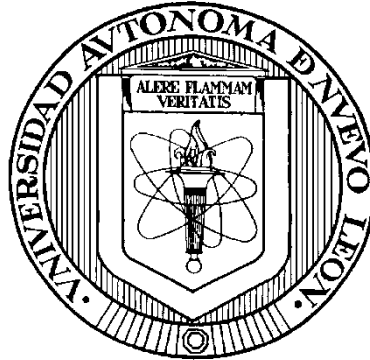


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DETECCIÓN DE PROTEÍNAS URINARIAS POR iTRAQ  
ASOCIADAS A COMPLICACIONES DEL TRASPLANTE  
RENAL Y SU MODIFICACIÓN CON LA TERAPIA**

**Por**

**MIGUEL MARIANO ESCOBEDO VILLARREAL**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de**

**DOCTOR EN MEDICINA**

**Enero 2015**

# **DETECCIÓN DE PROTEÍNAS URINARIAS POR iTRAQ ASOCIADAS A COMPLICACIONES DEL TRASPLANTE RENAL Y SU MODIFICACIÓN CON LA TERAPIA**

**Aprobación de la Tesis:**

---

**Dra. C. Paula Cordero Pérez**  
Director de Tesis

---

**Dra. PhD. Linda Elsa Muñoz Espinosa**  
Co-Director de Tesis

---

**Dr. med. Edelmiro Pérez Hernández**  
Comisión de Tesis

---

**Dr. med. Adrián Gutiérrez González**  
Comisión de Tesis

---

**Dr. med. Carlos Alberto Montero Cantú**  
Comisión de Tesis

---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Postgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres que siempre me orientaron y me apoyaron para seguir adelante en mi carrera profesional.

A la Dra. C. Paula Cordero Pérez, por haber aceptado ser la Directora de mi tesis doctoral quien a pesar de todas las actividades que realiza ha tenido la paciencia y dedicación para orientarme y ayudarme a terminarla.

A la Dra. PhD. Linda Elsa Muñoz Espinosa Co-Directora de mi tesis doctoral quien con sus valiosos comentarios y críticas me ayudaron a desarrollar la tesis doctoral.

Al Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez quien siempre me estuvo animando y apoyando con sus comentarios y críticas para terminar la tesis doctoral.

A los Doctores Dr. med. Adrián Gutiérrez González y Dr. med. Carlos Alberto Montero Cantú por sus valiosos comentarios y recomendaciones.

A la M.C. Amanda Berenice Mercado Moreira por su valiosa participación en el desarrollo de mi tesis doctoral.

A las estudiantes de Medicina Mariana Gamboa Esparza y Norma Angélica Guerrero Barrientos por su ayuda en la recolección de la información de los expedientes clínicos.

A la M.A. Marlene Marisol Perales Quintana por su apoyo en la revisión de redacción y comentarios de la tesis doctoral.

## INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Enfermedad Renal Crónica .....	1
1.1.1 Etiología de ERC en adultos: .....	2
1.1.2 Etiología de ERC en niños: .....	3
1.1.3 Clasificación de la ERC.....	3
1.2 Incidencia de enfermedades renales y perspectiva global. ....	3
1.2.1 Diabetes Mellitus (DM) y sus consecuencias. ....	4
1.2.2 Nefropatía diabética .....	5
1.2.2.1 Proteinuria .....	6
1.3 Tratamientos para la insuficiencia renal crónica.....	7
1.3.1 Terapia sustitutiva mediante procedimientos de Hemodiálisis y Diálisis peritoneal.....	7
1.3.2 Trasplante renal. ....	8
1.3.2.1 Trasplante renal en México. ....	8
1.3.2.2 Inmunosupresión post- trasplante. ....	9
1.3.2.3 Complicaciones del trasplante renal.....	11
1.3.2.4 Rechazo al injerto.....	12
1.4 Análisis proteómico. ....	13
1.4.1 Marcaje peptídico mediante isótopos isobáricos para la cuantificación relativa (iTRAQ) .....	14
1.4.2 Proteómica en enfermedades renales y trasplante renal. ....	17
1.5 JUSTIFICACIÓN .....	20
1.6 ORIGINALIDAD .....	20
1.7 Objetivo general .....	21
1.8 Objetivos específicos .....	21

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
2.1 Área física .....	22
2.2 Pacientes incluidos en el estudio. ....	22
2.2.1 Criterios de inclusión de pacientes.....	22
2.2.2 Criterios de exclusión de pacientes.....	23
2.2.3 Revisión de expedientes clínicos. ....	23
2.2.4 Seguimiento de la evolución del paciente. ....	24
2.2.4.1 Obtención de sangre periférica y de catéter central. ....	25
2.2.4.2 Obtención de suero a partir de las muestras de sangre. ....	25
2.2.4.3 Recolección y preparación de muestras de orina. ....	25
2.2.4.4 Determinación de parámetros bioquímicos en suero.....	25
2.2.5 Análisis de orina por iTRAQ.....	26
2.2.5.1 Concentración de muestras de orina.....	26
2.2.5.2 Precipitación de las proteínas.....	26
2.2.5.3 Cuantificación de proteínas .....	26
2.2.5.4 Reducción, alquilación, digestión, desalado y liofilización de proteínas. ....	27
2.2.5.5 Marcaje con el kit iTRAQ .....	27
2.2.5.6 Análisis por CL-EM.....	28
2.2.5.7 Análisis de resultados con el programa Proteome discoverer 1.3, plataforma SEQUEST. ....	29
2.3 Análisis estadístico.....	29
<b>3. RESULTADOS</b> .....	30
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	47
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	48
<b>7. APENDICE</b> .....	61
<b>8. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO</b> .....	63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Parámetros hematológicos y bioquímicos de los pacientes incluidos sin complicaciones contra pacientes con complicaciones. ....	31
Tabla 2. Parámetros bioquímicos y hematológicos del grupo GR en las 4 fases del estudio. ....	32
Tabla 3. Parámetros bioquímicos y hematológicos del grupo GI en las 4 fases del estudio. ....	33
Tabla 4. Comparación de parámetros bioquímicos y hematológicos entre fases, valores estadísticamente significativos. ....	34
Tabla 5. Proteínas en el grupo GR que cumplieron los criterios de aceptación. ....	35
Tabla 6. Proteínas en el grupo GI que cumplieron los criterios de aceptación. ....	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Componentes de un marcador de iTRAQ.....	15
Figura 2. Estrategia general de seguimiento de los pacientes.....	24



## NOMENCLATURA

2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin Gfosfato
CMV	Citomegalovirus
CL	Cromatografía de líquidos
DM	Diabetes Mellitus
EM	Espectrometría de masas
ERC	Enfermedad Renal Crónica
g	Gramos

HTA	Hipertensión arterial
IEE	Isoelectroenfoque
iTRAQ	Cuantificación relativa de proteínas con marcaje peptídico con isótopos isobáricos estables
Kb	Kilobases
L	Litros
M	Concentración molar
mA	Miliamperios
mARN	ARN mensajero
MEC	Martiz extracelular
ND	Nefropatía diabética
pb	Pares de bases
PRA	Panel de reactividad antigénica

## **RESUMEN**

**Miguel Mariano Escobedo Villarreal**

**Fecha de Graduación: 2015**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del Estudio: Detección de Proteínas Urinarias por iTRAQ asociadas a complicaciones del trasplante renal y su modificación con la terapia.**

**Número de páginas: 63**

**Candidato para el grado de Doctor en Medicina**

**Área de Estudio: Ciencias de la Salud**

**Propósito y Método del Estudio:** Determinar los perfiles de expresión de proteínas en orina en pacientes agrupados de acuerdo a las complicaciones presentadas post trasplante (TR) y detectar su variación al modificar la terapia. Fue un estudio observacional, longitudinal, analítico y retrospectivo. Se incluyeron pacientes que fueron sometidos a trasplante y estuvieron de acuerdo en participar en el protocolo. Se recolectaron muestras de orina pretrasplante y cada tercer día desde el momento del trasplante. Las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis por marcaje peptídico mediante isótopos isobáricos para la cuantificación relativa (iTRAQ). Se agrupó a los pacientes con complicaciones por infección confirmado por cultivos y rechazo agudo confirmado por biopsia. Se establecieron 4 fases de estudio: pre trasplante, post TR previo a complicación, post TR con complicación en curso y post TR complicación tratada.

**Contribuciones y Conclusiones:** De Enero de 2009 a Mayo de 2013 se incluyeron a 22 pacientes: 10 mujeres (45%) y 12 hombres (55%) con una edad promedio de  $45 \pm 15$  años. Solo 12 pacientes presentaron complicaciones en el post TR: 2 pacientes con rechazo agudo al injerto (GR) (1 hombre, 1 mujer); y 10 pacientes (6 hombres, 4 mujeres) en el grupo de infecciones (GI). Para el análisis por iTRAQ se hizo la cuantificación relativa comparando la presencia de las proteínas en las diferentes fases de estudio. Para el grupo de rechazo agudo, se encontraron 345 proteínas, de las cuales solo 15 cumplieron los criterios de aceptación de la técnica (score  $>30$ ,  $\geq 2$  péptidos identificados con el 95% de confianza). Para el grupo de infecciones se encontraron 113 de las cuales 28 cumplieron los criterios de aceptación de la técnica. Conclusiones: La albúmina fue la única proteína encontrada en ambos grupos de estudio, el resto de las proteínas 14 en el GR y 27 en GI fueron diferentes. Las 5 proteínas con mayor scores en GR fueron alfa 1 microglobulina, 5' nucleosidasa citosólica, Proteína 4 de unión a retinol, proteína de membrana 4 palmitolada y serin carboxipeptidasa mientras que en GI: acetil coenzima A sintetasa mitocondrial, adenosil homocisteinasa 2, proteína de dedo de zinc GLIS1 isoforma X1, proteína putativa de la isoforma FAM157B, proteína de dedo de zinc 615 isoforma X6. Queda por dilucidar la participación de cada una de éstas en los pacientes con trasplante renal.

Palabras clave: trasplante renal, proteínas urinarias, iTRAQ, complicaciones post trasplante renal, rechazo al injerto renal

**FIRMA DEL ASESOR:** \_\_\_\_\_

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedad Renal Crónica

Actualmente se utiliza el término de Enfermedad Renal Crónica (ERC), citado por las guías prácticas para la evaluación y manejo de la enfermedad renal crónica de KDIGO 2012, donde define a la ERC como anomalías de la estructura o función renal, presente por más de 3 meses. La ERC se define como la disminución de la tasa de filtración glomerular  $< 60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$  o como la presencia de marcadores de daño renal (particularmente albuminuria) por lo menos en 2 ocasiones durante 3 o más meses. Entonces, aparecen las complicaciones propias del síndrome urémico, y se manifiesta mediante alteraciones: digestivas, hematológicas, cardiovasculares, neurológicas y metabólicas. Si la función renal no se estabiliza, se produce una enfermedad renal terminal (Cueto et al. 2014).

En México, no existe un registro nacional de pacientes con ERC terminal. La prevalencia de ERC en la población adulta mexicana con factores de riesgo para desarrollarla varía entre el 29 y 42% y en la mayoría de los casos los pacientes no saben que la padecen. Se estima que para el 2025 habrá más de 200,000 casos de ERC terminal. El costo de la ERC es extremadamente elevado; por ejemplo en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el año 2005 el tratamiento de la ERC terminal representó el 21% del gasto total de su mayor programa (Seguro de enfermedades y Maternidad). Se calcula que si en México el acceso a diálisis fuera universal, se requeriría una inversión

de más de 33,000 millones de pesos anuales, lo que representaría cerca del 40% del presupuesto nacional que fue destinado a salud en el año 2009 (Ávila P et al 2010).

Las causas de la ERC terminal han cambiado a través del tiempo. Hoy en día a nivel mundial la principal causa de ERC es la diabetes mellitus tipo 2. En México es la causa de cerca del 60% de todos los casos incidentes de diálisis (Amato et al 2005; Cueto et al 2007).

La ERC se puede producir como complicación de enfermedades: metabólicas, hereditarias, congénitas, obstructivas y vasculares. (Martín *et al.* 1997; Mac Gregor, 1997)

En México las causas de ERC en orden de frecuencia son:

#### **1.1.1 Etiología de ERC en adultos:**

1. Nefropatía diabética. (ND)
2. Glomerulopatías.
3. Hipertensión arterial (HTA)
4. Nefropatía gotosa.
5. Enfermedad renal poliquística.
6. Nefropatía secundaria a enfermedades sistémicas
7. Infección crónica de vías urinarias

(Mac Gregor, 1997)

### **1.1.2 Etiología de ERC en niños:**

1. Las malformaciones congénitas.
2. Las glomerulopatías.
3. La enfermedad renal poliquística.

### **1.1.3 Clasificación de la ERC**

La ERC se divide en 5 categorías de acuerdo al índice de filtrado glomerular (IFG) en ml/min/1.73m<sup>2</sup>

G1. IFG >90 Nivel Normal o alto

G2. IFG 60 - 89 Daño con disminución leve del IFG

G3a IFG 45 - 59 Disminución leve a moderada del IFG

G3b IFG 30 - 44 Disminución moderada a severa del IFG

G4. IFG 30 - 44 Disminución severa del IFG

G5. IFG <15 Insuficiencia renal

## **1.2 Incidencia de enfermedades renales y perspectiva global.**

En nuestro país, la Encuesta Nacional de Salud del año 2000, reportó una frecuencia del 10.9% de enfermedad renal diagnosticada a nivel nacional, Nuevo León tuvo una frecuencia de enfermedades renales diagnosticadas del 9%. De acuerdo a los datos estadísticos se encontró como la principal causa de insuficiencia renal a la ND con un 44%, HTA en un 11%, glomerulonefritis crónica en un 6%, enfermedad renal quística en un 5% y 30% aproximadamente de causa desconocida (Olaiz G *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2007).

