Is a Favorable Prognostic Marker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Genet.* 2020;11(August):931. doi:10.3389/fgene.2020.00931
443. Will C, Breiderhoff T, Thumfart J, et al. Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2010;298(5):F1152-F1161. doi:10.1152/ajprenal.00499.2009
444. Spencer JD, Schwaderer AL, Dirosario JD, et al. Ribonuclease 7 is a potent antimicrobial peptide within the human urinary tract. *Kidney Int.* 2011;80(2):174-180. doi:10.1038/ki.2011.109
445. Macfarlane RG, Pilling J. Fibrinolytic activity of normal urine. *Nature.* 1947;159(4049):779. doi:10.1038/159779a0
446. Ståhl A, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and Microvesicles in Normal Physiology, Pathophysiology, and Renal Diseases. *Pediatr Clin North Am.* 2019;34(1):11-30.
447. van Balkom BWM, Pisitkun T, Verhaar MC, Knepper MA. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney Int.* 2011;80:1138-1145. doi:10.1038/ki.2011.292
448. Zhang W, Zhou X, Zhang H, Yao Q, Liu Y, Dong Z. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2016;311(5):F844-F851. doi:10.1152/ajprenal.00429.2016
449. Gonzales PA, Zhou H, Pisitkun T, et al. Isolation and purification of exosomes in urine. *Methods Mol Biol.* 2010;641(2):89-99. doi:10.1007/978-1-60761-711-2
450. Royo F, Zuñiga-Garcia P, Sanchez-Mosquera P, et al. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J Extracell Vesicles.* 2016;5(29497):1-11. doi:10.3402/jev.v5.29497
451. Zeringer E, Li M, Barta T, et al. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World J Methodol.* 2013;3(1):11-18. doi:10.4329/wjm.v3.i1.11
452. Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell proteomics.* 2006;5(10):1760-1771. doi:10.1074/mcp.R600004-MCP200
453. Alvarez ML. Isolation of urinary exosomes for RNA biomarker discovery using a simple, fast, and highly scalable method. *Methods Mol Biol.* 2014;1182:145-170. doi:10.1007/978-1-4939-1062-5
454. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis.

- J Proteomics*. 2014;96:90-102. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.037
455. Sokolova V, Ludwig A-K, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids surfaces B Biointerfaces*. 2011;87(1):146-150. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.013
456. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm*. 2010;117(1):1-4. doi:10.1007/s00702-009-0288-8
457. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J Vis Exp*. 2012;59(e3037):1-6. doi:10.3791/3037
458. Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PST. Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol*. 2017;232(7):1587-1590. doi:10.1002/jcp.25387
459. GeneChip™ miRNA 4.0 Array. Affymetrix, Applied Biosystems. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/902411#902411>.
460. Tissot C. Analysis of miRNA content in total RNA preparations using the Agilent 2100 bioanalyzer. *Agil Technol*. 2008.
461. Bhome R, Del Vecchio F, Lee GH, et al. Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett*. 2018;420:228-235. doi:10.1016/j.canlet.2018.02.002
462. Wang P, Yang D, Zhang H, et al. Early detection of lung cancer in serum by a panel of MicroRNA biomarkers. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(4):313-319.e1. doi:10.1016/j.clcc.2014.12.006
463. Dong W, Li B, Zhang Z, Wang J. Clinical significance of microRNA-24 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Neoplasma*. 2015;62(2):250-258. doi:10.4149/neo
464. Xu T, Liao Z, O'Reilly MS, et al. Serum inflammatory miRNAs predict radiation esophagitis in patients receiving definitive radiochemotherapy for non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol*. 2014;113(3):379-384. doi:10.1016/j.radonc.2014.11.006
465. Montagnana M, Benati M, Tagetti A, et al. Evaluation of circ_100219 and miR-135b in serum and exosomes of healthy pregnant women. *J Matern Neonatal Med*. 2019:1-7. doi:10.1080/14767058.2019.1689556
466. Schwarzenbach H, Da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem*. 2015;61(11):1333-1342. doi:10.1373/clinchem.2015.239459
467. Gevaert AB, Witvrouwen I, Vrints CJ, et al. MicroRNA profiling in plasma samples using qPCR arrays: Recommendations for correct analysis and interpretation. *PLoS One*. 2018;13(2):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0193173
468. Benz F, Roderburg C, Cardenas DV, et al. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med*. 2013;45(9):1-9. doi:10.1038/emmm.2013.81
469. Gee HE, Buffa FM, Camps C, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer*. 2011;104(7):1168-1177. doi:10.1038/sj.bjc.6606076
470. Conserva F, Barozzino M, Pesce F, et al. Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of Kidney Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-11. doi:10.1038/s41598-019-47778-1
471. Liang YZ, Li JH, Xiao HB, He Y, Zhang L, Yan YX. Identification of stress-related microRNA biomarkers in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes*. 2018;12(August 2017):633-644. doi:10.1111/1753-0407.12643
472. Zampetaki A, Willeit P, Burr S, et al. Angiogenic microRNAs linked to incidence and progression of diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2016;65(1):216-227. doi:10.2337/db15-0389

473. Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, Anbazhagan AN, Voss FR, Haqqi TM. MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2010;62(5):1361-1371. doi:10.1002/art.27329
474. Tian X, Ji Y, Liang Y, Zhang J, Guan L, Wang C. LINC00520 targeting miR-27b-3p regulates OSMR expression level to promote acute kidney injury development through the PI3K/AKT signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):14221-14233. doi:10.1002/jcp.28118
475. Zang J, Maxwell AP, Simpson DA, McKay GJ. Differential Expression of Urinary Exosomal MicroRNAs miR-21-5p and miR-30b-5p in Individuals with Diabetic Kidney Disease. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-019-47504-x
476. Yu L, Gu T, Shi E, Wang Y, Fang Q, Wang C. Dysregulation of renal microRNA expression after deep hypothermic circulatory arrest in rats. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2016;49(6):1725-1731. doi:10.1093/ejcts/ezv460
477. Liu W, Li H, Wang Y, et al. MiR-30b-5p functions as a tumor suppressor in cell proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting G-protein subunit α -13 in renal cell carcinoma. *Gene.* 2017;626:275-281. doi:10.1016/j.gene.2017.05.040
478. Du B, Ma LM, Huang MB, et al. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Lett.* 2010;584(4):811-816. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.053
479. Fang Y, Yu X, Liu Y, et al. miR-29C is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF- α activation. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2013;304(10):1274-1282. doi:10.1152/ajprenal.00287.2012
480. Liu Y, Taylor NE, Lu L, et al. Renal medullary MicroRNAs in Dahl salt-sensitive rats: MiR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension.* 2010;55(4):974-982. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144428
481. Wang B, Komers R, Carew R, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(2):252-265. doi:10.1681/ASN.2011010055
482. Montgomery RL, Yu G, Latimer PA, et al. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO Mol Med.* 2014;6(10):1347-1356. doi:10.15252/emmm.201303604
483. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, Costa AR, et al. Circulating miRNAs in diabetic kidney disease: case-control study and in silico analyses. *Acta Diabetol.* 2019;56(1):55-65. doi:10.1007/s00592-018-1216-x
484. Castoldi G, di Gioia C, Giollo F, et al. Different regulation of miR-29a-3p in glomeruli and tubules in an experimental model of angiotensin II-dependent hypertension: Potential role in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(3):335-342. doi:10.1111/1440-1681.12532
485. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, et al. A pilot study identifying a set of microRNAs as precise diagnostic biomarkers of acute kidney injury. *PLoS One.* 2015;10(6):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0127175
486. Pezzolesi MG, Satake E, McDonnell KP, Major M, Smiles AM, Krolewski AS. Circulating TGF- β 1-regulated miRNAs and the risk of rapid progression to ESRD in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2015;64(9):3285-3293. doi:10.2337/db15-0116
487. Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russell RC, et al. YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol.* 2012;14(12):1322-1329. doi:10.1038/ncb2615
488. Lin CL, Lee PH, Hsu YC, et al. MicroRNA-29a Promotion of nephrin acetylation ameliorates hyperglycemia-induced podocyte dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(8):1698-1709. doi:10.1681/ASN.2013050527
489. Xue XX, Lei HQ, Zhao L, et al. MiR-185-3p downregulates advanced glycosylation end product receptor expression and improves renal function in diabetic nephropathy mice.

- Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(9):5018-5027. doi:10.26355/eurev_202005_21193
490. White NMA, Bao TT, Grigull J, et al. MiRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: Biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation. *J Urol.* 2011;186(3):1077-1083. doi:10.1016/j.juro.2011.04.110
491. Wala SJ, Karamchandani JR, Saleeb R, et al. An integrated genomic analysis of papillary renal cell carcinoma type 1 uncovers the role of focal adhesion and extracellular matrix pathways. *Mol Oncol.* 2015;9(8):1667-1677. doi:10.1016/j.molonc.2015.04.007
492. Li Y, Gong Y, Ma J, Gong X. Overexpressed circ-RPL15 predicts poor survival and promotes the progression of gastric cancer via regulating miR-502-3p/OLFM4/STAT3 pathway. *Biomed Pharmacother.* 2020;127(27):110219. doi:10.1016/j.biopha.2020.110219
493. Jiang C, Long J, Liu B, et al. miR-500a-3p promotes cancer stem cells properties via STAT3 pathway in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):1-13. doi:10.1186/s13046-017-0568-3
494. Pavkovic M, Vaidya VS. MicroRNAs and drug-induced kidney injury. *Pharmacol Ther.* 2016;163:48-57. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.016
495. Wang IK, Sun KT, Tsai TH, et al. miR-20a-5p mediates hypoxia-induced autophagy by targeting ATG16L1 in ischemic kidney injury. *Life Sci.* 2015;136:133-141. doi:10.1016/j.lfs.2015.07.002
496. Zhou J, Chen H, Fan Y. Systematic analysis of the expression profile of non-coding RNAs involved in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in mice using RNA sequencing. *Oncotarget.* 2017;8(59):100196-100215. doi:10.18632/oncotarget.22130
497. Butz H, Nofech-Mozes R, Ding Q, et al. Exosomal MicroRNAs Are Diagnostic Biomarkers and Can Mediate Cell-Cell Communication in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus.* 2016;2(2):210-218. doi:10.1016/j.euf.2015.11.006
498. Nandakumar P, Tin A, Grove ML, et al. MicroRNAs in the miR-17 and miR-15 families are downregulated in chronic kidney disease with hypertension. *PLoS One.* 2017;12(8):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0176734
499. Marrone AK, Stolz DB, Bastacky SI, Kostka D, Bodnar AJ, Ho J. MicroRNA-17~92 is required for nephrogenesis and renal function. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(7):1440-1452. doi:10.1681/ASN.2013040390
500. Pan YJ, Wei LL, Wu XJ, Huo FC, Mou J, Pei DS. miR-106a-5p inhibits the cell migration and invasion of renal cell carcinoma through targeting PAK5. *Cell Death Dis.* 2017;8(10):e3155. doi:10.1038/cddis.2017.561
501. Shin Y, Kim DY, Ko JY, Woo YM, Park JH. Regulation of KLF12 by microRNA-20b and microRNA-106a in cystogenesis. *FASEB J.* 2018;32(7):3574-3582. doi:10.1096/fj.201700923R
502. Wang L, Lin J, Yu T, et al. Identification of plasma miR-106a-5p and miR-30a-5p as potential biomarkers for mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clin Biochem.* 2020;S00009-912(30):30790. doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.07.001
503. Tjeldhorn L, Iversen N, Sandvig K, Bergan J, Sandset PM, Skretting G. Protein C mutation (A267T) results in ER retention and unfolded protein response activation. *PLoS One.* 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0024009
504. Bollo M, Paredes RM, Holstein D, Zheleznova N, Camacho P, Lechleiter JD. Calcineurin interacts with PERK and dephosphorylates calnexin to relieve ER stress in mammals and frogs. *PLoS One.* 2010;5(8):e11925. doi:10.1371/journal.pone.0011925
505. Wu J, Zheng C, Wang X, et al. MicroRNA-30 family members regulate calcium / calcineurin signaling in podocytes. *J Clin Invest.* 2015;125(11):4091-4106. doi:10.1172/JCI81061
506. Xu Y, Guo M, Jiang W, et al. Endoplasmic reticulum stress and its effects on renal tubular cells apoptosis in ischemic acute kidney injury. *Ren Fail.* 2016;38(5):831-837. doi:10.3109/0886022X.2016.1160724

507. Zheng X, Armando I, Jose PA, Konkalmatt P. G-Protein Coupled Receptors GPR37 and GPR37L1 Regulate Sodium Reabsorption in Renal Proximal Tubule Cells (Abstract). *Hypertension*. 2015;66(Suppl 1):Abstract 141.
508. Jin Y, Ratnam K, Chuang PY, et al. A systems approach identifies HIPK2 as a key regulator of kidney fibrosis. *Nat Med*. 2012;18(4):580-588. doi:10.1038/nm.2685
509. Nugent MM, Lee K, He JC. HIPK2 is a new drug target for anti-fibrosis therapy in kidney disease. *Front Physiol*. 2015;6(APR):1-5. doi:10.3389/fphys.2015.00132
510. Klymenko O, Huehn M, Wilhelm J, et al. Regulation and role of the ER stress transcription factor CHOP in alveolar epithelial type-II cells. *J Mol Med*. 2019;97(7):973-990. doi:10.1007/s00109-019-01787-9
511. Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*. 1998;394(6696):909-913. doi:10.1038/29814
512. Gu Y-Y, Liu X-S, Huang X-R, Yu X-Q, Lan H-Y. Diverse Role of TGF- β in Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:123. doi:10.3389/fcell.2020.00123
513. Zhou P, Wan X, Zou Y, Chen Z, Zhong A. Transforming growth factor beta (TGF- β) is activated by the CtBP2-p300-AP1 transcriptional complex in chronic renal failure. *Int J Biol Sci*. 2020;16(2):204-215. doi:10.7150/ijbs.38841
514. Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, et al. Tubular NF- κ B and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int*. 2001;60(4):1366-1377. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00941.x
515. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, et al. NF- κ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1254-1262. doi:10.1681/ASN.2010020218
516. Liu M, Ning X, Li R, et al. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med*. 2017;21(7):1248-1259. doi:10.1111/jcmm.13060
517. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF κ B. *Genes Dev*. 2007;21(11):1396-1408. doi:10.1101/gad.1553707
518. Tan RJ, Zhou D, Zhou L, Liu Y. Wnt/ β -catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl*. 2014;4(1):84-90. doi:10.1038/kisup.2014.16
519. Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R, Morgado-Pascual JL, et al. Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its ligands in kidney inflammation and damage. *Mediators Inflamm*. 2018;(8739473). doi:10.1155/2018/8739473
520. Laouari D, Burtin M, Phelep A, et al. TGF- α mediates genetic susceptibility to chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):327-335. doi:10.1681/ASN.2010040356
521. Gomella LG, Sargeni ER, Wade TP, Anglard P, Linehan WM, Kasid A. Expression of Transforming Growth Factor α in Normal Human Adult Kidney and Enhanced Expression of Transforming Growth Factors α and β 1 in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 1989;49(25):6972-6975.
522. Chen CH, Sue YM, Cheng CY, et al. Oligo-fucoidan prevents renal tubulointerstitial fibrosis by inhibiting the CD44 signal pathway. *Sci Rep*. 2017;7(December 2016):1-13. doi:10.1038/srep40183
523. Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: Molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res Int*. 2013;(292953). doi:10.1155/2013/292953
524. Umekawa T, Chegini N, Khan SR. Oxalate ions and calcium oxalate crystals stimulate MCP-1 expression by renal epithelial cells. *Kidney Int*. 2002;61(1):105-112. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00106.x
525. Wang X, Bhutani G, Vaughan LE, et al. Urinary monocyte chemoattractant protein 1 associated with calcium oxalate crystallization in patients with primary hyperoxaluria. *BMC*

- Nephrol.* 2020;21(1):1-8. doi:10.1186/s12882-020-01783-z
526. Costantini A, Valta H, Baratang NV, et al. Novel fibronectin mutations and expansion of the phenotype in spondylometaphyseal dysplasia with "corner fractures." *Bone.* 2019;121(December 2018):163-171. doi:10.1016/j.bone.2018.12.020
 527. Tsujihata M, Yoshimura K, Tsujikawa K, Tei N, Okuyama A. Fibronectin inhibits endocytosis of calcium oxalate crystals by renal tubular cells. *Int J Urol.* 2006;13(6):743-746. doi:10.1111/j.1442-2042.2006.01396.x
 528. Chen J, You H, Li Y, Xu Y, He Q, Harris RC. EGF receptor-dependent YAP activation is important for renal recovery from AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(9):2372-2385. doi:10.1681/ASN.2017121272
 529. Bozic M, Caus M, Rodrigues-Diez RR, et al. Alpha-synuclein maintains the epithelial phenotype and protects from renal fibrosis [ABSTRACT]. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34(Supplement_1):FP331. doi:10.1093/ndt/gfz106
 530. Olson KC, Kulling PM, Olson TL, et al. Vitamin D decreases STAT phosphorylation and inflammatory cytokine output in T-LGL leukemia. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(5):290-303. doi:10.1080/15384047.2016.1235669
 531. O'Brown ZK, Van Nostrand EL, Higgins JP, Kim SK. The Inflammatory Transcription Factors NFκB, STAT1 and STAT3 Drive Age-Associated Transcriptional Changes in the Human Kidney. *PLoS Genet.* 2015;11(12):e1005734. doi:10.1371/journal.pgen.1005734
 532. Adjibade P, Grenier St-Sauveur V, Bergeman J, Huot ME, Khandjian EW, Mazroui R. DDX3 regulates endoplasmic reticulum stress-induced ATF4 expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-12. doi:10.1038/s41598-017-14262-7
 533. Jongsma ML, Bakker J, Cabukusta B, et al. SKIP - HOPS recruits TBC 1D15 for a Rab7-to-Arl8b identity switch to control late endosome transport. *EMBO J.* 2020;39(6):1-25. doi:10.15252/embj.2019102301
 534. Namba T, Takabatake Y, Kimura T, et al. Autophagic clearance of mitochondria in the kidney copes with metabolic acidosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(10):2254-2266. doi:10.1681/ASN.2013090986
 535. Van De Graaf SFJ, Chang Q, Mensenkamp AR, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):303-312. doi:10.1128/MCB.26.1.303
 536. de Baaij JHF, Arjona FJ, van den Brand M, et al. Identification of SLC41A3 as a novel player in magnesium homeostasis. *Sci Rep.* 2016;6:28565. doi:10.1038/srep28565
 537. Viering DHHM, de Baaij JHF, Walsh SB, Kleta R, Bockenhauer D. Genetic causes of hypomagnesemia, a clinical overview. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(7):1123-1135. doi:10.1007/s00467-016-3416-3
 538. Duverger O, Ohara T, Bible PW, Zah A, Morasso MI. DLX3-Dependent Regulation of Ion Transporters and Carbonic Anhydrases is Crucial for Enamel Mineralization. *J Bone Miner Res.* 2017;32(3):641-653. doi:10.1002/jbmr.3022
 539. Barneaud-Rocca D, Etchebest C, Guizouarn H. Structural model of the anion exchanger 1 (SLC4A1) and identification of transmembrane segments forming the transport site. *J Biol Chem.* 2013;288(37):26372-26384. doi:10.1074/jbc.M113.465989
 540. Watanabe T. Improving outcomes for patients with distal renal tubular acidosis: recent advances and challenges ahead. *Pediatr Heal Med Ther.* 2018;Volume 9:181-190. doi:10.2147/phmt.s174459
 541. Alexander RT, Dimke H. Effect of diuretics on renal tubular transport of calcium and magnesium. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2017;312(6):F998-F1015. doi:10.1152/ajprenal.00032.2017
 542. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. Mirwalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One.* 2018;13(10):1-6. doi:10.1371/journal.pone.0206239

ANNEXOS

Annex 1. Certificat d'aprovació del projecte pel Comitè ètic d'investigació clínica.

Vall d'Hebron
Hospital

Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. 93 489 3891
Fax 93 489 4180
ceic@vhir.org

ID-RTF080

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Doña Mireia Navarro, Secretaria del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA CON MEDICAMENTOS del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, en el cual la Comisión de proyectos de investigación está integrada, se reunió en sesión ordinaria nº 244 el pasado 18 de marzo de 2016 y evaluó el proyecto de investigación PR(AMI)280/2015 presentado con fecha 01/09/2015, titulado "*Ultrasecuenciación de mRNA y microRNAs en exosomas de pacientes con Hipomagnesemia hipercalcúria y nefrocalcinosis familiar con mutaciones identificadas en el gen CLDN19*" que tiene como investigador principal a la Dra. Gema Ariceta Iraola del Servicio de Nefrología Pediátrica de nuestro Centro.

Y que tras emitir un informe aprobado condicionado en dicha reunión y evaluar la documentación recibida posteriormente en respuesta a este informe El resultado de la evaluación fue el siguiente:

DICTAMEN FAVORABLE

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 1090/2015, y su composición actual es la siguiente:

Presidenta: Gallego Melcón, Soledad. Médico
Vicepresidente: Segarra Sarries, Joan. Abogado
Secretaria: Navarro Sebastián, Mireia. Química



Institut Català
de la Salut

Hospital Universitari Vall d'Hebron
Universitat Autònoma de Barcelona



Vocales: Armadans Gil, Lluís. Médico
Azpiroz Vidaur, Fernando. Médico
Balasso, Valentina. Médico
Cucurull Folguera, Esther. Médico Farmacóloga
Latorre Arteché, Francisco. Médico
De Torres Ramírez, Inés M. Médico
Fernández Liz, Eladio. Farmacéutico de Atención Primaria
Ferreira González, Ignacio. Médico
Fuentelsaz Gallego, Carmen. Diplomada Enfermería
Fuentes Camps, Inmaculada. Médico Farmacóloga
Guardia Massó, Jaume. Médico
Joshi Jubert, Nayana. Médico
Hortal Ibarra, Juan Carlos. Profesor de Universidad de Derecho
Montoro Ronsano, J. Bruno. Farmacéutico Hospital
Rodríguez Gallego, Alexis. Médico Farmacólogo
Sánchez Raya, Judith. Médico
Solé Orsola, Marta. Diplomada Enfermería
Suñé Martín, Pilar. Farmacéutica Hospital
Vargas Blasco, Víctor, Médico

En dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Lo que firmo en Barcelona a 1 de Abril de 2016

**MIREIA NAVARRO
SEBASTIAN**

Firmado digitalmente por MIREIA NAVARRO SEBASTIAN,
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, ou=VREGU, https://
www.cerbert.cat/ver/dGAT_0003_ou=Servels Publics de
[certificacio CP1XSA-2, sh=MIREIA NAVARRO SEBASTIAN,
s=MIREIA NAVARRO SEBASTIAN, o=MIREIA NAVARRO SEBASTIAN,
c=ES]
Fecha: 2016.04.01 15:40:47 +02'00'

Sra. Mireia Navarro
Secretaria CEIm

Annex 2. Document d'informació al pacient i consentiments informats dissenyats per la inclusió dels individus a l'estudi.

Información al paciente para un estudio con muestras biológicas

Proyecto de investigación titulado “*Ultrasecuenciación de mRNA y microRNAs en exosomas de pacientes con Hipomagnesemia hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar con mutaciones identificadas en el gen CLDN19.*”

Investigador principal Dra. *M^a Gema Ariceta Iraola*; Servicio Nefrología pediátrica

Promotor: *proyecto financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria_FIS*

Objetivos:

Le solicitamos su participación en este proyecto de investigación cuyo objetivo principal es profundizar en el conocimiento de factores genéticos y epigenéticos que puedan influir en la enfermedad Hipomagnesemia hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar.

Beneficios:

Es posible que de su participación en este estudio no se obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores relacionados con la Hipomagnesemia hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que la sufren y contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

El ADN es un elemento que está presente en todas sus células, porque lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de “genes” que determina sus características físicas personales, como el color de ojos, de piel, etc. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas desarrollan unas enfermedades y otras no.

Procedimientos del estudio:

Si decide participar, se le realizará una historia clínica y una exploración física detallada, se le extraerá un tubo adicional de sangre (volumen en función del peso del paciente) y se le recogerá una muestra de orina (50mL).

Molestias y posibles riesgos:

La toma de muestras de sangre le puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y ocasionar un pequeño hematoma o una leve infección que desaparece en pocos días. Más raramente puede aparecer mareo en el momento de la extracción de sangre.

Lugar de realización del análisis:

Las muestras biológicas se enviarán al laboratorio de *Fisiopatología renal - CIBBIM*, del Vall d'Hebron Institut de Recerca, donde se analizarán.

Protección de datos personales:

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad por la Dra. *M^a Gema Ariceta Iraola*. El acceso a dicha información quedará

restringido al personal del servicio de pediatría, designado al efecto o a otro personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

Implicaciones de la información obtenida en el estudio:

Si decide participar en el estudio, es posible que en el análisis de sus muestras biológicas se obtenga información relevante para su salud o la de su familia. De acuerdo con la legislación vigente, tiene derecho a ser informado de los datos genéticos que se obtengan en el curso del estudio. Esta información se le comunicará si lo desea; en el caso de que prefiera no ser informado, su decisión se respetará.

Si quiere conocer los datos genéticos relevantes para su salud que se obtengan, infórmese a través de su médico sobre las implicaciones que esta información puede tener para su persona y su familia. Esta información se le comunicará si lo desea; en el caso de que prefiera no ser informado, su decisión se respetará.

Uso futuro de las muestras:

Además, le pedimos su consentimiento para que autorice al investigador a almacenar su muestra para realizar otros estudios genéticos relacionados con la enfermedad Hipomagnesemia hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar. Si autoriza que el material biológico obtenido se utilice en estas investigaciones, sus datos se mantendrán codificados a fin de garantizar la confidencialidad en su utilización, tal como prevé la legislación vigente.

Las muestras obtenidas se almacenarán en *el Biobanco del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Biobanco HUVH)* y el responsable de las mismas será la Dra. *G Ariceta* del Servicio de pediatría.

Su muestra sólo se utilizará en proyectos de investigación aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital.

Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con el investigador responsable, la Dra. *M^a Gema Ariceta Iraola* del Servicio de *Nefrología pediátrica*. Tel. *934893082*.

Derecho de revocación del consentimiento:

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que necesite y la relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

Si cambia de opinión después de dar sangre para el estudio genético, puede pedir que se destruya su muestra de ADN; para ello puede contactar con la Dra. *M^a Gema Ariceta Iraola* del Servicio de *Nefrología pediátrica*.

Consentimiento para el estudio con muestras biológicas codificadas de pacientes menores de 12 años

Título del estudio: Ultrasecuenciación de mRNA y microRNAs en exosomas de pacientes con Hipomagnesemia hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar con mutaciones identificadas en el gen *CLDN19*.

Yo (nombre y apellidos del padre, madre o tutor legal) _____ como padre, madre o tutor de (nombre y apellidos del participante) _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Comprendo que la participación es voluntaria.
Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Punto 1: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio sobre posibles factores genéticos relacionados con la enfermedad hipomagnesemia hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar en mi muestra de ADN.

Punto 2: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra de ADN se almacene para utilizarla en otros estudios sobre factores genéticos relacionados con la enfermedad hipomagnesemia hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar. Mi sangre y mis muestras de ADN se identificarán con un número codificado, y mi identidad se mantendrá en secreto.

Fecha y firma
del padre, madre o tutor

Fecha y firma
del investigador

Consentimiento para el estudio con muestras biológicas codificadas de pacientes de 12 a 18 años

Título del estudio: Ultrasecuenciación de mRNA y microRNAs en exosomas de pacientes con Hipomagnesemia hiper calciuria y nefrocalcinosis familiar con mutaciones identificadas en el gen *CLDN19*.

Yo (nombre y apellidos del participante), _____
En presencia de mis padres o representantes legales,

(nombre y apellidos del padre, madre o representante legal)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria.
Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Punto 1: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio sobre posibles factores genéticos relacionados con la enfermedad hipomagnesemia hiper calciuria y nefrocalcinosis familiar en mi muestra de ADN.

Punto 2: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra de ADN se almacene para utilizarla en otros estudios sobre factores genéticos relacionados con la enfermedad hipomagnesemia hiper calciuria y nefrocalcinosis familiar. Mi sangre y mis muestras de ADN se identificarán con un número codificado, y mi identidad se mantendrá en secreto.

Fecha y firma
del participante

Fecha y firma
del padre, madre o tutor

Fecha y firma
del investigador

Consentimiento para el estudio con muestras biológicas codificadas de pacientes mayores de 18 años

Título del estudio: Ultrasecuenciación de mRNA y microRNAs en exosomas de pacientes con Hipomagnesemia hiper calciuria y nefrocalcinosis familiar con mutaciones identificadas en el gen *CLDN19*.

