



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**Valores de referencia de  
actividades  
aminopeptidásicas en  
microvesículas y  
exosomas urinarios de una  
población adulta sana.**

**Alumno: Noelia Risquez Chica**

**Junio, 2017**



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**Valores de referencia de  
actividades  
aminopeptidásicas en  
microvesículas y  
exosomas urinarios de una  
población adulta sana.**

**Alumno: Noelia Risquez Chica**

**Junio, 2017**

## ÍNDICE.

<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Marcadores de daño renal.....</b>	<b>5-6</b>
1.1.1. Marcadores de daño renal plasmáticos.....	6-7
1.1.2. Marcadores de daño renal urinarios.....	7-12
<b>1.2. Enzimas aminopeptidásicas como biomarcadores urinarios....</b>	<b>12-13</b>
<b>1.3. Vesículas extracelulares como fuente de biomarcadores.....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Biosíntesis de microvesículas y exosomas.....	14-16
1.3.2. Funciones de los exosomas.....	17-18
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Población analizada.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Obtención de las fracciones urinarias.....</b>	<b>19-20</b>
<b>3.3. Medición de la actividad enzimática en las distintas fracciones....</b>	<b>20</b>
3.3.1. Preparación del tampón Tris.....	20
3.3.2. Preparación de los sustratos.....	21
3.3.3. Cuantificación de actividad enzimática en las fracciones urinarias.....	21-22
<b>3.4. Medición de proteína total en las fracciones microvesicular y                 exosomal.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5. Medición de proteína total en sobrenadante de orina centrifugada a                 1000 G.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6. Medición de creatinina en orina.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7. Análisis estadísticos realizados.....</b>	<b>23</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Análisis estadístico de los datos.....</b>	<b>24-25</b>
<b>4.2. Comparación entre mujeres y hombres.....</b>	<b>25-27</b>
<b>4.3. Correlación de la actividad con la edad.....</b>	<b>27-34</b>
<b>5. Discusión.....</b>	<b>35-37</b>
<b>6. Conclusión.....</b>	<b>38</b>
<b>7. Agradecimientos.....</b>	<b>38</b>
<b>8. Referencias.....</b>	<b>38-43</b>

## **RESUMEN.**

Se sabe que la lesión renal aguda constituye un problema de salud debido a la elevada morbilidad y mortalidad que lleva asociada. En anteriores estudios se ha asociado la medición de las enzimas AlaAp, GluAp y DPP4 como marcadores de daño renal tempranos, antes de que el daño sea irreversible. Con este trabajo se quiere obtener unos valores de referencia para estas tres enzimas con los cuales poder comparar con pacientes ya diagnosticados y poder establecer así un diagnóstico precoz. También se establecerán diferencias entre hombres y mujeres, ya que el valor de la enzima puede variar con el sexo y así poder ser más precisos. También es interesante ver como esta actividad varía con la edad, ya que como otros tantos parámetros analizados en un laboratorio, no son iguales en jóvenes que en ancianos.

## **ABSTRACT.**

It is known that the acute kidney injury constitutes a health problem due to the high morbidity and mortality that it associated to that. In previous studies it has been associated the measure of AlaAp, GluAp and DPP4 enzymes as markers of early renal damage, before this damage will be irreversible. With this study we want to obtain some reference values for these three enzymes with which we can compare with patients already diagnosed and to be able to establish an early diagnostic. We will also establish differences between men and women, since like some other parameters analysed in a laboratory, they are not the same in young people than in older people.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Marcadores de daño renal.

Actualmente, las enfermedades crónicas son consideradas un problema de salud pública debido a la alta morbilidad y mortalidad que causan. Diversos estudios sugieren que las enfermedades renales crónicas (ERC) suponen un riesgo de mortalidad en la población (Matsushita *et al*, 2010). Además, también se ha observado una relación entre la reducción de la tasa de filtración glomerular con el riesgo de muerte, enfermedades cardiovasculares y la hospitalización (Go *et al*, 2004).

La función renal se evalúa indirectamente midiendo la tasa de filtración glomerular, la depuración de creatinina, la creatinina sérica y la proteinuria. Sin embargo, todos ellos constituyen un signo tardío de daño renal. La única técnica estándar para diagnosticar enfermedades renales es la biopsia renal, lo que conlleva a cierta morbilidad en el paciente debido a la invasividad de la técnica, por lo que existe una necesidad de encontrar otras técnicas no invasivas para diagnosticar la enfermedad renal (Gámez, 2015).