### **1.2.1 Diabetes Mellitus (DM) y sus consecuencias.**

En los últimos años se ha incrementado la incidencia y prevalencia de DM en forma creciente a nivel mundial. En 2004 se hizo una estimación respecto al número global de pacientes diabéticos en el mundo, calculando que puede llegar a 366 millones de personas en el año 2025, sobre todo a expensas de la DM tipo 2. Solo en EUA, la diabetes afecta a 18.2 millones de personas, lo que equivale al 6.3% de la población (Martínez, 2008). En nuestro país, la prevalencia de DM en el 2000 en adultos fue de 7% (Olaiz *et al.*, 2003). Se estima que la prevalencia de DM tipo 2 puede aumentar al doble en los próximos 15 años siendo también la causa principal de enfermedad renal terminal (Rao *et al.*, 2007).

Paralelamente a la pandemia de DM se observa un aumento de la ND como causa de enfermedad renal crónica terminal. Desde hace algunos años se ha venido hablando de que un 15% de pacientes con DM tipo 1 y entre 20 y 40% de pacientes con DM tipo 2 presentaran afectación renal a lo largo de la evolución de la enfermedad diabética, lo que marcará la evolución hacia la ND establecida (Martínez, 2008).



### 1.2.2 Nefropatía diabética

La Nefropatía diabética (ND) se caracteriza en el paciente diabético por la aparición de proteinuria persistente ( $>0.5$  g/día) en ausencia de otras causas de enfermedad renal, que se acompaña generalmente de hipertensión arterial y de otras complicaciones microvasculares asociadas a la DM (Jain *et al.*, 2005). El paso de macromoléculas y en particular proteínas a los túbulos y al mesangio como consecuencia de alteraciones en la permeabilidad glomerular, constituye un factor determinante en el desarrollo de esclerosis renal. La presencia de proteínas en la orina es útil para establecer el diagnóstico y la fase de progresión de la enfermedad.

Durante la evolución natural de la ND hacia la IRC permanente (IRCP) existen una serie de fases; en el caso de la DM tipo 1 abarca un periodo que oscila entre 25 a 30 años desde el momento del diagnóstico. Se puede establecer una división cronológica de cuatro fases, cada una de ellas con una duración aproximada de 10 años. Primera fase (precoz): corresponde al momento del diagnóstico de la diabetes, donde ya se han producido una serie de cambios tanto funcionales como estructurales. Estos hallazgos suelen asociarse con un defectuoso control glicémico junto a otras alteraciones metabólicas. La duración de este periodo oscila entre 7 y 13 años durante los cuales se desarrollan las alteraciones estructurales glomerulares. Del 30 al 40% de los pacientes evolucionan a fases más avanzadas. Segunda fase: presencia de microalbuminuria (MA). Corresponde a la segunda década de la enfermedad y puede durar desde 7 hasta 20 años después del diagnóstico de DM. Se caracteriza por la aparición de MA que oscila entre 20 a 200 mg/min., lo que

corresponde a un valor entre 30 y 300 mg/día. Tercera fase (proteinuria): Esta constituye la ND propiamente dicha, la proteinuria supera los 0.5 g/día y produce un descenso progresivo de la tasa de filtración glomerular. Cuarta fase (insuficiencia renal establecida): se produce después de más de 30 años de diagnóstico de DM.

La presencia de proteinuria junto a un deterioro cada vez más severo de la función renal dan lugar a hallazgos clínicos y analíticos característicos: uremia, HTA, hiperuricemia, anemia, etc. Todo ello contribuye a un importante aumento de la morbilidad de estos pacientes, con una mayor prevalencia de amputaciones, ceguera e infarto de miocardio en el grupo de pacientes diabéticos que inician tratamiento renal sustitutivo (Macía *et al.*, 2001).

La ND constituye una de las causas más frecuentes de entrada a los programas de diálisis. Una vez que la depuración de creatinina desciende por debajo de 15 mL/min., la HTA es difícilmente controlable y consecuentemente se presenta retinopatía y la función renal se deteriora con rapidez (De Francisco *et al.*, 2001).

### **1.2.2.1 Proteinuria**

La presencia de abundante matriz extracelular (MEC) alrededor de los capilares glomerulares y la membrana basal de la capsula de Bowman provee una barrera física para el paso de proteínas de alto peso molecular a través del glomérulo. El daño alrededor de la MEC del glomérulo da como resultado la liberación de proteínas hacia los túbulos y la aparición de proteínas séricas en

la orina. Del mismo modo, una perturbación de las células epiteliales de los túbulos proximales puede causar una reabsorción ineficiente de proteínas urinarias que conducen a la pérdida de proteínas en la orina. Esta condición es clínicamente referida como proteinuria y es indicador de daño glomerular o tubular a los riñones (Kumar *et al.*, 2002; Vojtova *et al.*, 2007). Es sabido que bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas, se pueden producir cambios en la abundancia de proteínas como resultado de alteraciones en la transcripción o estabilidad del ARN mensajero (mARN), e incluso como resultado de la regulación directa de la traducción o regulación de proteínas (Knepper, 2002).

### **1.3 Tratamientos para la insuficiencia renal crónica.**

Los tratamientos para los pacientes con IRCP son la hemodiálisis, la diálisis peritoneal y el trasplante renal (Lorenzo *et al.*, 2002).

#### **1.3.1 Terapia sustitutiva mediante procedimientos de Hemodiálisis y Diálisis peritoneal.**

Cuando el paciente no logra conservar un adecuado control ácido-base, excretar productos tóxicos del organismo, mantener el equilibrio de sodio y líquidos corporales, se debe iniciar el tratamiento dialítico. Ambos procedimientos están encaminados a ajustar la concentración de solutos en sangre, eliminar las sustancias tóxicas y a remover el exceso de líquidos del organismo.

### **1.3.2 Trasplante renal.**

El trasplante renal se define como la transferencia de este órgano, de un individuo a otro y que se integra al organismo (Mendoza y col., 2002)

Constituye la mejor alternativa de tratamiento para el paciente urémico crónico, le ofrece mejores posibilidades de rehabilitación y calidad de vida. Sin embargo, no a todos los pacientes se les puede realizar el trasplante renal, ya que deben someterse a una evaluación rigurosa, sin olvidar que pueden existir problemas de índole inmunológico, infeccioso y de carácter social. Actualmente no se cuenta con una adecuada disponibilidad de órganos, debido a la insuficiencia de donadores. El trasplante renal es el tratamiento de elección de la insuficiencia renal crónica terminal. En comparación con la diálisis crónica, mejora la calidad de vida y disminuye la mortalidad de la mayoría de los pacientes (Soulillou, 2001; Li *et al.*, 2001).

#### **1.3.2.1 Trasplante renal en México.**

Hasta el tercer trimestre de año 2013, en México se contó con 612 programas en 426 hospitales autorizados para la procuración y/o trasplante de órganos y tejidos distribuidos en instituciones públicas y privadas, siendo los programas de trasplante renal y cornea los más relevantes en número, con 224 y 247 respectivamente, significando 77% del total de los programas. Desde que se inició el programa de trasplante renal en 1963 hasta el tercer trimestre de 2013, en nuestro país se han realizado 36,259 trasplantes de riñón, de los cuales 28,279 el 78% corresponde a trasplantes de donador vivo, 22% de donador cadavérico. ([www.cenatra.gob.mx](http://www.cenatra.gob.mx)).

En el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), al 30 de mayo de 2014 se han realizado 312 trasplantes de riñón; opuesto a lo que sucede a nivel nacional, en su mayoría han sido de donador cadavérico 78% (242 trasplantes) mientras que de donador vivo relacionado han sido minoría con un 22% (70 trasplantes) (Archivos Coordinación de Trasplantes del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González UANL).

### **1.3.2.2 Inmunosupresión post- trasplante.**

Para evitar el rechazo se ha desarrollado una terapia inmunosupresora que bloquea en forma efectiva la respuesta inmune. Si la inmunosupresión es excesiva, se provocan efectos indeseables como, por ejemplo, la aparición de infecciones oportunistas y tumores (Morris *et al.*, 1987; Morris, 1988; Najarian *et al.*, 1983, Lorenzo et al, 2002).

Existen diferentes esquemas terapéuticos, donde se combinan dos o más drogas en bajas dosis que suprimen alguna de las fases de la respuesta inmunológica; estas combinaciones ofrecen menor riesgo de sobre-inmunosupresión. Desde 1950 y hasta los inicios de la década de los ochenta, las drogas más utilizadas en combinación eran la azatioprina y los esteroides. Este esquema se denominó Terapia Convencional (Oppenheimer, 1998, Carpenter *et al.*, 1991). La aparición de la ciclosporina en 1980 marcó una nueva etapa en el trasplante renal ya que mejoró dramáticamente la sobrevida del injerto y disminuyó en forma considerable los episodios de rechazo agudo y las complicaciones relacionadas con el uso de dosis altas de esteroides, por lo que la ciclosporina se asoció a la Terapia Convencional (AHSF, 2001).

Actualmente existen otras drogas inmunosupresoras como los anticuerpos mono y policlonales derivados de caballo o conejo, los anticuerpos monoclonales humanizados y químicos (Daclizumab y Basiliximab), el FK-506 (tacrolimus), el micofenolato de mofetilo, y la rapamicina entre otros. Estos medicamentos forman parte de un arsenal terapéutico que se utiliza en combinación con dosis bajas de esteroides (Terry *et al.*, 1998; Hug *et al.*, 1998).

La selección del esquema ideal dependerá de la edad del paciente, del número de trasplantes recibidos y del porcentaje aloantígenos o panel de reactividad antigénica (PRA). Las nuevas tendencias en inmunosupresión intentan minimizar la respuesta autoinmune y aumentar la tolerancia al injerto. Por otra parte, aumentar la sobrevida del injerto con una menor incidencia de complicaciones secundarias de la sobre inmunosupresión, mejorando así la calidad de vida del paciente trasplantado. Una de las opciones para reducir el número de episodios y la severidad de los rechazos agudos en los primeros 6 meses de haberse realizado el trasplante, consiste en la inmunosupresión profiláctica con agentes biológicos. A este abordaje se le ha llamado terapia de inducción (Giudice *et al.*, 2000; EBPGRT, 2000). Es posible que esta modalidad terapéutica, que aumenta el grado de supresión inmunológica, tenga el inconveniente de producir mayor número de complicaciones (EBPGRT, 2000). Actualmente en nuestra institución el abordaje de inmunosupresión a los pacientes que serán sometidos a trasplante renal se basa en la terapia de inducción con Basiliximab o timoglobulina

### **1.3.2.3 Complicaciones del trasplante renal**

El trasplante renal es un procedimiento quirúrgico electivo o semielectivo en pacientes que han sido evaluados cuidadosamente.

Las complicaciones del trasplante renal pueden ser quirúrgicas y no quirúrgicas.

La disfunción del injerto podría reflejar un rechazo agudo o una pérdida anormal de la orina; la fiebre y el edema del injerto podrían indicar una infección de la herida o un rechazo.

Los problemas post trasplante presentan un amplio diagnóstico diferencial que deben incluir las complicaciones técnicas de la cirugía, así como las causas inmunológicas, infecciosas y otras.

En el algoritmo fundamental del manejo de las complicaciones post trasplante, se requiere que se descarten primero causas vasculares que alteren la perfusión sanguínea del injerto y urológicas, antes de concluir que la disfunción del injerto sea por una causa médica como rechazo o toxicidad de inmunosupresores.

La ecografía doppler tiene un valor importante en la diferenciación de las complicaciones médicas y quirúrgicas.

La primera semana post operatoria se caracteriza por la mejoría progresiva del paciente en su estado general junto a la estabilización de la función renal.

La diuresis es un indicador útil de la función del injerto renal, pero puede ser engañosa en pacientes que han tenido diuresis residual de sus riñones nativos antes del trasplante. Se aceptan ligeras fluctuaciones en el volumen urinario, pero un descenso de más del 50% o el inicio súbito de oliguria o anuria deben ser investigados inmediatamente.

El tratamiento del receptor de un trasplante renal durante la primera semana está determinado en gran parte por la calidad de la función del injerto. Los pacientes muestran típicamente uno de los siguientes tres patrones de función: a) función excelente, b) función lenta, c) función retrasada.

Cualquier riñón recién trasplantado que no funciona bien, puede considerarse que sufre función retrasada del injerto (FRI). Su frecuencia puede ser tan baja como el 10% y tan alta como 50% en algunos programas.

El diagnóstico diferencial de la FRI incluye: necrosis tubular aguda, contracción del volumen intravascular, oclusión arterial, trombosis venosa, obstrucción ureteral, escape de orina, rechazo hiperagudo, nefrotoxicidad, síndrome urémico hemolítico.