Yo (nombre y apellidos del participante), _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Punto 1: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio sobre posibles factores genéticos relacionados con la enfermedad hipomagnesemia hiper calciuria y nefrocalcinosis familiar en mi muestra de ADN.

Punto 2: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra de ADN se almacene para utilizarla en otros estudios sobre factores genéticos relacionados con la enfermedad hipomagnesemia hiper calciuria y nefrocalcinosis familiar. Mi sangre y mis muestras de ADN se identificarán con un número codificado, y mi identidad se mantendrá en secreto.

Fecha y firma
del participante

Fecha y firma
del investigador

Annex 3. Documentació preparada per sol·licitar la inclusió d'individus en l'estudi.

ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE LA HIPOMAGNESEMIA FAMILIAR CON HIPERCALCIURIA Y NEFROCALCINOSIS (HFHNC). SOLICITUD DE COLABORACION

Apreciado compañero/a,

Como probablemente ya conoces, en el grupo de Fisiopatología Renal del Instituto de Investigación de nuestro hospital (Vall d'Hebron Institut de Recerca –VHIR-) estamos trabajando en un proyecto titulado "*Ultrasecuenciación de mRNA y microRNAs en exosomas de pacientes con Hipomagnesemia hipercalcúria y nefrocalcinosis familiar con mutaciones identificadas en el gen CLDN19*" liderado por la Dra. Gema Ariceta y la Dra. Anna Meseguer, y que está englobado dentro del proyecto Renaltube (www.renaltube.com)

Se trata de un proyecto de investigación financiado tanto por el Instituto de Salud Carlos III (FIS FI14_01107) como parcialmente por HIPOFAM (www.hipofam.org), la asociación de pacientes con hipomagnesemia familiar, que fomenta y apoya activamente la investigación en su enfermedad.

Este proyecto tiene como objetivo dilucidar qué mecanismos pueden modular la expresión clínica y la progresión de la hipomagnesemia familiar con hipercalcúria y nefrocalcinosis (HFHNC) en pacientes con diagnóstico genético confirmado. Entre las pruebas que realizaremos se incluye la secuenciación de genes potencialmente modificadores del fenotipo y el análisis de expresión de microRNAs en exosomas urinarios y circulantes en suero. De un modo simple queremos comparar pacientes con historia de progresión a la enfermedad renal crónica rápida o severa con otros con afectación lenta o menos grave, incluyendo trasplantados renales o no trasplantados, y también pacientes con o sin afectación ocular. Para ello analizaremos distintos factores genéticos y marcadores en muestras de sangre, en suero y orina, de modo transversal. Así mismo nos gustaría estudiar algunos pacientes controles sanos, sin la enfermedad, pero con una dotación genética similar, por lo que estamos interesados en estudiar a los hermanos no afectados de los pacientes, en el caso de que fuera posible.

Debido que se trata de una enfermedad rara o minoritaria, se precisa del mayor número posible de pacientes, y también controles, para obtener unos resultados robustos. Por ello, solicitamos tu colaboración en reclutar pacientes para el estudio y para la obtención de muestras, que esperamos puedas combinar con las extracciones que necesitan estos pacientes en su control clínico.



Intentaremos facilitar en lo posible este proceso encargándonos de la logística de la recogida de muestras en tu propio centro y de su transporte, que será libre de coste. Así mismo y para facilitar el envío hemos comprobado la eficacia de estudiar las muestras procesadas a temperatura ambiente, si bien es deseable que se envíen lo antes posible.

Una diferencia importante en el caso de los pacientes trasplantados es que no vamos a recoger orina (la expresión de microRNAs no corresponde al propio individuo), sino únicamente muestras de sangre y suero. En el resto de los pacientes y también en los controles sanos, sí precisamos orina (puede corresponder a orina que se recoja el mismo día de la consulta o en domicilio el día previo), aunque el volumen necesario es elevado (la razón es que la cantidad de exosomas que se pueden obtener en orinas tan diluidas como las que presentan estos pacientes es muy baja).

¿Quién puede incluirse en el estudio y que documentos y muestras biológicas son necesarias?

La inclusión del paciente al ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE LA HIPOMAGNESEMIA FAMILIAR CON HIPERCALCIURIA Y NEFROCALCINOSIS requiere del diagnóstico genético confirmado de HFHNC y de los siguientes documentos:

- 1) documento de Consentimiento Informado del paciente o de sus tutores, y del documento de Asentimiento para los pacientes entre los 12-18 años de edad.
- 2) copia del documento con el diagnóstico genético del paciente
- 3) una ficha sencilla de información clínica del paciente, que se detalla en el Anexo 2
- 4) en lo posible (no es indispensable), una copia impresa de los datos del paciente en la plataforma RenalTube (si tiene más de un control, una copia de cada uno de ellos)
- 5) una copia del último control analítico con el tratamiento actual del paciente. Si además nos pudieras facilitar un breve informe sobre el estado clínico del paciente, te estaríamos muy agradecidos, aunque no es indispensable.
- 6) el material biológico necesario para llevar a cabo el estudio se obtendrá a partir de muestras de sangre y orina de los pacientes, tal y como se especifica en el Anexo 1.

En el caso de que fuera UN CONTROL SANO, únicamente solicitamos que nos envíes los documentos de consentimiento informado /asentimiento, así como una copia de su analítica.

Es preferible que nos informes con 3 días de antelación antes de la obtención de las muestras para poder gestionar el envío de las muestras por mensajería y enviarte nuevamente una copia



de los documentos de *Consentimiento Informado* y *Asentimiento*, y la *Ficha de información clínica* por correo electrónico. No obstante si no hubieras podido contactar antes, llámanos por favor cuanto obtengas las muestras y agilizaremos la recogida de las mismas.

El protocolo de recogida de las muestras será el siguiente:

1. Avisar preferiblemente 3 días antes de la extracción de muestras a las personas de contacto en el VHIR. La persona a contactar es Mónica Valls Tel. 93 274 62 00 e-mail: monica.vall@vhir.org . No obstante, ante cualquier duda o falta de respuesta, contactar siempre con alguna de las otras dos investigadoras.
2. Facilitar nombre, teléfono y localización de la persona que entregará las muestras al mensajero.
3. Extracción y procesamiento de las muestras de sangre y recogida de la orina según el protocolo indicado en el Anexo 1.
4. **Guardar las muestras a 4°C (EN NEVERA NO EN CONGELADOR) hasta la llegada del mensajero.**
5. Recogida de los datos clínicos y cumplimentación de la Ficha de información clínica (Anexo 2). Impresión de los datos del paciente desde la plataforma RenalTube.
6. El mismo día de la obtención de las muestras, el centro proveedor recibirá un mensajero con el contenedor adecuado para el transporte de las mismas a 4°C.
7. A la llegada del mensajero, introducir las muestras de sangre, suero y orina en el contenedor para que el envío de vuelta al VHIR se realice de forma inmediata.

- Qué deberá incluir el paquete de envío:

- ✓ **Consentimiento/Asentimiento informado debidamente rellenado y firmado.**
- ✓ **1 tubo de sangre con EDTA** (especificaciones detalladas en el anexo 1).
- ✓ **1 tubo de suero** (especificaciones detalladas en el anexo 1).
- ✓ **5 botes de 100mL de orina (mínimo 3)** (especificaciones detalladas en el anexo 1).
- ✓ **Ficha de información clínica completa** (Anexo 2).
- ✓ **Impresión de la ficha del paciente de la plataforma RenalTube (diagnóstico y seguimiento)** (no en los controles)
- ✓ **Último control analítico y el tratamiento actual del paciente.**

Las muestras se recibirán en el laboratorio de Fisiopatología Renal del Vall d'Hebron Institut de Recerca, cuya dirección ya figurará en la caja que os haremos llegar.



Mònica Vall Palomar
Vall d'Hebron Institut de Recerca
Edifici Mediterrània
Planta 1, Laboratori 116 – 117
Paseo Vall d'Hebron, 119-129
08035 BARCELONA

Estamos a tu disposición para cualquier consulta o aclaración.

Muchas gracias por tu colaboración y esperamos obtener resultados importantes para el conocimiento de esta enfermedad, que permitan avanzar en su tratamiento.

Recibe un cordial saludo,

Dra. Gema Ariceta
Jefa de Servicio de Nefrología Pediátrica
Hospital Vall d'Hebron
Passeig Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. 93 489 30 82
E-mail: gariceta@vhebron.net

Dra. Anna Meseguer
Jefa de grupo de Fisiopatología Renal
CIBBIM Nanomedicina
Vall d'Hebron Institut de Recerca
Passeig Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. 93 489 40 61
E-mail: ana.meseguer@vhir.org

Mònica Vall Palomar
Vall d'Hebron Institut de Recerca
Passeig Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. 93 274 62 00
E-mail: monica.vall@vhir.org



ANEXO 1: Recogida de muestras biológicas

- Qué muestras deben ser recogidas:

- ✓ **ORINA:** 500mL → 5 botes de tapa roja de 100mL llenos.
(Mínimo 300mL: 3 botes)



Comprobar que los botes están correctamente cerrados

La orina se mantendrá en nevera a 4°C –no congelada- hasta que llegue el mensajero, pero puede haberse recogido a temperatura ambiente el mismo día de la consulta o el día previo. Es importante detallar que la pérdida de orina en algunas micciones no invalida la muestra ya que lo importante es que el volumen total sea el indicado)

- ✓ **SANGRE:** volumen en función del peso del paciente.

- **1 TUBO CON EDTA:**

- <10Kg: 2-4mL de sangre
- 10-20Kg: 4mL de sangre
- >20Kg: 4-8 mL de sangre



- **1 TUBO CON GEL SEPARADOR:** [vacutainer tapón **ORO**] para obtención de suero.

- <10Kg: 2-4mL de sangre
- 10-20Kg: 4mL de sangre
- >20Kg: 4-8 mL de sangre



IMPORTANTE: tras la extracción se deberá centrifugar el tubo durante 15 minutos a 1.500 x g a temperatura ambiente **y traspasar el suero (fase superior) a un tubo nuevo sin conservantes.**

GUARDAR A 4°C HASTA REALIZAR EL ENVÍO EL MISMO DÍA DE LA EXTRACCIÓN

NO CONGELAR !!!



Vall d'Hebron
Institut de Recerca
ANEXO 2: Ficha de información clínica



Marcar con una X las casillas correspondientes y rellenar los campos marcados con una línea.

- INICIALES del paciente y número de historia clínica: _____
- Sexo del paciente: Hombre Mujer
- Fecha de nacimiento: _____ Peso actual _____ Talla actual _____
- ¿Tiene algún familiar afectado de HFHNC?: Sí. Especificar: _____ No
- Fecha de diagnóstico de HFHNC: _____ No afecto es un control sano
- ¿Ha precisado diálisis?: Sí. Fecha de inicio: _____ No
- ¿Ha precisado trasplante renal?: Sí. Fecha: _____ No
- ¿Ha tenido más de un tiempo de diálisis o trasplante renal? Sí. Fechas: _____ No
- ¿Ha sido ingresado por infecciones urinarias)? Sí. (Indique número: _____) No
- ¿Presenta algún tipo de afectación ocular? No Sí.

Especificar: _____

Evolución de la creatinina anual y del filtrado glomerular (FG) desde el diagnóstico: (indique con una D si precisó diálisis, y con Tx si recibió un trasplante renal)

Método de cálculo usado: Ccr (Aclaramiento de creatinina) eGFR (*glomerular filtration rate*)

	Al diagnóstico	1er año	2º año	3er año	4º año	5º año	6º año	7º año	8º año	9º año	10º año
Cr mg/dL											
FG											

Si hay más años de seguimiento, anotar los datos correspondientes.



Vall d'Hebron
Institut de Recerca
ANEXO 2: Ficha de información clínica



Marcar con una X las casillas correspondientes y rellenar los campos marcados con una línea.

- INICIALES del paciente y número de historia clínica: _____
- Sexo del paciente: Hombre Mujer
- Fecha de nacimiento: _____ Peso actual _____ Talla actual _____
- ¿Tiene algún familiar afectado de HFHNC?: Sí. Especificar: _____ No
- Fecha de diagnóstico de HFHNC: _____ No afecto es un control sano
- ¿Ha precisado diálisis?: Sí. Fecha de inicio: _____ No
- ¿Ha precisado trasplante renal?: Sí. Fecha: _____ No
- ¿Ha tenido más de un tiempo de diálisis o trasplante renal? Sí. Fechas: _____ No
- ¿Ha sido ingresado por infecciones urinarias)? Sí. (Indique número: _____) No
- ¿Presenta algún tipo de afectación ocular? No Sí.

Especificar: _____

Evolución de la creatinina anual y del filtrado glomerular (FG) desde el diagnóstico: (indique con una D si precisó diálisis, y con Tx si recibió un trasplante renal)

Método de cálculo usado: Ccr (Aclaramiento de creatinina) eGFR (*glomerular filtration rate*)

	Al diagnóstico	1er año	2º año	3er año	4º año	5º año	6º año	7º año	8º año	9º año	10º año
Cr mg/dL											
FG											

Si hay más años de seguimiento, anotar los datos correspondientes.

Annex 4. Article sotmès a la revista Journal of Nephrology, actualment en revisió.

Heterogeneity is a common ground in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis caused by *CLDN19* gene mutations.

Mònica Vall-Palomar^{1†}, Carla Burballa^{1†}, Félix Claverie-Martín², Anna Meseguer^{1,3,4}, Gema Ariceta^{1,5,6}

[†]Both authors contributed equally to this manuscript. ¹Fisiopatologia Renal. Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM). Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Spain. ²Unidad de Investigación, Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain. ³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Unitat de Bioquímica de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain. ⁴Red de Investigación Renal (REDINREN), Instituto Carlos III-FEDER, Madrid, Spain. ⁵Servicio de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ⁶Departamento de Pediatría. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain.

Corresponding author: Dr. Gema Ariceta; Hospital Universitari Vall d'Hebron, Servicio de Nefrología Pediátrica, 08035 Barcelona, Spain; T: +34-934803082; gariceta@vhebron.net.

Acknowledgements

This study could not had been done without the collaboration of patients and families, the FHHNC patient advocacy group HIPOFAM (<http://hipofam.org>) and the Renaltube group (<http://renaltube.com>). We are also grateful to the physicians for their cooperation: Marisa Justa (Hospital Infantil Miguel Servet), Mireia Aguirre (Hospital Universitario Cruces), Carmen de Lucas and Carmen Aparicio (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús), Javier Lumbreras (Hospital Universitari Son Espases), Ainhoa Iceta (Hospital Virgen del Camino), Inés Vergara (Complejo Hospitalario Universitario A Coruña), Ana Sánchez (Hospital Universitario Virgen del Rocío), Marta Melgosa (Hospital Infantil La Paz), Santiago Rodríguez (Hospital de Terrassa), Ana Ruiz (Hospital Universitario Torrecárdenas), Juan David González (Hospital General Universitario Santa Lucía), Belén Campos (Hospital Infantil Miguel Servet), Leire Madariaga (Hospital Universitario Cruces), Montse Antón (Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba), Jonay Pantoja (Hospital Universitari Doctor Peset de Valencia), Manel Perelló (Hospital Universitari Vall d'Hebron), Ramón Saracho (Hospital Universitario de Álava), María Herrero (Hospital Universitario Cruces), Rebeca Garrote (Hospital Clínico Universitario de Valladolid) and Francisco Aguilar (Hospital General de Valencia).

ABSTRACT

Background: Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) is a rare tubulopathy caused by mutations in *CLDN16* or *CLDN19* genes. Patients develop hypomagnesemia, hypercalciuria, nephrocalcinosis and end-stage kidney disease (ESKD) early in life. Patients with *CLDN19* mutations may also have ocular abnormalities. Despite clinical variability, factors associated renal function (RF) progression and other disease features, especially in patients with *CLDN19* mutations, have not been addressed.

Methods: Retrospective multicenter study of 30 genetically confirmed FHHNC Spanish patients. We analyzed RF evolution considering CKD 3-free survival and annual estimated glomerular filtration rate (eGFR) decline to identify factors associated with different phenotypes.

Results: From thirty patients, 27 had mutations in the *CLDN19* gene (20 homozygous for p.G20D mutation) and 3 in the *CLDN16*. Age at diagnosis was 1.71 (0.67 – 6.04) years and follow-up time 8.34±4.30 years. No differences in CKD 3-free survival according to *CLDN19* mutation (p.G20D homozygous vs. other mutations) or gender were found, although female seemed to progress faster than men. At diagnosis, we observed higher PTH levels in patients with more pronounced eGFR decline afterwards than those with long-term stable RF, despite similar initial eGFR. Approximately 60% *CLDN19* patients associated ocular abnormalities. Further, we confirmed a high phenotypic intrafamilial variability.

Conclusions: In a contemporary cohort of FHHNC patients with *CLDN19* mutations, females seemed to progress faster to CKD-3 than men. Increased PTH levels at baseline may indicate more severe renal course. There was a high phenotype variability among patients with *CLDN19* mutations, and RF outcome even in siblings.

Key words: FHHNC, *CLDN19*, renal function (RF), hypomagnesemia

INTRODUCTION

Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) is a rare autosomal recessive tubulopathy (prevalence $<1/1.000.000$), characterized by renal Mg^{2+} and Ca^{2+} wasting, bilateral nephrocalcinosis and progressive chronic kidney disease (CKD) [1]. FHHNC can be caused by mutations in either *CLDN16* [2] (OMIM#248250) or *CLDN19* [3] (OMIM#248190) genes, which encode claudin-16 and claudin-19 respectively. Both proteins are co-expressed in the tight junction of the thick ascending limb of Henle's loop. They form a cation paracellular selective barrier that induces NaCl concentration gradient and a lumen-positive transepithelial voltage driving Ca^{2+} and Mg^{2+} reabsorption [4]. Loss-of-function mutations lead to urinary waste of Ca^{2+} and Mg^{2+} , resulting in hypomagnesemia, hypercalciuria and nephrocalcinosis [2, 3]. Other common clinical manifestations are polyuria-polydipsia, recurrent urinary tract infections (UTI), hypocitraturia, nephrolithiasis and, sometimes, incomplete distal tubular acidosis with persistent hypercalciuria and hypermagnesuria even after correction of acidosis [1, 5–8]. No differences in renal manifestations have been described between patients affected by mutations in these two genes. However, as *CLDN19* gene is also expressed in the retinal epithelium, patients with *CLDN19* mutations may also develop severe ocular impairment including colobomata, significant myopia, nystagmus and a characteristic retinal lesion or dysplasia involving macula [3]. Only mild ocular abnormalities have been described in a minority of patients with *CLDN16* mutations [7–9].

To date, at least 69 different mutations have been reported in *CLDN16* whereas only 22 in *CLDN19* [10]. For *CLDN16* mutations, a genotype-phenotype correlation was established in 71 patients: those with complete loss-of-function mutations in both alleles exhibited an earlier clinical onset and a faster CKD progression compared with patients with at least one partial-function mutation [11]. As for *CLDN19* mutations, no genotype-phenotype relationship has been reported. Conversely, there are evidences of phenotypic variability among patients sharing the p.G20D (c.59G>A) mutation in *CLDN19* gene. This mutation (Spanish/Hispanic mutation) is highly prevalent in the South of Europe due to a common founder ancestor [6, 12].

Although there are numerous reports on FHHNC evolution in patients with *CLDN16* mutations [1, 6, 8, 9, 12–15], those on *CLDN19* patients are fewer [3, 6, 12, 15–19]. Reported FHHNC patients exhibited some stage of CKD at diagnosis and progressed invariably to end stage kidney disease (ESKD).

In this study we describe the renal and ocular features in a contemporary Spanish cohort of 30 FHHNC patients with confirmed genetic diagnosis. We mean to update the clinical FHHNC knowledge, to assess gender differences on disease progression and to explore putative phenotype-genotype relationship among patients.

MATERIAL AND METHODS

Patients

We conducted an observational study by collecting clinical and biochemical data, at diagnosis and at different time points during follow-up in 30 individuals with genetically confirmed FHHNC. All patients attended follow-up care in 12 different hospitals in Spain and were treated according to care standards. Data was either provided by the nephrologist in charge or collected from the RenalTube Network database [20] and retrospectively analyzed. Regarding the last follow-up data, only patients who did not need renal replacement therapy were considered. Data of some patients had been previously reported [6, 19].

We assessed patient growth by adjusted Z-score estimation using reference growth charts from Spanish pediatric population ($Z = (\text{length of patient} / \text{mean length of population by age}) / \text{Length Standard Deviation of population by age}$) [21].

Genetics

All patients had been previously diagnosed with FHHNC through exonic sequencing of *CLDN16* and/or *CLDN19* [6, 19]. In 2 siblings, only one mutation was identified. Overall, 3 patients (2 families) were diagnosed with pathogenic variants in *CLDN16* gene while the remaining 27 patients in *CLDN19* gene. From those, 74% (n=20) were homozygous for the p.G20D mutation while the others were heterozygous or presented other variants in *CLDN19* gene (Figure 1).

Renal function calculation and glomerular filtration rate decline estimation

eGFR was calculated using the modified Schwartz formula for children [22] and the Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formula for adults [23]. To address disease evolution, patients were classified in 3 groups according to eGFR slopes as follows (Table 1): fast-renal progression, comprised by patients with an eGFR decline ≥ 10 mL/min/1.73m²/year (n=6); moderate-renal progression, which included patients with an eGFR decrease < 10 mL/min/1.73m²/year (n=17); and slow-renal progression, involving patients with no eGFR decline during follow-up. eGFR slopes were obtained by calculating the regression lines after plotting eGFR values and age.

Statistical Analyses

Continuous variables were expressed as mean and standard deviation if normally distributed, or as median and interquartile range otherwise. Comparative analyses of quantitative variables were performed with ttest or ANOVA. CKD 3-free survival time was estimated from birth to CKD stage 3 (first measurement of eGFR < 60 mL/min/1.73m²) using the Kaplan-Meier method. Data was censored at the last available patient follow-up. Log-rank tests were used to compare survival between groups. Pearson correlation was used for analyzing renal progression and ocular abnormalities relationship. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses and graphs were performed using SPSS v.20.0 RRID:SCR_002865, and GraphPad Prism 6 RRID:SCR_002798.

RESULTS

Demographics

This study included 30 patients (16 females) from 22 unrelated families. Remarkably, eight pairs of siblings were enrolled. Twenty one families were Caucasian; one had Latino ancestors. Seventeen patients (56%) had a family history of FHHNC (mainly siblings), whereas the other 13 represented the index case in the family.

Presentation at diagnosis and last follow-up

At time of clinical diagnosis, the median age was 1.71 (0.67 – 6.04) year old (eight patients were <1 year). Key diagnostic signs/symptoms were polyuria (30.4%), ocular abnormalities (21.7%), vomiting (17.4%), and UTI (17.4%) (Figure 2). In 13% cases, the diagnosis followed family screening. All patients exhibited severe bilateral nephrocalcinosis. Although 5 patients were identified after failure to thrive, the length/height ratio at diagnosis of this patient cohort was normal. None of the patients was born prematurely.

Remarkably, isolated hypomagnesemia ($Mg^{2+} < 1.6$ mg/dL) was found in 69% of patients. Hyperparathyroidism was often seen despite normal eGFR or mild CKD at diagnosis. Characteristically, urine analysis showed severe hypercalciuria and hypermagnesiuria. Additional parameters are shown in Table 2.

At last follow-up, ten patients had progressed to end-stage kidney disease (ESKD) at a median age of 7.5 (1.6-26.2) years, and were excluded from further analysis. In 20 non-ESKD patients, the mean follow-up time since diagnosis was 8.34 ± 4.30 years and the age at the study was 12.63 ± 5.40 years. Several patients (78.6%) remained with hypomagnesemia ($Mg^{2+} 1.38 \pm 0.27$ mg/dl), with a urinary Mg^{2+} /Creatinine ratio ($U_{Mg/Cr}$) of 0.21 ± 0.10 mg/mg and increased fractional Mg^{2+} excretion (FE_{Mg}) of $21.10 \pm 14.35\%$, despite low serum Mg^{2+} . Most individuals ($n=10$, 71%) had also an increased urinary Ca^{2+} wasting with a urinary Ca^{2+} /Creatinine ratio ($U_{Ca/Cr}$) of 0.29 ± 0.13 mg/mg.

None of those patients suffered from tetanic episodes, muscle cramps, weakness or rickets. One patient presented recurrent seizures. Other manifestations included ITUs in 9 patients requiring hospital admission, recurrently in 3 of them.

Renal function progression

Serum creatinine at diagnosis was 0.63 ± 0.38 mg/dL and eGFR 69.52 ± 16.94 mL/min/1.73m². To evaluate renal function (RF) progression, we compared those patients who evolved to CKD stage ≥ 3 (< 60 mL/min/1.73m²) from the others. CKD 3-free survival was 60%, 50% and 20% at 5, 10 and 20 years of patient age, respectively, as described in Figure 3. When considering gender, though not statistically significant, female patients reached CKD stage 3 earlier than male ($p=0.60$) (Figure 4a). Specifically,

at 2 years old, CKD 3-free survival was 92% in boys and 64% in girls, whereas at 10 years old it was 57% and 35%, respectively. Besides, patients with homozygous p.G20D *CLDN19* mutations exhibited a similar CKD progression than those with other *CLDN19* mutations ($p=0.7$) (Figure 4b).

Furthermore, we distributed patients according to their renal evolution pattern and analyzed them separately comparing fast, moderate, and slow-renal progression groups as detailed before. The fast-renal progression group, with a RF decline of -39.6 ± 27.18 mL/min/1.73m²/year, was entirely composed by *CLDN19* patients ($n=6$, 4 females), two homozygous for the p.G20D mutation. Most patients included in the moderate-renal progression category ($n=12$) were homozygous for mutation p.G20D as well, but in one case the disease was caused by *CLDN16* mutations. In the slow-renal progression group ($n=7$, 3 males), 4 individuals homozygous for *CLDN19* p.G20D, one with other *CLDN19* mutation and 2 patients with *CLDN16* mutations were included. When comparing serum biochemical parameters at diagnosis among different progression groups, serum PTH levels were significantly higher in the fast-renal progression group than in the slow-renal progression one, 155.25 ± 23.98 vs. 67.1 ± 34.75 pg/mL respectively ($p=0.02$) despite similar eGFR between both groups (Table 3). Even with higher urinary Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting at diagnosis seen in the fast-renal progression group, those differences were not statistically significant. Five out of six patients (83.3%) included into the fast-renal progression group reached ESKD before 4 years of age. In the moderate-renal progression group ($n=17$, 8 females), with a decline of the RF of -3.36 ± 1.82 mL/min/1.73m²/year, 5 out of 12 patients (41.6%) reached ESKD at a mean age of 23.1 ± 9.9 years. All patients included in the slow-renal progression group maintained stable RF.

Ocular manifestations

As expected, several patients with *CLDN19* mutations presented with ocular manifestations: fifteen patients (60%) were affected by myopia magna, macular coloboma and/or nystagmus, considered the prototypic ocular findings of the disease. Five patients (20%) had other ocular abnormalities, including mild myopia or astigmatism. No ocular involvement was detected neither in 5 patients (20%) with *CLDN19* mutations nor in those with *CLDN16* mutations. Data from 2 patients with *CLDN19* mutations were not available. Remarkably, no correlation between ocular impairment and kidney failure progression was observed ($p=0.41$).

Phenotypic variability among siblings

Characteristically, comparison between affected siblings revealed important renal and ocular phenotypic differences (Table 4). Since the single pair of siblings with *CLDN16* mutation shared similar disease manifestations, we focused on siblings with *CLDN19* mutations. For instance, in families F1 and F7, the youngest siblings (P2 and P14) reached ESKD at very early age and suffered from mild ocular impairment; instead, their older

brothers (P1 and P13) preserved RF at 18 and 11 years old respectively, but exhibited FHHNC ophthalmic disorders since diagnosis. On the other hand, all patients from families F2, F3 and F4 preserved native kidney function but distinctly the oldest siblings maintained a higher eGFR than the youngest ones. Nevertheless, siblings of family F5 (P9 and P10) had very similar and extreme renal phenotypes without ocular abnormalities; and, conversely, patients of family F6 had similar and mild renal phenotype reaching ESKD at an adult age. In this cohort, differences in RF decline between siblings was not related to delayed diagnosis.

DISCUSSION

Herein, we described the clinical phenotype and renal outcome in a large Spanish contemporary cohort of FHHNC genetically confirmed patients. Our study provides additional knowledge of the natural history of the disease, mainly focused on patients with *CLDN19* mutations. Major findings can be summarized as: i) there was high variability in CKD progression among FHHNC patients despite early diagnosis, even between siblings, ii) affected female seemed to progress faster to CKD stage 3 than men, iii) at diagnosis, serum PTH level was linked to kidney disease severity, iv) ocular impairment appeared exclusively in patients with *CLDN19* mutations, and v) there was no relationship between kidney and ocular manifestations or severity, not even between siblings.