La lesión renal aguda (LRA o AKI en inglés) se define como una disminución brusca de la función renal, causando una acumulación de productos y toxinas nitrogenados y no nitrogenados, con un rápido desarrollo de trastornos líquidos, electrolíticos y del equilibrio ácido-base. La búsqueda de un tratamiento eficaz es una necesidad hoy en día debido a la alta mortalidad que lleva asociada. Aparece en un 5% de los pacientes ingresados y en un 30-50 % de pacientes de la UCI (Schrier *et al*, 2004).

El Grupo de Trabajo sobre la Iniciativa de Calidad de la Diálisis Aguda sugirió una clasificación RIFLE, que define tres grados de gravedad: Riesgo, Lesión y Fallo; y dos clases clínicas: Pérdida y Enfermedad renal terminal. Los criterios RIFLE están basados en las determinaciones de la creatinina sérica. Son una forma útil de evaluar sucesivas etapas de desarrollo de insuficiencia pero las mediciones de creatinina tienen una sensibilidad demasiado baja para detectar lesiones intrarrenales tempranas (Bagshaw *et al*, 2008).

La progresión de la enfermedad resulta de interés clínico para la detección precoz y la aplicación de un tratamiento eficaz (Rabb *et al*, 2003). El problema que nos encontramos es la falta de marcadores bioquímicos que sean sensibles y fácilmente aplicables en la clínica.

La principal causa de LRA es la apoptosis de las células tubulares renales, que se presenta en un 80% de los casos. Esta necrosis tubular aguda (ATN) solo se confirma mediante biopsia renal, lo cual constituye un daño extra al paciente enfermo (Soni *et al*, 2009). Se ha visto que la ATN puede deberse a una deficiencia de oxígeno (procedimientos quirúrgicos en los principales vasos sanguíneos, operación de corazón, trasplante de riñón), lesión renal séptica o tóxica (fármacos antibacterianos, antimicóticos o citotóxicos). (Vaidya *et al*, 2006)

#### *1.1.1. Marcadores de daño renal plasmáticos.*

Los marcadores plasmáticos utilizados habitualmente son la creatinina sérica (SCr), nitrógeno ureico en sangre (BUN), proteinuria y albuminuria, pero todos ellos presentan problemas de sensibilidad (aumentan cuando la lesión renal es evidente) y de especificidad (diversas patologías alteran sus niveles normales: dietas ricas en proteínas, alteraciones musculares, deshidratación...) (Venkataraman *et al*, 2007).

Diversos estudios indican que la creatinina sérica no es un buen marcador de lesión renal aguda por las siguientes razones: (Nguyen *et al*, 2008)

- Altas concentraciones de creatinina sérica no son específicas de LRA, requieren diferenciación de causas prerrenales o extrarenales de azotemia.
- La concentración de creatinina sérica no es específica de lesión tubular renal, pero sí refleja la pérdida de filtración glomerular que acompaña a LRA.
- Los aumentos de creatinina sérica son detectados más tarde que los cambios de filtración glomerular.
- Los cambios en la concentración de creatinina sérica solo se manifiestan cuando los riñones han perdido el 50 % de su capacidad funcional.

- Los cambios en la creatinina sérica pueden estar influidos por otros factores que no están directamente relacionados con el daño renal, como la edad, el sexo, la masa corporal, la hidratación y el estado nutricional.

Muchos autores han propuesto la medición de ácido úrico en sangre para la detección temprana y la evaluación del desarrollo de LRA. Hay asociaciones entre la hiperuricemia y la nefropatía aguda de urato, así como con muchos tipos de LRA, por lo que se cree que el ácido úrico detectado en suero es un simple marcador de inicio de la LRA.