#### **1.3.2.4 Rechazo al injerto.**

El rechazo agudo continua siendo la principal causa de fracaso en el trasplante renal de donador cadavérico ocasionando pérdida del injerto en el primer año post-trasplante con una incidencia de 15 a 25% y una sobre vida a 10 años del 50% (Reichelt *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 2002). Se produce por la agresión del sistema inmunológico del receptor frente a los antígenos extraños del injerto. Este es lesionado por factores celulares, humorales y otros no totalmente conocidos. Se caracteriza por una alternación brusca de la función del injerto, con otros cambios histológicos específicos.

La función renal es monitoreada post-trasplante comúnmente con el seguimiento de las variaciones de las concentraciones de creatinina en suero, sin embargo, este es un indicador poco sensible ya que está influenciado por



cambios en la masa muscular y la secreción tubular (Lamiere *et al.*, 2005; Hewitt *et al.*, 2004; Oetting *et al.*, 2006; Essawy *et al.*, 2006). Actualmente el diagnóstico de rechazo agudo solo puede confirmarse a través de la biopsia renal, la cual es un método costoso, invasivo y acarrea el riesgo de complicaciones tales como dolor, hematuria, hematomas, fístulas arteriovenosas, sepsis y shock. Además no puede detectar cambios tempranamente porque la función renal no siempre correlaciona con las alteraciones histológicas. Un error de muestreo es otro problema conocido (Li *et al.*, 2001; Reichelt *et al.*, 2006).

El estudio histológico debe hacerse de acuerdo a la clasificación de Banff. Dicha clasificación es un esquema internacional desarrollado para establecer los parámetros patológicos a considerarse durante la interpretación de una biopsia renal para confirmar o descartar un rechazo agudo. Clásicamente se ha clasificado en: vascular o celular, en un intento de correlacionar los aspectos patogénicos (inmunidad celular o humoral) y morfológicos (afectación túbulo intersticial o vascular) (Racusen *et al.*, 1999). En años recientes ha incrementado el interés en la exploración del proteoma urinario humano, particularmente para el establecimiento de mapas que ayuden en el descubrimiento de biomarcadores auxiliares en el diagnóstico de diversos padecimientos, entre los que se encuentran las enfermedades renales (Khan *et al.*, 2006; O'riordan *et al.*, 2004).

#### **1.4 Análisis proteómico.**

El proteoma es una colección dinámica de proteínas que demuestran variaciones significativas entre individuos, entre los tipos celulares, y en un

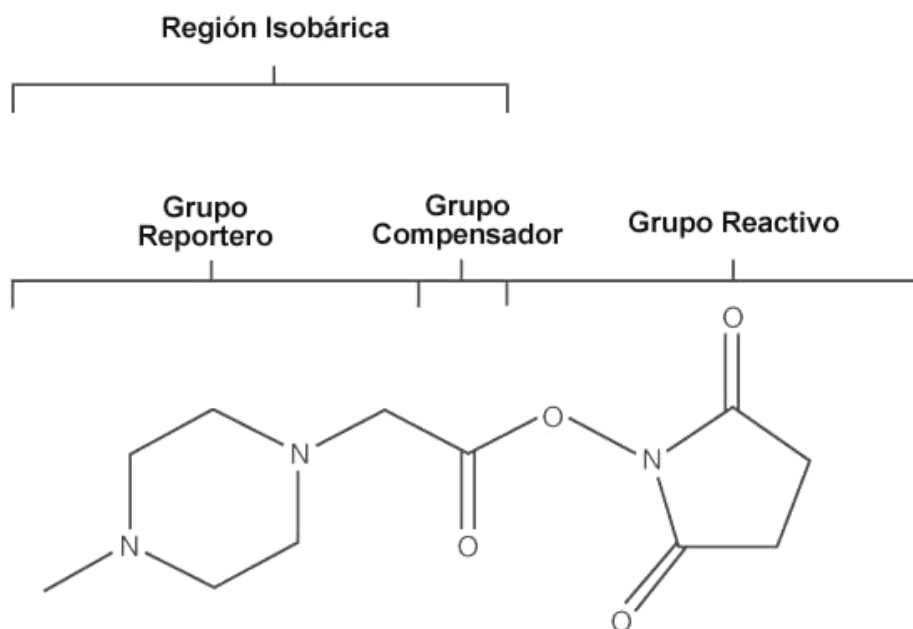
mismo individuo bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. La proteómica es el conjunto de herramientas implicadas en el análisis del proteoma (Clarke, 2006).

Se puede decir que hubo tres factores decisivos para el desarrollo de la proteómica: La secuenciación de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas, el desarrollo de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y pépticos y los avances realizados en la separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en doble dimensión (2D-PAGE) con la introducción de los gradientes de pH inmovilizados (IPG's)(Gil, 2003; O'Farrel, 1974). La proteómica ha sido aplicada ampliamente en la búsqueda de marcadores para el diagnóstico y pronóstico de diversas patologías (Sritippayawan et al 2007), entre las que se incluyen las cardiovasculares, aparato reproductor femenino y masculino, enfermedades hepáticas y renales, peritonitis relacionada a diálisis entre otras (O'riordan *et al.*, 2004; Kurian *et al.*, 2005; Vivanco *et al.*, 2003; Wei-Tung L 2008 Raaijmakers R, 2008)

#### **1.4.1 Marcaje peptídico mediante isótopos isobáricos para la cuantificación relativa (iTRAQ)**

Se han desarrollado actualmente otras alternativas cuantitativas con gran potencial, como el marcaje isobárico o iTRAQ (Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification) que está jugando un papel determinante en lo que se conoce como proteómica de expresión diferencial cuantitativa, en el contexto de la proteómica de segunda generación. Se han desarrollado ocho formas

isotópicamente diferentes de los reactivos iTRAQ (Pierce 2008), pero en sus orígenes, salió al mercado con sólo cuatro de las mismas (Ross 2004).



**Figura 1. Componentes de un marcador de iTRAQ.**

El reactivo iTRAQ es un marcador isobárico que presenta un grupo reportero, un grupo reactivo y una porción compensadora (figura 1). El grupo reportero presenta una relación  $m/z$  que va desde 113,1 a 121,1 en la versión de ocho reactivos y de 114,1 a 117,1 en la de cuatro. Así, el grupo compensador compensa la diferencia que presentan entre sí los diferentes marcadores, por lo que su masa va de 184 a 192 Da en la versión de ocho reactivos y de 28 a 31 Da en la de cuatro. De esta manera, la masa de la región isobárica de todos los reactivos se mantiene constante, siendo de 305 Da en la versión de ocho reactivos y de 145 en la de cuatro. El grupo reactivo es derivado de la N-hidroxisuccimida y reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina y el extremo N-terminal de todos los péptidos. Durante la fragmentación de los

péptidos marcados, los grupos reporteros derivados de la N-metilpiperacina se liberan de los mismos y pueden ser detectados en el espectro de MS/MS como picos con una relación  $m/z$  de 113,1; 114,1; 115,1; 116,1; 117,1; 118,1; 119,1 y 121,1 en la versión de ocho reactivos o de 114,1 a 117,1 en la de cuatro, usándose los en la cuantificación relativa de la concentración peptídica. El grupo compensador ecualiza las masas de los distintos reactivos, de manera que la masa total de cada reactivo sea la misma. De esta manera, dado que la suma de los pesos moleculares de las tres partes de cada reactivo es constante, un péptido marcado es detectado como un pico único en el espectro MS, pero, como cada grupo reportero difiere en su peso molecular, los fragmentos originados tras la ruptura de cada marcador se observan como picos distintos en el espectro de MS/MS. Así, la concentración relativa de los péptidos se obtiene por comparación de las intensidades de las señales MS/MS de estos grupos reporteros. En el protocolo estandarizado para el marcaje de iTRAQ, las proteínas son primero digeridas con tripsina a sus péptidos resultantes y luego se marcan con los distintos reactivos iTRAQ. Todas las muestras marcadas se combinan, luego se fraccionan por ejemplo por cromatografía de intercambio catiónico y las fracciones resultantes se analizan por LC-MS/MS. El espectro de MS/MS se usa tanto en la identificación como en la cuantificación, porque al mismo tiempo que las señales procedentes de los grupos reporteros son usados para calcular la concentración relativa de los péptidos en las muestras, el resto de fragmentos originados, procedentes de la cadena principal de cada péptido, se usan en la identificación de los mismos.

Los reactivos de iTRAQ suponen un avance en los métodos de marcaje al permitir el análisis simultáneo de hasta ocho muestras en la versión actual de los mismos. Los reactivos de iTRAQ se incorporan a todos los péptidos presentes en la muestra, lo que incrementa la confianza de las identificaciones proteicas realizadas al alcanzarse con ellos un mayor porcentaje de cobertura de las secuencias polipeptídicas de las proteínas identificadas. Sin embargo, como el iTRAQ no reduce la complejidad de la muestra, tal como ocurre en el ICAT, el fraccionamiento de la misma es de gran importancia. La dificultad de los experimentos iTRAQ, como los del ICAT, radica en el manejo, depósito y análisis de las grandes cantidades de datos generadas. Se han realizado distintas revisiones sobre las aplicaciones de esta técnica (Zieske 2006, Gan 2007).

#### **1.4.2 Proteómica en enfermedades renales y trasplante renal.**

El diagnóstico no invasivo de enfermedades renales y la evaluación del pronóstico todavía son problemas clínicos en nefrología. La definición de marcadores biológicos sobre la base del análisis del proteoma, especialmente de la orina, ha avanzado recientemente y puede proporcionar nuevas herramientas para resolver esos problemas. Diversos estudios destacan más prometedores enfoques tecnológicos para descifrar el proteoma humano y las aplicaciones de los conocimientos clínicos en nefrología, con énfasis en el proteoma urinario. Estos estudios indican que, aunque una investigación a fondo de todo el proteoma urinario está muy lejos de cumplirse a corto tiempo, las aplicaciones clínicas ya están disponibles (Voshol et al, 2005). El progreso en el análisis del proteoma humano en la

salud y la enfermedad dependerá más en la normalización de los datos y la disponibilidad de adecuadas de software de bioinformática que en los nuevos avances tecnológicos. Se prevé que la proteómica desempeñará un papel importante en la clínica de nefrología en el muy corto plazo y que este progreso exigirá un diálogo interactivo y la colaboración entre especialistas clínicos y analíticos (Fliser et al, 2007; Pisitkun et al, 2006; Cutillas P, 2004; Thongboonkerd et al, 2005; Hoorn et al. 2005; Janech 2007).

Los criterios propuestos para un biomarcador ideal detectados en fluidos como la orina o la sangre son: facilidad de medición, estabilidad en la matriz; sensibilidad, poder ser detectados en el curso agudo de la enfermedad, incluso antes de observar alteración en otros parámetros bioquímicas; especificidad, tener la capacidad de presentarse diferencialmente en patologías semejantes y habilidad predicativa, es decir, que sea útil para detectar la progresión o regresión del padecimiento en observación (Vidal *et al.*, 2005).

En 2004, Shaub y cols. realizaron un estudio utilizando la metodología de ionización realizada por la superficie mediante desorción con láser (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization – Time of Flight-Mass Spectrometry; SELDI-TOF-MS) en el que incluyeron personas sanas, pacientes con trasplante de evolución estable, con rechazo agudo, con necrosis tubular aguda y con glomerulopatía recurrente o de novo. Encontraron picos característicos de proteínas urinarias en los espectros de masas en el grupo de pacientes con rechazo agudo. Posteriormente, Shaub y cols. en 2005 publicaron otro trabajo en el que realizan la detección de las proteínas con SELDI-TOF en un grupo de pacientes con rechazo agudo comparando con el grupo de personas sanas y realizaron la identificación de la proteína utilizando MALDI-TOF. Encontraron la

$\beta$  2- microglobulina en el grupo de los pacientes trasplantados con rechazo al injerto renal reportándola como potencial marcador de rechazo agudo. Por otro lado Reichelt y cols. encontraron 2 proteínas características en un grupo de pacientes con rechazo al injerto renal, una de 25.71 kDa y otra de 28.13 kDa, utilizando SELDI- TOF (Reichelt et al., 2006). Con esta misma metodología O'riordan y cols. reportaron la presencia de siete proteínas específicas (2, 2.8, 4.8, 5.9, 7, 19 y 25.7 kDa) en la orina de un grupo de pacientes que presentaron rechazo al injerto renal con rechazo confirmado por histología de acuerdo a la clasificación de Banff (O'riordan *et al.*, 2004). Jain y cols. utilizando la electroforesis bidimensional en conjunto con la identificación con MALDI-TOF y análisis de western blot, encontraron que la zinc alfa-2 glicoproteína, alfa-1 microglobulina, alfa-1 glicoproteína ácida e inmunoglobulina G estaban presentes en los pacientes con ND con microalbuminuria, y ausentes en pacientes sin microalbuminuria, (Jain et al.,2005). Por otro lado se ha descrito a través del análisis proteómico que la Fetuina –A puede ser un biomarcador predictivo del daño estructural renal (Zhou et al, 2006).