FHHNC is caused by mutations in *CLDN16* or *CLDN19* genes, encoding claudin-16 and -19 proteins, respectively [2, 3]. Despite FHHNC rarity and clinical heterogeneity, some studies reported a relevant number of affected patients; several individual and familial cases had also been published [3, 6–9, 11, 16, 24]. Most of these studies described patients with *CLDN16* mutations, and only few of them with *CLDN19* mutations [3, 6, 16]. Konrad et al. identified *CLDN19* as a causative gene of FHHNC in 9 families and described the kidney and ocular involvement. Six years later, Godron et al. described a cohort of 32 patients, 23 of them with mutations in the *CLDN19* gene and, later on, Claverie-Martín et al. reported 31 patients from 27 unrelated families with *CLDN19* mutations (93.5% with the p.G20D mutation; 80% homozygous). In concordance with the geographical distribution of *CLDN16* and *CLDN19* mutations, in our series, 74% of patients were homozygous for the p.G20D mutation in *CLDN19*. Increasing availability of genetic diagnosis allows earlier recognition of FHHNC patients and better identification of its natural history. In this study, 53% of patients were female, as previous reports (56% to 61% females) [6, 9, 11, 16].

According to our findings, most patients were diagnosed during childhood. The age of clinical diagnosis in our study, 1.71 (0.67 – 6.04) years old, was similar to that reported

by Konrad et al. (0.8 (0.27-3.45) years old) [3], but substantially younger than what Godron et al. published 7.0 (3–14) and 10.0 (1–21) years for *CLDN16* and *CLDN19* patients, respectively [16].

Consistent with the literature [1, 7–9, 16], clinical presentation at diagnosis in our cohort included polyuria, failure to thrive and UTI. In some patients, prototypic ocular anomalies, presence of bilateral nephrocalcinosis or a prior affected sibling (13% of cases) facilitated the diagnosis too. Remarkably, laboratory evaluation showed hypomagnesemia associated with high urinary Mg^{2+} and Ca^{2+} [25], but normal serum Mg^{2+} in 30% of cases. Also, unexpected high PTH to eGFR, findings were also reported [8] (Table 2). Altogether, it is important to highlight that mild or absent hypomagnesemia in the presence of CKD does not preclude FHHNC disease; moreover, the detection of severe hypercalciuria and hypermagnesiuria may be a reason to be aware of that entity. In addition, the finding of nephrocalcinosis and/or ocular abnormalities can be key elements for suspecting FHHNC disease.

In our study, 10 patients reached ESKD during follow-up at a median age of 7.5 years with a wide age range (1.6-26.2), similarly to previously described cohorts [1, 6, 9, 11, 16] underlying the great variability regarding RF evolution. Differences in renal outcomes between patients with *CLDN16* and *CLDN19* mutations could not be compared in this series, due to the low number of patients with *CLDN16* included in this Spanish cohort, confirming the *CLDN19* predominance in the South of Europe as already described [6, 16]. To date, genotype-phenotype studies have shown that *CLDN19* patients had a higher risk of progression to CKD stage 3 than *CLDN16* patients [16] and, as mentioned, mutations in claudin-16 allowing residual function in at least one allele may delay the progression towards renal failure [11]. However, to our knowledge, no other studies about risk factors neither predictors of renal progression in FHHNC patients have been yet reported.

The originality of our study grounds on the finding that FHHNC patients with *CLDN19* mutations progressed differently over time even between individuals with the same pathogenic variants. This finding contrasts with what has been described in patients with *CLDN16* mutations, whose genotype highly influenced their kidney disease progression [11]. Therefore, we studied the role of *CLDN19* pathogenic variants (homozygous for p.G20D mutation vs other mutations) on progression to CKD stage 3, and no correlation between renal outcome and type of *CLDN19* mutation could be established (Figure 4a).

Importantly, this study provides additional information on differences in phenotype between siblings. Several works about phenotypic heterogeneity between siblings sharing the same mutations have been published [6, 9, 12, 13, 15]. However, we reported here 7 pairs of siblings, the largest number with *CLDN19* mutations ever analyzed. These findings suggest the presence of other unknown epigenetics, genetics or environmental

factors that could be modelling the disease progression. In our cohort, delay of diagnosis or differences on care were absent and so, those factors did not play a role in the differences in disease evolution.

Our study provides additional information regarding gender. We analyzed progression to CKD stage-3 (female vs. male) and observed that girls reached CKD stage 3 earlier (Figure 4b). Specifically, at 2 years old, the CKD3-free survival in girls was lower than in boys (64% and 92%, respectively). Possibly, it is likely that the small number of patients could explain the lack of statistical significance, but this finding may suggest the presence of unknown gender-related factors in kidney disease progression in FHHNC patients. Noteworthy, on the long-term (8.34 ± 4.30 years after diagnosis), the number of female patients included into the fast-renal progression group doubled the number of males, despite similar age of diagnosis and treatment initiation.

As a potential prognostic factor, we found that serum PTH level was linked to severity of kidney disease as patients within the fast-renal progression group had higher PTH levels than those within the slow one, despite similar eGFR. FHHNC patients were already described to show unexpected hyperparathyroidism even with normal eGFR [1, 26], which may be linked to renal tubular acidosis or a consequence of severe hypocalcemia [11, 27]. Indeed, two studies observed higher PTH levels in groups of patients with worse renal outcome [11, 16]. One could speculate that specific mineral metabolism disorders may explain differences in patient phenotypes as well. Importantly, reference values for some biochemical parameters (Table 3) are age dependent [28, 29] and their interpretation should take into consideration as serum creatinine in the fast-renal progression group is substantially elevated in relation with the median age group.

In this study, we did not observe any correlation between ocular abnormalities and kidney disease. In the eye, claudin-19 is expressed specifically in the retinal pigment epithelium [3] and so, ocular defects in *CLDN19* patients were expected despite an incomplete penetrance [3, 6, 12, 17]. In our cohort, 60% of patients with *CLDN19* mutations showed prototypic ocular manifestations, which is slightly less than what has been published [3, 6, 16]. Anyway, the differences in ocular and kidney involvement between siblings support different pathogenic mechanisms in each organ.

The main limitation of our study was the sample size, related with the low prevalence of the disease though we included most of known FHHNC patients in Spain. The retrospective and multicentre nature of the study explains the lack of data availability in some patients. Furthermore, patients were mainly Caucasian and very few had *CLDN16* mutations preventing us from additional study of potential prognostic factors or differences between both genes.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Funding: Research grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI14/01107 and PI18/01107) and HIPOFAM contribution supported this work.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval: This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of Vall d'Hebron Hospital (Date 01.04.2016 / No. (PR(AMI)280/2015)).

Informed consent: All patients, or their caregivers, provided written informed consent before participation in the study.

Authors' contributions: Mònica Vall-Palomar and Carla Burballa contributed equally in research design, research performance, data analysis and writing of the manuscript. Félix Claverie-Martín participated in the diagnosis of patients and writing of the manuscript. Anna Meseguer participated in research design, data analysis and writing of the manuscript. Gema Ariceta participated in research design, research performance, data analysis and writing of the manuscript.

REFERENCES

1. Praga M, Vara J, González-Parra E, et al (1995) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int* 47:1419–1425. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.199>
2. Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al (1999) Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg²⁺ Resorption. *Science* (80-) 285:103–106. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.103>
3. Konrad M, Seelow D, Pandey A V, et al (2006) Mutations in the Tight-Junction Gene Claudin 19 (*CLDN19*) Are Associated with Renal Magnesium Wasting , Renal Failure , and Severe Ocular Involvement. *Am J Hum Genet* 79:949–957
4. Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al (2008) Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cationselective tight junction complex. *J Clin Invest* 118:619–628. <https://doi.org/10.1172/JCI33970>
5. Ariceta G, Vallo A, Rodriguez-Soriano J (2004) Acidosis increases magnesiumuria in children with distal renal tubular acidosis. *Pediatr Nephrol* 19:1367–1370. <https://doi.org/10.1007/s00467-004-1609-7>
6. Claverie-Martín F, García-Nieto V, Loris Pablo C, et al (2013) Claudin-19 mutations and clinical phenotype in spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *PLoS One* 8:e53151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053151>
7. Weber S, Hoffmann K, Jeck N, et al (2000) Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet* 8:414–422. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200475>
8. Sikora P, Zaniew M, Haisch L, et al (2015) Retrospective cohort study of familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis due to *CLDN16* mutations. *Nephrol Dial Transplant* 30:636–644. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu374>
9. Weber S, Schneider L, Peters M, et al (2001) Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 12:1872–1881
10. Stenson PD, Mort M, Ball E V., et al (2017) The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 136:665–677. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6>

11. Konrad M, Hou J, Weber S, et al (2008) *CLDN16* Genotype Predicts Renal Decline in Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 19:171–181. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007060709>
12. Faguer S, Chauveau D, Cintas P, et al (2011) Renal, ocular, and neuromuscular involvements in patients with *CLDN19* mutations. *J Am Soc Nephrol* 6:355–360. <https://doi.org/10.2215/CJN.02870310>
13. Seeley HH, Loomba-Albrecht LA, Nagel M, et al (2012) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in three siblings having the same genetic lesion but different clinical presentations. *World J Pediatr* 8:177–180. <https://doi.org/10.1007/s12519-011-0295-3>
14. Müller D, Kausalya PJ, Bockenhauer D, et al (2006) Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3076–3079. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0200>
15. Arteaga ME, Hunziker W, Teo ASM, et al (2015) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: variable phenotypic expression in three affected sisters from Mexican ancestry. *Ren Fail* 37:180–183. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.977141>
16. Godron A, Harambat J, Boccio V, et al (2012) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: Phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with *CLDN16* or *CLDN19* mutations. *J Am Soc Nephrol* 7:801–809. <https://doi.org/10.2215/CJN.12841211>
17. Al-shibli A, Konrad M, Altay W, et al (2013) Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis (FHHNC): Report of Three Cases with a Novel Mutation in *CLDN19* Gene. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 24:338–344
18. Sharma S, Place E, Lord K, et al (2016) Claudin 19-based familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in a sibling pair. *Clin Nephrol* 85 (2016):346–352. <https://doi.org/10.5414/CN108783>
19. Perdomo-Ramirez A, Aguirre M, Davitaia T, et al (2019) Characterization of two novel mutations in the claudin-16 and claudin-19 genes that cause familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Gene* 689:227–234. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.024>
20. Mejía N, Santos F, Claverie-Martín F, et al (2013) RenalTube: A network tool for clinical and genetic diagnosis of primary tubulopathies. *Eur J Pediatr* 172:775–780. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-1934-6>
21. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al (2008) Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte II: Valores de talla, peso e índice de masa corporal desde el nacimiento a la talla adulta. *An. Pediatría* 68:552–569
22. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al (2009) New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 20:629–637. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008030287>
23. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al (2009) A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 150:604–612
24. Müller D, Kausalya PJ, Claverie-Martín F, et al (2003) A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet* 73:1293–1301. <https://doi.org/10.1086/380418>
25. Ariceta G, Rodríguez-Soriano J, Vallo A (1996) Renal magnesium handling in infants and children. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 85:1019–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb14209.x>
26. Michelis MF, Drash AL, Linarelli LG, et al (1972) Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis. *Metabolism* 21:905–920. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(72\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0026-0495(72)90025-X)
27. Yuan T, Pang Q, Xing X, et al (2015) First Report of a Novel Missense *CLDN19* Mutations Causing Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis in a Chinese Family. *Calcif Tissue Int* 96:265–273. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9951-7>
28. Espinosa Román L (2017) Valoración de la función renal. *Pediatr Integr* 21:549–555
29. de Kieviet W, Slaats EH, Abeling NG (1986) Pediatric reference values for calcium, magnesium and inorganic phosphorus in serum obtained from Bhattacharya plots for data from unselected patients. *J Clin Chem Clin Biochem* 24:233–242. <https://doi.org/10.1515/cclm.1986.24.4.233>
30. Haisch L, Almeida JR, Abreu Da Silva PR, et al (2011) The role of tight junctions in paracellular ion transport in the renal tubule: Lessons learned from a rare inherited tubular disorder. *Am J Kidney Dis* 57:320–330. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.08.038>

Figure Captions**Fig.1** Genetic characteristics of the study population**Fig.2** Initial signs and symptoms leading to diagnosis**Fig.3** Renal function survival (defined as ≥ 60 mL/min/1.73 m²)**Fig.4** Renal function survival (defined as <60 mL/min/1.73 m²) comparisons: a) by *CLDN19* genotype, and b) by gender

Figure 1.

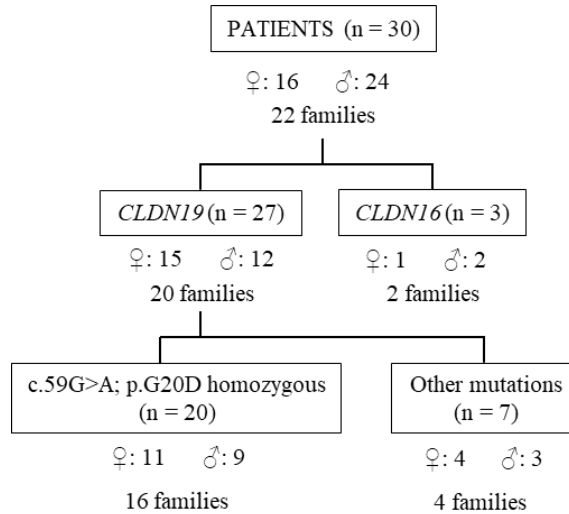


Figure 2.

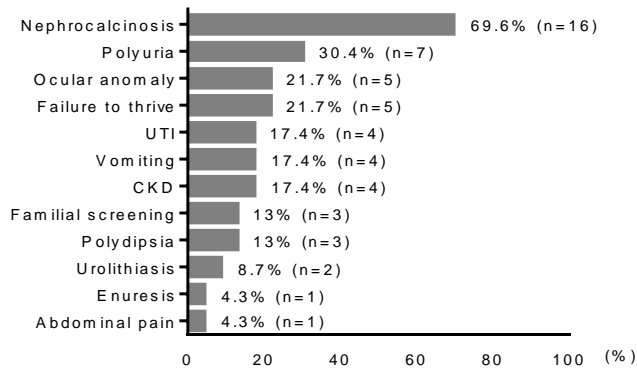


Figure 3.

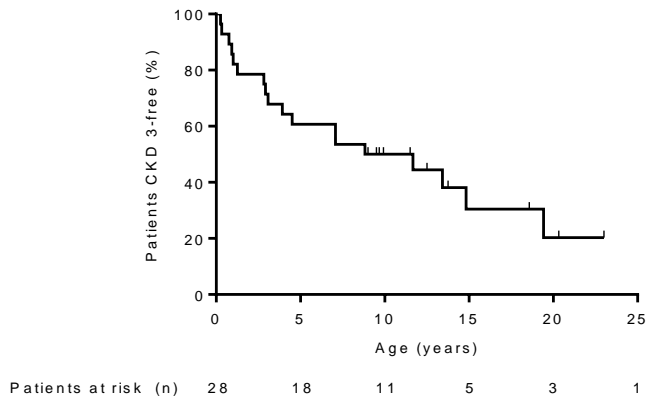
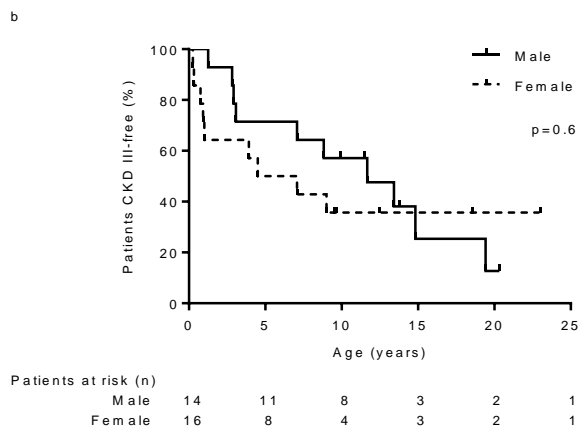
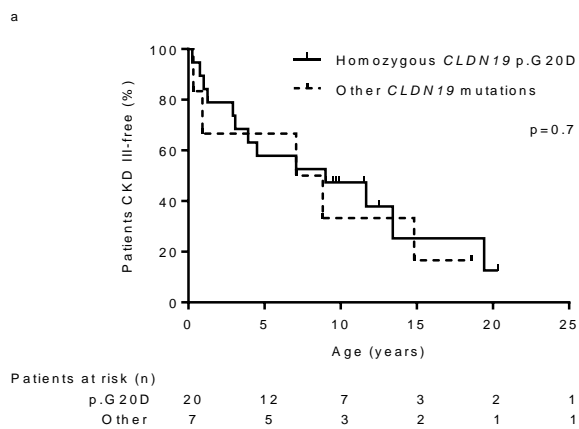


Figure 4.



Tables

Table 1. Criteria for patient stratification based on renal disease progression.

	Slope	Renal function	Patients (n)
Fast-renal progression	≤ -10	Decrease >10 mL/min/1.73m ² per year	6
Moderate-renal progression	-10 to 0	Decrease < 10 mL/min/1.73m ² per year	17
Slow-renal progression	> 0	Stable	7

Table 2. Biochemical parameters at diagnosis.

	N	All patients	Reference values [13, 30]
Creatinine, mg/dL	20	0.63±0.38	According to age[28]
eGFR ^a , mL/min/1.73m ²	19	69.52±16.94	>80
PTH, pg/mL	12	113.25±49.44	12-88
Venous pH	11	7.37±0.06	7.35 - 7.45
Serum bicarbonate, mmol/L	11	23.4±2.56	22 - 32
Serum potassium, mmol/L	13	4.62±0.45	3.3 - 5
Serum sodium, mmol/L	13	140.04±3.06	136 - 145
Serum chloride, mmol/L	12	105.08±4.38	95 - 110
Serum total calcium, mg/dL	13	10.18±0.60	8.8 - 10.6
Serum phosphate, mg/dL	13	5.07±0.67	According to age[29]
Serum magnesium, mg/dL (% of patients with Hypomagnesemia)	13	1.47±0.17 (69%)	1.6 - 2.6
Serum uric acid, mg/dL	12	6.37±2.10	2.6 - 6
U _{Ca} /Cr ^b , mg/mg	14	0.71±0.41	0.9 -2.2
U _{Mg} /Cr ^c , mg/mg	11	0.31±0.18	0.1-2.2
FE _{Mg} ^d , %	10	11.34±3.84	<4

Values expressed as (mean±SD).

^aEstimated glomerular filtration rate, ^bUrinary Ca²⁺/Creatinine, ^cUrinary Mg²⁺/Creatinine,

^dFractional excretion of Mg²⁺.

Table 3. Biochemical parameters at diagnosis in patients classified based on their progression towards ESKD. Fast-renal progression group was comprised by patients with an eGFR decrease > 10 mL/min per year, the moderate one by those with a milder eGFR decline of < 10 mL/min per year, and the slow-renal progression group included patients with a stable renal function.

	Fast	Moderate	Slow	p-value
Age, years	0.3 (0.1-0.8)	1.7 (0.7-4.1)	5.1 (1.8-6.2)	0.07
Serum Creatinine, mg/dL	0.5±0.1	0.8±0.5	0.6±0.1	0.3
eGFR ^a , mL/min/1.73m ² (Median (IQR)) [% of patients with eGFR < 90]	68.2±31.9 (60 (43.5-101.2)) [83]	67.5±14.3 (65 (54.6-82.4)) [94]	74.6±6.2 (74.8 (68.7-80.5)) [100]	0.8
PTH, pg/mL	155.4±23.9	117.4±44.3	67.1±34.8	0.02*
Venous pH	7.38±0.07	7.35±0.05	7.37±0.1	0.8
Serum bicarbonate, mmol/L	22.7±1.9	22.1±2.6	26.0±1.2	0.1
Serum potassium, mmol/L	4.8±0.5	4.6±0.5	4.4±0.3	0.3
Serum sodium, mmol/L	141.7±3.8	140.0±2.5	138.0±1.5	0.2
Serum chloride, mmol/L	107.0±6.4	104.3±2.1	103.0±1.0	0.4
Serum total calcium, mg/dL	10.2±0.6	10.3±0.8	10.2±0.6	0.9
Serum phosphate, mg/dL	5.6±0.7	4.7±0.5	4.8±0.5	0.06
Serum magnesium, mg/dL	1.5±0.2	1.4±0.1	1.5±0.1	0.3
Serum uric acid, mg/dL	5.7±2.2	7.1±2.8	6.5±0.8	0.6
U _{Ca} /Cr ^b , mg/mg	0.89±0.61	0.62±0.29	0.58±0.19	0.5
U _{Mg} /Cr ^c , mg/mg	0.42±0.19	0.19±0.02	0.22±0.13	0.2
FE _{Mg} ^d , %	12.2±4.7	12.0±3.3	8.4±3.7	0.5

Values expressed as (mean±SD), except for age which is median (IQR).

* Significant differences between the fast and the slow group.

^aEstimated glomerular filtration rate, ^bUrinary Ca²⁺/Creatinine, ^cUrinary Mg²⁺/Creatinine, ^dFractional excretion of Mg²⁺.

Table 4. Clinical characteristics of sibling patients at diagnosis and at last follow-up.

	Family 1		Family 2		Family 3		Family 4		Family 5		Family 6		Family 7	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Gender	M	F	F	M	M	M	F	F	F	F	F	F	M	M
Age at diagnosis^a	9,17	0,25	3,58	1,58	8,58	5,17	5,08	1,92	0,92	0,33	<1	2	3,92	0,75
Causes of diagnosis	PU, OA	FS	FS	PU	-	OA, CKD	-	PU, PD, NC, FT	UTI	CKD, NC	NC	-	PU, PD, UTI, NC	-
eGFR^b at diagnosis	60	45,98	85,5	90	67	55	78	63	56	64	N/D	N/D	0,9 ^c	0,52 ^c
Current age^a	18,5	9,08	18,5	17	15,08	11,67	9,67	7,25	12,92	9,33	45,92	36,33	11,25	10,42
Current eGFR^b	47	N/A	61,46	27	87	54	79	41	N/A	N/A	N/A	N/A	22,4	N/A
Age at ESKD^{a,d}	N/A	1,5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1,5	1,75	29,9	25,4	N/A	3,58
Ocular Impairment	MM, MC	My, AS	My	N, My	MM	MM	-	-	-	-	MM, MC, N	My, AS	MC, A	My

M: Male; F: Female; My: Myopia; AS: Astigmatism; MM: Myopia magna; MC: Macular colobomata; N: Nystagmus.

CKD: Chronic Kidney Disease; FS: Familiar Screening; FT: Failure to Thrive; NC: Nephrocalcinosis; PU: polyuria; PD: Polydipsia; OI: Ocular anomaly; UTI: Urinary tract infection.

N/A: Not applied; N/D: Not determined.

^aAge expressed as years, ^bEstimated glomerular filtration rate, ^cCreatinine levels at diagnosis expressed as mg/dL, ^dEnd-stage kidney disease

Annex 5. Article publicat a la revista Journal of Translational Medicine.

Vall-Palomar et al. *J Transl Med* (2018) 16:278
<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1651-z>

Journal of
Translational Medicine

METHODOLOGY

Open Access



Establishment of urinary exosome-like vesicles isolation protocol for FHHNC patients and evaluation of different exosomal RNA extraction methods

M. Vall-Palomar¹, J. Arévalo¹, G. Ariceta^{1,2} and A. Meseguer^{1,3,4*}

Abstract

Background: Molecular and cellular pathophysiological events occurring in the majority of rare kidney diseases remain to be elucidated. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in either *CLDN16* or *CLDN19* genes. This disease is characterized by massive urinary wasting of magnesium and calcium, osmosis deregulation and polyuria. Patients with p.G20D homozygous mutation in *CLDN19* gene exhibit different progression to kidney failure suggesting that beyond the pathogenic mutation itself, other molecular events are favoring disease progression. Due to the fact that biopsy is not clinically indicated in these patients, urinary exosome-like vesicles (uEVs) can be envisioned as a valuable non-invasive source of information of events occurring in the kidney. Exosome research has increased notably to identify novel disease biomarkers but there is no consensus standardized protocols for uEVs isolation in patients with polyuria. For this reason, this work was aimed to evaluate and refine different uEVs isolation methods based on differential centrifugation, the gold standard method.

Results: Characterization by NTA, cryo-TEM and immunoblotting techniques identified the most appropriate protocol to obtain the highest yield and purest uEVs enriched fraction possible from urine control samples and FHHNC patients. Moreover, we tested five different RNA extraction methods and evaluated the miRNA expression pattern by qRT-PCR.

Conclusions: In summary, we have standardized the conditions to proceed with the identification of differentially expressed miRNAs in uEVs of FHHNC patients, or other renal diseases characterized by polyuria.

Keywords: Urinary exosome-like vesicles, Exosome isolation, Exosomal miRNA, FHHNC

Background

Rare kidney diseases include at least 150 different inherited disorders that can affect all the segments in the nephron impairing homeostatic processes [1]. The high number of rare kidney diseases, their low prevalence and, in many cases, their highly phenotypic variability leads to

a poor knowledge of the natural history and mechanisms underlying disease progression.

Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) is a rare autosomal-recessive disorder caused by mutations in either *CLDN16* or *CLDN19* genes [2–4]. The loss-of-function of one of those genes leads to massive urinary wasting of magnesium and calcium causing osmosis deregulation and polyuria. Although two-thirds of the affected patients in Spain are presenting a specific founder mutation (c.59G>A; p.G20D) in *CLDN19* gene, there are important individual differences on the progression to end-stage

*Correspondence: ana.meseguer@vhir.org

¹ Fisiopatologia Renal, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Spain

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



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

renal disease (ESRD) [5–10]. This suggests the existence of other non-identified molecular events that contribute to the physiopathology of the disease, promoting ESRD progression. Because kidney biopsy samples, which could allow the study of those intra-renal processes, are not clinically indicated in most patients with FHHNC, blood and urine are the only available samples for the discovery of surrogated markers that might indicate disease progression in those patients.

Exosomes are small (30–150 nm) membrane vesicles of endocytic origin contained into multivesicular bodies and released constitutively through fusion with the plasma membrane [11–13]. Exosomes can act as cell-to-cell communication mediators that trigger intracellular signaling pathways [14–18] and have been pointed out as a promising source of biomarkers, since their cargo (protein, DNA, mRNA and non-coding RNA) represents their cellular origin content [18–21]. The biogenesis and excretion of nanovesicles take place in every segment of the renal nephron [12], thereby, analysis of urinary vesicles should provide information about the pathophysiological state of the entire renal tubule and might be considered a reliable non-invasive source of cellular events information [12, 22]. It is important to remark that due to the absence of exosome specific markers that lead to an uncertain origin of the isolated vesicles (released from multivesicular bodies or other intracellular compartments), urinary exosome-like vesicles (uEVs) are considered as the enriched fraction of nanovesicles having similar size and morphology.

Diverse studies have shown that nanovesicles can be recovered from urine by ultracentrifugation, ultrafiltration or by other techniques [12, 23, 24]; however, these studies focused predominantly on patients with normal urine output. There is no information about the efficiency of those methods in isolating nanovesicles from patients with urinary ionic deregulation and massive urine wasting. In diseases coursing with severe polyuria, such as FHHNC, urinary exosome-enrichment may be lower than in a control sample. Therefore, we decided that differential centrifugation, which allows an unlimited urine volume input, might be the best method to obtain sufficient exosome yields for subsequent analysis. So far, diverse differential centrifugation protocols for urinary exosome isolation have been described in the literature, including: (a) DTT treatment step to release entrapped exosomes from the polymeric Tamm–Horsfall protein (THP) networks, the most abundant protein in urine [25–30]; (b) large extracellular vesicles removal through a 0.22 μm filter to restrict the co-precipitation of larger extracellular vesicles presents in urine [26]; (c) exosome-enriched fraction precipitation speed ranging 100,000–200,000 $\times g$ [26, 28, 29, 31].

To the best of our knowledge, there is no consensus protocol to isolate uEVs of patients with polyuria. Therefore, in the present study we propose an optimized differential centrifugation method for uEVs isolation that would be useful for further identification of markers linked to disease outcome in patients with FHHNC [32].

One of the most appealing features of isolating urinary exosomes is explained by their miRNA cargo. In particular, exosomal miRNAs have become an object of study in many biomedical areas to identify novel and highly promising biomarkers for kidney diseases [20, 33, 34]. In this work, we also evaluated five different RNA extraction methods and selected the one that provided with the best yield and purity for further differential miRNAs expression analysis.