El aumento de la filtración glomerular de ácido úrico en la orina da como resultado la sobresaturación del líquido intratubular con ácido úrico, su cristalización con posterior oclusión del lumen tubular y el desarrollo de la respuesta inflamatoria renal local, con infiltración por células inflamatorias. El ácido úrico no sólo es un marcador diagnóstico, sino también un indicador biológicamente activo de la lesión intrarrenal de la microvasculatura, un potente regulador de los niveles endoteliales de NO e inhibidor de la proliferación y migración de las células epiteliales, causando la apoptosis de células endoteliales y la estimulación de los agentes proinflamatorios: Proteína quimioattractante monocítica 1 y proteína C reactiva (Ejaz *et al*, 2007).

#### *1.1.2. Marcadores de daño renal urinarios.*

Un biomarcador ideal para la LRA debería: (Trof *et al*, 2006).

- (1) ser altamente específico de órganos y permitir la diferenciación entre las causas intrarrenales, prerrenales y postrenales de la LRA y la lesión glomerular renal aguda.
- (2) permitir el reconocimiento de la etiología de la LRA (hipoxia, toxinas, sepsis, o una combinación de estos factores).
- (3) Correlacionarse con los hallazgos histológicos de las muestras de biopsia de riñón.
- (4) Ser específico del sitio para detectar lesiones tempranas e identificar cambios patológicos en varios segmentos de los túbulos renales.

- (5) Correlacionarse con el grado de lesión tubular y que tengan alta sensibilidad para la detección temprana de cambios menores y el inicio de un daño más grave.
- (6) su investigación no debe ser invasiva.
- (7) las pruebas de laboratorio deben ser sencillas y rápidas de realizar, precisas, fiables, económicas y comúnmente disponibles, lo que permite una evaluación en serie de un gran número de muestras.

La orina es un fluido corporal que se puede obtener fácilmente, sin producir ningún daño al individuo, siendo un líquido ideal para la determinación y análisis de biomarcadores. Sin embargo, la orina contiene muchas proteínas, sales, urea y metabolitos, cuyas concentraciones pueden variar en situaciones fisiológicas y en situaciones patológicas asociadas a una afectación renal. Además, la composición proteica de la orina depende en gran medida de la tasa de filtración glomerular (GFR), el metabolismo tubular, la reabsorción tubular, la dieta y el estado de hidratación del paciente, entre otros. La variación en la concentración de una determinada proteína podría ser el resultado de cualquier trastorno tisular o alteración fisiopatológica. Se estima que sólo en torno a un 3% de las proteínas de orina están contenidos en vesículas extracelulares, por lo que la determinación de biomarcadores específicamente relacionados con los EVs pueden ser de interés para describir las alteraciones en el sistema renal (Pisitkun *et al*, 2006). **Figura 1.**

Los marcadores urinarios para lesión renal aguda se pueden clasificar en:

- Enzimas liberadas de las células dañadas: NAG, AlaAp, GluAp.
- Proteínas de bajo peso molecular:  $\beta$ -2-microglobulina, RBP, cistatina C.
- Proteínas producidas por el riñón durante el desarrollo del AKI: NGAL, KIM-1, IL-18.
- Proteínas estructurales y funcionales de los túbulos renales: F-actina, NHE3.



NAG. La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa es una enzima lisosómica, es un marcador urinario específico de las células tubulares debido a su peso molecular relativamente alto (>130 kDa) que impide la filtración del enzima por los glomérulos. El aumento de la actividad urinaria NAG indica daño de las células tubulares, aunque también puede reflejar aumento de la actividad lisosomal sin daño celular. Una alta actividad de NAG en la orina, que persiste durante un período más largo, se ha correlacionado con la necesidad de terapia de reemplazo renal (Liangos *et al*, 2007).

$\beta$ -2-microglobulina. Es una proteína homóloga de los antígenos de histocompatibilidad y se filtra libremente por el glomérulo. Tiene un peso molecular 12 kDa. El aumento de su concentración en orina se ha relacionado con agentes nefrotóxicos, o hipoxia causada por operaciones de corazón o trasplantes de riñón. El problema que presenta es que es inestable a pH<6. (Lisowka, 2010).

RBP. Retinol-binding protein es una proteína ligada a las prealbúminas del plasma y transporta vitamina A. Tiene un peso molecular de 21 kDa. Se filtra fácilmente por el glomérulo y se reabsorbe casi por completo en los túbulos proximales. Presenta una ventaja sobre  $\beta$  2-microglobulina, ya que esta sí es estable a valores bajos de pH (Lisowka, 2010).