## **1.5 JUSTIFICACIÓN**

El monitoreo de los pacientes que han sido trasplantados es importante, ya que tiene la finalidad de identificar tempranamente cualquier tipo de complicación para, de ser necesario, modificar la terapia a la que está sometido el paciente, valorar la respuesta a esta terapia inicial o modificarla para prevenir la pérdida del injerto o alguna complicación más grave que ponga en riesgo la vida del paciente con trasplante renal, esto idealmente, mediante el uso de pruebas no invasivas.

La proteómica es una herramienta que permite establecer los perfiles de expresión de proteínas característicos en diferentes condiciones fisiopatológicas, por lo que se plantea utilizar esta herramienta en el monitoreo de la evolución del paciente con trasplante renal. Esto nos permitiría solo someter al proceso invasivo de la biopsia a aquellos pacientes que presenten un perfil de proteínas en orina indicativo de alguna complicación para evaluar el grado de daño del órgano trasplantado.

## **1.6 ORIGINALIDAD**

Se considera que el proyecto es importante y relevante ya que actualmente se ha descrito la presencia de una serie de proteínas asociadas a diversas complicaciones postrasplante como rechazo al injerto, complicaciones quirúrgicas e infecciosas, pero se desconoce la manera en que se modifican estas proteínas con la terapia específica para cada una de ellas. Este estudio es el primero en nuestro país que describe que proteínas se encuentran alteradas en los pacientes con trasplante renal que hacen rechazo al injerto o presentan complicaciones infecciosas y quirúrgicas.



## **1.7 OBJETIVO GENERAL**

Detectar proteínas urinarias asociados a complicaciones del trasplante renal y valorar su modificación con la terapia específica.

## **1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.8.1** Valoración clínica y bioquímica de los pacientes sometidos a trasplante renal durante el periodo de estudio.
- 1.8.2** Establecer a través de los parámetros clínicos y bioquímicos convencionales la presencia de complicaciones en pacientes sometidos a trasplante renal.
- 1.8.3** Evaluar en las fases pretrasplante, previo a complicación, complicación y post tratamiento los parámetros bioquímicos.
- 1.8.4** Realizar la cuantificación relativa de las proteínas a través de la técnica iTRAQ de las diferentes fases en los grupos de estudio.
- 1.8.5** Correlacionar los hallazgos en el patrón de proteínas con los marcadores bioquímicos en las diferentes fases de seguimiento en los grupos de estudio.

## **CAPITULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Área física**

El proyecto se desarrolló en la Coordinación de Trasplantes, Unidad Renal y Unidad de Hígado y Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL y en la Unidad de Proteómica de la Universidad Autónoma de México.

#### **2.2 Pacientes incluidos en el estudio.**

En este estudio se incluyeron pacientes que acudieron a la consulta de nefrología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González y fueron sometidos a trasplante renal durante el período de Enero 2009 a Mayo 2013 a los cuales se les invitó a participar y cumplieron con los criterios de inclusión de éste protocolo de investigación.

##### **2.2.1 Criterios de inclusión de pacientes.**

- Ser mayores de 18 años.
- Carta de consentimiento informado firmado por el paciente y un testigo
- Grupo de pacientes con trasplante renal de evolución estable, parámetros bioquímicos normales y sin recurrencia de nefropatía de base.
- Grupo de pacientes con trasplante renal con rechazo agudo, detectado por elevación de creatinina y confirmado por biopsia.

### **2.2.2 Criterios de exclusión de pacientes.**

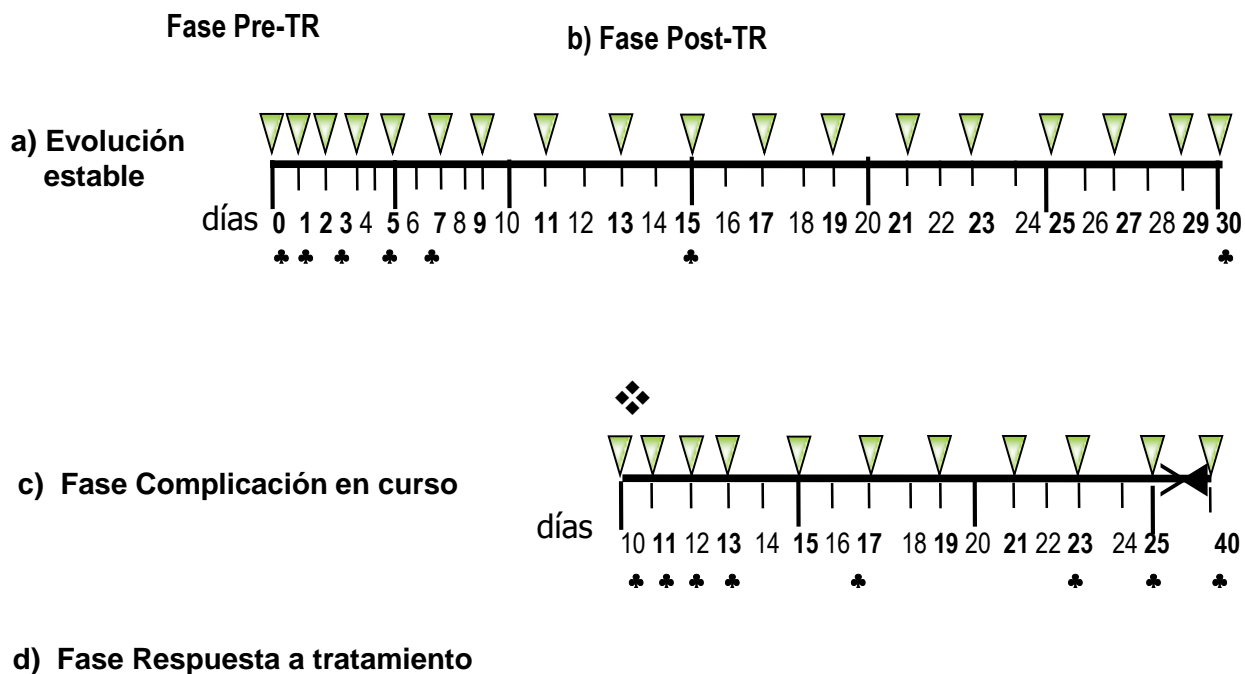
- Menores de 18 años.
- No cumplan con alguno de los criterios de inclusión.
- No estén de acuerdo en colaborar en el protocolo.

### **2.2.3 Revisión de expedientes clínicos.**

Se elaboró una base de datos en la que se incluyeron parámetros demográficos, clínicos, bioquímicos e histológicos de los pacientes; dentro de los cuales se encuentra: edad, sexo, grupo sanguíneo, etiología de la nefropatía, tiempo de evolución de la enfermedad, transfusiones sanguíneas pretrasplante, tipo de tratamiento sustitutivo, resultado de pruebas cruzadas, diuresis, hemoglobina, leucocitos, albúmina, colesterol, Glicéridos, Glucosa, BUN, creatinina sérica, ácido úrico, cloro, sodio, potasio, calcio, fósforo y magnesio, fármacos y dosis de inducción de inmunosupresión pretrasplante, condiciones de procuración, transfusiones durante trasplante, complicaciones generales, terapia inmunosupresora, biopsias, datos histológicos y tipo de rechazo, además de información del donador como edad, sexo, grupo sanguíneo y marcador serológico para citomegalovirus (CMV).

## 2.2.4 Seguimiento de la evolución del paciente.

El seguimiento de los pacientes se hará en base al siguiente esquema:



- ▼ Toma de muestra de orina para análisis de proteínas por iTRAQ
- ♣ Toma de muestras de sangre coagulada, con EDTA y con heparina para hematología y perfil Bioquímico
- ❖ Diagnóstico de Complicación

**Figura 2. Estrategia general de seguimiento de los pacientes.**

A los pacientes trasplantados que aceptaron participar en este protocolo de investigación, se les realizó un seguimiento con tomas de sangre pretrasplante y a las 24, 48, 72 horas; 7, 15 y 30 días post trasplante (post TR). También se recolectaron las muestras de orina pretrasplante y cada tercer día hasta un mes post TR.

Adicional a estas tomas, en los pacientes que presentaron alguna complicación se les realizó la recolección de muestras de sangre y orina previa a la biopsia.

#### **2.2.4.1 Obtención de sangre periférica y de catéter central.**

Se utilizaron las técnicas convencionales de extracción.

#### **2.2.4.2 Obtención de suero a partir de las muestras de sangre.**

Se utilizó la técnica convencional de obtención de suero a partir de sangre coagulada y se almacenará en 3 alícuotas de 1 mL a -20°C hasta su uso.

#### **2.2.4.3 *Recolección y preparación de muestras de orina.***

Se utilizó la técnica convencional de obtención de orina de una micción y se tomará de la bolsa de la sonda y se almacenará en 6 alícuotas de 4 mL a -70°C hasta su uso.

#### **2.2.4.4 Determinación de parámetros bioquímicos en suero.**

Las pruebas serológicas se realizaron en el equipo Vitros DT60 II Chemistry System (modulo central y módulo DTSC II, Johnson & Johnson Co., el cual es un sistema semiautomático de química seca.

Para realizar la determinación de hemoglobina se realizó la biometría hemática utilizando las muestras de sangre colectadas en los tubos con EDTA. Se utilizó el equipo Cell Dyn 1700, Abbott.

### **2.2.5 Análisis de orina por iTRAQ.**

Las muestras de orina fueron analizadas en pul de acuerdo al grupo en que fueron catalogados los pacientes, tomando de cada uno de ellos 2 mL y se hicieron alícuotas de 4 mL de cada grupo y fase de estudio para su posterior concentración, precipitación, marcaje y análisis.

#### **2.2.5.1 Concentración de muestras de orina**

Se utilizó una alícuota de 4 mL de orina y se colocó en un filtro Ultracel centricon 10kDa, Millipore; se centrifugó en una centrífuga refrigerada a 9500 rpm a 20°C hasta alcanzar un volumen de 200µL. Se añadieron 1µL de coctel de inhibidor de proteasas Amresco y se homogenizó la muestra.

#### **2.2.5.2 Precipitación de las proteínas.**

Se agregaron 2.4 mL de Acetona enfriada a -20°C y se dejaron precipitar a -20°C durante 12 a 16 horas. Se centrifugaron las muestras a 3500 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200µL de agua milliQ.

#### **2.2.5.3 Cuantificación de proteínas**

Se preparó una curva de calibración con estándares de 10, 20, 30, 40 y 50 µg de albúmina bovina. Se utilizó un kit de cuantificación de proteínas Bio-Rad basado en la determinación de bradford.

#### **2.2.5.4 Reducción, alquilación, digestión, desalado y liofilización de proteínas.**

Los puentes disulfuro de las proteínas se redujeron con DTT 10 mM durante 30 min a 56°C. Posteriormente, la muestra se incubó con iodoacetamida 50 mM durante 30 min a temperatura ambiente bajo protección de la luz para permitir la alquilación de las cisteínas. Finalmente, se adicionó tripsina Promega (Fitchburg, WI, USA) en una proporción 1:50 (enzima: sustrato). La digestión enzimática se incubó durante 18h a 37°C. Finalmente las muestras se desalaron utilizando cartuchos Sepack vac C18 (Waters) y se liofilizaron utilizando un Speed vac Savan-ThermoFisher (San Jose, CA, USA).

#### **2.2.5.5 Marcaje con el kit iTRAQ**

Los viales de reactivos con los marcadores isobáricos 114, 115, 116 y 117 se dejaron a temperatura ambiente, se resuspendió el reactivo con el vortex, se agregaron 70 µL de etanol a cada reactivo del kit y se vortexeo nuevamente durante 1 minuto. Se agregó un marcador isobárico a cada fase de estudio, la fase pretrasplante se marcó con el reactivo 114, la post TR previo a complicación 115, post TR con complicación en curso 116 y post TR con complicación ya tratada 117. Se colocó en vortex para mezclar las muestras con los reactivos y se dejaron una hora a temperatura ambiente para incubación. Finalmente se mezclan todas las muestras (Inserto de reactivos iTRAQ, Applied Biosystems).

### 2.2.5.6 Análisis por Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas (CL-EM)

El sistema CL-EM constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San José, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permite determinaciones con exactitudes mejores que 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1%) en 120 minutos sobre una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75µm ID × 50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema CL fue de 400 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2<sup>+</sup> y 3<sup>+</sup> fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1<sup>+</sup>, superiores a 4<sup>+</sup> y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones segundo las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (*m/z*), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 segundos.



#### **2.2.5.7 Análisis de resultados con el programa Proteome discoverer 1.3, plataforma SEQUEST.**

Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos de humano a través del programa Proteome Discoverer 1.3, como plataforma SEQUEST. Se colocan los parámetros restrictivos, como tolerancia de error para los iones precursores y los iones hijos; y las modificaciones como; carbamidometilcisteína, marcaje por iTRAQ en el extremo terminal y en lisinas (constantes), oxidación en metioninas (variables).

### **2.3 Análisis estadístico**

Los resultados bioquímicos y hematológicos fueron promediados  $\pm$  su desviación estándar (SD), y serán analizados con las pruebas de ANOVA de un factor. Para ello se utilizaron los programas estadísticos SPSS versión 16.0. Se considerará estadísticamente significativo si el valor de  $P < 0.05$ .