Methods

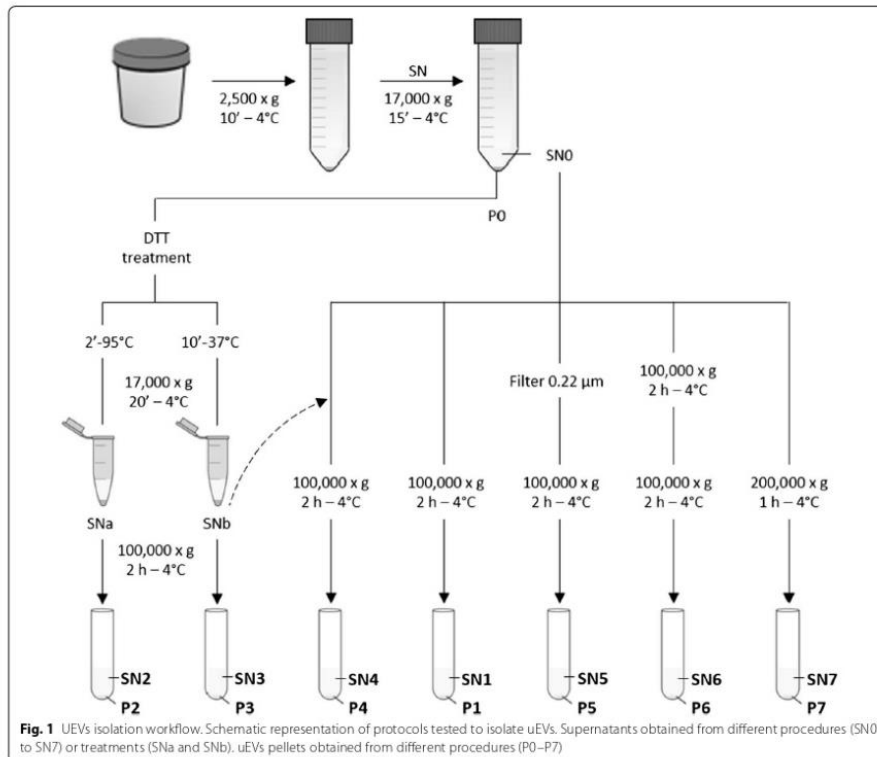
In order to standardize a protocol for uEVs isolation in patients with polyuria we evaluated and refined different uEVs isolation methods based on differential centrifugation.

Urinary exosome-like vesicles isolation

We performed different approaches (based on differential centrifugation) named P1–P7 (Fig. 1).

Approximately 500 mL of urine from seven healthy human donors (control samples), 4 females and 3 males, were collected in sterile recipients, pooled and maintained at 4 °C for 24 h. These conditions recapitulate those suffered by FHHNC patient's samples collected at different hospitals of Spain. Protease inhibitor cocktail (PIC) (#S8820 Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE) was added to the sample at 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and centrifuged 10 min at 2500 $\times g$ to remove cell debris. Samples were centrifuged 15 min at 17,000 $\times g$ to pull down cell fragments, apoptotic cells and larger vesicles. The supernatant (SNO) was kept on ice while the pellet obtained (P0) was treated with DTT (#A2948 AppliChem, Barcelona, ES) (200 mg/mL) at 95 °C for 2 min or at 37 °C for 10 min and vortexed every 2 min. Both DTT treated pellets were centrifuged at 17,000 $\times g$ for 20 min and supernatants (SNa–SNb) were ultracentrifuged (Sorvall WX90; AH629 rotor) at 100,000 $\times g$ for 2 h, obtaining P2 and P3 respectively.

SNO was divided into five 100 mL aliquots that were processed by different procedures: (a) SNO ultracentrifugation at 100,000 $\times g$ for 2 h (P1); (b) combination of SNO with SNb and ultracentrifugation at 100,000 $\times g$ for 2 h (P4); (c) SNO filtration through a 0.22 μm -pore followed by ultracentrifugation at 100,000 $\times g$ for 2 h (P5); (d) SNO double ultracentrifugation for 2 h at 100,000 $\times g$ (P6) and; (e) SNO ultracentrifugation at 200,000 $\times g$ for 1 h (P7), all them performed at 4 °C. All the uEVs isolated were



resuspended in 150 μ L of cold and pre-filtered PBS 1 \times and saved at -80°C .

Urine samples from 20 FHHNC patients (8 women and 12 men) were collected at hospitals from different geographical places in Spain and individually processed at Hospital Universitari Vall d'Hebron, as previously described. Clinical and genetic data from these patients is included in the RENALTUBE Spanish Registry (www.renaltube.com) [32].

Urinary exosome-like vesicles characterization

uEVs obtained following the procedure described above were characterized by three methods: Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM) and immunoblotting techniques.

NTA

NTA was performed using NanoSight NS300 (Malvern Instruments). Videos were recorded and analyzed using NTA software v3.1 (NanoSight Ltd., UK). Background extraction was applied and the automatic setting for minimum track length, blur settings and minimum expected particle size were established. uEVs samples were diluted to optimal concentrations according to the manufacturer's protocol. Each measure was carried out in triplicate of 60 s recordings at 25 frames per second, generating three replicate histograms that were averaged.

Cryo-TEM

Ten microliters of uEVs diluted in PBS 1 \times were placed on Formvar-Carbon EM grids and frozen in ethane.

Samples were analyzed on a Jeol JEM 2011 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 200 kV.

Immunoblotting

uEVs suspensions were treated with lysis buffer 1:1 (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, NP-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, PIC, 1:200, NaF 1 mM, Na_2VO_4 1 mM). After 1 h shaking at 4 °C, samples were sonicated at maximum amplitude for 5 cycles of 5 s and then centrifuged at $13,000\times g$ for 15 min at 4 °C. Supernatants were collected and stored at -20 °C. An equal amount of total uEVs lysates (20 μL) were mixed with Laemmli sample buffer 1:1 (Tris-HCl pH 6.8 0.3 M, SDS 10%, glycerol 5%, β -mercaptoethanol 2%, bromophenol blue 0.01%) and loaded onto 15% acrylamide gel and ran at 100–150 V for 1 h. Proteins were transferred to a PVDF 0.2 μm membrane (Immobilon-P^{SO}) (#ISEQ00010 Millipore, Darmstadt, DE) at 100 V for 1 h. Membranes were blocked using 5% non-fat dry milk diluted in PBS-T (PBS 1 \times , Tween-20 0.1%) and tested against specific primary antibodies: TSG101 (#Ab83 Abcam, Cambridge, UK) 1:500 and Alix (#Ab76608 Abcam, Cambridge, UK) 1:500. Secondary antibodies were rabbit anti-mouse polyclonal and goat anti-rabbit polyclonal, respectively (#P0260, #P0448 Dako, California, EUA) 1:5000. All the antibodies were diluted in blocking solution.

Immunoblots were visualized using chemiluminescence reagent (#WBLUF0500 Millipore, Darmstadt, DE) and Odyssey Fc Imaging System (Li-Cor, Lincoln, NE).

RNA extraction and miRNA expression pattern

uEVs RNA extraction and quantification

For total RNA extraction, 5 different methods were tested: miRNeasy Mini kit (#217004 Qiagen), miRCURY RNA Isolation kit (#300110 Exiqon, Vedbaek, DK), All-prep DNA/RNA/miRNA Universal kit (#80224 Qiagen), TRIzol LS (#10296010 Life Technologies) and TRIzol (#15596026 Life Technologies). Each RNA extraction was performed from 100 μL of FHHNC patient's uEVs. Purified RNAs were eluted in RNase-free water and stored at -80 °C. RNA concentrations were measured by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer-Picochip).

miRNA profiling

Four nanograms of total RNAs were retrotranscribed according to Universal cDNA Synthesis Kit (#203301 Exiqon, Vedbaek, DK) protocol. cDNAs were diluted at 1:40 and combined with SYBR Green master mix following the miRCURY LNA Universal microRNA PCR (#203403 Exiqon, Vedbaek, DK) instructions. qPCR was performed in an ABI7500 Real-Time cyclers (Applied

Biosystems). Primers used were designed to detect: miR-200c-3p, miR-103a-3p, miR-let7b-5p, miR-99a-5p and miR-10b-5p. Unisp6 was added as an exogenous control, since they have been found in uEVs [27].

Results

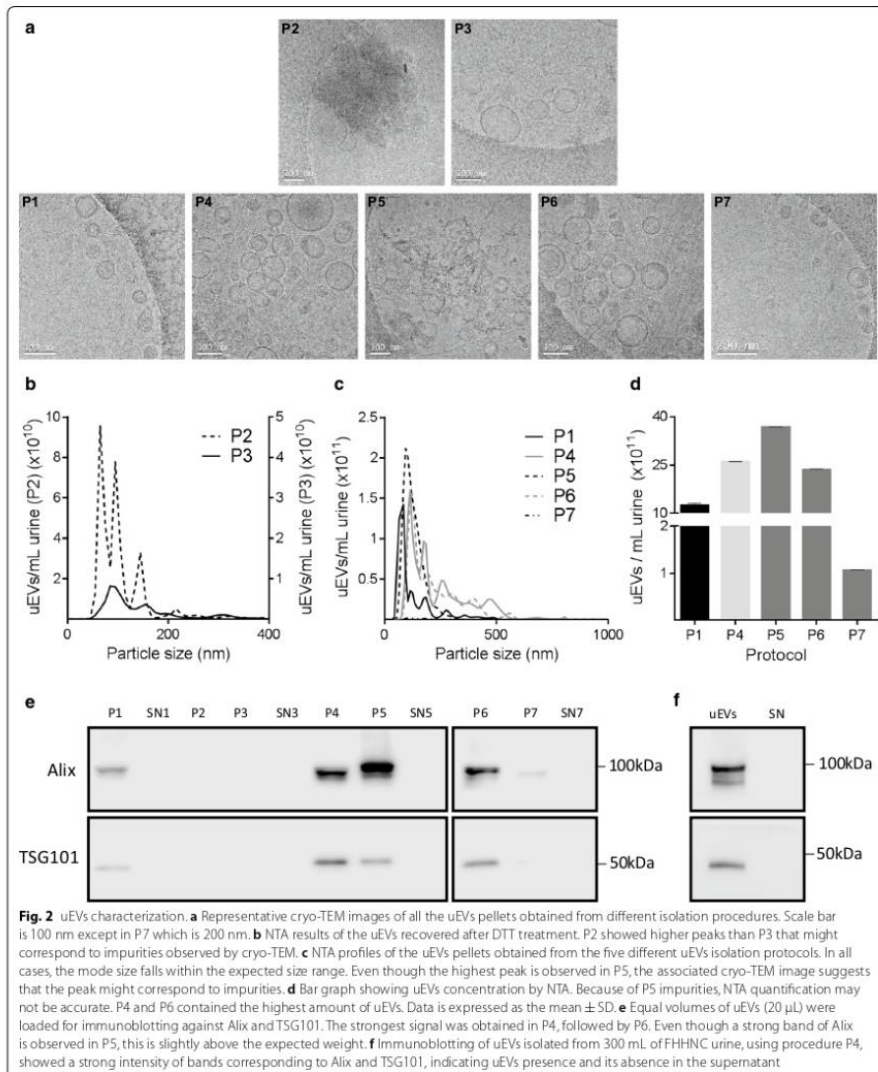
Optimization of urinary exosome-like vesicles isolation protocol

Because of the lack of methodological consensus and the imperative need to standardize the uEVs isolation protocol, we tested several paths based on differential centrifugation steps and sample treatments to determine the procedure that provides the purest and highest uEVs yield (Fig. 1). Morphology, size and quantity of isolated uEVs from a control urine sample pool were evaluated by cryo-TEM and NTA.

We first aimed to observe which temperature and time of the DTT treatments tested improved the yield and purity of uEVs. As shown in Fig. 1, the former $17,000\times g$ pellet (P0) was treated with DTT either at 95 °C for 2 min or at 37 °C for 10 min and centrifuged at $17,000\times g$ for 20 min. The uEVs-containing supernatants (SNa and SNb) were then ultracentrifuged at $100,000\times g$ for 2 h, giving as a result pellets P2 and P3. Cryo-TEM images clearly demonstrated that P3 was superior on purity when compared with P2, indicating that DTT treatment for 10 min at 37 °C (P3) was more efficient depolymerizing the THP network than 2 min at 95 °C (P2) treatment (Fig. 2a above). By using NTA we quantified more uEVs in P2 than in P3 (Fig. 2b) likely due to the presence of impurities (THP complexes) contained in P2. Western blot assays for Alix and TSG101 proteins gave negative results for P2 and P3, in accordance with the low yield of exosomes released from the THP network (Fig. 2e).

We next analyzed whether recovering THP network entrapped uEVs might improve the final uEVs yield. For this purpose, we mixed SN0 with SNb (Fig. 1) and proceeded with the ultracentrifugation at $100,000\times g$ for 2 h, obtaining P4. Cryo-TEM images showed that P4 contains highly purified uEVs (Fig. 2a below) that are in higher quantities than those observed in P1 and P3, separately, upon NTA quantification (Fig. 2b, c). To validate uEVs yield by another method and to verify the presence of exosome-enriched proteins in the sample, we performed immunoblots against two exosomal associated proteins (Alix and TSG101), showing higher expression of these proteins in P4 than in P1 (Fig. 2e). In conclusion, we could say that mixing uEVs released from the DTT treated pellet with SN0 increases the number of uEVs without compromising its purity.

NTA profiles of uEVs obtained from the different isolation procedures revealed that mode size falls within the expected size range. NTA quantification confirms



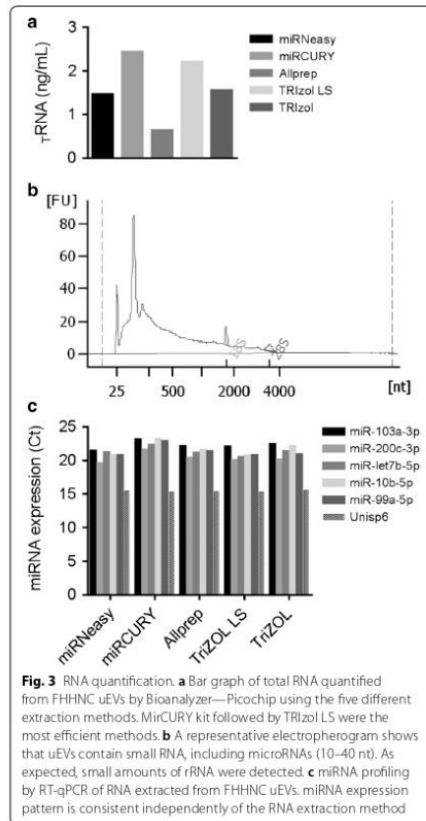
that P5, obtained after one ultracentrifugation of filtered SN0 at 100,000×g for 2 h, exhibits the highest yield, followed by P4 (described above), P6 (SN0 at 100,000×g for 2 h twice), P1 (SN0 at 100,000×g for 2 h once) and P7 (SN0 at 200,000×g for 1 h once) (Fig. 2c, d). These results are in accordance with the visual inspection of uEVs by cryo-TEM, except for P5 which seemed to drag some unknown material by the filtering process (Fig. 2a below). Western blot assays did also agree with previous NTA quantification (Fig. 2e). Supernatants SN1, SN3, SN5 and SN7, resulting from uEVs precipitation steps, were included as controls to demonstrate that no exosome particles remain in those supernatants.

Overall, data obtained in this study indicate that: (i) the protocol used in P5 produces the best yield but the cryo-TEM images show impurities in the sample that makes it unacceptable for further differential expression analyses of miRNAs; (ii) the protocol used in P7 is not producing enough exosomes for our purposes; (iii) the procedure used in P4 is the one that shows the best yield and purity followed by the one used in P6. In conclusion, ultracentrifugation at 100,000×g for 2 h of mixed SN0 and SNb was selected as the preferred protocol for uEVs isolation and was the one validated and used in patient's urine samples.

In order to validate the proposed methodology in FHHNC patients, whose urine is estimated to be diluted at least three times in relation to control urine, we performed the P4 procedure in 300 mL of patients' urine and observed that the selected protocol is suitable for successful uEVs isolation from diluted urines (Fig. 2f).

Evaluation of different RNA extraction methods and miRNA expression pattern

A systematic comparison of five different commercial RNA extraction methods (mentioned above) was performed with uEVs isolated from a FHHNC patient. Total RNA, including miRNAs, were extracted from 100 µL of uEVs in each procedure, being miRCURY and TRIzol LS the most efficient methods, according to the Agilent 2100 Bioanalyzer-Picochip quantification analyses (Fig. 3a). The miRCURY-RNA profile obtained with Bioanalyzer-Picochip is shown in Fig. 3b. To evaluate if the RNA extraction method could affect the miRNA profile of the samples, we analyzed five different miRNAs by qRT-PCR (miR-103a-3p, miR-200c-3p, miR-let7b, miR-10b-5p and miR-99a-5p). Unisp6 was added as an exogenous control. Results obtained in Fig. 3c demonstrated that miRNA pattern is similar in all samples, and therefore that the RNA extraction method does not have any significant effect on miRNA profiling. Unisp6 levels were exactly the same for each procedure, validating the assay.



Discussion

Urine sample analysis is irreplaceable as a non-invasive method for disease diagnosis and follow-up, particularly for kidney diseases. However, non-degraded protein and RNA may be only found in uEVs. Unlike tissue biopsy, an invasive and expensive procedure that allows only a partial sampling of an organ, uEVs provide a full representation of the entire urinary system and their study is attractive in the field of biomarker discovery in kidney diseases. RNA and proteins confined into uEVs can be used as a reliable and non-invasive source of information of renal cellular and molecular related-events.

There are a growing number of commercial kits for uEVs isolation but the results often differ from those obtained using traditional isolation techniques. In

diseases such as FHHNC, coursing with polyuria, the starting quantity of urine required to obtain a good yield of uEVs might be higher than in healthy individuals and the currently available exosome isolation kits are not suitable for our purposes. Therefore, for the aim of this pilot study, which is in its discovery phase, we propose the use of ultracentrifugation techniques, which are the gold standard method for uEVs isolation and allow an unlimited urine volume input to obtain enough uEVs in highly diluted urine samples.

Diverse protocols based on differential centrifugation have been described in several reports [27, 28, 35–39]. However, there is no a consensus protocol that would provide information on the amount of starting urine volume, nor a detailed and thorough procedure that could give reliable information on uEVs yield and purity. Because we want to use these uEVs for further comparative miRNA profiling of patients suffering from FHHNC, the aim of this study was to standardize a differential centrifugation protocol for uEVs isolation from diluted samples. We validated every step of the ultracentrifugation process by cryo-TEM, NTA and immunoblotting assays, to finally establish a protocol that would be suitable for the accomplishment of our goals and also to select the best RNA extraction method for further miRNA profiling.

The first issue that we faced was sample handling standardization and storage. In rare diseases, such as FHHNC, the number of patients is very low and they are distributed in different places of the geography which requires sample transportation before uEVs isolation. Urine, which is a complex fluid, should not be frozen before removing cells and cellular debris that can be lysed releasing their content in an undesired manner. For this reason, and although previous studies recommended freezing samples at -80°C to loss the minimum urinary exosome-associated proteins after urine collection [40], we maintained control sample at 4°C for 24 h, in order to mimic the time-lag and temperature of transportation, and proceed to uEVs isolation afterward. Our results indicated that this storage procedure maintained uEVs structure in perfect conditions for further analysis, as demonstrated by cryo-TEM.

Regarding DTT treatment, there are different recommendations in the literature in terms of time and temperature [25–30]. Our results showed that incubation at 37°C for 10 min (P3) is the condition that produced the purest uEVs, as well as, an acceptable yield (Fig. 2a above and Fig. 2b).

Different speed and ultracentrifugation cycles of SN0 showed that $100,000\times g$ for 2 h (P1) is more efficient than $200,000\times g$ for 1 h (P7). Moreover, uEVs yield was improved with the addition of uEVs released from THP

networks (SNb) to SN0 (P4). Another step analyzed was the filtering of SN0 through a $0.22\ \mu\text{m}$ filter [19, 41–43]. Unexpectedly, cryo-TEM analysis indicated that filtered uEVs contained many impurities (Fig. 2a below), likely released by the filter or from disrupted uEVs as a consequence of pressure, producing an over-quantification by NTA (Fig. 2c, d). The efficiency of ultracentrifugation in uEVs isolation was confirmed by immunoblotting since neither Alix nor TSG101 were detected in supernatants (Fig. 2e). In accordance with our results, we selected P4 as the best protocol to process diluted urine from FHHNC patients which is, on average, three times more diluted than controls, adapting the protocol to 300 mL of starting urine instead of 100 mL. The presence of exosomal-enriched markers (Fig. 2f), indicated that the volume sample input was enough to obtain a sufficient yield of uEVs.

An accurate quantification of RNA extracted from uEVs, which mainly includes miRNA, represents an important bottleneck for comparative expression analyses. Since there are no robust endogenous controls for data normalization of miRNA from uEVs, quantification should be as accurate as possible. Our next concern was then to obtain and quantify, in a reliable manner, the RNA yield from the FHHNC uEVs. Five RNA extraction methods were compared in different aliquots of the same uEVs sample.

Quantification of the RNA obtained by each method was based on spectrophotometry (Nanodrop ND-1000), capillary electrophoresis (Bioanalyzer—Nanochip and Picochip) and fluorescence (Ribogreen) (data not shown). In our experience, the Bioanalyzer Picochip, with a detection range from 50 to $5000\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$, was the most precise, consistent and robust method for RNA measurement. Therefore, it was used as the reference for other RNA quantification methods and selected for further uses. We observed that Nanodrop and Ribogreen over- and underestimated RNA quantifications, respectively, and Bioanalyzer Nanochip, with a detection range from 5 to $500\ \text{ng}/\mu\text{L}$, provided non-consistent results. Subsequent qRT-PCR, showing similar expression levels of each miRNA among all samples demonstrated the accuracy of the Bioanalyzer Picochip method. Albeit the similar miRNA expression pattern obtained from the five different RNA extraction methods (Fig. 3c), we selected miRCURY kit since exhibited the highest RNA yield.

This work has provided with a comprehensive protocol for reliable uEVs isolation, both from healthy individuals and polyuric patients suffering from kidney disease. It covers the conditions for sample pre-processing, uEVs isolation, characterization and quantification, as well as, the conditions for RNA isolation and quantification. This protocol shall be useful for

differential high-throughput miRNA expression assays between healthy individuals and FHHNC patients that might eventually result in the identification of novel biomarkers of disease progression and/or therapeutic targets.

Conclusions

We established the best protocol for uEVs isolation in control samples based on ultracentrifugation at 100,000×g for 2 h of mixed 17,000×g supernatant (SN0) and its pellet treated with DTT for 10 min at 37 °C (SNb). This selected protocol was also suitable to threefold diluted urine from patients coursing with polyuria such as FHHNC patients. Moreover we demonstrated that miRNA pattern is independent of the RNA extraction method being miRCURY kit and TRIzol LS, with which we obtained the highest RNA yield.

Authors' contributions

MV, JA designed the research, acquired the data, interpreted results of experiments and wrote and revised the manuscript; AM conceived and designed the research, interpreted results of experiments and edited and revised the manuscript; GA managed sample collection and edited and revised manuscript; All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Fisiopatologia Renal, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHR), Barcelona, Spain. ² Nefrologia Pediàtrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain. ³ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. ⁴ Red de Investigación Renal (REDINREN), Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Madrid, Spain.

Acknowledgements

This work would not have been possible without HIPOFAM contribution. We would like to thank the RENALTUBE group for providing samples of FHHNC patients and NanoSight service (UAB) for samples analyses. Also, we thank Dr. Irene Campoy for her helpful suggestions and for critical reading of the manuscript and Dr. Mireia Oliván, Dr. Cristina Solé and Dr. Laura García Bermejo for their technical advice.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

FHHNC patient's urine from 20 patients, 8 woman and 12 men, were provided by the Renaltube Group and processed at Hospital Universitari Vall d'Hebron. All subjects have provided written informed consent before participation in the study, which has been approved by the Institutional Review Board of the Vall d'Hebron Hospital (PR(AMI)280/2015).

Funding

This work was supported by grant P114/01107 from Instituto de Salud Carlos III, Spain. M. Vall is supported by HIPOFAM donation. J. Arévalo is supported by a CONAGyT Ph.D. fellowship (No. 549678).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 2 August 2018 Accepted: 1 October 2018

Published online: 11 October 2018

References

- Devuyst O, Kneors NVAM, Remuzzi G, Schaefer F. Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities and perspectives. *Lancet*. 2014;383:1844–59.
- Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, et al. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet*. 2006;79:949–57.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*. 1999;285:103–6.
- Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, et al. Familial hypomagnesaemia with hypercalcaemia and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet*. 2000;8:414–22.
- Arteaga ME, Hunziker W, Teo ASM, Hillmer AM, Mutchinick OM. Familial hypomagnesaemia with hypercalcaemia and nephrocalcinosis: variable phenotypic expression in three affected sisters from Mexican ancestry. *Ren Fail*. 2015;37:180–3.
- Claverie-Martin F, García-Nieto V, Loris C, Ariceta G, Nadal I, Espinosa L, et al. Claudin-19 mutations and clinical phenotype in spanish patients with familial hypomagnesaemia with hypercalcaemia and nephrocalcinosis. *PLoS ONE*. 2013;8:e53151.
- García-Nieto VM, Claverie-Martin F, Loris-Pablo C. Hipomagnesemia familiar con hipercalcemia y nefrocalcinosis. *Su historia Nefrologia*. 2014;34:5–10.
- Godron A, Harambat J, Boccio V, Mensire A, May A, Rigotier C, et al. Familial hypomagnesaemia with hypercalcaemia and nephrocalcinosis: phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with CLDN16 or CLDN19 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7:801–9.
- Martin-Núñez E, Cordoba-Lanus E, Gonzalez-Acosta H, Olliet A, Izquierdo E, Claverie-Martin F. Haplotype analysis of CLDN19 single nucleotide polymorphisms in Spanish patients with familial hypomagnesaemia with hypercalcaemia and nephrocalcinosis. *World J Pediatr*. 2014;11:272–5.
- Sikora P, Zaniew M, Haisch L, Pulcer B, Szczepanska M, Moczulska A, et al. Retrospective cohort study of familial hypomagnesaemia with hypercalcaemia and nephrocalcinosis due to CLDN16 mutations. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:636–44.
- Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985;101:942–8.
- Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:13368–73.
- Schageman J, Zeringer E, Li M, Barta T, Lea K, Gu J, et al. The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–15.
- Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 2000;113:3365–74.
- Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:415–21.
- Nolte-Hoehn EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MHM. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Brief report activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1*. *Blood*. 2009;113:1977–81.
- Smalheiser NR. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol Direct*. 2007;2:35.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:654–9.

19. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm*. 2010;117:1–4.
20. Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Păunescu TG, Da Silva N, et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int*. 2010;78:191–9.
21. Skog J, Wurdinger T, Van Rijn S, Meijer D, Gainche L, Sena-esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10:1470–6.
22. Gonzales P, Psitkun T, Knepper MA. Urinary exosomes: is there a future? *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1799–801.
23. Cheruvanky A, Zhou H, Psitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PST, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *AJP Ren Physiol*. 2007;292:F1657–61.
24. Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int*. 2002;62:1461–9.
25. Alvarez ML. Isolation of urinary exosomes for RNA biomarker discovery using a simple, fast, and highly scalable method. *Methods Mol Biol*. 2014;1182:145–70.
26. Alvarez ML, Khosroheidari M, Ravi RK, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int*. 2012;82:1024–32.
27. Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, Coleman BM, Hill AF. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int*. 2014;86:433–44.
28. Fernández-Llama P, Khosrseth S, Gonzales PA, Star RA, Psitkun T, Knepper MA. Tamm–Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int*. 2010;77:736–42.
29. Gonzales PA, Psitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:363–79.
30. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, Calvo E, Martín-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *J Proteomics*. 2014;96:90–102.
31. Khurana R, Ranches G, Schafferer S, Lukasser M, Rudnicki M, Mayer G, et al. Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease. *RNA*. 2017;23:142–52.
32. Mejía N, Santos F, Claverie-Martin F, García-Nieto V, Ariceta G, Castaño L. RenalTube: a network tool for clinical and genetic diagnosis of primary tubulopathies. *Eur J Pediatr*. 2013;172:775–80.
33. Lv L-L, Cao Y-H, Ni H-F, Xu M, Liu D, Liu H, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 2013;305:F1220–7.
34. Sole C, Cortes-Hernandez J, Felip ML, Vidal M, Ordi-Ros J. MIR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:1488–96.
35. Gonzales PA, Zhou H, Psitkun T, Wang NS, Star RA, Knepper MA, et al. Isolation and purification of exosomes in urine. *Methods Mol Biol*. 2010;641:89–99.
36. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, Adiconis X, Sivachenko A, Russ C, et al. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS ONE*. 2014;9:e96094.
37. Royo F, Zúñiga-García P, Sanchez-Mosquera P, Egia A, Perez A, Loizaga A, et al. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:1–11.
38. Sáenz-Cuesta M, Arbelaz A, Oregi A, Irizar H, Osorio-Quejeta I, Muñoz-Culla M, et al. Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Front Immunol*. 2015;6:1–12.
39. Zeringer E, Li M, Barta T, Schageman J, Pedersen KW, Neuraüter A, et al. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World J Methodol*. 2013;3:11–8.
40. Zhou H, Yuen PST, Psitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int*. 2006;69:1471–6.
41. Sokolova V, Ludwig A-K, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;87:146–50.
42. Masuyk AI, Huang BQ, Ward CJ, Gradilone SA, Banales JM, Masuyk TV, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G990–9.
43. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012;59:1–6.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Annex 6. Interaccions miRNA-mRNA dels miRNAs diferencialment expressats.

miRNA	MTI (n)	MTI fortes / febles (n)	miRTarBase (n)	TarBase (n)	Número de proteïnes regulades únicament per cada miRNA dins de la mateixa comparació [n (%)]				
					HFHNC vs.	p.G20D vs.	Tots. Mod	p.G20D. Mod	Home vs.
					CTL	CTL	vs. Lenta	vs. Lenta	Dona
miR-30b-5p	1788	27/1761	416	1615	160 (8,9)	-	-	-	-
miR-500a-5p	431	3/428	145	301	107 (24,8)	-	-	-	-
miR-4454	144	0/144	58	88	38 (26,4)	31 (21,5)	-	-	-
miR-99a-5p	528	19/509	133	430	55 (10,4)	57 (10,8)	-	-	-
miR-489-3p	341	7/334	75	272	74 (21,7)	78 (22,9)	-	-	-
miR-29a-3p	1764	112/1652	265	1643	576 (32,7)	615 (34,9)	-	-	-
miR-27b-3p	2313	58/2255	421	2129	727 (31,4)	786 (34)	-	-	-
miR-100-5p	596	28/568	251	403	75 (12,6)	74 (12,4)	-	-	-
miR-204-5p	881	81/800	398	552	210 (23,8)	219 (24,9)	-	-	-
miR-30e-5p	474	14/460	347	166	9 (1,9)	103 (21,7)	-	-	-
miR-152-3p	689	26/663	158	579	173 (25,1)	166 (24,1)	-	-	-
miR-664a-5p	342	0/342	133	213	106 (31)	74 (21,6)	-	-	-
miR-1972	124	0/124	124	0	39 (31,5)	33 (26,6)	-	-	-
miR-4793-3p	577	0/577	418	166	172 (29,8)	143 (24,8)	-	-	-
miR-619-5p	425	0/425	425	0	177 (41,6)	141 (33,2)	-	154 (36,2)	-
miR-6754-3p	107	0/107	107	0	31 (29)	24 (22,4)	-	-	-
miR-595	204	1/203	100	113	41 (20,1)	44 (21,6)	-	-	-
miR-4701-3p	260	0/260	163	97	54 (20,8)	46 (17,7)	-	-	-
miR-4440	6	0/6	6	0	1 (16,7)	1 (16,7)	-	-	-
miR-4502	62	0/62	62	0	20 (32,3)	21 (33,9)	-	-	-
miR-6875-3p	261	0/261	261	0	77 (29,5)	75 (28,7)	-	-	-
miR-6877-3p	117	0/117	117	0	49 (41,9)	40 (34,2)	-	-	-
miR-297	194	7/187	190	5	65 (33,5)	58 (29,9)	-	-	-
miR-8071	87	0/87	87	0	29 (33,3)	27 (31)	-	-	-
miR-4685-3p	606	0/606	269	348	-	122 (20,1)	-	-	-
miR-6753-3p	35	0/35	35	0	-	13 (37,1)	-	-	-
miR-1299	251	0/251	89	166	-	64 (25,5)	-	-	-
miR-6893-3p	97	0/97	97	0	-	29 (29,9)	-	-	-
miR-1273f	295	0/295	295	1	-	36 (12,2)	-	-	-
miR-4708-5p	142	0/142	142	0	-	2 (1,4)	-	-	-
miR-6772-3p	55	0/55	55	0	-	15 (27,3)	-	-	-
miR-670-5p	161	1/160	99	63	-	37 (23)	-	-	-
miR-1306-3p	131	0/131	12	119	-	33 (25,2)	-	-	-
miR-6849-5p	85	0/85	85	0	-	38 (44,7)	-	-	-
miR-7844-5p	75	0/75	75	0	-	12 (16)	-	-	-
miR-3149	173	0/173	173	0	-	34 (19,7)	-	-	-
miR-1183	85	0/85	85	0	-	30 (35,3)	-	-	-
miR-185-3p	614	3/611	112	532	-	176 (28,7)	-	-	-
miR-6741-5p	61	0/61	61	0	-	4 (6,6)	-	-	-
miR-6799-5p	678	0/678	678	0	-	222 (32,7)	-	-	-
miR-4436b-5p	94	0/94	94	0	-	39 (41,5)	-	-	-
miR-7114-5p	73	0/73	73	0	-	22 (30,1)	-	-	-
miR-1910-5p	479	0/479	59	425	-	128 (26,7)	-	-	-
miR-3064-5p	99	1/98	81	18	-	17 (17,2)	-	-	-
miR-3907	43	0/43	43	0	-	16 (37,2)	-	-	-
miR-1915-5p	184	0/184	61	124	-	-	-	-	184 (100)
miR-204-3p	199	5/194	131	70	-	-	174 (87,4)	-	-
miR-500a-3p	443	0/443	132	319	-	-	343 (77,4)	-	-
miR-501-3p	538	0/538	69	475	-	-	-	74 (13,8)	-
miR-20a-5p	3254	90/3164	1070	2758	-	-	-	1103 (33,9)	-
miR-106a-5p	1658	44/1614	673	1146	-	-	-	202 (12,2)	-
miR-17-5p	2931	115/2816	1181	2349	-	-	-	793 (27,1)	-
miR-6511b-5p	106	0/106	106	0	-	-	-	47 (44,3)	-

Annex 7. Proteïnes diana dels miRNAs diferencialment expressats amb alta implicació en els processos biològics característics de la HFHNC. *Implicació en altres processos biològics.

A. Estrès de reticle endoplasmàtic.

Proteïna	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
ANKS4B	79%		miR-619-5p miR-4708-5p; miR-1273f	-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
APAF1	86%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
ATF6	88%	-	miR-6799-5p; miR-1306-3p	-	-	-
ATP2A2*	83%	miR-29a-3p; miR-100-5p; miR-30e-5p miR-30b-5p		-		miR-502-3p miR-20a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
BAK1	84%	miR-29a-3p; miR-6754-3p		-	-	-
BFAR	80%	-	miR-1910-5p	-	-	-
DERL2	87%	-	-	-	miR-204-3p; miR-500a-3p	miR-20a-5p; miR-17-5p
DNAJB9	84%		miR-27b-3p miR-7844-5p; miR-3064-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
EIF2AK3	89%	-	-	-	-	miR-106a-5p
ERO1A; ERO1L	83%	miR-30b-5p; miR-500a-5p	miR-27b-3p; miR-664a-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
FAM129A	82%		miR-4793-3p	-	miR-500a-3p	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p; miR-502-3p
GPR37	86%		miR-29a-3p	-	-	-
GSK3B	81%	miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-204-5p miR-500a-5p	miR-1910-5p	-	miR-500a-3p	miR-502-3p miR-17-5p; miR-501-3p
JUN *	87%	miR-99a-5p; miR-29a-3p miR-30b-5p	miR-4685-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
LAMP2	82%	miR-30b-5p	miR-29a-3p	-	miR-502-3p	-
MBTPS1	85%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p
MBTPS2	78%	miR-30b-5p	-	-	-	-
NFE2L2	86%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-		miR-502-3p miR-20a-5p; miR-17-5p
PDIA4	79%	-	-	-	-	miR-17-5p
PPP3R1	85%	miR-30b-5p	miR-204-5p; miR-30e-5p	-		miR-5189-3p
SEPT4	79%	miR-500a-5p	-	-	miR-20a-5p	miR-106a-5p; miR-17-5p
SHC1	81%	miR-30b-5p	miR-27b-3p	-	-	-
SIAH1	82%	miR-30b-5p	miR-29a-3p	miR-1915-5p	-	-
SNCA	81%	miR-500a-5p	miR-29a-3p; miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p
SNCAIP	80%	-	-	-	-	miR-20a-5p
SOD1	80%	-	miR-1299	-	-	-
SQSTM1	88%	-	miR-4685-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
SRPX	80%		miR-29a-3p	-	-	-
STC2	80%	miR-30b-5p	miR-489-3p; miR-27b-3p; miR-204-5p; miR-4502 miR-4685-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
TOR1A	78%		miR-27b-3p	-	-	-
UBE2J1	81%		miR-27b-3p; miR-204-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
UBXN4	80%	miR-30b-5p	miR-204-5p; miR-30e-5p	miR-1915-5p	-	-
UFC1	78%		miR-595	-	-	-
USP9X	78%		miR-489-3p; miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-204-5p; miR-152-3p miR-1306-3p	-	miR-500a-3p	miR-20a-5p; miR-17-5p
WFS1	80%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
XBP1	83%		miR-29a-3p; miR-27b-3p	-		miR-502-3p

B. Tight junctions

Proteïna	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
ACTB	85%	miR-29a-3p; miR-100-5p		-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
AMOT	83%	miR-29a-3p		-	-	-
		miR-500a-5p	miR-4685-3p			
ARHGEF18	88%	-	miR-185-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
ATAD2B	81%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-	-	-
CAMKK2	80%	miR-100-5p		-	-	miR-501-3p
CTNNB1 *	87%	miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-664a-5p		-	-	miR-20a-5p
CXADR *	82%	miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p
DCHS1	90%	miR-29a-3p		-	-	miR-17-5p
DLG1	90%	miR-27b-3p		-	-	-
EPCAM	82%	-	miR-1299;	-	-	miR-20a-5p
EZR	80%	miR-204-5p; miR-152-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
		miR-30b-5p	miR-1910-5p			
F11R	92%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
		miR-1299				
		miR-500a-5p	miR-1910-5p			
HSPA8	85%	-	miR-4436b-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
LIN7A	78%	miR-30b-5p	-	-	-	-
LLGL1	93%	-	miR-6799-5p;	-	-	miR-6511b-5p
MAP2K7	84%	miR-1972		-	-	-
		miR-6799-5p				
MAP3K11	85%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
MPDZ	90%	miR-152-3p;		-	-	-
		miR-500a-5p	miR-1299			
MPP5	90%	miR-27b-3p		-	-	-
		miR-500a-5p				
MSN	89%	miR-27b-3p		-	-	-
		miR-6772-3p				
MYH10	83%	-	miR-1910-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
PAR6A	80%	miR-595		-	-	-
PAR6B	81%	miR-27b-3p; miR-4701-3p		-	miR-500a-3p	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
		miR-30b-5p; miR-500a-5p				
PAR6G	87%	miR-204-5p		-	-	miR-106a-5p
RAPGEF2	79%	miR-489-3p; miR-27b-3p; miR-204-5p		-	-	miR-502-3p
		miR-30b-5p				
RUNX1	83%	miR-27b-3p		-	-	miR-17-5p
		miR-185-3p				
SES3	78%	miR-99a-5p; miR-27b-3p; miR-100-5p; miR-152-3p		-	-	miR-502-3p
		miR-30b-5p	miR-4685-3p; miR-4436b-5p			
TJP1	81%	miR-29a-3p; miR-4701-3p		-	-	miR-502-3p miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
TJP2	85%	-	-	-	-	miR-17-5p
TSC22D2	80%	miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-204-5p		-	-	miR-106a-5p
		miR-1306-3p				
UBN1	85%	miR-30e-5p; miR-4793-3p		-	-	-
		miR-30b-5p				
		miR-30b-5p				
ZSWIM1	81%	miR-1972		-	-	-

C. Cristal·lització i proteïnes de la matriu òssia

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
ANKRD28	80%	miR-99a-5p; miR-489-3p; miR-29a-3p		-	-	miR-20a-5p
ANXA2	89%	-	-	-	-	miR-17-5p
BMP2	91%		miR-29a-3p	-	-	-
BMP8A	78%		miR-8071	-	miR-500a-3p	-
			miR-1273f			
BMP8B	89%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
CCL2	89%		miR-99a-5p; miR-100-5p	-	-	miR-20a-5p
CD44 *	90%		miR-27b-3p; miR-204-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p -
			miR-1299; miR-670-5p			
CTSB	85%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p
			miR-3149; miR-1910-5p			
FBN1	78%		miR-29a-3p; miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p
FN1 *	90%		miR-27b-3p	-	miR-204-3p	-
			miR-30b-5p			
GLI1	81%		miR-100-5p	-	-	-
GLI2	81%		miR-27b-3p	-	-	-
KCNJ8	80%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
S100A10	87%		miR-100-5p	-	-	-
			miR-30b-5p			
TSG101	78%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p

D. Nefrocalcinosi

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
CCL2 *	82%		miR-99a-5p; miR-100-5p	-	-	miR-20a-5p
FN1 *	81%		miR-27b-3p	-	miR-204-3p	-
			miR-30b-5p			
HSPG2	79%		miR-29a-3p; miR-204-5p; miR-1972	-	-	miR-17-5p; miR-6511b-5p
ICAM1	82%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
SERPINA1	79%	-	-	-	-	miR-20a-5p
VWA1	78%	-	miR-6799-5p	-	-	miR-17-5p

E. Nefritis túbul-intersticial

Proteïna	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
CEBPB	82%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p
CTGF	84%		-	-		miR-502-3p
					miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p	
CXCL2	83%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p
HAVCR1	81%	-	miR-6799-5p	-	-	-
IFI16	83%		miR-29a-3p	-	-	-
IL1B	87%		miR-204-5p	-	-	miR-106a-5p
IL6	89%		miR-99a-5p; miR-100-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p
JUN *	82%		miR-99a-5p; miR-29a-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
			miR-30b-5p; miR-4685-3p			
MUC1	86%		miR-29a-3p	-	-	-
NFKB1 *	83%		miR-152-3p	-	-	-
NLRP3	89%		miR-100-5p	-	-	-
PTX3	82%		miR-29a-3p	-		miR-502-3p
					miR-20a-5p	
RELA	84%		miR-29a-3p; miR-30e-5p	-	-	-
			miR-1299			
SERPINE1	87%		miR-99a-5p; miR-204-5p; miR-30e-5p; miR-152-3p	-	-	miR-17-5p
			miR-30b-5p			

F. Fibrosi renal (I)

Proteínas	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
ADAM17	78%	miR-204-5p; miR-152-3p; miR-6877-3p	miR-3064-5p	-	-	miR-106a-5p; miR-17-5p
BCL3	90%	miR-27b-3p; miR-6754-3p		-	-	-
BMX	90%	-	-	-	-	miR-106a-5p
C1QBP	92%	miR-30b-5p	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
CARM1	87%	miR-4454; miR-27b-3p		-		miR-502-3p miR-501-3p
CASP3	78%	miR-99a-5p; miR-100-5p; miR-30e-5p	miR-30b-5p	-	-	-
CCT7	86%	-	miR-4685-3p; miR-1910-5p;	-	-	miR-20a-5p
CD44 *	85%		miR-27b-3p; miR-204-5p miR-1299; miR-670-5p	-	-	-
CDH1	86%		miR-204-5p	-	-	-
CHD3	80%		miR-27b-3p; miR-100-5p	-	miR-204-3p	miR-17-5p
CIITA	79%	-	-	-	-	miR-17-5p
CLU	93%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
COL1A1	85%		miR-29a-3p miR-7114-5p	-	-	-
COL1A2	84%		miR-29a-3p; miR-27b-3p	-	-	miR-17-5p
CTBP1	90%		miR-204-5p; miR-595	-		miR-5189-3p; miR-502-3p miR-20a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
CTNNB1 *	87%		miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-664a-5p	-	-	miR-20a-5p
DUSP6	92%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p
E2F3	90%	miR-30b-5p	miR-1910-5p	-	miR-500a-3p	miR-502-3p miR-20a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
ECT2	90%		miR-27b-3p miR-4685-3p	-		miR-502-3p miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
EIF1B	93%	miR-30b-5p	-	-	-	-
EIF6	92%		miR-29a-3p	-	-	-
ELOC; TCEB1	78%		miR-27b-3p; miR-152-3p; miR-619-5p	-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
ERAL1	83%		miR-27b-3p	-	-	-
ERRFI1	79%		miR-489-3p; miR-29a-3p; miR-152-3p miR-30b-5p	-	-	miR-20a-5p
FHL2	83%		miR-27b-3p; miR-4793-3p; miR-6754-3p	-	miR-204-3p	miR-17-5p
FLI1	81%		miR-204-5p	-	-	miR-17-5p
FN1 *	84%		miR-27b-3p miR-30b-5p	-	miR-204-3p	-
FRK	90%		miR-29a-3p; miR-6877-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
GAB1	89%		miR-27b-3p; miR-30e-5p; miR-152-3p miR-30b-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
GATA1	81%		miR-4454	-	-	-
HEY1	83%	miR-30b-5p	-	-	-	-
HIF1A	87%		miR-29a-3p; miR-27b-3p	-		miR-502-3p miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
HSP90B1	92%		miR-27b-3p; miR-204-5p; miR-152-3p; miR-664a-5p	-	-	miR-106a-5p
HSPA4	78%		miR-29a-3p miR-1306-3p	-	-	miR-501-3p
JUP	90%		miR-29a-3p	-	-	-
KAT2A	81%	-	-	-	-	miR-17-5p
LOX	84%		miR-29a-3p	-	-	miR-20a-5p
LTBR	78%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p

F. Fibrosi renal (II)

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
MTA1	80%	miR-30e-5p; miR-4793-3p		-	-	miR-106a-5p
		miR-30b-5p	miR-6799-5p			
NFKB1 *	85%	miR-152-3p		-	-	-
P4HB	82%	-	miR-670-5p	-	-	miR-20a-5p
PDPK1	89%	miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
		miR-1299; miR-1183				
PIAS2	80%	miR-29a-3p		-	-	miR-17-5p
PIAS4	85%	-	miR-185-3p; miR-7114-5p;	-	-	miR-17-5p
POSTN	78%	miR-29a-3p; miR-204-5p		-	-	miR-17-5p
PTP4A3	93%	-	-	-	-	miR-17-5p
PTPN23	92%	-	-	-	-	miR-20a-5p
PTPN3	91%	miR-30b-5p	-	-	-	-
PTPRN	79%	-	miR-185-3p	-	-	-
RET	85%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-	-	-
SHH	89%	miR-595; miR-297		-	-	-
SMAD3	83%	-	miR-4685-3p	-	-	miR-106a-5p; miR-17-5p
SMARCD1	78%	-	-	-	-	miR-17-5p
		miR-6875-3p		-		miR-502-3p
STAT3	79%	miR-1299				miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
STK11	83%	-	-	miR-1915-5p	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
TEC	91%	miR-204-5p		-	-	-
TFAP2C	80%	miR-595		-	miR-500a-3p	miR-17-5p
TFG	94%	miR-30b-5p	-	-	-	miR-106a-5p; miR-17-5p
TGFA	95%	miR-30e-5p; miR-152-3p		-	-	-
		miR-30b-5p				
TGFB1	83%	-	-	-	-	miR-106a-5p; miR-17-5p
TPST2	89%	miR-619-5p		-	-	miR-619-5p
TXK	89%	miR-619-5p		-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
UBE2V1	90%	miR-8071		-	-	-
WDR5	89%	miR-27b-3p		-	-	-
		miR-30b-5p				
WNT1	90%	miR-152-3p		-	-	-
WNT5A	86%	-	-	-	-	miR-17-5p
WNT5B	86%	miR-30b-5p	-	-	-	-
WNT7B	86%	-	miR-6849-5p; miR-6799-5p	-	-	-
WWP1	85%	miR-595		-	-	-

G. Metabolisme de la vitamina D

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
SIAH2	80%	miR-30b-5p	-	-	-	-
SNCA *	78%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p
		miR-500a-5p				
STAT1	81%	miR-500a-5p	miR-1183	-	-	-
STAT2	79%	miR-27b-3p		-	-	-
STAT5B	78%	miR-204-5p		-	-	-
YAP1	81%	miR-27b-3p; miR-204-5p		-	-	miR-106a-5p

H. Acidosis tubular distal (I)

Proteínas	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
ACTR2	79%	-	miR-1910-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
ATG5	78%	miR-30e-5p		-	-	-
ATP2A2 *	81%	miR-29a-3p; miR-100-5p; miR-30e-5p		-	-	miR-502-3p
		miR-30b-5p				miR-20a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
C1QBP *	78%	miR-30b-5p	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
CAPN1	78%	miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-6511b-5p
CHMP3	82%	miR-152-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
		miR-30b-5p				
CLEC17A	81%	-	miR-4708-5p; miR-6799-5p; miR-1273f	-	-	-
CPT1A	80%	miR-619-5p		-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
CREB5	79%	miR-29a-3p; miR-204-5p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
CRY2	78%	miR-27b-3p; miR-4793-3p; miR-619-5p		-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
			miR-6799-5p			
CYBRD1	78%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
CYTH2	81%	miR-4454		-	-	-
			miR-6799-5p; miR-1910-5p; miR-1273f			
DDOST	85%	miR-29a-3p		-	miR-204-3p	-
EDA2R	78%	miR-297		-	-	-
EIF1B *	80%	miR-30b-5p	-	-	-	-
EIF4G1	82%	miR-4454; miR-29a-3p; miR-4793-3p		miR-1915-5p	miR-500a-3p	miR-502-3p
		miR-500a-5p	miR-4685-3p; miR-185-3p; miR-1910-5p; miR-1299			miR-501-3p
FKBP8	78%	miR-27b-3p		-	-	-
			miR-185-3p			
HSPD1	80%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-	-	-
LAMTORS	79%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
MRPS35	78%	miR-27b-3p		-	-	-
MTAP	78%	miR-6754-3p		-	-	-
NDUF55	78%	miR-30b-5p	miR-6799-5p	-	-	-
PDIA3	82%	miR-4502		-	-	-
PDLIM7	78%	-	miR-185-3p	-	-	miR-17-5p
POGZ	79%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
PSMB1	78%	miR-30b-5p	miR-1910-5p;	-	-	miR-17-5p
RAB11A	85%	miR-30b-5p	-	-	miR-500a-3p	miR-106a-5p
RAB14	78%	miR-489-3p; miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-204-5p; miR-152-3p		-	-	-
		miR-30b-5p	miR-4685-3p			
RAB1B	78%	miR-152-3p		-	-	-
			miR-6799-5p			
RC3H1	78%	miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-152-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-501-3p
			miR-6799-5p			
RHEB	78%	miR-27b-3p		-	-	-
RHOA	79%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
RPN2	80%	miR-29a-3p; miR-27b-3p		-	-	-
RTN4	79%	miR-27b-3p; miR-204-5p; miR-152-3p; miR-4793-3p		-	-	miR-20a-5p
			miR-1910-5p			
SEC31A	78%	miR-29a-3p; miR-30e-5p; miR-152-3p		-	-	miR-502-3p
		miR-30b-5p; miR-500a-5p				
SSR1	79%	miR-27b-3p; miR-4793-3p		-	-	miR-20a-5p
			miR-6799-5p			

H. Acidosis tubular distal (II)

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
TBC1D15	79%	-	-	-	-	miR-502-3p miR-20a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
TEAD1	78%	miR-27b-3p; miR-152-3p		-	-	-
TK1	82%	-	-	-	-	miR-106a-5p
TXNDC5	78%	miR-27b-3p; miR-30e-5p		-	-	-
		miR-30b-5p		-	-	-
UBR1	81%	miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
UBXN1	79%	miR-27b-3p		-	-	-
UCHL5	83%	miR-664a-5p; miR-4793-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
VAMP7	78%	miR-27b-3p; miR-204-5p		-	-	-
XPR1	80%	miR-27b-3p		-	-	miR-5189-3p

I. Transport de Mg²⁺ i Ca²⁺ (I)

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
ACBD5	89%	miR-152-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
ACOX1	78%	miR-27b-3p; miR-619-5p; miR-595		-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
ADA	82%	-	-	-	-	miR-20a-5p
AGL	79%	miR-29a-3p		-	-	miR-20a-5p
AGRN	91%	miR-27b-3p		-	-	miR-502-3p
AKR1A1	84%	-	-	-	miR-204-3p	-
AMIGO2	81%	miR-29a-3p		-	-	-
AR	86%	miR-297		-	-	-
		miR-3149		-	-	-
ATP2B1	83%	miR-99a-5p; miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-100-5p; miR-204-5p		-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
		miR-30b-5p		-	-	-
ATP2B4	79%	miR-29a-3p; miR-204-5p; miR-152-3p		-	-	-
ATP6V1G2	78%	miR-27b-3p		-	-	-
ATP9A	86%	-	miR-185-3p; miR-1306-3p	-	-	miR-502-3p miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
		miR-27b-3p; miR-204-5p; miR-30e-5p; miR-664a-5p	miR-1910-5p	-	-	miR-502-3p miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
C9orf78	86%	-	-	-	-	miR-20a-5p
CACNA1C	83%	miR-29a-3p; miR-204-5p		-	-	-
		miR-185-3p		-	-	-
CLDN4	78%	-	miR-1910-5p	-	-	miR-6511b-5p
CNTNAP1	84%	-	miR-185-3p	-	-	-
CRIM1	83%	miR-27b-3p; miR-152-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
CSF3	91%	-	-	-	-	miR-20a-5p
CXADR *	81%	miR-27b-3p		-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p
DNAJB5	87%	miR-204-5p		-	-	-
DOLK	81%	miR-100-5p		-	-	-
EMC10	81%	miR-664a-5p		-	-	-
		miR-4685-3p; miR-185-3p		-	-	-
EMC4	81%	miR-664a-5p		-	-	-
		miR-30b-5p		-	-	-
EPB42	78%	-	miR-4708-5p; miR-1273f	-	-	-
FAM109A	90%	miR-1972		-	-	-
FAM111A	80%	-	miR-1910-5p	-	-	-
GCM1	79%	-	miR-1273f	-	-	miR-106a-5p

I. Transport de Mg²⁺ i Ca²⁺ (II)

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
GLO1	83%		miR-29a-3p; miR-27b-3p miR-4685-3p; miR-1910-5p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
GRHPR	83%	-	miR-185-3p	-	-	-
HDGFRP2	81%		miR-27b-3p miR-185-3p	-	-	-
HECW1	85%		miR-29a-3p; miR-4701-3p	-	-	-
HYI	80%		miR-27b-3p	-	-	-
IFNE	86%		miR-30e-5p miR-30b-5p	-	-	-
IL11	86%		miR-204-5p	-	-	-
IL20	91%	-	-	-	-	miR-20a-5p
IP6K1	88%		miR-29a-3p miR-6799-5p; miR-185-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
KCNA7	81%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
KCNE4	81%		miR-99a-5p; miR-100-5p	-	-	miR-20a-5p
KCNJ3	82%		miR-29a-3p; miR-297 miR-4708-5p; miR-1273f	-	miR-500a-3p	-
KIAA1143	86%		miR-297 miR-3149	-	-	-
KIAA1522	78%		miR-29a-3p miR-4685-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
LTBP4	89%		miR-1972 miR-185-3p	-	-	-
MAGT1	80%		miR-27b-3p miR-4708-5p; miR-1273f	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
MANBAL	83%	-	-	-		miR-502-3p miR-501-3p
MARC1	88%		miR-100-5p; miR-6875-3p	-	-	-
MDM2	84%		miR-29a-3p; miR-27b-3p; miR-204-5p; miR-30e-5p; miR-152-3p; miR-30b-5p; miR-500a-5p; miR-4793-3p miR-4685-3p; miR-4793-3p; miR-6799-5p	-	miR-500a-3p	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
MEGF8	89%		miR-152-3p miR-1910-5p	-	-	-
MLLT10	82%		miR-489-3p; miR-152-3p	-	-	miR-20a-5p
MYT1L	78%		miR-27b-3p	-	-	-
NEDD4	88%		miR-99a-5p; miR-27b-3p; miR-100-5p miR-30b-5p	-	-	-
NEDD4L	87%		miR-27b-3p miR-30b-5p	-	-	miR-20a-5p
NELL2	83%		miR-297	-	-	-
NEMF	83%	-	-	-	-	miR-17-5p
OLIG1	84%	-	-	-	-	miR-20a-5p
PCNP	89%		miR-4793-3p; miR-8071	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
PCSK6	86%	-	-	-		miR-502-3p miR-501-3p
PGM1	85%	miR-30b-5p	-	-	-	miR-17-5p
PNMA3	87%		miR-6875-3p	-	-	-
PNPLA6	89%		miR-27b-3p; miR-152-3p miR-6799-5p	-	-	-
PRKRIR	88%	miR-30b-5p	-	-	-	-
PRRC2C	78%		miR-29a-3p; miR-100-5p; miR-204-5p; miR-152-3p miR-30b-5p miR-6772-3p	-	-	miR-6772-3p; miR-20a-5p
PTGIS	84%		miR-619-5p miR-4685-3p	-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p

I. Transport de Mg²⁺ i Ca²⁺ (III)

Proteïnes	ANN	PACIENTS vs CTL	p.G20D vs CTL	Home vs Dona	Mod vs Lenta	p.G20D_Mod vs Lenta
RBM12B	86%		miR-27b-3p; miR-4793-3p		miR-500a-3p	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p
			miR-30b-5p			
RBM6	83%		miR-30b-5p	-	-	miR-106a-5p
RFK	85%		miR-27b-3p; miR-619-5p	-	-	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
			miR-1273f			
SCAF8	83%		miR-4793-3p	-	-	-
SEC62	80%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p
SH3RF1	81%	miR-500a-5p	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
SLC12A3	82%	-	miR-4685-3p	-	-	-
SLC35A5	84%		miR-27b-3p	-	-	-
SLC41A3	81%		miR-29a-3p	-	-	-
SLC4A1	87%		miR-4454	-	-	-
SLC4A1AP	84%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
SLC4A4	84%	miR-30b-5p	-	-	-	-
			miR-99a-5p; miR-100-5p	-	-	-
SLC7A8	86%		miR-185-3p			
			miR-29a-3p; miR-27b-3p	-	-	-
SLC8A1	78%		miR-500a-5p			
SMURF1	83%		miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
SMURF2	83%		miR-4454; miR-29a-3p	-	-	-
SNX33	83%	-	-	-	-	miR-20a-5p; miR-17-5p
SPRYD4	78%		miR-4793-3p; miR-4701-3p	-	-	-
SRRM4	88%	-	miR-4685-3p; miR-3064-5p; miR-6772-3p	-	-	-
STXBP2	87%		miR-6875-3p	-	-	-
			miR-7844-5p; miR-185-3p			
SUMF2	88%		miR-489-3p	-	-	-
			miR-6799-5p			
TMEM14B	84%	-	-	-	-	miR-20a-5p
TMEM9B	90%		miR-27b-3p; miR-152-3p	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
TRMT10C	88%	miR-30b-5p	-	-	-	-
TRPM7	84%	-	-	-	-	miR-17-5p
TSPAN7	85%	-	-	-	-	miR-20a-5p
USP42	78%		miR-489-3p; miR-29a-3p; miR-27b-3p	-	-	miR-17-5p
			miR-4708-5p; miR-1273f			
USP44	82%		miR-29a-3p; miR-27b-3p	-	-	miR-20a-5p
			miR-30b-5p			
USP48	90%	miR-30b-5p	-	-	-	miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p
YLPM1	90%	-	-	-	-	miR-17-5p
ZMAT3	85%		miR-27b-3p; miR-619-5p	-		miR-502-3p
		miR-30b-5p			miR-500a-3p	miR-619-5p; miR-20a-5p; miR-106a-5p; miR-17-5p; miR-501-3p

ALTRES PUBLICACIONS

Publicació 1. Article original publicat a la revista *Molecular Genetics & Genomic Medicine*.

