

Análisis proteómico de exosomas de orina humana en la búsqueda de marcadores de nefropatía diabética

Zubiri I¹, Benito-Martin A², Calvo E³, Posada M¹, Martin-Lorenzo M¹, De la Cuesta F⁴, Lopez JA³, Barderas MG⁴, Fernandez-Fernandez B², Ramos A², Ortiz A², Vivanco F^{1,5±} Alvarez-Llamas G^{1±}

¹Departamento de Inmunología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España; ²Departamento de Nefrología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España; ³Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid; ⁴Departamento de Fisiopatología Vascular, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, España ⁵ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense, Madrid, España

[±]Misma contribución al trabajo por parte de ambos autores

izubiri@fjd.es

La nefropatía diabética (ND) es la principal causa de fallo renal. El diagnóstico se realiza cuando la proteinuria está establecida y ya ha ocurrido un daño renal irreversible. Las primeras etapas de la enfermedad son silentes siendo necesario descubrir nuevas dianas moleculares que permitan un diagnóstico temprano. Los exosomas de orina son vesículas membranosas de 40-100 nm de tamaño, liberados por células epiteliales renales. Dado que proporcionan información valiosa sobre distintos procesos que tienen lugar en el riñón, suponen una prometedora fuente de potenciales biomarcadores.

El objetivo de este estudio es analizar la composición proteica de los exosomas de orina y su importancia en el diagnóstico de la ND. Se optimizó el aislamiento de exosomas, confirmándolo después mediante microscopía electrónica y Western-blot. Dada la elevada proteinuria en las muestras de pacientes, fue necesaria una ecualización del contenido en albúmina asociado a la fracción exosomal obtenida de las orinas de paciente, ya que ésta imposibilitaba la comparación entre grupos y enmascaraba proteínas minoritarias. Se probaron distintas estrategias para la depleción de albúmina y se combinaron con los métodos de aislamiento testados para optimizar el proceso.

Se realizó un estudio semicuantitativo, libre de marcaje, por LC-MS/MS comparando el proteoma de exosomas aislados de orina de controles sanos con aquellos aislados de orina de pacientes con ND en un estadio avanzado. Se identificaron 562 proteínas, 200 de las cuales habían sido previamente descritas en exosomas de orina, 94 descritas en exosomas provenientes de otras fuentes y 268 no se habían descrito con anterioridad. En base a la frecuencia con la que se identificaron en las distintas réplicas y el número de péptidos únicos identificados en cada una de ellas, pudimos observar un sub-grupo de 5 proteínas aumentadas en los exosomas de pacientes con ND, estas variaciones están siendo validadas por diferentes técnicas.