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

En el periodo de estudio 48 pacientes fueron trasplantados de riñón con donación de cadáver, de los cuales, 22 cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron participar en el protocolo previo consentimiento informado.

Se incluyeron 10 mujeres (45.5%) y 12 hombres (54.5%) con una edad promedio de  $45\pm 15$  años. De los 22 pacientes incluidos, 12 (54.5%) presentaron complicaciones en la etapa post trasplante renal con un promedio de edad de  $53\pm 17$  años; 10 (45.5%) de ellos del tipo infeccioso con una edad promedio de  $43\pm 17$  años y 2 (9%) con rechazo agudo y una edad de 63 años en ambos casos (Tabla 1).

La etiología de la enfermedad renal de los pacientes con rechazo agudo fue nefropatía diabética en ambos casos (100%); mientras que en el grupo con infección 2 (20%) fueron de etiología desconocida, 2(20%) glomerulonefritis membranosa, 2(20%) glomeruloesclerosis, 2 (20%) nefropatía diabética, 1 (10%) nefropatía lúpica severa y 1(10%) glomerulolitiasis.

**Tabla 1. Parámetros hematológicos y bioquímicos de los pacientes incluidos sin complicaciones contra pacientes con complicaciones.**

Parámetros	Pacientes en seguimiento N=22	Pacientes sin complicaciones n=10	Pacientes con complicaciones n=12	P
Hemoglobina (g/dL)	9.2 ± 1.5	9.1 ± 1.8	9.2 ± 1.4	0.580
Leucocitos (K/uL)	8.6 ± 3.5	7.8 ± 4.2	10.3 ± 5.5	0.743
Glucosa (mg/dL)	109.6 ± 55	95.4 ± 44	130.5 ± 61.6	0.146
BUN (mg/dL)	26.6 ± 19.2	22.8 ± 5.9	27.0 ± 10.5	0.567
Creatinina (mg/dL)	2.1 ± 2.8	1.4 ± 0.5	2.0 ± 1.2	0.385
Cloro (mmol/L)	107.1 ± 5.9	109.9 ± 2.2	107.7 ± 7.4	0.005
Sodio (mmol/L)	138.2 ± 3.3	139.9 ± 2.1	136.7 ± 3.5	0.127
Potasio (mmol/L)	4.05 ± 0.7	3.8 ± 0.5	4.5 ± 0.6	0.693
Calcio (mg/dL)	8.2 ± 0.6	8.3 ± 0.5	8.4 ± 0.7	0.177
Fosforo (mg/dL)	2.5 ± 2.5	2.1 ± 0.5	2.8 ± 1.6	0.914
Magnesio (mg/dL)	2.11 ± 0.39	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.5	0.045

Valor de p significativo <0.05, comparación del grupo con complicaciones vs grupo sin complicaciones.

Los pacientes trasplantados con infecciones se subdividieron en infección (GI) e infección con complicación quirúrgica (GICQ). Se identificaron 4 pacientes con infección por *Escherichia coli* (*E coli*), *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis* (*E faecalis*) y *Staphylococcus aureus* (*S aureus*) uno respectivamente; mientras que en el grupo de complicaciones quirúrgicas con infecciones fueron 6 pacientes, donde se presentó un caso de pseudoaneurisma de la arteria con

infección por *S aureus*, uno con infección en herida con *E faecalis*, uno con fístula arteriovenosa con infección por *Staphylococcus sp*, uno con fibrosis de ureteros con *E faecalis*, uno con fístula urinaria con infección don *P aeruginosa* y un caso de fístula urinaria con *E coli*.

Los resultados de los parámetros bioquímicos y hematológicos de cada grupo de complicaciones en las diferentes fases del estudio se muestran en la tabla 2 para el grupo GR y tabla 2 para el grupo GI.

**Tabla 2. Parámetros bioquímicos y hematológicos del grupo GR en las 4 fases del estudio.**

	F1	F2	F3	F4
Hemoglobina (g/dL)	11.9	9.9	9.8	10.8
Leucocitos (K/uL)	9	4.2	4.2	7.8
Glucosa (mg/dL)	239	97	111	513
BUN (mg/dL)	30.3	45.8	46.9	43.1
Creatinina (mg/dL)	1.8	5.2	4.8	3.1
Cloro (mmol/L)	109	106	110	109
Sodio (mmol/L)	141	132	137	136
Potasio (mmol/L)	5.7	4.3	4.3	2.5
Calcio (mg/dL)	8.4	7.6	8.3	7.7
Fosforo (mg/dL)	2.3	5.2	6.8	4.0
Magnesio (mg/dL)	1.9	2.8	2.8	2.1

*F1: Fase pre Trasplante renal (TR); F2: Fase post TR previo a complicación; F3: Fase post TR complicación en curso; F4: Fase post TR complicación tratada.*

*En el caso del grupo GR solo se muestran los promedios de los valores ya que al tratarse solo de 2 valores no se pudo obtener la desviación estándar.*

**Tabla 3. Parámetros bioquímicos y hematológicos del grupo GI en las 4 fases del estudio.**

	F1	F2	F3	F4
Hemoglobina (g/dL)	9.0 ± 1.4	8.6 ± 1.1	9.1 ± 1.4	9.6 ± 1.7
Leucocitos (K/uL)	10.6 ± 5.4	9.2 ± 4.2	11.0 ± 5.3	10.8 ± 7.7
Glucosa (mg/dL)	184 ± 101	121 ± 41	32 ± 64	115 ± 74
BUN (mg/dL)	50.6 ± 28	29.5 ± 12.8	25.1 ± 8.6	24.5 ± 9.8
Creatinina (mg/dL)	5.5 ± 2.9	2.6 ± 1.7	1.7 ± 0.8	1.6 ± 1.0
Cloro (mmol/L)	105 ± 4.5	109 ± 7.1	107.4 ± 7.8	106.2 ± 6.7
Sodio (mmol/L)	138.1 ± 5.5	140.0 ± 3.8	136.7 ± 3.7	137.6 ± 2.9
Potasio (mmol/L)	4.6 ± 0.6	4.2 ± 0.7	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.5
Calcio (mg/dL)	7.8 ± 0.8	8.0 ± 0.7	8.4 ± 0.7	8.4 ± 0.6
Fosforo (mg/dL)	5.3 ± 2.6	3.1 ± 1.2	2.3 ± 0.8	2.1 ± 0.6
Magnesio (mg/dL)	2.1 ± 0.6	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.4

*F1: Fase pre Trasplante renal (TR); F2: Fase post TR previo a complicación; F3: Fase post TR complicación en curso; F4: Fase post TR complicación tratada.*

Se realizó la comparación de los parámetros bioquímicos y hematológicos entre las fases para el grupo de GI. Los valores estadísticamente significativos fueron glucosa al comparar la F1 vs F2, BUN entre F1 vs F3 y F1 vs F4, creatinina en F1 vs F3, F1 vs F4, F2 vs F3 y el magnesio en F1 vs F2 (tabla 4).

**Tabla 4. Comparación de parámetros bioquímicos y hematológicos entre fases, valores estadísticamente significativos.**

Parámetro	Fases F vs F*	Media ± DE F	Media ± DE F*	Valor p
Glucosa (mg/dL)	1 vs 2	184 ± 101	121 ± 41	0.009
BUN (mg/dL)	1 vs 3	50.6 ± 28	25.1 ± 8.6	0.018
	1 vs 4	50.6 ± 28	24.5 ± 9.8	0.049
Creatinina (mg/dL)	1 vs 3	5.5 ± 2.9	1.7 ± 0.8	0.004
	1 vs 4	5.5 ± 2.9	1.6 ± 1.0	0.013
	2 vs 3	2.6 ± 1.7	1.7 ± 0.8	0.020
Magnesio (mg/dL)	1 vs 2	2.1 ± 0.6	1.9 ± 0.3	0.050

*F1: Fase pre Trasplante renal (TR); F2: Fase post TR previo a complicación; F3: Fase post TR complicación en curso; F4: Fase post TR complicación tratada.*

Con la aplicación de las técnicas de iTRAQ con CL-EM, en el grupo GR se encontraron 345 proteínas, de las cuales 15 cumplieron con los criterios de inclusión de la técnica (score > a 30, dos o más péptidos identificados con el 95% de confianza), de los cuales todos correspondieron a péptidos humanos (tabla 5).

Se consideraron significativas las diferencias con 2 veces la abundancia de las proteínas entre las fases de estudio.

**Tabla 5. Proteínas en el grupo GR que cumplieron los criterios de aceptación.**

No.	Proteína	F2/F1 F1/F2*	F3/F2 F2/F3*	F4/F3 F3/F4*	F4/F2 F2/F4*	F4/F1 F1/F4*
1	Albúmina	0.469 2.1*	2.2 0.456*	0.039 25.6*	0.070 14.3*	0.039 25.6*
2	Alfa 1-microglobulina	-	2.443 0.409*	0.062 16.26*	0.067 15.01*	0.044 22.52*
3	5 nucleotidasa citosólica	0.360 2.78*	2.34 0.428*	0.035 28.26*	0.045 22.44*	0.038 26.1*
4	Proteína de unión a retinol 4	0.404 2.48*	2.77 0.36*	0.049 20.49*	0.049 20.56*	0.035 28.73*
5	Proteína de membrana palmitolada 4	-	2.1 0.48*	0.026 38.22*	0.054 18.66*	0.041 24.57*
6	Serin carboxipeptidasa vitelogénica	0.35 2.79*	2.36 0.42*	0.033 30.17*	0.091 10.99*	0.033 20.17*
7	Proteína de ensamblaje en ribosomas	0.36 2.20*	2.36 0.42*	0.04 24.85*	0.02 53.98*	0.039 25.77*
8	Subunidad pequeña de molibdopterina sintasa	0.36 2.78*	2.35 0.43*	0.095 10.50*	0.17 5.86*	0.07 15.15*
9	Inhibidor de serin peptidasa	0.46 2.17*	2.02 0.49*	0.02 60.48*	0.03 31.79*	0.015 64.68*
10	Serin/treonin quinasa 2	0.43 2.32*	2.24 0.45*	0.046 21.68*	0.091 11.00*	0.036 27.43*
11	N-acetil galactosamin transferasa 10	0.43 2.33*	3.08 0.32*	NR	NR	NR
12	Policistina 1	0.46 2.19*	3.08 0.325*	NR	NR	NR
13	Alfa 1 glucoproteína ácida (orosomucoide)	0.42 2.36*	2.40 0.417*	NR	NR	NR
14	Proteína hipotética LOC91750	0.52 1.92*	2.36 0.423*	NR	NR	NR
15	Proteína activadora de GTPasa	0.443 2.26*	2.67 0.38*	0.056 17.89*	0.17 6.05*	0.07 14.77*

F1: Fase pre Trasplante renal (TR); F2: Fase post TR previo a complicación; F3: Fase post TR complicación en curso; F4: Fase post TR complicación tratada; NR: No realizado; Valores en rojo: > 5 veces elevado; (-) No significativo.

En el grupo de GI se encontraron 113 proteínas, de las cuales 28 cumplieron con los criterios de inclusión de la técnica (Tabla 6).

Tabla 6. Proteínas en el grupo GI que cumplieron los criterios de aceptación.

No.	Proteínas	F2/F1 F1/F2*	F3/F2 F2/F3*	F4/F3 F3/F4*	F3/F1 F1/F3*	F4/F2 F2/F4*	F4/F1 F1/F4*
1	Albúmina	0.04 23.50*	14.77 0.07*	-	0.370 2.70*	8.67 0.12*	0.21 4.68*
2	Producto protéico sin nombre	0.04 19.35*	7.19 0.14*	-	0.281 3.56*	11.16 0.09*	0.43 2.32*
3	Acetil coenzima A sintetasa	0.05 19.35*	5.89 0.17*	-	0.281 3.55*	3.92 0.26*	0.19 5.24*
4	Adenosil homocisteinasa 2	0.10 10.00*	4.24 0.24*	-	0.380 2.64*	2.97 0.34*	0.26 3.85*
5	Proteína de dedo de zinc GLIS1	0.09 11.06*	-	-	0.397 2.52*	3.20 0.31*	0.24 4.26*
6	Proteína FAM157B	0.16 6.43*	2.16 0.46*	0.380 2.63*	0.394 2.54*	NR	0.16 6.14*
7	Proteína de dedo de zinc 615	0.02 44.08*	12.23 0.08*	-	0.25 3.97*	12.68 0.08*	0.24 4.16*
8	DNA metiltransferasa 1	0.03 30.01*	9.16 0.11*	-	0.26 3.79*	4.00 0.25*	0.14 7.05*
9	Proteína armadillo repetidora 5	NR	NR	-	-	NR	0.33 3.02*
10	Proteína de dedo de zinc 629	0.04 27.91*	9.98 0.10*	-	0.36 2.79*	5.40 0.18*	0.18 5.46*
11	AT hook, DNA binding motif, containing 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	0.07 13.28*	4.71 0.21*	-	0.33 3.04*	3.64 0.27*	0.24 4.14*