Received: 13 June 2020 | Revised: 13 July 2020 | Accepted: 4 August 2020

DOI: 10.1002/mgg3.1475

CLINICAL REPORT

Molecular Genetics & Genomic Medicine 

Novel compound heterozygous mutations of *CLDN16* in a patient with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis

Alejandro García-Castaño¹  | Ana Perdomo-Ramirez²  | Mònica Vall-Palomar³  |
Elena Ramos-Trujillo²  | Leire Madariaga^{1,4}  | Gema Ariceta^{3,5,6}  |
Felix Claverie-Martin² 

¹Biocruces Bizkaia Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

²Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

³Fisiopatología Renal, Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (CIBBIM), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

⁴Pediatric Nephrology Department, Cruces University Hospital, UPV/EHU, Barakaldo, Spain

⁵Servicio de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁶Departamento de Pediatría, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain

Correspondence

Felix Claverie-Martin, Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Carretera del Rosario 145, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain.

Email: fclamar@gobiernodecanarias.org; fclamar@gmail.com

FUNDING INFORMATION

This work was supported by Grant PI17/00153 co-financed by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) and the European Regional Development Fund "Another way to build Europe".

Abstract

Background: Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) is an autosomal recessive tubulopathy characterized by excessive urinary wasting of magnesium and calcium, bilateral nephrocalcinosis, and progressive chronic renal failure in childhood or adolescence. FHHNC is caused by mutations in *CLDN16* and *CLDN19*, which encode the tight-junction proteins claudin-16 and claudin-19, respectively. Most of these mutations are missense mutations and large deletions are rare.

Methods: We examined the clinical and biochemical features of a Spanish boy with early onset of FHHNC symptoms. Exons and flanking intronic segments of *CLDN16* and *CLDN19* were analyzed by direct sequencing. We developed a new assay based on Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF) to investigate large *CLDN16* deletions.

Results: Genetic analysis revealed two novel compound heterozygous mutations of *CLDN16*, comprising a missense mutation, c.277G>A; p.(Ala93Thr), in one allele, and a gross deletion that lacked exons 4 and 5, c.(840+25_?)del, in the other allele. The patient inherited these variants from his mother and father, respectively.

Conclusions: Using direct sequencing and our QMPSF assay, we identified the genetic cause of FHHNC in our patient. This QMPSF assay should facilitate the genetic diagnosis of FHHNC. Our study provided additional data on the genotypic spectrum of the *CLDN16* gene.

KEYWORDS

claudin-16, *CLDN16*, deletion, hypomagnesemia, novel mutations, QMPSF

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals LLC.

Mol Genet Genomic Med. 2020;00:e1475.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.1475>

wileyonlinelibrary.com/journal/mgg3 | 1 of 10

1 | INTRODUCTION

Loss-of-function mutations in two genes involved in renal paracellular reabsorption of calcium and magnesium, *CLDN16* (OMIM #603959) and *CLDN19* (OMIM #610036), cause two types of a rare autosomal recessive disease known as Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis, respectively (FHHNC; type 1, OMIM #248250 and type 2, #248190) (Konrad et al., 2006; Simon et al., 1999). This tubulopathy is characterized by excessive urinary losses of renal magnesium and calcium, bilateral nephrocalcinosis, and progressive chronic renal failure early in life (Claverie-Martin, 2015; Praga et al., 1995). Patients usually present with recurrent urinary tract infections, polyuria, polydipsia, and nephrolithiasis. The symptoms usually appear in early childhood or adolescence. Common biochemical characteristics include low levels of magnesium in serum, high urine levels of calcium and magnesium, high serum levels of parathyroid hormone, and reduced glomerular filtration rate (Godron et al., 2012; Konrad et al., 2008; Weber et al., 2001; Claverie-Martin et al., 2013). Defects in enamel formation have been reported in some FHHNC patients (Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017). In addition, patients with mutations in *CLDN19* display severe ocular abnormalities such as myopia, macular colobomata, and nystagmus (Konrad et al., 2006; Claverie-Martin et al., 2013; Godron et al., 2012).

CLDN16 and *CLDN19* encode tight junction proteins claudin-16 and claudin-19, respectively, which are members of a family of membrane proteins that contain four transmembrane domains, two extracellular loops, a cytoplasmic loop, and cytoplasmic amino- and carboxy ends (Meoli & Günzel, 2020; Suzuki et al., 2014). Both claudins interact with each other on adjacent epithelial cells of the thick ascending loop of Henle to form a cation paracellular selective barrier that regulates the paracellular reabsorption of magnesium and calcium in the kidney (Hou et al., 2008). Claudin-16 and claudin-19 are also expressed in the tight junction of ameloblasts, which might explain their association with defective enamel formation in FHHNC patients (Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017). Moreover, severe ocular involvement in FHHNC patients with mutation in claudin-19 might be attributed to the expression of this claudin in fetal retinal pigment epithelium (Peng, Rao, Adelman, & Rizzolo, 2011; Wang et al., 2019).

The clinical diagnosis of FHHNC needs to be confirmed by the detection of *CLDN16* or *CLDN19* pathogenic variants in both alleles. Most *CLDN16* and *CLDN19* variants identified in FHHNC patients are missense mutations found in homozygous or compound heterozygous state (Claverie-Martin et al., 2015; Prot-Bertoye & Houillier, 2020). These mutations are mainly located in the two extracellular loops but a few affect the transmembrane domains and the cytoplasmic

regions. Only one large deletion has been identified in the *CLDN16* gene of a patient with FHHNC (Yamaguti et al., 2015).

In this study, we aimed to describe the clinical and genetic features of a patient with early onset of the first FHHNC symptoms. Since direct DNA sequencing of coding exons and flanking intronic sequences only detected a missense heterozygous mutation of *CLDN16*, we designed a Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF) assay to identify a novel large deletion in the other allele.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethical compliance

The Ethics Committee of Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (Santa Cruz de Tenerife, Spain) approved the protocols of this study, which was conducted according to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from the patient's parents.

2.2 | Genomic DNA purification and direct sequence analysis

After obtaining written informed consent, peripheral blood samples of patients and relatives were collected for genetic analysis. Genomic DNA was extracted using the GenElute Blood Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's instructions. The coding exons and flanking intronic sequences of *CLDN16* and *CLDN19* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers and conditions previously described (Claverie-Martin et al., 2013; Perdomo-Ramirez et al., 2019; Simon et al., 1999). PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence reactions were purified with Performa[®]DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio BioSystems, Gaithersburg, Maryland, USA), and analyzed on a 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mutations were identified by comparison to the respective reference sequences (GenBank accession numbers NG_008993.1 and NG_008149.1, for *CLDN19* and *CLDN16*, respectively), and confirmed by sequencing additional independent amplification products. We inspected several databases, including ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Human Gene Mutation database (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>), and gnomAD database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), to verify that the variant detected in our patient

was not a common polymorphism and to confirm that it was novel. There are two potential start codons (methionine 1 and methionine 71) in the *CLDN16* gene that would produce a short (235 amino acids) or a long (305 amino acids) claudin-16 isoform (Hou, Paul, & Goodenough, 2005; Weber et al., 2001). It is currently unknown whether both iso- **2.4** forms are functional. For all *CLDN16* mutations described in the literature, nucleotide numbering starts with the A of the first ATG translation initiation site as nucleotide 1 (see, table 4 of Prot-Bertoye & Houillier, 2020, and HGMD). We used this same numbering for the two mutations described here (Reference NCBI sequence used for numbering: NM_006580.3). We followed the recommendations of the Human Genome Variation Society (<http://varnomen.hgvs.org/>) for the description of sequence variants.

2.3 | Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments analysis

In order to detect the potential gross deletions or duplications in the *CLDN16* region, we used a QMPFS assay. Primer pairs for amplification of short exonic fragments corresponding to exons 1–5 of the *CLDN16* gene and a sequence control of the *HNF1B* gene were designed (Table 1). Simultaneous PCR-amplification was performed in a 20 μ L reaction mixture containing dNTPs (10 mM), MgCl₂, 10% DMSO, KAPA Taq DNA Polymerase (Kapabiosystems, Boston, Massachusetts), dye-labeled primers (0.3 μ M of each primer), and 40 ng of genomic DNA. The amplification conditions consisted of an initial step of denaturation at 94°C for 5 min, followed by 24 cycles of denaturation at 94°C for 20 s, annealing at 60°C for 20 s, and extension at 72°C for 20 s. A final extension was performed at 72°C for 10 min. Then, the samples were denatured and loaded onto an ABI3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies). We used the GeneMapper[®] Software v. 4.0 (Applied Biosystems, California) for data analysis. Normalization was performed by dividing the peak height of each amplification product by the peak height of

the control-amplified product. Finally, the results obtained from the test samples were compared with the results from a healthy individual and positive control samples.

Bioinformatics analysis

The potential detrimental effect of the amino acid substitution on the structure and function of claudin-16 was evaluated using the following bioinformatics tools, which are based on different principles: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei et al., 2010), Panther v.15.0 (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp>) (Tang & Thomas, 2016), MutPred2 (<http://mutpred.mutdb.org/>) (Pejaver, Mooney, & Radivojac, 2017), MutationTaster2 (<http://www.mutationtaster.org/>) (Schwarz, Cooper, Schuelke, & Seelow, 2014), and Fathmm-XF (<http://fathmm.biocompute.org.uk/fathmm-xf/>) (Rogers et al., 2018). The protein sequence of human claudin-16 was obtained from the Uniprot database (<https://www.uniprot.org/>, entry identifier Q9Y5I7). Protein stability changes resulting from the missense variant were estimated using web-based programs MUpro (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>) (Cheng, Randall, & Baldi, 2006) and I-Mutant 3.0 (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi>) (Capriotti, Fariselli, & Casadio, 2005). These tools provide the predicted free energy change value (DDG) and the sign of the prediction. The DDG value is calculated from the unfolding Gibbs free energy value of the mutant protein minus the unfolding Gibbs free energy value of the wild type (kcal/mol). A DDG value below 0 means that the stability of the protein has decreased, whereas a DDG superior to 0 means it has increased.

2.5 | Protein modeling

There is no experimentally determined 3D structure available for claudin-16 protein in the Protein Data Bank (PDB).

TABLE 1 Primer used for QMPFS analysis of the human *CLDN16* gene

Exon ^a	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Amplicon size (bp)
1	GACCACCACTAGCCACAGT	56-FAM-TGGTACCTGGCAATGTGAAA	243
2	AATGCTTTTGATGGGATTCG	56-FAM-CCATTACAAACTGGACCGAAC	185
3	TGGTAACTCGAGCGTTGATG	56-FAM-GTTGCTAGTCCAGCCAGACC	181
4	CCAGGAATCATTGGCTCTGT	56-FAM-GAACAGTCCAGCCAAAAAG	160
5	TTGGACCTGAGAGAACTATCCTT	56-FAM-AGCATACATTTGGCCGTCT	113
Control ^b	56-FAM-TGTCTAGTGAGACCCCTTGG	GGATCTCTCGTTGCTTTCTG	199

^aNumbering is according to DNA sequence (Ensembl: ENST00000264734.2).

^b*HNF1B* gene.

Therefore, wild-type and mutant claudin-16 were modeled using the SWISS-MODEL server (Waterhouse et al., 2018) (<https://swissmodel.expasy.org/>). Protein sequences in FASTA format were uploaded and modeled with the crystal structure of human claudin-4 in complex with the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (PDB: 5b2g) (Shinoda et al., 2016).

3 | RESULTS

3.1 | Clinical description

An 11 month old previously healthy boy consulted for fever and respiratory symptoms, and leukocyturia was identified incidentally. Urinary tract infection was suspected but the finding by renal ultrasound of severe and bilateral nephrocalcinosis led to additional diagnostic work-up. His physical exam, height, and weight were normal by age (percentile >99), as well as his blood pressure. Previously unnoticed polyuria and hyposthenuria were also identified. Biochemistry serum tests revealed increased creatinine (0.61 mg/dl) [estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR): 56 ml/min/1.73 m²], without associated electrolytes anomalies (potassium 5.3 mEq/L, chloride 106 mEq/L, total calcium 10.2 mg/dl, and phosphorus 4.9 mg/dl) except mild hypomagnesemia (magnesium 1.54 mg/dl) and elevated uric acid (7.4 mg/dl), and remarkably significant high intact parathyroid hormone (175 pg/ml), for the degree of renal function impairment, with adequate 25-hydroxy-vitamin D levels (25 ng/dl). Acid-base balance was preserved. Urine exam demonstrated increased urinary calcium and magnesium excretion: urinary calcium/creatinine (U_{Ca/Cr}) 0.39 mg/mg, urinary magnesium/creatinine (U_{Mg/Cr}) 0.21 mg/mg (at the high-normal level but inappropriately increased for the level of serum magnesium), and elevated fractional excretion of magnesium (FE_{Mg}, 8.2%). At the age of 2 years, under the clinical suspect of FHHNC, genetic analysis was performed (see, below). The patient's follow-up 7 years later was consistent with FHHNC with moderate chronic kidney disease (serum creatinine 1.16 mg/dl (eGFR: 40 ml/min/1.73 m²), persistent hypomagnesemia despite oral supplements (magnesium 1.3 mg/dL) due to maintained hypermagnesiuria (U_{Mg/Cr} 0.27 mg/mg, FE_{Mg} 24%), associated with significant hypercalciuria (U_{Ca/Cr} 0.42 mg/mg; VCa 5.4 mg/Kg/day). His PTH levels were normalized under medical treatment. Dentistry careful evaluation did not demonstrate any enamel defects. Furthermore, the patient had no ocular abnormalities. His parents are not consanguineous, and there is no family history of nephropathy except a maternal great grandmother with a single kidney and nephrolithiasis.

3.2 | Detection of a novel *CLDN16* missense mutation by direct DNA sequencing

DNA sequence analysis showed that the *CLDN19* coding exons and their flanking intronic regions had the normal sequence. Analysis of the *CLDN16* gene revealed a heterozygous variant c.277G>A, in exon 1 (Figure 1a). This variant was also detected in heterozygosis in the patient's mother, who was unaffected. Sequence analysis of the patient's father and brother, both healthy, showed the *CLDN16* normal sequence (Figure 1a). The pedigree of the family is shown in Figure 1b. The G to A substitution leads to the replacement of alanine for threonine in residue 93 of the claudin-16 protein, p.(Ala93Thr). Alanine 93 is located next to the last amino acid of the first transmembrane domain (Figure 1c), and is highly conserved throughout the evolution (Figure 1d). We searched several databases to verify that the variant detected in our patient, c.277G>A; p.(Ala93Thr), was not a common SNP and to confirm that it was a novel mutation not previously reported. This variant was not found in ClinVar, HGMDor 1000 Genomes Project database. In the gnomAD database, it was found in only one allele from a genome sample from African population with a frequency of 0.00003 (variant ID: 3-190106185-G-A). *In silico* prediction tools PolyPhen-2, Panther, MutPred2, MutationTaster, and Fathmm-XF indicated that this rare variant was probably pathogenic (Table 2). Furthermore, this variant caused a decrease in claudin-16 protein stability according to programs that predict the protein stability of mutated proteins including I-Mutant 3.0 (DDG in kcal/mol: -1.51). We submitted this new missense *CLDN16* mutation to ClinVar and it was included with accession number VCV000930213.1.

3.3 | Identification by QMPSF of a new *CLDN16* deletion

Direct sequencing of *CLDN16* revealed only a mutated allele, therefore, since FHHNC is an autosomal recessive disease, we suspected that the mutation in the other allele was a large heterozygous deletion in this gene. In order to detect a potential heterozygous deletion of *CLDN16* that could explain the clinical phenotype and to map precisely the deletion, we designed a QMPSF assay, a method based on simultaneous amplification of multiple short sequences under quantitative conditions. The results of this assay revealed a novel large deletion in the *CLDN16* gene of the patient that, at least, lacked exons 4 and 5, c.(840+25_?)del. As illustrated by Figure 2, exonic deletions were easily detected by a 50% decrease of the corresponding peaks; the probes designed for exons 4 and 5 presented half the expected signal in the patient, brother and father. In contrast, exons 1, 2, and 3 were not deleted.

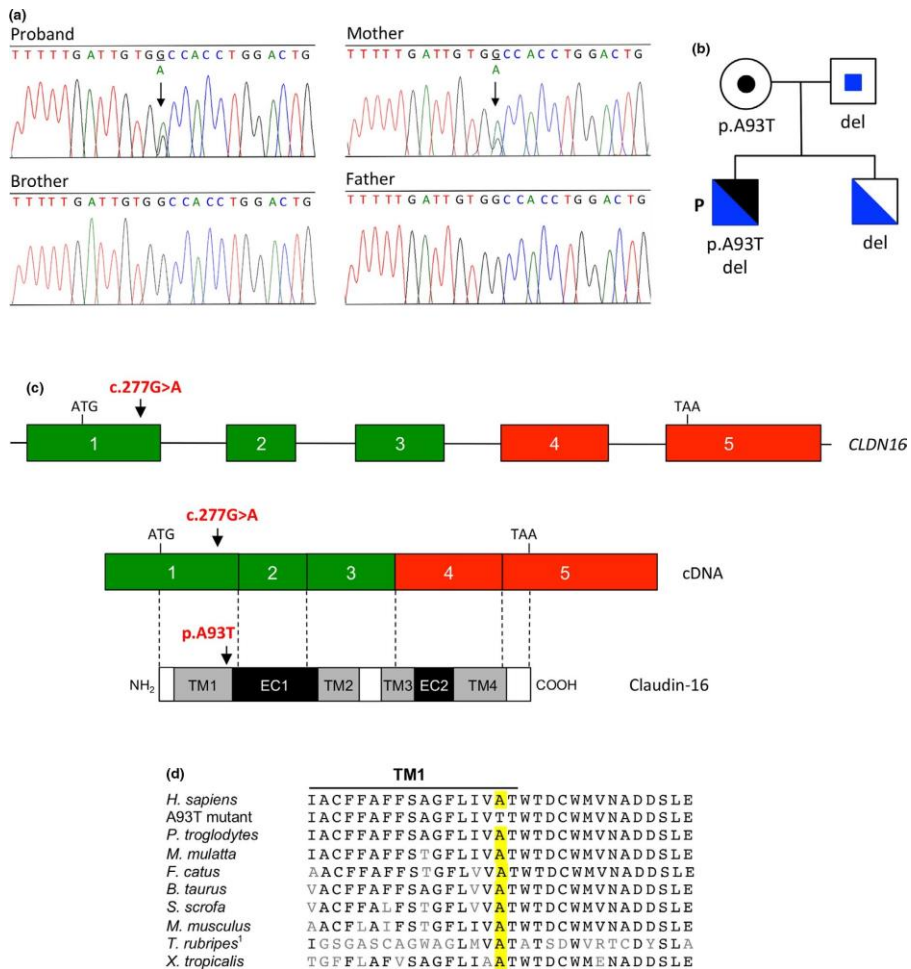


FIGURE 1 Identification of novel *CLDN16* heterozygous missense mutation c.277G>A; p.(Ala93Thr) in patient with FHHNC. (a) Electropherograms showing the heterozygous substitution in exon 1 of the patient and his mother. Arrows indicate the position affected by the mutation in the patient and his mother. The brother and father revealed the normal sequence. (b) Pedigree of the family showing segregation of both *CLDN16* variants (missense mutation and deletion in blue and black, respectively). Circle, female individual; squares, male individual; P, proband; del, c.(840+25_?)del detected in the other allele. The patient inherited the missense mutation and the deletion from his mother and father, respectively. (c) Schematic representation of the *CLDN16* gene, cDNA, and claudin-16 protein. Arrows indicate the position affected by missense mutation c.277G>A;p.(Ala93Thr). Colored boxes represent the five coding exons and black lines indicate intron sequences; exons missing in the deletion mutant are in red. Exons and introns sizes are not at scale. The positions of the ATG start codon and the TAA stop codon are also shown. Exons are associated by dotted lines to the schematic representation of the claudin-16 protein where transmembrane domains (TM1–TM4), extracellular segments (EC1 and EC2) and cytoplasmic regions (white boxes) are indicated. (d) Multiple sequence alignment of claudin-16 or related proteins showing evolutionary conservation of alanine 93. ¹*T. rubripes* does not contain the ortholog for mammalian claudin-16. The sequence shown is that of claudin-11B

TABLE 2 Pathogenicity prediction for claudin-16 mutation p.(Ala93Thr) using bioinformatic tools

Tool	PolyPhen-2 ^a	Panther ^b	MutPred2 ^c	MutationTaster ^d	Fathmm-XF ^e
Score	0.85	362	0.747	58	0.615
Significance	Possibly damaging	Possibly damaging	Probably pathogenic	Disease causing	Pathogenic

^aThe PolyPhen-2 score varies from 0 to 1. Variants with scores in the range 0.85 to 1.0 are more confidently predicted to be damaging.

^bPanther measures the length of time (in millions of years, my) an amino acid position in the protein has been preserved. The longer a position has been preserved, the more likely that amino acid change will have a deleterious effect. The thresholds are: probably damaging (preservation time is greater than 450 my), possibly damaging (preservation time is between 200 my and 450 my), and probably benign (preservation time is less than 200 my).

^cThe MutPred2 prediction ranges from 0.0 and 1.0, in which a higher score indicates a greater propensity to be pathogenic.

^dThe MutationTaster score ranges from 0.0 to 215. It is derived from the Grantham Matrix for amino acid substitutions and shows the physicochemical difference between the original and the mutated amino acid.

^eFathmm-XF predictions are given as *p*-values in the range 0–1: values above 0.5 are predicted to be deleterious, while those below 0.5 are predicted to be neutral or benign.

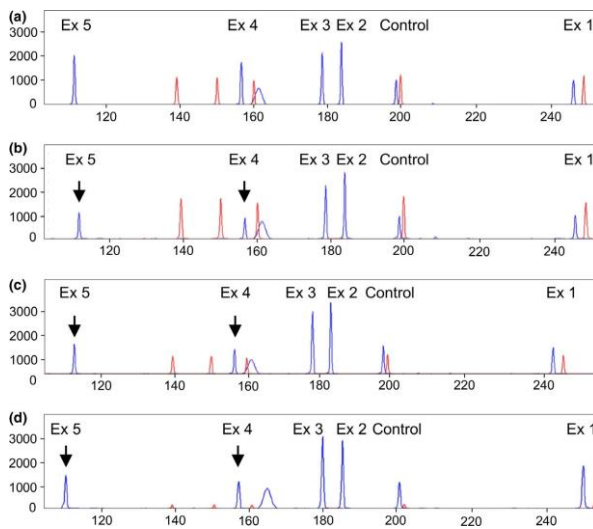


FIGURE 2 Detection of the *CLDN16* deletion using a QMPSF assay. Panels show the QMPSF electropherograms of: (a) normal control, (b) proband, (c) brother, and (d) father. Blue peaks and red peaks correspond to *CLDN16* exons 1–5 fragments and molecular weight markers, respectively. The Y-axis indicates fluorescence in arbitrary units, and the X-axis displays the size in base pairs. The heterozygous deletion is easily detected by a reduction of the peaks corresponding to exons 4 and 5 (arrows) in the proband, his brother and father compared to a normal control

The patient's unaffected brother and father were found to be carriers of this deletion (Figure 2). This novel *CLDN16* deletion was submitted to ClinVar and it was included with accession number SCV001335520.

3.4 | Modeling of claudin-16 protein structure

To analyze the structural impact of the two *CLDN16* mutations detected in the patient, the 3D structure of the claudin-16 protein was modeled based on the solved protein structure of claudin-4 using SWISS-MODEL. The results did not reveal any derangement in the structure of the mutant claudin-16

protein with the missense mutation (Figure 3). The predicted 3D structure of the claudin-16 protein encoded by the allele with the deletion of exons 4 and 5 resulted in the removal of nine amino acids of the third transmembrane domain, the second extracellular loop, the fourth transmembrane domain (encoded by exon 4) and the carboxy-terminal cytoplasmic region containing a PDZ-binding motif and potential phosphorylation sites (encoded by exon 5) (Figure 3).

4 | DISCUSSION

FHHNC is a rare hereditary disease characterized by excessive renal losses of magnesium and calcium,

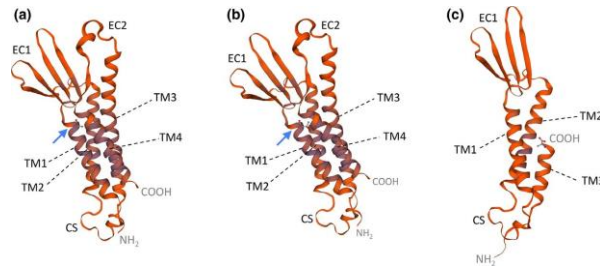


FIGURE 3 Predicted 3D structures of wild-type and mutant claudin-16 proteins generated using homology modeling with SWISS-MODEL. TM1 to 4, transmembrane domains 1 to 4; EC1 and EC2, extracellular loops 1 and 2; CS, cytoplasmic segment. (a) Wild type claudin-16. (b) Mutant p.(Ala93Thr). Blue arrows indicate the location of the original alanine 93 residue and missense mutation p.(Ala93Thr). The NH₂ and COOH termini correspond to threonine 70 and cysteine 255, respectively. (c) Deletion mutant lacking part of TM3, EC2, TM4, and COOH terminus. The COOH terminus corresponds now to alanine 197. The models are based on template 5b2.g.2 of claudin-14

bilateral nephrocalcinosis, and progressive chronic renal failure (Claverie-Martin, 2015; Praga et al., 1995). Clinical observations and clearance studies in patients suggested that the primary defect was associated with reduced paracellular reabsorption of magnesium and calcium in the thick ascending loop of Henle (Rodríguez-Soriano, Vallo, & Garcia-Fuentes, 1987). The disease is caused by loss-of-function mutations of *CLDN16* (previously known as *PCLN1*) (type 1), (Simon et al., 1999) or *CLDN19* (type 2). The majority of Spanish patients with FHHNC are homozygous for *CLDN19* founder mutation p.(Gly20Asp), and they also have severe ocular defects (Konrad et al., 2006; Claverie-Martin et al., 2013; Martín-Núñez et al., 2015). We examined the phenotype and genotype of a Spanish child with the typical characteristics of FHHNC and no ocular abnormalities. He suffered from polyuria and hyposthenuria. Bilateral nephrocalcinosis, mild hypomagnesemia, hypercalciuria, elevated fractional excretion of magnesium, increased parathyroid hormone, and decreased glomerular filtration rate were found. Genetic analysis of the proband and family members revealed two novel mutations of *CLDN16* in a compound heterozygous state, which confirmed the clinical diagnosis of FHHNC type 1.