12	Producto protéico sin nombre	0.06 15.80*	6.95 0.14*	-	0.29 3.40*	6.62 0.15*	0.30 3.33*
13	Inmunoglobulina lamda	0.04 26.38*	9.93 0.10*	-	0.39 2.56*	7.60 0.13*	0.25 4.02*
14	Producto protéico sin nombre	0.02 56.77*	19.83 0.05*	0.48 2.09*	0.38 2.89*	9.88 0.10*	0.16 6.34*
15	Proteína ecotrópica de integración viral 5	0.06 16.37*	4.84 0.21*	-	0.29 3.43*	5.44 0.18*	0.32 3.11*
16	Proteína de progresión del ciclo celular 1	NR	NR	-	0.36 2.81*	NR	0.28 5.31*
17	Atropina 1	0.06 18.15*	7.20 0.14*	0.46 2.18*	0.42 2.36*	6.33 0.16*	0.26 3.92*
18	Proteína de dedos de zinc 568	NR	32.64 0.03*	-	0.26 3.79*	37.02 0.03*	0.28 3.53*
19	Protocaderina 1	0.04 26.83*	16.37 0.06*	-	0.43 2.31*	14.16 0.07*	0.31 3.24*
20	Proteína activadora de GTPasa 1	0.12 8.42*	11.04 0.09*	-	-	10.52 0.09*	-
21	Proteína del gen 19 de la esclerosis lateral amiotrófica	0.02 40.10*	18.38 0.05*	-	0.43 2.31*	11.69 0.09*	0.36 2.8*
22	Beta 2-microglobulina	0.01 91.65*	25.7 0.04*	-	0.28 3.57*	20.4 0.05*	0.22 4.49*
23	Proteína quinasa KIF13A	0.02 51.2*	54.72 0.02*	0.39 2.54*	0.38 2.64*	13.07 0.08*	0.35 2.88*
24	Protocaderina 1	0.04 26.83*	16.37 0.06*	-	0.43 2.31*	14.16 0.07*	0.31 3.24*
25	Proteína activadora de GTPasa 1	0.12 8.42*	11.04 0.09*	-	-	10.52 0.09*	-
26	Proteína del gen 19 de la esclerosis lateral amiotrófica	0.02 40.10*	18.38 0.05*	-	0.43 2.31*	11.69 0.09*	0.36 2.8*
27	Beta 2-microglobulina	0.01 91.65*	25.7 0.04*	-	0.28 3.57*	20.4 0.05*	0.22 4.49*

28	Proteína quinasa KIF13A	0.02 51.2*	54.72 0.02*	0.39 2.54*	0.38 2.64*	13.07 0.08*	0.35 2.88*
----	-------------------------	---------------	----------------	---------------	---------------	----------------	---------------

*F1: Fase pre Trasplante renal (TR); F2: Fase post TR previo a complicación; F3: Fase post TR complicación en curso; F4: Fase post TR complicación tratada; NR: No realizado; Valores en rojo: > 5 veces elevado; (-) No significativo.*

De las 15 proteínas encontradas para el grupo GR, se encontró que el inhibidor de serin peptidasa, la proteína de membrana palmitolada, serin carboxipeptidasa vitelogénica, 5 nucleotidasa citosólica y la subunidad pequeña de molibdoterina sintasa fueron las proteínas que presentaron los mayores cocientes entre las fases post TR con complicación en curso (F3) vs la fase post TR post tratamiento de la complicación (F4); mientras que para este mismo grupo las proteínas con mayor valor de score fueron la alfa 1 microglobulina, 5 nucleotidasa citosólica, proteína de unión a retinol 4, proteína de membrana palmitolada 4 y la serin carboxipeptidasa vitelogénica.

En el grupo de GI de las 28 proteínas, las que presentaron mayor cociente fueron la proteína de procesamiento de RNA 12; Glipicano 4, proteína de dedo de zinc 568, proteína quinasa KIF3A y protocaderina 1 al comparar la fase post TR previo a la complicación (F2) vs fase post TR complicación en curso (F3); y las de mayor score fueron acetil coenzima A sintasa, adenosil homocisteinasa 2, Proteína FAM157B, proteína de dedo de zinc 615 y la DNA metil transferasa1.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

A nivel mundial la principal causa de ERC es la diabetes mellitus tipo 2. En México es la causa de cerca del 60% de todos los casos incidentes de diálisis (Amato et al 2005; Cueto et al 2007) y ésta se puede producir como complicación de enfermedades: metabólicas, hereditarias, congénitas, obstructivas y vasculares (Martín *et al.* 1997; Mac Gregor 1997). Los tratamientos para los pacientes con IRC son la hemodiálisis, la diálisis peritoneal y el trasplante renal (Lorenzo *et al.*, 2002).

El trasplante renal es la mejor opción disponible para el tratamiento de la enfermedad renal crónica avanzada, tanto en términos de supervivencia como de calidad de vida de los pacientes. La escasez de órganos disponibles para el procedimiento es la mayor limitación de este tipo de terapéutica y por tanto prolongar la vida útil de los injertos renales es la principal prioridad en el contexto del trasplante renal. Éste en comparación con la diálisis crónica, mejora la calidad de vida y disminuye la mortalidad de la mayoría de los pacientes (Souillou, 2001; Li *et al.*, 2001).

El análisis mediante biopsia protocolizada del injerto con buena función es el método de elección para calcular y predecir el riesgo de pérdida del injerto y también aporta indicios sobre el posible mecanismo patogénico de la disfunción del injerto (DI) y por lo tanto guía la terapia inmunosupresora a seguir (Cosio, 2005-99). Sin embargo diversos mecanismos etiológicos como la toxicidad por anti-calceinurínicos, el rechazo celular y humoral, y las infecciones generan una lesión tisular inicial, temporal, que tiene como morfología final y común: la

presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular (Mengel, 2007). Por lo que actualmente se están generando nuevos abordajes diagnósticos no invasivos que permitan detectar y seguir la evolución de la DI y sus diferentes subtipos histológicos, para optimizar la información que aporta la histología actualmente y para contar con una herramienta no invasiva que en el futuro sustituya a la punción-biopsia del injerto renal.

Algunas de las estrategias estudiadas son la caracterización de anticuerpos en suero (Terasaki, 2007), la determinación de marcadores individuales en sangre periférica y orina (Hu, 2004) y la evaluación de la inmunidad celular periférica (Augustine 2005). Incluso se utilizaron abordajes genómicos y proteómicos para intentar establecer nuevos marcadores de tolerancia inmunológica en el trasplante renal (Brouard, 2007).

La proteómica se define como una colección dinámica de proteínas que demuestran variaciones significativas entre individuos, entre los tipos celulares, y en un mismo individuo bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. Existen tres factores decisivos para el desarrollo de esta técnica: La secuenciación de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas, el desarrollo de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos y los avances realizados en la separación de proteínas (Gil, 2003). La proteómica ha sido aplicada ampliamente en la búsqueda de marcadores para el diagnóstico y pronóstico de diversas patologías (Sritippayawan et al 2007), entre las que se incluyen las cardiovasculares, enfermedades hepáticas y renales, peritonitis relacionada a diálisis entre otras (O'riordan *et al.*, 2004; Kurian *et al.*, 2005; Vivanco *et al.*, 2003; Wei-Tung L 2008, Raaijmakers R, 2008). Actualmente se han desarrollado otras

alternativas cuantitativas con gran potencial, como el iTRAQ que está jugando un papel determinante en lo que se conoce como proteómica de expresión diferencial cuantitativa. Se prevé que la proteómica desempeñará un papel importante en la clínica de nefrología en el muy corto plazo y que este progreso exigirá un diálogo interactivo y la colaboración entre especialistas clínicos y analíticos (Fliser et al, 2007; Pisitkun et al, 2006; Cutillas P, 2004; Thongboonkerd et al, 2005; Hoorn et al. 2005; Janech 2007).

En el presente trabajo se describe la presencia de una serie de proteínas asociadas a diversas complicaciones postrasplante como rechazo al injerto, complicaciones quirúrgicas e infecciosas, ya que se desconoce la manera en que se modifican estas proteínas con la terapia específica para cada una de ellas. Este estudio es el primero en nuestro país que describe que proteínas se encuentran alteradas en los pacientes con trasplante renal que hacen rechazo al injerto o presentan complicaciones infecciosas y quirúrgicas.

Con la aplicación de las técnicas de iTRAQ con CL-EM, en el grupo GR se encontraron 345 proteínas, de las cuales 15 cumplieron con los criterios de inclusión de la técnica (score > a 30, dos o más péptidos identificados con el 95% de confianza), de los cuales todos correspondieron a péptidos humanos (tabla 4), mientras que en el grupo de GI se encontraron 113 proteínas, de las cuales 28 cumplieron con los criterios de inclusión de la técnica (Tabla 5).

De las 15 proteínas encontradas para el grupo GR, las 5 proteínas que presentaron los mayores cocientes entre las fases post TR con complicación en curso (F3) vs la fase post TR post tratamiento de la complicación (F4) fueron: el inhibidor de serin peptidasa que se activa en respuesta a estrés celular y durante el daño por isquemia-reperfusión renal (Faccio et al, 2000; Gray et al,

2000), también se ha descrito que es un antagonista natural de la granzima B que causa un daño al injerto renal por apoptosis de las células tubulares y se expresa en altos niveles en linfocitos T citotóxicos (CTL) reportándose que los niveles del inhibidor se correlacionan con la gravedad del rechazo, así como predecir la función posterior del injerto renal (Muthukumar, 2003; Rowshani 2004); la proteína de membrana palmitolada la cual es una proteína integral de membrana con actividad de guanilato quinasa, lo que le permite interactuar con el citoesqueleto y regular la proliferación celular y la transducción de señales (Ruff et al, 1991); la serin carboxipeptidasa vitelogénica (CPVL) es una proteasa de función desconocida que se caracteriza en primer lugar en los macrófagos humanos que se limita en gran medida a la estirpe monocítica, aunque también puede ser expresada por células fuera del sistema inmune (Harris et al, 2006); la 5'-nucleotidasa citosólica que está implicada en diversas funciones, como la comunicación célula-célula, la reparación de ácido nucleico, síntesis de nucleótidos, transducción de señales y transporte de membrana (Hunsucker SA, 2005) y por último la subunidad pequeña de molibdoterina sintasa que en los seres humanos, las deficiencias genéticas de esta enzima implicada en la biosíntesis de cofactor de molibdeno desencadena una enfermedad autosómica recesiva y generalmente fatal con síntomas neurológicos graves en su mayoría (Hänzelmann P, 2002; Ichida K, 2006). Estas cinco fueron las proteínas que presentaron los mayores cocientes entre las fases F3 vs F4 indicando que cuando se presenta la complicación de rechazo estas proteínas son las que más se expresan y posteriormente se suprime su expresión con la modificación de la terapia inmunosupresora y aunque se han descrito su participación en diversos procesos estas pudieran

ser potenciales biomarcadores de respuesta a los diversos tipos de inmunosupresión.

Por otro lado para este mismo grupo de pacientes las cinco proteínas con mayor valor de score fueron: alfa 1 microglobulina, es una lipocalina con propiedades inmunosupresivas (Åkerstro et al., 2000), la cual elimina radicales libres y oxidantes especialmente hemo de los tejidos (Olsson, 2012) y esta proteína es una de las más estudiadas como potencial biomarcador no invasivo para la detección temprana de anomalías renales y en la diferenciación de patologías nefrológicas y urológicas (Penders et al., 2004; Bazzi et al., 2001); la 5 nucleotidasa citosólica cuya inhibición farmacológica aumenta las concentraciones de AMP y mejora la función renal en ratas sometidas a procesos de isquemia y reperfusión (Lu, 2008); la proteína 4 de unión a retinol que se ha encontrado elevada en pacientes con daño túbulo intersticial (Hosaka 2003), y secretada por los adipocitos, se ha reportado aumentada en los estados resistentes a la insulina (Graham TE et al., 2006); la proteína de membrana 4 palmitolada que se ha visto sobre expresada en tejido renal sometido a procesos de isquemia reperfusión (Teruya, 2013) y la serin carboxipeptidasa vitelogénica que se expresa abundantemente en corazón y riñones (Harris 2006). Estos 5 biomarcadores se han reportado más asociados a la función renal y como están sobre expresados en el post-trasplante cuando se presenta la complicación de rechazo en curso y no cuando está ausente este episodio en el pretrasplante renal concordando con lo reportado en la literatura.

En el grupo de GI de las 28 proteínas, las que presentaron mayor cociente entre las fases post TR previo a la complicación (F2) vs fase post TR complicación en curso (F3) fueron: la proteína de procesamiento de RNA 12; el glipicano 4 (GPC-4) de la familia de proteoglicanos de sulfato de heparán de la superficie celular que se expresa de una manera regulada por el desarrollo de un tejido específico (Karihaloo, 2004); la proteína de dedo de zinc 568 la cual se ha descrito que tiene un efecto protector en diversas condiciones de estrés como shock térmico y estrés osmótico (Görner,1998); proteína quinasa KIF3A son proteínas de la superfamilia de la kinesinas, las cuales son protagonistas en el sistema de transporte intracelular, que es esencial para la función celular y la morfología (Miki, 2005) y protocadherina 1, esta familia de proteínas se ha propuesto que juegan un papel en el desarrollo cerebral, la formación de hendidura glomerular, y también pueden actuar como supresores de tumores, aunque sus mecanismos de acción no se han dilucidado (Magg, 2005).