The *CLDN16* gene is located on chromosome 3q27, and to date, 69 pathogenic mutations have been identified: 43 missense, 10 nonsense, 5 splicing, 5 small deletions, 2 small insertion, 2 small indels, 1 complex, and 1 gross deletion (Prot-Bertoye & Houillier, 2020). Because of the autosomal recessive pattern of inheritance in FHHNC type 1, patients are homozygous or compound heterozygous for the particular mutations. Functional studies have shown that *CLDN16* mutations may cause partial or complete loss of claudin-16 function (Hou et al., 2005; Kausalya et al., 2006; Konrad et al., 2008; Müller et al., 2003). The majority of mutant claudin-16 proteins display normal trafficking to the cell membrane, but

others remain in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, or lysosomes. Even mutant proteins that are correctly localized to the tight junction frequently show defective magnesium paracellular transport (Hou et al., 2005; Konrad et al., 2008). Hou and colleagues have shown that claudin-16 interacts with claudin-19 conferring cation selectivity to the tight junction in a synergistic manner (Hou et al., 2008). Mutations that disturb this interaction cause loss of cation selectivity.

Direct sequencing of *CLDN16* exons identified heterozygous missense variant c.277G>A; p.(Ala93Thr) in our patient, which was inherited from his mother. This very rare variant, which results in the replacement of an alanine residue for threonine, has not been described previously in FHHNC. The substitution of a hydrophobic amino acid for a polar amino acid in the first transmembrane domain of claudin-16 could lead to misfolding or defects in membrane insertion. Therefore, p.(Ala93Thr) could affect the formation of claudin-16/claudin-19 tight junctions. We consider this variant is a pathogenic mutation based on the following: (1) it affects a highly conserved amino acid residue, (2) bioinformatics analysis predicts deleterious consequences, (3) it's extremely low frequency, and (4) it results in a decrease of protein stability. However, this would have to be confirmed experimentally by functional analysis. Most *CLDN16* mutations affect the two extracellular loops of the protein, and only two previously reported missense mutations are located in the first transmembrane domain, p.(Cys80Tyr) and p.(Gly88Glu) (Prot-Bertoye & Houillier, 2020). Functional analysis of p.(Gly88Glu) has revealed that this mutation results in a complete loss of function (Konrad et al., 2008).

Since only one heterozygous mutation of *CLDN16* could not explain the FHHNC phenotype of our patient, we used a QMPSF assay designed by us to detect the mutation in the other allele. The results showed a heterozygous deletion of exons 4 and 5 that was inherited from his father. The

claudin-16 protein encoded by this mutant would lack part of the third transmembrane domain, the second extracellular loop, the fourth transmembrane domain, and the cytoplasmic carboxy terminus, which plays an important role in protein stability and trafficking to the tight junction (Itoh et al., 1999; Müller et al., 2003). Therefore, we assumed that this deletion induces a complete loss of function of the mutant claudin-16 protein. Only one large homozygous deletion in the *CLDN16* gene of a patient with FHHNC has been reported in the literature (Yamaguti et al., 2015). This deletion was detected using a multiplex ligation-dependent probe amplification assay, and included exons 2 to 5. *CLDN16* large deletions may be underestimated, and we suggest that in cases where only one mutated allele is detected, the genetic analysis should include a method to detect large deletions.

The pathogenesis of chronic renal disease in patients with FHHNC remains unclear. The hypercalciuria and nephrocalcinosis present in these patients may contribute to progression to end-stage renal disease, however, a suitable correlation has not been found (Praga et al., 1995). Moreover, not all hereditary tubulopathies characterized by nephrocalcinosis lead to end-stage renal disease. Other factors related to the progression of chronic kidney disease could be the activation of the inflammasome by crystal nephropathy or the anomalies caused by the defective claudin-16 function early in the development of tubular tight junctions (Godron et al., 2012; Claverie-Martin et al., 2015). Konrad and colleagues have suggested a genotype-phenotype correlation related to the progression of renal failure in FHHNC patients with *CLDN16* mutations (Konrad et al., 2008). They found that the progression of renal failure is significantly faster in patients with complete loss-of-function mutations in both alleles as compared with patients with partial loss-of-function mutations in one or both alleles. As most patients with FHHNC, our patient presented the typical characteristics of FHHNC, including moderate chronic kidney disease early in infancy. However, during the last 7 years of follow-up, he showed a slow deterioration in renal function (eGFR from 56–40 ml/min/1.73 m²) in comparison with other patients (Weber et al., 2001). This suggests that at least one of the two mutations detected in the patient has a partial loss of function. Since the large deletion obviously has a complete loss of function, we speculate that p.(Ala93Thr) has a residual claudin-16 function that delays progression of renal failure.

In conclusion, we report the clinical and genetic features of a Spanish boy with early onset of FHHNC symptoms but slow deterioration in renal function. By applying direct DNA sequencing and a QMPFSF analysis designed by us, two novel compound heterozygous pathogenic variants of *CLDN16* were identified; a missense mutation, c.277G>A; p.(Ala93Thr), in one allele and a large deletion, c.(840+25_?)del, in the other allele. The missense mutation affects the first transmembrane domain of claudin-16 and probably conserves a

residual function, while the deletion involves exons 4 and 5 and most likely leads to a complete loss of function. These mutations were inherited from his mother and father, respectively. Our study provides further insights into the molecular basis of FHHNC. Moreover, the QMPFSF assay described here should facilitate the genetic diagnosis of FHHNC.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant PII7/00153, integrated in the Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 and co-financed by the ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación and the European Regional Development Fund “Another way to build Europe,” and by the Hipofam Association. We thank the patient and family members for their participation in this study


CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.


AUTHOR CONTRIBUTION

AG-C designed and implemented the QMPFSF assay. AP-R and M-VP performed PCR amplifications and analyzed the DNA sequences. AP-R, ER-T, and FC-M contributed to the bioinformatics analysis. GA and LM collected the patient's data and followed up the case. FC-M, AG-C, and GA wrote the paper. FC-M and GA acquired funding. All authors read and approved the final version of the manuscript.

ORCID

Alejandro García-Castaño  <https://orcid.org/0000-0002-9734-6600>


Ana Perdomo-Ramirez  <https://orcid.org/0000-0002-2562-2119>

Mónica Vall-Palomar  <https://orcid.org/0000-0002-4133-5814>

Elena Ramos-Trujillo  <https://orcid.org/0000-0002-7080-7649>

Leire Madariaga  <https://orcid.org/0000-0002-4032-9842>

Gema Ariceta  <https://orcid.org/0000-0003-1763-1098>

Felix Claverie-Martin  <https://orcid.org/0000-0003-2468-3267>

REFERENCES

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., ... Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Bardet, C., Courson, F., Wu, Y., Khaddam, M., Salmon, B., Ribes, S., ... Chaussain, C. (2016). Claudin-16 deficiency impairs tight junction function in ameloblasts, leading to abnormal enamel formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(3), 498–513. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2726>
- Capriotti, E., Fariselli, P., & Casadio, R. (2005). I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or

- structure. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W306–W310. <https://doi.org/10.1093/nar/gki375>
- Cheng, J., Randall, A., & Baldi, P. (2006). Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 62(4), 1125–1132. <https://doi.org/10.1002/prot.20810>
- Claverie-Martin, F. (2015). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: Clinical and molecular characteristics. *Clinical Kidney Journal*, 8(6), 656–664. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfv081>
- Claverie-Martin, F., García-Nieto, V., Loris, C., Ariceta, G., Nadal, I., Espinosa, L., ... Muley, R. (2013). Claudin-19 mutations and clinical phenotype in Spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *PLoS One*, 8(1), e53151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053151>
- Claverie-Martin, F., Vargas-Poussou, R., Müller, D., & García-Nieto, V. (2015). Clinical utility gene card for: Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis with/without severe ocular involvement. *European Journal of Human Genetics*, 23(6), 889. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.176>
- Goodenough, A., Harambat, J., Boccio, V., Mensire, A., May, A., Rigother, C., ... Vargas-Poussou, R. (2012). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: Phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with CLDN16 or CLDN19 mutations. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(5), 801–809. <https://doi.org/10.2245/cjn.12841211>
- Hou, J., Paul, D., & Goodenough, D. (2005). Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *Journal of Cell Science*, 118(21), 5109–5118. <https://doi.org/10.1242/jcs.02631>
- Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A. S., Schneeberger, E. E., Paul, D. L., ... Goodenough, D. A. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 619–628. <https://doi.org/10.1172/jci33970>
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of Cell Biology*, 147(6), 1351–1363. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>
- Kausalya, P. J., Amasheh, S., Günzel, D., Wurps, H., Müller, D., Fromm, M., & Hunziker, W. (2006). Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *Journal of Clinical Investigation*, 116(4), 878–891. <https://doi.org/10.1172/jci26323>
- Konrad, M., Hou, J., Weber, S., Dötsch, J., Kari, J. A., Seeman, T., ... Schaller, A. (2008). CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(1), 171–181. <https://doi.org/10.1681/asn.2007060709>
- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., ... Weber, S. (2006). Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *The American Journal of Human Genetics*, 79(5), 949–957. <https://doi.org/10.1086/508617>
- Martin-Núñez, E., Cordoba-Lanus, E., Gonzalez-Acosta, H., Oliet, A., Izquierdo, E., & Claverie-Martin, F. (2015). Haplotype analysis of CLDN19 single nucleotide polymorphisms in Spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *World Journal of Pediatrics*, 11(3), 272–275. <https://doi.org/10.1007/s12519-014-0528-3>
- Meoli, L., & Günzel, D. (2020). Channel functions of claudins in the organization of biological systems. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(9), 183344. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2020.183344>
- Müller, D., Kausalya, P. J., Claverie-Martin, F., Meij, I. C., Eggert, P., García-Nieto, V., & Hunziker, W. (2003). A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *The American Journal of Human Genetics*, 73(6), 1293–1301. <https://doi.org/10.1086/380418>
- Pejaver, V., Mooney, S. D., & Radivojac, P. (2017). Missense variant pathogenicity predictors generalize well across a range of function-specific prediction challenges. *Human Mutation*, 38(9), 1092–1108. <https://doi.org/10.1002/humu.23258>
- Peng, S., Rao, V. S., Adelman, R. A., & Rizzolo, L. J. (2011). Claudin-19 and the barrier properties of the human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(5), 1392. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5984>
- Perdomo-Ramirez, A., Aguirre, M., Davitaia, T., Ariceta, G., Ramos-Trujillo, E., & Claverie-Martin, F. (2019). Characterization of two novel mutations in the claudin-16 and claudin-19 genes that cause familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Gene*, 689, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.024>
- Praga, M., Vara, J., González-Parra, E., Andrés, A., Alamo, C., Araque, A., ... Rodicio, J. L. (1995). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney International*, 47(5), 1419–1425. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.199>
- Prot-Bertoye, C., & Houillier, P. (2020). Claudins in renal physiology and pathology. *Genes*, 11(3), 290. <https://doi.org/10.3390/genes11030290>
- Rodriguez-Soriano, J., Vallo, A., & Garcia-Fuentes, M. (1987). Hypomagnesemia of hereditary renal origin. *Pediatric Nephrology*, 1(3), 465–472. <https://doi.org/10.1007/bf00849255>
- Rogers, M. F., Shihab, H. A., Mort, M., Cooper, D. N., Gaunt, T. R., & Campbell, C. (2018). FATHMM-XF: Accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. *Bioinformatics*, 34(3), 511–513. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx536>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, 11(4), 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Shinoda, T., Shinya, N., Ito, K., Ohsawa, N., Terada, T., Hirata, K., ... Shirouzu, M. (2016). Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. *Scientific Reports*, 6(1), <https://doi.org/10.1038/srep33632>
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., ... Lifton, R. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*, 285(5424), 103–106. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.103>
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., ... Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science*, 344(6181), 304–307. <https://doi.org/10.1126/science.1248571>
- Tang, H., & Thomas, P. D. (2016). PANTHER-PSEP: Predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics*, 32(14), 2230–2232. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw222>

- Wang, S.-B., Xu, T., Peng, S., Singh, D., Ghiassi-Nejad, M., Adelman, R. A., & Rizzolo, L. J. (2019). Disease-associated mutations of claudin-19 disrupt retinal neurogenesis and visual function. *Communications Biology*, 2(113). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0355-0>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Weber, S., Schneider, L., Peters, M., Misselwitz, J., Rönnefarth, G., Böswald, M., ... Konrad, M. (2001). Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(9), 1872–1881. Retrieved from <https://jasn.asnjournals.org/content/12/9/1872.long>
- Yamaguti, P. M., de Neves, F. A. R., Hotton, D., Bardet, C., de La Dure-Molla, M., Castro, L. C., ... Acevedo, A. C. (2017). Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. *Journal of Medical Genetics*, 54(1), 26–37. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103956>
- Yamaguti, P. M., dos Santos, P. A. C., Leal, B. S., Santana, V. B. B. D. M., Mazzeu, J. F., Acevedo, A. C., & Neves, F. D. A. R. (2015). Identification of the first large deletion in the CLDN16 gene in a patient with FHHNC and late-onset of chronic kidney disease: case report. *BMC Nephrology*, 16(92). <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0079-4>

Publicació 2. Invited Review de la revista *Pediatric Nephrology*, actualment en revisió.

Pediatric Nephrology. Invited educational review

FAMILIAL HYPOMAGNESEMIA WITH HYPERCALCIURIA AND NEPHROCALCINOSIS

Authors: Mònica Vall-Palomar¹, Leire Madariaga^{2,3}, Gema Ariceta^{1,4}

¹ Fisiopatologia Renal, Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (CIBBIM), Vall d'Hebron. Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain. ² Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain. ³ Pediatric Nephrology Department, Cruces University Hospital, UPV/EHU, Barakaldo, Spain. ⁴ Pediatric Nephrology Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Corresponding author: Gema Ariceta, Servei Nefrologia Pediàtrica, Hospital Vall d' Hebron, Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129 | 08035 Barcelona. Spain; gariceta@vhebron.net

ORCID numbers: Mònica Vall-Palomar: <https://orcid.org/0000-0002-4133-5814>; Leire Madariaga: <https://orcid.org/0000-0002-4032-9842>; Gema Ariceta: <https://orcid.org/0000-0003-1763-1098>

Acknowledgments: We would like to acknowledge the FHHNC patient advocacy group Hipofam (Asociación para la Información y la Investigación de la Hipomagnesemia Familiar) (<http://hipofam.org>).

Abstract

Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC; OMIM 248250) is a rare autosomal recessive kidney disease caused by mutations in the *CLDN16* or *CLDN19* genes encoding the proteins claudin-16 and claudin-19, respectively. These are implicated in the paracellular magnesium and calcium transport in the thick ascending limb of Henle's loop and account for most of the magnesium reabsorption in the tubules. FHHNC is characterized by hypomagnesaemia, hypercalciuria and nephrocalcinosis, and progresses to renal failure, requiring dialysis and kidney transplantation at early stages of life. Patients carrying *CLDN19* mutations frequently exhibit associated ocular congenital defects leading to variable visual impairment. Despite this severe clinical course, phenotype variability even among siblings has been described in this entity, suggesting the implication of unidentified epigenetic mechanisms or other genetic or environmental modifiers.

Currently, there is no specific therapy for FHHNC. Supportive treatment with high fluid intake and dietary restrictions, as well as magnesium salts, thiazides and citrate are

commonly used in an attempted to retard progression of renal failure. Kidney transplant remains the only curative option for renal failure in these patients.

In this review we summarize the current knowledge about FHHNC and discuss about the remaining open questions in this entity.

Key words

Hypomagnesemia-Hypercalciuria-Nephrocalcinosis, FHHNC, *CLDN16*, *CLDN19*, claudin, tight junctions, macular colobomata

Introduction

Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) is a rare autosomal recessive renal tubular disease, with an incidence of <1/1.000.000 individuals, characterized by severe urinary magnesium (Mg) wasting, associated with hypercalciuria, nephrocalcinosis and progression to renal failure [1, 2]. Described in 1972 [3], most patients are diagnosed in childhood, but the disease may be overlooked due non-specific manifestations [4, 5]. Common symptoms include polyuria-polydipsia, failure to thrive and urinary tract infections (UTI). Further, hypercalciuria with nephrocalcinosis, hypomagnesemia and significant hyperparathyroidism regardless of glomerular filtration rate are characteristic but not universal findings [1, 6, 7]. FHHNC pathogenesis is explained by impaired paracellular Mg and calcium (Ca) reabsorption at the thick ascending limb of Henle's loop (TAL). In 1999, Simon et al, identified that FHHNC was caused by pathogenic variants in *CLDN16* gene, (FHHNC type 1, OMIM #248250) [8]. Some years later, in 2006, Konrad et al, identified a second type of FHHNC, often associated with ocular manifestations, caused by mutations in *CLDN19* gene (FHHNC type 2, OMIM #248190) [9].

Herein, FHHNC is a monogenic disorder caused by loss of function mutations in *CLDN16* or *CLDN19* genes encoding the tight junction (TJ) proteins claudin-16 [8] and claudin-19 [9], respectively. Genetic advances led to better understanding of the selective paracellular cation transport pathway at the TAL [10, 11]. In addition, discovery of *CLDN19* expression in retina explained the coexistence of ocular disease in some affected individuals, a clinical feature known since 1979 [12]. Unfortunately, increased FHHNC knowledge was not followed by significant therapeutic advances, and patient outcome remains poor with progression to renal failure [7, 13–18]. Remarkably, disease severity differs between FHHNC patients, even in those carrying the same mutations, and siblings, a finding that points out that other potential pathogenic factors could play a role in progression and outcome [17, 19].

In this review we aim to increase awareness about FHHNC and summarize current knowledge and remaining open questions about this entity.

Etiopathogenesis

Mg is the second most abundant intracellular cation and essential for several vital functions, such as neurotransmission, cardiac conductance, blood glucose and blood pressure regulation, being a cofactor of >600 enzymes, including those participating in ATP metabolism. Further, Mg enhances DNA and RNA resistance against oxidative stress, and participates in cell cycle and cell proliferation control [20].

Most body content of Mg is stored at muscle (39%) and bone (60%), whereas plasma Mg represents only 1% of body Mg. Circulating Mg level (normal values 1.8-2.3 mg/dL or 0.70-1.1 mmol/L) reflects the equilibrium between Mg intestinal reabsorption, which is poorly regulated and depends on Mg intake (highly present in chocolate, cocoa, nuts, peanuts, green vegetables), and Mg excretion by urine [normal values: total magnesuria 1.6-2.8 mg/Kg/day [21], 3-5 mmol/24h[22] and fractional excretion of Mg (FEMg) <4% [23]].

Kidneys are the primary regulators of Mg homeostasis and can modify the amount of Mg excreted in urine to maintain or restore its body balance. Ionized Mg (~80% of total serum Mg) is freely filtered at the glomerulus and ~95–99% is recovered along the nephron. The main location for renal Mg reabsorption (~60%) is the TAL, but final Mg content in urine is determined by the reabsorption at the distal tubule (~10%), since no further reabsorption takes place beyond that segment [24, 25]. Tubular Mg handling had been extensively reviewed elsewhere and is out of the scope of this review.

The TAL is the tubular segment where 60% of filtered Mg and 25% of filtered Ca are reabsorbed through a paracellular pathway in a lumen-positive transepithelial voltage (V_{te}) dependent manner [26]. That electric gradient is a result of Na, K and Cl transtubular transport, and depends on its integrity. Differential ionic conductance between the apical and basolateral cellular membranes generates a lumen-positive V_{te} around +8 mV in the deeper medullary TAL, which is the driving force for Na paracellular reabsorption since tubular fluid is more concentrated. Na secretion to the luminal fluid increases the lumen-positive V_{te} up to values of +30 mV at the cortical TAL, constituting the driving force for Mg and Ca paracellular transport through the claudin-16/19 complex [2, 27, 28] (Figure 1).

Claudins are a family of transmembrane proteins that constitute TJ, a type of intercellular union with a key role in selective paracellular tubular transport and cell polarity. Claudins polymerize with other claudins from the same cell (*cis* interaction) as well as with those from adjacent cells (*trans* interaction), forming claudin complexes which constitute an ion pore that mediates paracellular ion conductance between the apical and the basolateral cell compartments [29]. Claudin-16 and claudin-19 are co-expressed in TAL of the nephron [8, 9] and form a selective cation pore for Mg, Ca and others. More specifically, claudin-16 acts as a cation pore and claudin-19 as an anion blocker [11, 27].

Preserved function of both claudin-16 and claudin-19 is mandatory to maintain paracellular pore selectivity. Consequently, mutations in *CLDN16* or *CLDN19* genes result in defective transtubular Vte gradient generation and loss of ion synergistic effects on paracellular transport [27]. Claudin-16/19 complex activity is negatively modulated by claudin-14, expressed also at the TAL, through an epigenetic mechanism triggered by the activation of calcium-sensing receptor (CaSR) by high extracellular Ca concentrations [30].

Further, claudin-16 and claudin-19 are also located outside the kidney, in the TJ of ameloblast, which might explain their association with defective enamel formation in FHHNC patients [31, 32]. Moreover, claudin-19 is also expressed in retinal pigment epithelium [9], where it is involved in ocular development, and in Schwann cells of the peripheral nervous system [33]; whereas claudin-16 has been detected in salivary glands [34].

Genetic heterogeneity and geographic distribution - Founder mutations

To date, at least 70 different mutations in *CLDN16* and 24 in *CLDN19* have been described [35]. Most *CLDN16* and *CLDN19* variants identified in FHHNC patients are missense mutations found in homozygous or compound heterozygous state [2, 36]. These mutations are mainly located in the two extracellular loops of the protein but a few affect the transmembrane domains and the cytoplasmic regions. Few large deletions in these genes had been also identified [14, 19, 37].

Functional studies have shown that *CLDN16* mutations may cause partial or complete loss of claudin-16 function [7, 10, 38, 39]. Most mutant proteins display normal trafficking to the cell membrane, but others are retained in intracellular compartments. Even mutant proteins that are correctly localized to the tight junction frequently show defective magnesium paracellular transport [7, 10].

Characteristically, there is a geographic distribution of genetic variants. Most FHHNC patients are carriers of *CLDN16* mutations, namely those with North-European and North-African ancestry but in the South of Europe (mainly Spain and France), *CLDN19* mutations are highly prevalent. Moreover, ~ two-thirds of *CLDN19* patients exhibit the c.59G>A (p.G20D) mutation in homozygosis, which was named the Spanish/Hispanic mutation due to its founder effect in the region [9, 14, 17]. Regarding *CLDN16*, two different mutations [c.453G>T (p.L151F) and c.416C>T (p.A139V)] recurrent in Germany and the east of Europe [16], and in the north of Africa [14], respectively, were also found to have a common ancestor.

Clinical Presentation

Patient age at clinical onset is variable, but commonly within the first 5 years of life. Some individuals are identified later in life, commonly within the 2nd decade, due to scarce early symptoms [19, 40, 41].

- Renal manifestations: Initial symptoms include failure to thrive, polyuria and polydipsia, and recurrent UTI. Additional clinical manifestations at diagnosis are abdominal pain, vomiting, feeding problems, enuresis, nephrolithiasis or rickets [7, 14–17]. Half patients present hyperuricemia and persistent leukocytes in sterile urine [15]. Hypomagnesemia, hypercalciuria and nephrocalcinosis are prominent findings in FHHNC patients at diagnosis too [7, 14, 16, 17]. In some patients, serum Mg levels persist within normal range at diagnosis because an underlying moderate to advanced chronic kidney disease (CKD) and parallel reduction of Mg urinary loss. However, the FEMg always remains inappropriately elevated for serum level of Mg and associates significant hypercalciuria [15]. In most cases hypomagnesemia is not severe, but can cause muscle cramps, exercise intolerance or even seizures [16]. Often, serum potassium remains normal or at the upper high normal value, and patients maintain normal acid-base balance [1, 2, 6].

Image findings include medullary nephrocalcinosis due to Ca deposit in almost every patient at diagnosis, regardless of the degree of renal function, and renal cysts are also common [7, 14–17]. Histological findings in historical patients who underwent a kidney biopsy for diagnosis demonstrated Ca deposits, glomerular sclerosis and tubular atrophy with interstitial fibrosis [16].

Associated incomplete distal renal tubular acidosis without hypokalemia is often reported in FHHNC, unrelated to renal dysfunction [6, 16]. Although the exact mechanism remains unknown, nephrocalcinosis or primary claudin dysfunction *per se* may be involved. Hypocitraturia, a frequent finding in FHHNC patients, probably contributes to the development of nephrocalcinosis as well [15, 16]. Polyuria and polydipsia and often enuresis, which are seen from diagnosis, are explained by impaired urinary concentrating ability with scarce response to desmopressin [42].

Renal manifestations are similar in FHHNC type 1 or 2 [14]. CKD occurs frequently beyond the first decade of life in FHHNC patients, and >50% progress to renal failure within the 2nd or 3rd decade of life. However, some patients, in general with *CLDN19* mutations, require renal replacement therapy (dialysis or transplant) during the first decade of life [7, 14–17].

- Ocular manifestations: Different reports have described severe ocular congenital defects in about 90% of patients with *CLDN19* mutations, mainly myopia magna, horizontal nystagmus, and a characteristic retinal lesion or dysplasia named macular colobomata, leading to severe visual impairment in some cases [9, 14, 17]. This is due to

the embryonic retinal epithelium expression of *CLDN19*, which may be involved in retinal neurogenesis [43]. Few patients with *CLDN16* mutations may present ocular abnormalities but these are less frequent and severe [2, 10, 16, 31].

- **Other clinical manifestations:** One clinical hallmark in FHHNC patients is the presence of early hyperparathyroidism, independent of CKD stage, and more severe than observed in patients with CKD of other origin [7]. That may be the result of an excessive elimination of Ca in the urine and the need for maintaining normal serum Ca level, or secondary to mild or moderate hypomagnesemia, in an attempt of high PTH levels to balance those excess urinary loss by enhancing Ca and Mg renal absorption within other tubular transporters [7, 44]. Thus, rickets [45] and bilateral slipped capital femoral epiphysis has been reported in FHHNC patients with severe hyperparathyroidism [46].

Another clinical feature more rarely related to FHHNC is calcium pyrophosphate dehydrate deposition in the joints, also known as chondrocalcinosis [47]. This is a common manifestation in other tubulopathies presenting with chronic hypomagnesemia, such as Gitelman syndrome, or even in hypomagnesemia of intestinal origin [48, 49]. Amelogenesis imperfect (inherited enamel formation abnormalities) is described in patients with both *CLDN16* and *CLDN19* mutations too, as both genes are expressed in ameloblasts [31, 32].

Finally, different neurological symptoms have been observed in FHHNC patients, independent of the presence or degree of hypomagnesemia, such as gait instability, tremors, troubles with fine psychomotricity or even cerebral convulsions [14, 16, 17]. Neuromuscular disorders, including exercise intolerance, limb stiffness or cramps, are reported in those patients even after receiving a kidney transplant and having normalized serum Mg levels [50].

Phenotype variability among siblings

Clinical presentation and severity of the renal disease progression differ between FHHNC patients, even in those carrying the same mutations causing the disease [17, 19]. A clear demonstration of this phenomenon is the phenotype variability among siblings. Some of the differences described in the literature include the age of clinical presentation, the recurrence of UTI or nephrolithiasis, the age when patients develop renal failure, and the presence and type of ocular abnormalities [51–54].

Diagnosis

Clinical diagnostic clues for FHHNC includes early nephrocalcinosis in an infant or child with hypercalciuria and mild to moderate hypomagnesemia of renal origin. High FEMg is always observed despite inappropriately low serum Mg level [15]. It is important to remark that hypomagnesemia may be absent in affected patients with advanced CKD [17, 55, 56]. Increased PTH levels without correlation with CKD stage is characteristic of FHHNC as well [1, 3]. Detection of prototypic ocular manifestations such as macular colobomata, horizontal nystagmus and CKD at diagnosis is highly suggestive of this disease [2, 14, 17, 50].

Whenever possible, molecular analyses of *CLDN16* and *CLDN19* genes should be performed to confirm diagnosis and provide patient and family counselling. Keeping in mind the geographic distribution and ocular phenotype, genetic diagnosis may start with single *CLDN16* or *CLDN19* analyses by traditional Sanger sequencing [14, 16, 17, 57]. However, nowadays many laboratories proceed with next generation sequencing (NGS) directly, as it allows not only analyses of both genes at the same time, but also other genes associated with other inherited diseases with hypomagnesemia of renal origin. In cases where only one heterozygous mutation in *CLDN16* or *CLDN19* is detected, quantitative multiplex polymerase chain reaction can be used to look for partial or whole exon deletions [14, 19, 37].

Differential diagnosis

FHHNC differential diagnosis includes other inherited and acquired causes of urinary Mg wasting [58] and other entities with loss of the transtubular voltage gradient at the TAL and defective Mg and Ca paracellular reabsorption [23].

Most frequent differential diagnosis includes Gitelman Syndrome (caused by loss of function mutations in *SLC12A3*, the sodium chloride co-transporter, NCC), as it is more prevalent than FHHNC. Gitelman Syndrome is easily identified by its characteristic hypocalciuria without nephrocalcinosis [59]. Further, mutations in *TRPM6*, *FXYD2*, *EGF*, *CNNM2* and *KCNA1* genes encoding different proteins involved in renal tubular Mg handling, are generally associated with a more severe hypomagnesemia and consequent early neurologic severe manifestations, but rarely present with nephrocalcinosis [23, 44]. Other primary tubulopathies such as Bartter Syndrome, EAST Syndrome (caused by *KCNJ10* mutations) or Autosomal dominant hypocalcemia (caused by gain of function mutations in the *CaSR* gene) should be considered as impaired Na, K and Cl reabsorption at the TAL and distal nephron impacts on the driving forces essential for Mg tubular handling, as explained. Hypomagnesemia may be observed in renal dysplasia caused by *HNF1b* gene mutations or in mitochondrial diseases, but often extrarenal clinical features

help with the differential diagnosis [60]. Recently, a diagnostic flowchart for a suspected genetic cause of hypomagnesemia has been proposed based on clinical characteristics as hypercalciuria, prenatal onset, inheritance transmission mode and/or extrarenal symptoms [23].

Further, the most frequent causes of hypomagnesemia are related to medications. Proton pump inhibitors (omeprazole), diuretics (furosemide, thiazides), anticalcineurin inhibitors (cyclosporin, tacrolimus), antimicrobials, cisplatin and anti-EGF receptors (cetuximab, panitumumab), among others, may cause hypomagnesemia and should be excluded [59].

Finally, in patients without significant hypomagnesemia, or whenever Mg is not measured routinely, clinical picture could resemble distal tubular acidosis [61]. Normalization of Ca and Mg wasting in urine after correction of acidosis guides the diagnostic approach in those cases [62].

Treatment

To date there is not specific therapy for FHHNC. Supportive treatment, hydration and prevention of acquired renal damage remain the only option for those patients with preserved renal function, in an attempted to retard CKD progression. Kidney transplantation cures the disease but has no impact on ocular disability if present.

General measures such high fluid intake, low dietary intake of salt, as well as protein and potassium intake adjusted for CKD are advised in patients with FHHNC. Based on local availability, different magnesium salts are prescribed for treating those individuals with significant hypomagnesemia. The usual daily dose in children is 10 to 20 mg of elemental Mg per kg of body weight, distributed in 3 times [23, 46, 59]. Doses are titrated based on the presence and severity of related symptoms as most patients do not achieve complete correction of serum Mg level, and to avoid high Mg dose adverse events as diarrhea, abdominal pain and other gastrointestinal side effects [59].

Low thiazides dose (0.5-1.5 mg/kg/day) are cautiously used in FHHNC patients to treat hypercalciuria and reduce progression of nephrocalcinosis, but avoiding further renal damage due to volume depletion. Although thiazides have been proved to effectively correct hypercalciuria in some studies [15, 63], its long-term impact in the natural course of the disease, severity of nephrocalcinosis and decline of renal function is controversial. Potassium citrate is also commonly prescribed to treat the frequent hypocitraturia seen in those patients, to prevent nephrocalcinosis and lithiasis, and correct the acidosis if present [15, 18].

Prostaglandin inhibitors, especially indomethacin, may be used with caution to avoid polyuria and optimize growth in some selected FHHNC patients [14, 64]. However, this treatment is highly controversial because associated side effects due to diminished renal blood flow, especially in situations of volume contraction that can deteriorate renal function and even precipitate renal failure [65].

Treatment of early secondary hyperparathyroidism with active vitamin D is advised. Nevertheless, non-active forms of vitamin D should be used with caution to avoid secondary hypercalciuria that may aggravate nephrocalcinosis.

Patients with renal failure are treated with renal replacement therapies, both hemodialysis and its variants, and peritoneal dialysis. Renal transplant is the only curative therapy in FHHNC patients.

Outcome

Most reported FHHNC patients exhibited CKD at diagnosis and progressed invariably to renal failure over time (50% of patients at 20 years old) [1, 14–18]. Early development of CKD in FHHNC is attributed to different risk factors, such as nephrocalcinosis, chronic dehydration due to polyuria, recurrent UTI, and gender [5, 66]. However, it remains unclear why FHHNC patients develop renal failure in contrast with other tubulopathies sharing similar risk factors, such as distal renal tubular acidosis or Bartter syndrome, with more favorable outcome if treated [67]. Animal studies suggest a developmental tubular defect in FHHNC [68] that may explained patient bad prognosis.

Genetic factors may influence patient outcome too. Despite renal presentation is indistinguishable between FHHNC patients with mutations in either *CLDN16* or *CLDN19* genes, individuals with pathogenic variants in *CLDN19* gene have more risk to progress earlier to CKD stage 3 and renal failure [14]. For *CLDN16* mutations a genotype-phenotype relationship has been established in patients with complete loss-of-function mutations in both alleles (nonsense, truncating, splice-site and missense mutations with a demonstrated deleterious effect) who exhibit earlier symptoms and a faster CKD progression compared to those with at least one partial-function mutation [7]. Reversely, no genotype-phenotype association has been established in individuals affected by *CLDN19* mutations, though the high frequency of the p.G20D mutation hampers those kind of studies [17]. Even more, there is evidence of large phenotypic variability among patients sharing the founder Spanish/Hispanic mutation p.G20D (c.59G>A) mutation in homozygosis, even among siblings [2, 17]. This phenotypic variability suggests the presence of unidentified epigenetics, other genetic and/or environmental modifier events that could be modulating the disease progression.

Future research

Future research should be focused on increasing knowledge on FHHNC physiopathology to identify what factors (environmental, modifier genes or differential epigenetic regulation) determine phenotype variability and on novel therapeutic targets and drug discovery. Thus, exome analysis, and renal protein/mRNA/microRNA profile might help us to identify biomarkers of progression. On the other hand, new therapeutic approaches to rescue claudin-16 function in some mutant proteins open promising expectations. Using cell models, primaquine is described to increase claudin-16 mutant (p.D97S) stability and cell surface localization [69]. In the same context, Müller *et al.* demonstrated that the presence of the p.Y207X claudin-16 mutant in the plasmatic membrane can be improved by inhibiting clathrin-mediated internalization [70].

Key summary points

- FHHNC is an ultrarare autosomal recessive tubular disease characterized by severe renal Mg and Ca wasting, nephrocalcinosis and progressive CKD, caused by loss of function mutations in either *CLDN16* or *CLDN19* genes, which encode protein claudin-16 and -19 respectively.
- Claudin-16 and -19 are co-expressed at the tight junction of the TAL, where they regulate the selectivity of paracellular Mg and Ca reabsorption through the efflux of Na into the tubular lumen. The lumen-positive potential difference represents the major driving force for that process and depends on K secretion via ROMK, Na⁺, K⁺ and Cl⁻ absorption via NKCC2, and dilution potential between the medulla and cortex.
- Clinical expression of kidney disease is similar in patients with FHHNC type 1 or type 2, but those affected by *CLDN19* mutations commonly present ocular manifestations including retinal involvement. Increased fractional excretion of Mg associated with hypercalciuria and nephrocalcinosis with early CKD, and hyperparathyroidism are highly suggestive of FHHNC.
- Despite current knowledge in disease pathogenesis, specific treatment is lacking and poor outcome with progression to renal failure remains the rule. Kidney transplant is curative, but many patients present severe visual impairment.

Questions

1. **What clinical manifestations are common in FHHNC?**
 - a) Polyuria-polydipsia
 - b) Urinary tract infections
 - c) Muscle cramps
 - d) All the above
2. **Identify which clinical finding that may be absent in FHHNC.**
 - a) Increased fractional excretion of magnesium in urine
 - b) Hypomagnesemia
 - c) Hypercalciuria
 - d) Nephrocalcinosis
3. **Magnesium tubular transport is characterized by:**
 - a) Most tubular Mg reabsorption occurs at TAL
 - b) Tight junction proteins claudin-16 and claudin-19 constitute a selective cation pore for Mg, Ca and others
 - c) Loss of lumen-positive potential difference at the TAL explains Mg renal wasting in different tubulopathies
 - d) All the above
4. **What of the following factors is not helpful for differential diagnosis between FHHNC type 1 and type 2?**
 - a) Kidney disease manifestations
 - b) Geographic origin
 - c) Ocular symptoms
 - d) Genetic testing
5. **Treatment of FHHNC may include:**
 - a) Oral Citrate
 - b) Thiazides
 - c) Mg supplements
 - d) All the above

Correct answers: 1. d) All the above; 2. b) Hypomagnesemia; 3. d) All the above; 4. a) Kidney disease manifestations; 5. d) All the above

Declarations. Compliance with Ethical Standards.

Funding: This work was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (PI14/01107 and PI18/01107) and the patient advocacy group Hipofam (Asociación para la Información y la Investigación de la Hipomagnesemia Familiar).

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and material: Not applicable

Code availability: Not applicable

Authors' contributions: All authors have written and reviewed the manuscript.

REFERENCES

1. Praga M, Vara J, González-Parra E, et al (1995) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int* 47:1419–1425. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.199>
2. Claverie-Martin F (2015) Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: clinical and molecular characteristics. *Clin Kidney J* 1–9. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfv081>
3. Michelis MF, Drash AL, Linarelli LG, et al (1972) Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis. *Metabolism* 21:905–920. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(72\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0026-0495(72)90025-X)
4. Manz F, Schärer K, Janka P, Lombeck J (1978) Renal magnesium wasting, incomplete tubular acidosis, hypercalciuria and nephrocalcinosis in siblings. *Eur J Pediatr* 128:67–79. <https://doi.org/10.1007/BF00477550>
5. Haisch L, Almeida JR, Abreu Da Silva PR, et al (2011) The role of tight junctions in paracellular ion transport in the renal tubule: Lessons learned from a rare inherited tubular disorder. *Am J Kidney Dis* 57:320–330. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.08.038>
6. Rodríguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M (1987) Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr Nephrol* 1:465–472. <https://doi.org/10.1007/BF00849255>
7. Konrad M, Hou J, Weber S, et al (2008) CLDN16 Genotype Predicts Renal Decline in Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 19:171–181. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007060709>
8. Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al (1999) Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg²⁺ Resorption. *Science* (80-) 285:103–106. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.103>
9. Konrad M, Seelow D, Pandey A V, et al (2006) Mutations in the Tight-Junction Gene Claudin 19 (CLDN19) Are Associated with Renal Magnesium Wasting , Renal Failure , and Severe Ocular Involvement. *Am J Hum Genet* 79:949–957
10. Hou J, Paul DL, Goodenough D a (2005) Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci* 118:5109–5118. <https://doi.org/10.1242/jcs.02631>
11. Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al (2008) Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 118:619–628. <https://doi.org/10.1172/JCI33970>
12. Meier W, Blumberg A, Imahorn W, et al (1979) Idiopathic hypercalciuria with bilateral macular coloboma: a new variant of oculo-renal syndrome. *Helv Paediatr Acta* 34:257–269
13. Nicholson JC, Jones CL, Powell HR, et al (1995) Familial hypomagnesaemia-hypercalciuria leading to end-stage renal failure. *Pediatr Nephrol* 9:74–76
14. Godron A, Harambat J, Boccio V, et al (2012) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: Phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with CLDN16 or CLDN19 mutations. *J Am Soc Nephrol* 7:801–809. <https://doi.org/10.2215/CJN.12841211>
15. Sikora P, Zaniew M, Haisch L, et al (2015) Retrospective cohort study of familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis due to CLDN16 mutations. *Nephrol Dial Transplant* 30:636–644. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu374>
16. Weber S, Schneider L, Peters M, et al (2001) Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 12:1872–1881
17. Claverie-Martin F, García-Nieto V, Loris Pablo C, et al (2013) Claudin-19 mutations and clinical phenotype in spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *PLoS One* 8:e53151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053151>
18. Benigno V, Canonica CS, Bettinelli A, et al (2000) Hypomagnesaemia – hypercalciuria – nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol Dial Transplant* 15:605–610
19. Yamaguti PM, Dos Santos PAC, Leal BS, et al (2015) Identification of the first large deletion in the CLDN16 gene in a patient with FHHNC and late-onset of chronic kidney disease: Case report. *BMC Nephrol* 16:1–6. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0079-4>
20. Quamme GA (1993) Magnesium homeostasis and renal magnesium handling. *Miner Electrolyte Metab* 19:218–225
21. Ariceta G (2013) Magnesium and infant health. In: Ross Watson R, Grimble G, Preedy VR, Zibadi

- S (eds) *Nutrition in Infancy*, 1st ed. Humana Press, New York, pp 417–428
22. Tang NLS, Cran YK, Hui E, Woo J (2000) Application of urine magnesium/creatinine ratio as an indicator for insufficient magnesium intake. *Clin Biochem* 33:675–678. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(00\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(00)00173-9)
 23. Viering DHHM, de Baaij JHF, Walsh SB, et al (2017) Genetic causes of hypomagnesemia, a clinical overview. *Pediatr Nephrol* 32:1123–1135. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3416-3>
 24. Curry JN, Yu ASL (2018) Magnesium Handling in the Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis* 25:236–243. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2018.01.003>
 25. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2015) Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol Rev* 95:1–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2014>
 26. Di Stefano A, Roinel N, de Rouffignac C, Wittner M (1993) Transepithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport in the cortical thick ascending limb of henle's loop of the mouse is a voltage-dependent process. *Ren Physiol Biochem* 16:157–166. <https://doi.org/10.1159/000173762>
 27. Hou J, Goodenough DA (2010) Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19:483–488. <https://doi.org/10.1038/nature13314.A>
 28. Mount DB (2014) Thick ascending limb of the loop of henle. *J Am Soc Nephrol* 9:1974–1986. <https://doi.org/10.2215/CJN.04480413>
 29. Günzel D, Fromm M (2012) Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2:1819–1852. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110045>
 30. Gong Y, Renigunta V, Himmerkus N, et al (2012) Claudin-14 regulates renal Ca⁺⁺ transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J* 31:1999–2012. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.49>
 31. Bardet C, Courson F, Wu Y, et al (2016) Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation. *J Bone Miner Res* 31:498–513. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2726>
 32. Yamaguti PM, Neves F de AR, Hotton D, et al (2017) Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. *J Med Genet* 54:26–37. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103956>
 33. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, et al (2005) Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: A lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 169:527–538. <https://doi.org/10.1083/jcb.200501154>
 34. Kriegs JO, Homann V, Kinne-Saffran E, Kinne RKH (2007) Identification and subcellular localization of paracellin-1 (claudin-16) in human salivary glands. *Histochem Cell Biol* 128:45–53. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0291-9>
 35. Stenson PD, Mort M, Ball E V., et al (2017) The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 136:665–677. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6>
 36. Prot-Bertoye C, Houillier P (2020) Claudins in renal physiology and pathology. *Genes (Basel)* 11:1–30. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1824-y>
 37. García-Castaño A, Perdomo-Ramirez A, Vall-Palomar M, et al (2020) Novel compound heterozygous mutations of CLDN16 in a patient with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Mol Genet Genomic Med* 1–10. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1475>
 38. Müller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F, et al (2003) A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet* 73:1293–1301. <https://doi.org/10.1086/380418>
 39. Jaya Kausalya P, Amasheh S, Günzel D, et al (2006) Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest* 116:878–891. <https://doi.org/10.1172/JCI26323>
 40. Vianna JGP, Simor TG, Senna P, et al (2019) Atypical presentation of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in a patient with a new claudin-16 gene mutation. *Clin Nephrol – Case Stud* 7:27–34. <https://doi.org/10.5414/CNCS109595>
 41. Kutluturk F, Temel B, Uslu B, et al (2006) An unusual patient with hypercalciuria, recurrent nephrolithiasis, hypomagnesemia and G227R mutation of paracellin-1: An unusual patient with

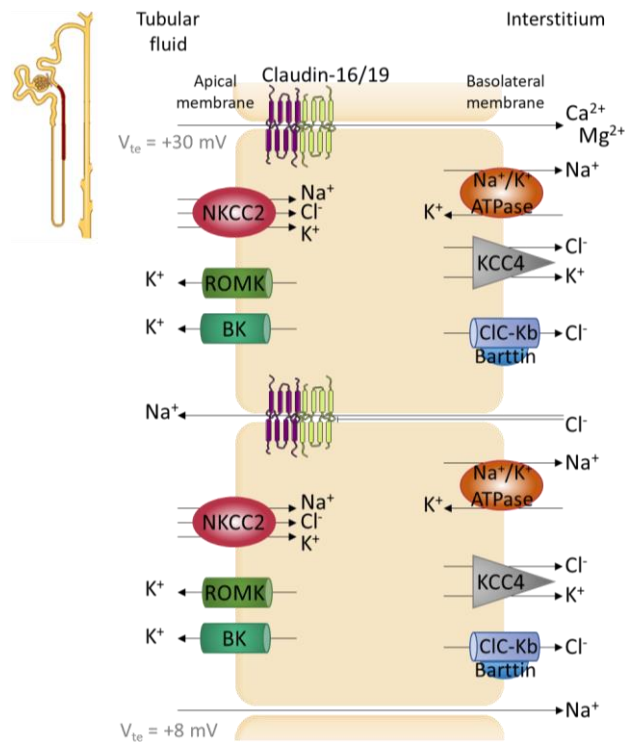
- hypercalciuria and hypomagnesemia unresponsive to thiazide diuretics. *Horm Res* 66:175–181. <https://doi.org/10.1159/000094253>
42. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, et al (2001) Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 59:2206–2215. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590062206.x>
 43. Wang S-B, Xu T, Peng S, et al (2019) Disease-associated mutations of claudin-19 disrupt retinal neurogenesis and visual function. *Commun Biol* 2:113. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0355-0>
 44. Konrad M, Schlingmann KP (2014) Inherited disorders of renal hypomagnesaemia. *Nephrol Dial Transplant* 29:iv63–iv71. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu198>
 45. Naeem M, Hussain S, Akhtar N (2011) Mutation in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) and familial hypomagnesemia, hypercalciuria, nephrocalcinosis (FHHNC) and severe ocular disease. *Am J Nephrol* 34:241–248. <https://doi.org/10.1159/000330854>
 46. Sikora P, Zajączkowska M, Raganowicz T, et al (2013) Bilateral slipped capital femoral epiphysis in a male adolescent with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC), chronic renal failure, and severe hyperparathyroidism. *Eur J Pediatr* 172:1551–1555. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-1979-6>
 47. Cimbek EA, Sen Y, Yuca SA, Peru H (2015) Chondrocalcinosis related to familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 28:713–716. <https://doi.org/10.1515/jpem-2013-0254>
 48. Rim PC, Keith MP (2011) Chondrocalcinosis and hypomagnesemia in a 26-year-old woman. *J Clin Rheumatol* 17:334–335. <https://doi.org/10.1097/rhu.0b013e31822c55df>
 49. Richette P, Ayoub G, Bardin T, et al (2005) Hypomagnesemia and chondrocalcinosis in short bowel syndrome. *J Rheumatol* 32:2434–2436
 50. Faguer S, Chauveau D, Cintas P, et al (2011) Renal, ocular, and neuromuscular involvements in patients with CLDN19 mutations. *J Am Soc Nephrol* 6:355–360. <https://doi.org/10.2215/CJN.02870310>
 51. Seeley HH, Loomba-Albrecht LA, Nagel M, et al (2012) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in three siblings having the same genetic lesion but different clinical presentations. *World J Pediatr* 8:177–180. <https://doi.org/10.1007/s12519-011-0295-3>
 52. Arteaga ME, Hunziker W, Teo ASM, et al (2015) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: variable phenotypic expression in three affected sisters from Mexican ancestry. *Ren Fail* 37:180–183. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.977141>
 53. Kuwertz-Bröking E, Frund S, Bulla M, et al (2001) Familial hypomagnesemia-hypercalciuria in 2 siblings. *Clin Nephrol* 56:155–161
 54. Deeb A, Abood SA, Simon J, et al (2013) A novel CLDN16 mutation in a large family with familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *BMC Res Notes* 6:1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-527>
 55. Loris Pablo C, Martín de Vicente C, Abio Albero S, et al (2004) Hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis y asociación con alteraciones oculares. *An Pediatría* 61:502–508. <https://doi.org/10.1157/13069183>
 56. Ariceta G, Aguirre M (2011) Tubulopatías en la infancia que progresan hacia la enfermedad renal crónica. *NefroPlus* 4:11–18. <https://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2011.Feb.10852>
 57. Claverie-Martín F, Vargas-Poussou R, Müller D, García-Nieto V (2014) Clinical utility gene card for: familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis with/without severe ocular involvement. *Eur J Hum Genet* e1–e4. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.176>
 58. Agus ZS (2016) Mechanisms and causes of hypomagnesemia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 25:301–307. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000238>
 59. Blanchard A, Bockenhauer D, Bolignano D, et al (2017) Gitelman syndrome: consensus and guidance from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 91:24–33. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.046>
 60. Madariaga L, García-Castaño A, Ariceta G, et al (2018) Variable phenotype in HNF1B mutations: Extrarenal manifestations distinguish affected individuals from the population with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Clin Kidney J* 12:373–379.

- <https://doi.org/10.1093/cjk/sfy102>
61. Rodríguez Soriano J (2002) Renal tubular acidosis: The clinical entity. *J Am Soc Nephrol* 13:2160–2170. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000023430.92674.E5>
 62. Ariceta G, Vallo A, Rodríguez-Soriano J (2004) Acidosis increases magnesuria in children with distal renal tubular acidosis. *Pediatr Nephrol* 19:1367–1370. <https://doi.org/10.1007/s00467-004-1609-7>
 63. Zimmermann B, Plank C, Konrad M, et al (2006) Hydrochlorothiazide in CLDN16 mutation. *Nephrol Dial Transplant* 21:2127–2132. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl144>
 64. Wolf MTF, Dötsch J, Konrad M, et al (2002) Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatr Nephrol* 17:602–608. <https://doi.org/10.1007/s00467-002-0884-4>
 65. McCarthy JT, Torres VE, Romero JC, et al (1982) Acute intrinsic renal failure induced by indomethacin: role of prostaglandin synthetase inhibition. *Mayo Clin Proc* 57:289–296
 66. Peco-Antić A, Konrad M, Miloševski-Lomić G, Dimitrijević N (2010) Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: The first four patients in Serbia. *Srp Arh Celok Lek* 138:351–355. <https://doi.org/10.2298/SARH1006351P>
 67. Dickson FJ, Sayer JA (2020) Nephrocalcinosis: A review of monogenic causes and insights they provide into this heterogeneous condition. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21010369>
 68. Okada K, Ishikawa N, Fujimori K, et al (2005) Abnormal development of nephrons in Claudin-16-defective Japanese Black cattle. *J Vet Med Sci* 67:171–178. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.171>
 69. Marunaka K, Fujii N, Kimura T, et al (2019) Rescue of tight junctional localization of a claudin-16 mutant D97S by antimalarial medicine primaquine in Madin-Darby canine kidney cells. *Sci Rep* 9:9647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46250-4>
 70. Müller D, Kausalya PJ, Bockenhauer D, et al (2006) Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3076–3079. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0200>

FIGURE CAPTION:

Fig. 1 Ca and Mg reabsorption in the TAL. Along the TAL, the apical Na-K-2Cl co-transporter (NKCC2) reabsorbs Na, K and Cl. Na ions are extruded to the basolateral compartment through the Na/K-ATPase, in exchange for K input, which is returned to the apical lumen through the renal outer medullary potassium (ROMK) and BK channels. In parallel, intracellular Cl reabsorbed by NKCC2 is extruded by the ClC-Kb (requiring the Barttin subunit functionality) and the K-Cl cotransporter 4 (KCC4) to the basolateral side. The differential ionic conductance between the apical and basolateral cellular membranes generates a lumen-positive V_{te} around +8 mV in the deeper medullary TAL, allowing Na paracellular reabsorption (lower part). The continuous reabsorption of Na generates a concentration gradient that induces paracellular backflow of Na through the claudin-16/19 complex. This Na secretion increases the lumen-positive V_{te} up to values of +30 mV, being the driving force for Ca and Mg paracellular reabsorption through the claudin-16/19 complex in the cortical TAL (upper part).

Figure 1.



TABLES:

Table 1 Symptoms and signs characteristics of FHHNC.

Clinical symptoms	Laboratory findings	Radiological findings	Extrarenal manifestations
Polyuria/Polydipsia	Hypomagnesemia	Medullary	Horizontal nystagmus
Feeding difficulties	Hypercalciuria	nephrocalcinosis	Myopia magna
Vomits	Hypermagnesiuria	Nephrolithiasis	Macular colobomata
Failure to thrive	Hyperuricemia	Renal cysts	Macular degeneration
Abdominal pain	Elevated serum	Bilateral slipped	Pigmentary retinitis
Enuresis	creatinine	capital femoral	Macular scar
UTI	High PTH	epiphysis	Strabismus, astigmatism
Rickets	Metabolic acidosis		Amelogenesis imperfecta
Cramps	Sterile leukocyturia		Chondrocalcinosis
Tremors	Hypocitraturia		
Gait instability			
Seizures			

UTI: Urinary tract infection; PTH: Parathyroid hormone

Table 2 Urinary and plasmatic values of Ca and Mg in FHHNC patients.

Serum Mg	Urinary Mg	Urinary Ca	Ref.
<i>M</i> : 1.1 ± 0.2 mg/dL ^a	<i>M</i> : 70 ± 17 mg/24h <u>FEMg</u> : <i>M</i> : 16.2 ± 7.1%	<i>M</i> 6.3 ± 4.6 mg/Kg/day	[1]
<i>CLDN16</i> – <i>Mdn</i> : 0.49 (0.39–0.60) mmol/L <i>CLDN19</i> – <i>Mdn</i> : 0.59 (0.50–0.60) mmol/L	-	<u>UCa/Cr</u> : <i>CLDN16</i> – <i>Mdn</i> : 0.8 (0.3–5.3) mmol/mmol [0.3 (0.1-1.9) mg/mg] <i>CLDN19</i> – <i>Mdn</i> : 1.0 (0.8-1.7) mmol/mmol [0.4 (0.3-0.6) mg/mg]	[14]
<i>Mdn</i> : 0.59 (0.29–0.96) mmol/L	<u>FEMg</u> : <i>Mdn</i> : 10.6 (6.2–26.7) %	<i>Mdn</i> : 8.9 (4.5–17.8) mg/Kg/day	[15]
<i>Mdn</i> : 0.40 mmol/L ^b	-	<i>Mdn</i> : 10.0mg/kg/day ^c	[16]
<i>Mdn</i> : 0.53 (0.45-0.62) mmol/L ^d	<i>M</i> 5.0 (3.4-6.15) mg/kg/day ^d	<i>Mdn</i> : 10.6 (3.1-16.6) mg/Kg/day ^d	[17]
<i>Mdn</i> : 0.62 (0.53-0.63) mmol/L ^d	<u>UMg/Cr</u> : 0.96 (0.8-1.2) mmol/mmol ^d [0.2 (0.18-0.26) mg/mg]	<u>UCa/Cr</u> : <i>Mdn</i> : 1.71 (1.38-2.5) mmol/mmol ^d [0.6 (0.5-0.9) mg/mg]	[18]

^a1mg/dL = 0.41152mmol/L; ^bMedian of the lowest value; ^cMedian of the highest value; ^dValues calculated from clinical data of patients described in the articles.

FEMg: Fractional excretion of Mg; UMg/Cr: Urinary Mg/Creatinine; UCa/Cr: Urinary Ca/Creatinine. *M*: Mean, expressed as mean ± standard deviation; *Mdn*: Median, expressed as median (interquartile range).