Para este mismo grupo con GI las proteínas de mayor score fueron: acetil coenzima A sintasa de la cual se ha descrito su importancia para mantener la temperatura corporal normal durante el ayuno y la homeostasis energética (Schwer 2006); adenosil homocisteinasa 2, Proteína FAM157B cuya función no ha sido reportada; proteína de dedo de zinc 615 que participa en la regulación de la transcripción (Ramalingam, 2011) y la DNA metil transferasa 1 que participa en la regulación de la expresión génica de acuerdo a un patrón de metilación (Qian, 2006).

La proteinuria masiva ha sido reconocida como un factor de riesgo para la pérdida del injerto a largo plazo (Pérez 1999, Yidiz 1999). Un estudio reciente indicó que la proteinuria de bajo grado fue un potente predictor independiente



de la pérdida del injerto a largo plazo (Halimi, 2005). Por otro lado la albúmina fue un biomarcador presente en las dos complicaciones evaluadas en el presente trabajo. La microalbuminuria es un marcador de pronóstico cardiovascular y renal, y se demostró que se asocia con la mortalidad total y la mortalidad no cardiovascular (Verhave 2004; Mann 2004; Adler 2003; Halimi 1995; Sarnak 2003). Del mismo modo, se ha demostrado que la microalbuminuria fue predictivo de muerte cardiovascular y tumores malignos relacionados con poblaciones no trasplantadas (Pedersen 1998; Pedersen 1999). Un tamizaje de microalbuminuria es recomendado en todos los sujetos diabéticos. La American Heart Association y el Consejo cardiovascular, los Consejos de Investigación de Presión Arterial Alta en colaboración con la Fundación Nacional del Riñón recomienda recientemente la detección de microalbuminuria en todos los sujetos con enfermedad cardiovascular para la detección de la enfermedad renal crónica (Brosius 2006). Sin embargo este biomarcador no sería útil para la diferenciación de las diversas complicaciones evaluadas, ya que en ambas estuvo presente.

Diversos biomarcadores han sido reportados en la literatura como marcadores de rechazo agudo, en 2004, Shaub y cols. reportaron a la  $\beta$  2- microglobulina como potencial marcador de rechazo agudo. Por otro lado Reichelt y cols. encontraron 2 proteínas características en un grupo de pacientes con rechazo al injerto renal, una de 25.71 kDa y otra de 28.13 kDa, utilizando SELDI- TOF (Reichelt *et al.*, 2006). Jain y cols. utilizando la electroforesis bidimensional en conjunto con la identificación con MALDI-TOF y análisis de western blot, encontraron que la zinc alfa-2 glicoproteína, alfa-1 microglobulina, alfa-1 glicoproteína ácida e inmunoglobulina G estaban presentes en los pacientes

con nefropatía diabética con microalbuminuria, y ausentes en pacientes sin microalbuminuria, (Jain *et.al.*,2005). Por otro lado se ha descrito a través del análisis proteómico que la Fetuina –A puede ser un biomarcador predictivo del daño estructural renal (Zhou et al, 2006).

Como se ha descrito en el presente trabajo diversos péptidos específicos son candidatos a biomarcadores de buen funcionamiento del injerto renal, ya que su presencia en la orina puede ser utilizada para discriminar entre pacientes trasplantados con disfunción del injerto renal y pacientes trasplantados con buena función del injerto, además de que cada una de las complicaciones evaluadas presento una serie de proteínas diferentes a excepción de la albúmina. Este trabajo enfatiza la utilidad de la proteómica urinaria para detectar biomarcadores que en combinación pueden ser utilizados para el desarrollo de un panel de marcadores urinarios que se empleen para el futuro diseño de una herramienta diagnóstica no invasiva para detectar más oportunamente la disfunción del injerto renal trasplantado. Esto favorecerá el rendimiento de la biopsia protocolizada del injerto y que incluso pueda llegar a sustituir a una prueba invasiva por un examen rápido y sin riesgo añadido para el paciente.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES**

En el análisis proteómico se encontraron 15/345 proteínas en GR vs 28/113 proteínas en GI por iTRAQ.

Las proteínas candidatas a biomarcadores de rechazo son: Alfa 1 microglobulina, 5' nucleotidasa citosólica, Proteína 4 de unión a retinol, Proteína de membrana 4 palmitolada, Serin carboxipeptidasa.

Las proteínas candidatas a biomarcadores del grupo con GI son: Acetil coenzima A sintasa mitocondrial, adenosil homocisteinasa 2, DNA metil transferasa, isoforma X1 FAM157B, proteína de dedo de zinc 615 isoforma X6.

Se encontró que las proteínas son específicas para cada complicación ya que no encontraron en las dos complicaciones, excepto la albúmina.

### **PERSPECTIVAS**

En base a las proteínas encontradas en los dos grupos de estudio, se planteará la cuantificación de cada una de ellas como posibles biomarcadores de rechazo agudo o presencia de infecciones en TR por técnicas de ELISA. Esto permitirá un abordaje clínico más oportuno para dichas complicaciones.

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

- Adler A, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003; 63: 225–232.
- AHSF. Drug Information. American Society of Health System Pharmacists. Bethesda, MD 2001; 3562 – 3577.
- Aikerstro B, Logdberg L , Bergga T, Osmark P, Lindqvist A.  $\alpha$ 1-Microglobulin: yellow-brown lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1482:172 – 184.
- Amato D, Álvarez-Aguilar C, Castañeda-Limones R, Rodríguez E, Ávila-Díaz M, Arreola F, et al. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int* 2005; 68: S11 – S17.
- Agustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005 8:1971-1975
- Ávila P, López M, Durán L. Estimación del tamaño óptimo de una unidad de hemodiálisis con base en el potencial de su infraestructura. *Salud Pública Méx* 2010; 52: 315-323.
- Bazzi C, Peglini C, Rizza V, Arrigo G, Beltrame A, Pisano L, et al. Urinary excretion of IgG and  $\alpha$ 1 –microglobulin predicts clinical course better than extent of proteinuria in membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 240 – 248.

Brosius FC, Hostetter TH, Kelepouris E, Mitsnefes MM, Moe SM, Moore MA, et al. Detection of Chronic Kidney Disease in Patients With or at Increased Risk of Cardiovascular Disease A Science Advisory From the American Heart Association Kidney and Cardiovascular Disease Council; the Councils on High Blood Pressure Research, Cardiovascular Disease in the Young, and Epidemiology and Prevention; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: Developed in Collaboration With the National Kidney Foundation. *Circulation* 2006; 114: 1083–1087.

Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L., Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 15448-15453.

Carpenter CB, Lazarus M. La diálisis y el trasplante en el tratamiento de la insuficiencia renal. 12ª Edición, Principios de Medicina Interna. Harrison, Vol II. Interamericana McGraw-Hill, México 1991; 1337 – 1352.

Clarke W. Proteomic research in renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2006; 28, 19 – 21.

Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) [www.cenatra.gob.mx](http://www.cenatra.gob.mx)

Cueto AM, Rojas E. Status of renal replacement therapy and peritoneal dialysis in Mexico. *Perit Dial Int* 2007; 27: 142 – 148.

Cueto AM, Cortés L, Martínez HR, Rojas E, Gómez B, Castillero M. Prevalence of Chronic Kidney Disease in an Adult Population. *Arch Med Res* 2014; 45: 507-513

Cutillas P, Burlingame A, Unwin R. Proteomic Strategies and Their Application in Studies of Renal Function. *News Physiol Sci* 2004; 19: 114 – 119.

Coordinación de Trasplante del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Datos no publicados).

Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant* 2005; 5: 2464-2472

De Francisco A, Fernandez G, Pinera C, Rodrigo E, Hernandez I., Ruiz J, et al. Tratamiento renal sustitutivo en el paciente diabético. ¿Quién, cuándo, cómo? *Nefrología* 2001; 3: 88 – 96.

Essawy B, Otu H, COI B, Zheng X, Libermann T, Strom T. Proteomic analysis of the allograft response. *Transplantation* 2006; 82: 267 – 274.

European best practice guidelines for renal transplantation (part 1). *Nephrol Dial Trans* 2000; 15: 52 – 85.

Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* 2000; 275: 2581 – 2588.

Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argiles A, Jankowski V, Girolami M, Jankowski J, Mischak H. Advances in Urinary Proteome Analysis and Biomarker Discovery. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1057 – 1071.

Gan CS, Chong PK, Pham TK, Wright PC. Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J Proteome Res* 2007; 6: 821-827.

Giudice P, Dubourg L, Hadj-Aissa A, Saïd MH, Claris O, Audra P, et al. Renal function of children exposed to cyclosporin in utero. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1575-1579.

- Gil C. La metodología proteómica una herramienta para la búsqueda de función. *Actualidad SEM* 2003; 35:12 – 20.
- Görner W, Durchschlag E, Martínez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, et al. *Genes & Dev.* 1998. 12: 586-597
- Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, et al. Retinol-Binding Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese, and Diabetic Subjects. *N Engl J Med* 2006; 354: 2552 – 2563.
- Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, et al. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5699 – 5710.
- Halimi JM, Ribstein J, Du Cailar G, Ennouchi JM, Mimran A. Albuminuria predicts renal functional outcome after revascularization in atheromatous renovascular disease. *J Hypertens* 1995; 13: 1335–1342.
- Halimi J-M, Laouad I, Buchler M et al. Early low-grade proteinuria: Causes, short-term evolution and long-term consequences in renal transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 2281–2288.
- Harris J, Schwinn N, Mahoney JA, Lin H, Shaw M, Howard CH, et al. A vitellogenic-like carboxypeptidase expressed by human macrophages is localized in endoplasmic reticulum and membrane ruffles *Int J Exp Pathol.* 2006; 87: 29 – 39.
- Hänzelmann P, Schwarz G, Mendel RR. Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem.* 2002; 277: 18303 – 18312.

Hewitt S, Dear J, Star R. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1677 – 1689.

Hoorn E, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer R, Wang N, et al. Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology* 2005; 10: 283 – 290.

Hosaka B, Park SI, Felipe CR, Garcia RG, Machado PG, Pereira AB, et al. Predictive value of urinary retinol binding protein for graft dysfunction after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2003 Jun;35(4):1341-1343.

Hu H, Aizentein BD, Puchalski A, Burmania JA, Hamawy MM, Knechtle SJ. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J. Transplant* 2004; 4:432-437

Hug S, Guy H. Cyclosporin nephrotoxicity. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, Second Edition, Vol III, Davison Cameron. Oxford University Press. New York 1998; 2205 – 2219.

Hunsucker SA., Mitchell BS., Spychala, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 1 – 30.

Ichida K, Aydin HI, Hosoyamada M, Kalkanoglu HS, Dursun A, Ohno I, et al. A Turkish case with molybdenum cofactor deficiency. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2006; 25: 1087 – 1091.

Inserto de reactivos iTRAQ, Applied Biosystems.

Jain S, Rajput A, Kumar Y, Uppuluri, Arvind A, Tatu U. Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorders. *JAPI* 2005; 53: 513 – 520.

Janech M, Raymond J, Arthur J. Proteomics in renal research. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 501 – 512.



- Karihaloo A, Kale S, Rosenblum N, Cantley LG. Hepatocyte Growth Factor-Mediated Renal Epithelial Branching Morphogenesis Is Regulated by Glypican-4 Expression. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24:8745-8752.
- Khan A, Packer N. Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J Proteome Res* 2006, 5: 2824 – 2838.
- Knepper M. Proteomics and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1398 – 1408.
- Kumar Y, Rao N, Uppuluri V, Babu K, Phadke, Kumar P, et al. Proteomics of renal disorders: urinary proteome analysis by two dimensional gel electrophoresis and MALDI –TOF mass spectrometry. *Current Sci India* 2002; 82: 655 – 663.
- Kurian S, Flechner, Salomon D. Genomics and proteomics in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2005; 10:191 – 197.
- Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005; 365: 17 – 430.
- Li B, Hartono Ch, Ding R, Sarna V, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *NEJM* 2001; 344: 947 – 954.
- Lorenzo Sellarés V, Torres Ramírez A, Hernández Marrero D, Ayus JC. *Manual de Nefrología, 2ª edición*; Ediciones Harcourt, Elsevier Science, España 2002.
- Lu B, Rajakumar SV, Robson SC, Lee EK, Crikis S, d'Apice AJ, et al. The impact of purinergic signaling on renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2008;86(12):1707-1712.

- Macia M, Coronel F. Nefropatía diabética: fisiopatología y curso clínico. *Nephrology* 2001; 21: 24 – 31.
- Mac Gregor G. JM. Insuficiencia Renal Crónica. *Med. Int. Mex* 1997; 3: 2 – 22.
- Magg T, Schreiner D, Solis GP, Bade EG, Werner-Hofer H. Experimental Cell Research 2005 ;307 :100-108
- Mann JF, Yi QL, Gerstein HC. Albuminuria as a predictor of cardio-vascular and renal outcomes in people with known artherosclerotic cardiovascular disease. *Kidney Int suppl* 2004; 66: S59–S62.
- Martín de Francisco AL, Rodríguez-Puyol D, Praga M. *Nefrología clínica*. Madrid: Editorial Panamericana, 1997: 528 - 545.
- Martínez A. Repercusiones clínicas y sociales de la epidemia de Diabetes Mellitus. *Nefrología* 2008; 23: 245 – 248.
- Mendoza E, Huerta B. Trasplante Renal. *Archivos de Cardiología de México* 2002; 71: 267 – 270.
- Mengel M., Gwinner W., Schwarz A., Bajeski R., Franz I., Bröcker V, et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am J Transplant* 2007 2: 356-365.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Trends in cell biology, 2005; 15: 467–476.
- Morris PJ. Cyclosporine. *Kidney Transplantation*. W.B. Saunders Company. 1988; 285 – 317.
- Morris PJ, Chapman J, Allen RD, et al. Transplantation of History. *Lancet* 1987; 6: 586 – 591.

- Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation*, 2003; 75:1565-1570
- Najarian JS, Ferguson R, Simmons RL. Injert of Disease. *Transplant* 1983; 15: 438 – 441.
- Oetting W, Rogers T, Krick T, Matas A, Ibrahim H. Urinary b2 Microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 898 – 904.
- O'Farrel P. High Resolution Two Dimensional Electrophoresis. *The J Biol Chem* 1974; 250: 4007 – 4021.
- Olaiz G, Rojas R, Aguilar C, Rauda J, Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos Mexicanos: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Pública Méx* 2007; 49: 331 – 337.
- Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, et al. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública, 2003.
- Olsson MG, Allhorn M, Bülow L, Hansson SR, Ley D, Olsson ML, Schmidtchen A, Akerström B Pathological conditions involving extracellular hemoglobin: molecular mechanisms, clinical significance, and novel therapeutic opportunities for  $\alpha(1)$ -microglobulin. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 17:813-846.
- Oppenheimer F. Inmunosupresión en el trasplante renal. *Manual de Nefrología clínica, Diálisis y Trasplante Renal*. Lorenzo Víctor Sellares. Harcourt Brace, España 1998; 874-93

- O'riordan E, Orlova T, Mei J, Butt K, Chander P, Rahman S, et al. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 12: 3240 – 3248.
- Pedersen LM, Milman N. Microalbuminuria in patients with lung cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34: 76–80.
- Pedersen LM, Sorensen PG. Clinical significance of urinary albumin excretion in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1999; 107: 889–891.
- Penders J, Delanghe JR. Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clinica Chimica Acta* 2004; 346: 107 – 118.
- Pérez Pérez M, Rodriguez-Carmona A, García García T, Valdés F. Early proteinuria in renal transplant recipients treated with cyclosporin. *Transplantation* 1999; 67: 561–568.
- Pierce A, Unwin RD, Evans CA, Griffiths S, Carney L, Zhang L, et al. Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008; 7:853-863.
- Pisitkun T, Johnstone R, Knepper M. Discovery of Urinary Biomarkers. *Molecular and Cellular Proteomics* 2006; 5: 1760 – 1771.
- Qian C, Wang X, Manzur K, Sachchidanand, Farooq A, Zeng L, et al. Structural insights of the specificity and catalysis of a viral histone H3 lysine 27 methyltransferase. *J Mol Biol*. 2006; 359:86-96.
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib M, Castro C, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713 – 723.

- Raaijmakers R, Pluk W, Schroder C, Gloerich J, Cornelissen E, Wessels H, Willems J, Monnens J, Heuvel L. Proteomic profiling and identification in peritoneal fluid of children treated by peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2402 – 2405.
- Ramalingam S, Kandavelou K, Rajenderan R, Chandrasegaran S. Creating designed zinc-finger nucleases with minimal cytotoxicity. *J Mol Biol.* 2011 Jan 21;405:630-641.
- Rao P, Lu X, Standley M, Pattee P, Girish G, Dakshinamurthy K, et al. Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2007; 30:629 – 637.
- Reichert O, Muller J, Von Eggeling F, Driesch D, Wunderlich H, Schubert J, Grone HJ, Stein G, Ott U, Junker K. Prediction of renal allograft rejection by urinary protein analysis using proteinchip arrays (Surface- Enhanced Laser Desorption/Ionization – Time of Flight-Mass Spectrometry). *Urology* 2006; 67: 472 – 475.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using aminereactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3:1154–1169
- Rowshani AT, Florquin S, Bemelman F, Kummer JA, Hack CE, Ten Berge IJ. Hyperexpression of the granzyme B inhibitor PI-9 in human renal allografts: a potential mechanism for stable renal function in patients with subclinical rejection. *Kidney Int.* 2004;66:1417-22.
- Ruff P, Speicher DW, Husain-Chishti A. Molecular identification of a major palmitoylated erythrocyte membrane protein containing the srchomology 3 motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6595 – 6599.
- Sarnak J, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular

disease a statement from the American Heart Association Councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. *Hypertension* 2003; 42: 1050–1065.

Schaub S, Wilkins J, Antonovici M, Krokhin O, Wailer T, Rush D, Nickerson P. Proteomics-Based Identification of cleaved urinary b2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant* 2006; 5: 729 – 738.

Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 ;103:10224-10229.

Soulillou JP. Immune monitoring for rejection of kidney transplants. *NEJM* 2001; 344, 13: 1006 – 1007

Sritippayawan S, Chiangjong W, Semangoen T, Aiyasanon N, Jaetanawanitch P, Sinchaikul S, et al. Proteomic Analysis of Peritoneal Dialysate Fluid in Patients with Different Types of Peritoneal Membranes. *J Proteome Res* 2007; 6: 4356 – 4362.

Subsecretaría de Innovación y Calidad. Red Estratégica de Servicios de Salud contra la Enfermedad Renal Crónica en México.

Terasaki PI, Cai J, Briley K, Catrou P, Haisch C, Rebellato L. Extremely High Association Between Appearance of HLA Antibodies and Failure of Kidney Grafts in a Five-Year Longitudinal Study. *Am J Transplant*, 2007; 7: 864-871

Teruya R, Ikejiri AT, Somaio Neto F, Chaves JC, Bertoletto PR, Taha MO, Fagundes DJ. Expression of oxidative stress and antioxidant defense genes in the kidney of inbred mice after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2013;28:848-855

- Terry BS, Manikkam S. Therapeutic approach to renal transplantation. Oxford Textbook of Clinical Nephrology, Second Edition, Vol III, Davison Cameron. Oxford University Press. New York 1998; 2147 – 2152.
- Thongboonkerd V, Malasit P. Renal and Urinary proteomics: Current applications and challenges. *Proteomics* 2005; 5: 1033 – 1042.
- Verhave JC, Gansevoort RT, Hillege HL, Bakker SJL, De Zeeuw D, De Jong PE. An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int* 2004; 66(Suppl 92): 18–21.
- Vidal B, Bonventre J, I Hong Hsu S. Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis. *Clin Sci* 2005; 109: 421 – 430.
- Vivanco F, Lopez L, Tunon J, Egido J. Proteómica y enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56: 289 – 302.
- Vojtova L, Zima T, Tesar V, Kazderova M. Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. *Folia Biologica* 2007; 53: 58 – 65.
- Voshol H, Brendlen N, Muller D, Inverardi B, Augustin A, Pally Ch, et al Evaluation of Biomarker Discovery Approaches to Detect Protein Biomarkers of Acute Renal Allograft Rejection. *J Prot Res* 2005; 4: 1192 – 1199.
- Weber M, Verwiebe R. a 1-Microglobulin (protein HC): features of a promising indicator of proximal tubular dysfunction. *Eur J Clin Chem ClinBiochem* 1992; 30: 683 – 691.
- Wei-Tung L; Chung-Chang T; Chen-Yin Ch; Wei-Jen L; Ching-Chyuan S; Yu-Jen W. Proteomic Analysis of Peritoneal Dialysate Fluid in Patients with Dialysis- Related Peritonitis. *Renal Failure* 2008; 30: 772 – 777.

Wild S, Rolic G, Green A, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047 – 1053.

Xu B, Yoshida Y, Zhang Y, Yaoita E, Osawa T, Yamamoto T. Two dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney: differential protein expression in glomerulus, cortex and medulla. *J Electrophoresis* 2005; 49: 5 – 13.

Yidiz A, Erkoc R, Sever MS et al. The prognosis importance of severity and type of proteinuria of post-transplant proteinuria. *Clin Transpl* 1999; 13: 241–244.

Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PST, Hoffert JD, Yasuda H, et al. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 2006; 70: 1847 – 1857.

Zieske, L. R. A perspective on the use of iTRAQ™ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot*, 2006; 57:1501-1508



## CAPÍTULO 7

# APENDICE

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Título del proyecto: "DETECCIÓN DE PROTEÍNAS URINARIAS ASOCIADAS AL RECHAZO AGUDO DEL TRASPLANTE RENAL Y SU MODIFICACIÓN CON LA TERAPIA INMUNOSUPRESORA"

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Los métodos disponibles para establecer el diagnóstico de algunas enfermedades renales y la detección del rechazo agudo en un órgano trasplantado (respuesta negativa del organismo hacia el órgano recibido) incluyen exámenes de laboratorio y biopsias de tejido. La biopsia es considerada como el mejor método para el diagnóstico de rechazo y retraso de la función del órgano e indispensable en el diagnóstico de algunas enfermedades renales. Sin embargo, la toma de biopsia renal es costosa y está asociada a condiciones incapacitantes y complicaciones en las cuales se incluyen dolor, sangrado al orina, moretones, daño en órganos cercanos, problemas para orina, formación de coágulos en el órgano trasplantado, infecciones, falla general del organismo y ocasionalmente muerte del paciente. Además, las biopsias también se presentan errores de muestreo y diferencias entre lo encontrado en los exámenes clínicos y lo observado en la biopsia. La búsqueda y empleo de sustancias específicas presentes en sangre y orina pueden beneficiar al paciente que ha sido trasplantado de riñón permitiendo el monitoreo mas frecuente y modificar la terapia inmunosupresora oportunamente y al paciente en el que se está estableciendo un diagnóstico de enfermedad renal iniciando una terapia adecuada antes de que la enfermedad se complique. Por ello se le hace una atenta invitación, para que done una muestra de sangre y nos proporcione una muestra de orina. Su colaboración contribuirá a que se realice la identificación de dichas sustancias específicas y tener mayor información para el seguimiento y detección de complicaciones utilizando pruebas menos agresivas.

#### Procedimiento del estudio

- **Pacientes programados para trasplante:** Se les tomará una muestra de sangre del brazo (20 mL de sangre) y se le solicitará una muestra de orina (aproximadamente 40 mL) antes del trasplante. Posterior al trasplante se volverán a realizar tomas a las 3, 6, 9, 12, horas, 1, 2, 3 días (20 mL de sangre en cada toma) 7, 15 y 30 días (20 mL de sangre y aproximadamente 40 mL de orina en cada toma). 220 mL de sangre en total y 160 mL de orina aproximadamente.
- **Pacientes trasplantados en los que se sospeche rechazo y tengan indicación de biopsia:** Se les realizará una toma de sangre del brazo y se le solicitará una muestra de orina en cuatro ocasiones: antes de la biopsia, (20 mL de sangre y 40 mL de orina aproximadamente).

Estas muestras se utilizarán para realizar la detección e identificación de proteínas que pueden funcionar como indicadores de rechazo y como estas se podrían modificar con la terapia inmunosupresora.

#### Riesgos asociados al estudio

Los riesgos asociados a esta prueba no ponen en peligro la vida del paciente. El mayor riesgo podría ser algún moretón en el sitio donde se realiza la punción para la toma de la muestra.

#### Beneficios que aportará el estudio al paciente

Mediatos: Minimizar la necesidad de la biopsia para determinar el estado del paciente, sustituyéndola por métodos no invasivos como la detección de sustancias indicadoras.

23

  
  
COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

SUBDIRECCIÓN DE  
Investigación

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además estoy en la libertad de retirarme en el momento que lo desee y si tomara esta decisión no me afectará en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario. La información obtenida de la investigación será manejada de forma confidencial y que en ningún momento se violará mi privacidad.

Además el Hospital Universitario de la U.A.N.L. estará en disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañado directamente por cualquiera de los procedimientos de este proyecto de investigación, en caso de dañarme permanentemente tendré derecho a ser indemnizado según el daño sufrido.

Responsables de la investigación:

- a) Investigador Principal
  - a. Dra. C. Paula Cordero Pérez
- b) Investigadores Asociados
  - a. Dra. Miguel Mariano Escobedo Villarreal
  - b. Dra. Concepción Sánchez

### Paciente

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_

### Testigo

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

### Investigador

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA

SUBDIRECCIÓN DE  
Investigación

## CAPÍTULO 8

# RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Miguel Mariano Escobedo Villarreal



Candidato para el Grado de  
Doctor en Medicina

**Tesis: DETECCIÓN DE PROTEÍNAS URINARIAS ASOCIADAS A  
COMPLICACIONES DEL TRASPLANTE RENAL Y SU MODIFICACIÓN CON  
LA TERAPIA**

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey N.L, el 5 de Mayo de 1950, hijo de Guillermo Escobedo Sánchez y Rosa Elia Villarreal Rodríguez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Cirujano y Partero en 1973.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1983, Jefe de Coordinación de Trasplantes del Hospital Universitario “Dr. José E. González” UANL de 2000 al 2009. Coordinador del Servicio de Trasplantes 2009 a la fecha.