Cistatina C. Tiene un peso molecular de 13 kDa y es fácilmente filtrada por el glomérulo, y reabsorbida y catabolizada, pero no secretada, por los túbulos renales. No se ve afectada por factores como la edad o la masa corporal. La relación cistatina C/creatinina urinaria es un buen indicador de la disfunción tubular renal. Si hay deterioro de la función tubular renal, la concentración de cistatina C aumenta hasta 200 veces. Cuando aumenta su excreción en la orina de pacientes con LRA, predice la necesidad del reemplazo renal antes de que progrese la enfermedad (Royakkers *et al*, 2007). Sin embargo, la cistatina C no es diagnósticamente específica para la LRA, ya que es un marcador temprano de la filtración glomerular deteriorada en lugar de la lesión tubular (Coca *et al*, 2008).

NGAL. La lipocalina asociada a gelatinasa neutrófila es una proteína de 25 kDa ligada covalentemente a la gelatinasa de neutrófilos humanos. En el riñón, el gen NGAL es fuertemente inducido después de su lesión por isquemia, sepsis o nefrotoxinas. NGAL podría ser expresado por el túbulo dañado para inducir la re-epitelización y para reducir la apoptosis. Un efecto protector de NGAL probablemente puede resultar de la participación de la proteína en la unión, transporte o almacenamiento de complejos férricos (Mishra *et al*, 2003).

En los seres humanos se ha demostrado que aumenta su expresión solo 2 horas después de una operación de corazón. En adultos con LRA, se ha demostrado un aumento de 10 veces en las concentraciones séricas de NGAL, así como un aumento de más de 100 veces en sus niveles urinarios. Las concentraciones de NGAL tanto en suero como en orina se correlacionaron con las concentraciones séricas de creatinina. Tales observaciones permiten la hipótesis de que la concentración de NGAL en la orina es un marcador temprano sensible, altamente predictivo, diferenciando la insuficiencia prerrenal aguda de la LRA o la enfermedad renal crónica (Bolignano *et al*, 2008).

KIM-1. *Kidney injury molecule 1*. Es de origen tubular. En un riñón sano, el KIM-1 no es detectable, mientras que en condiciones experimentales, empleando técnicas de biología molecular, el KIM-1 ha sido reconocido como marcador de lesión aguda isquémica y tóxica de células tubulares proximales.

El aumento de la expresión de KIM-1 ocurre en áreas con lesiones tubulointersticiales, con inflamación y fibrosis. Constituye un marcador premonitorio, sensible y específico de LRA en humanos, y no se afecta por las propiedades físicas y químicas de los componentes de la orina. Se ha demostrado un aumento de 5 veces en los niveles de KIM-1 desde el primer día de lesión tóxica de los túbulos renales, mientras que los niveles de creatinina y BUM aumentan al tercer día. También aumenta a las pocas horas de operación cardíaca. Una alta concentración de KIM-1 en la orina predice el resultado comprometido en pacientes con LRA (Zhang *et al*, 2007).

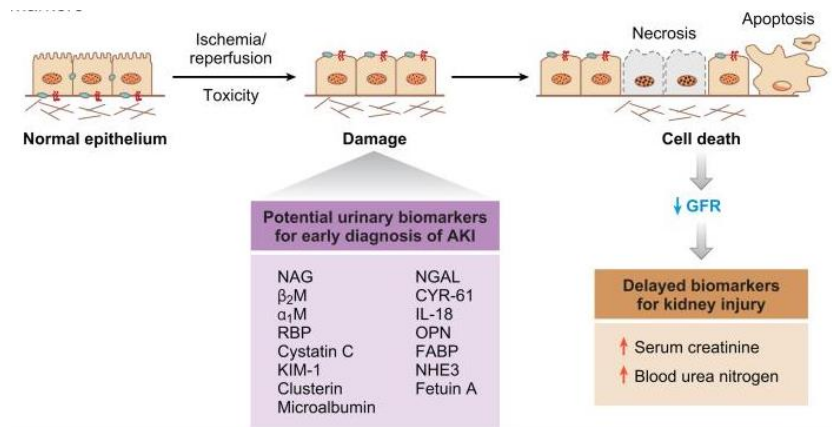
IL-18. La IL-18 es una citoquina proinflamatoria, un mediador de la inflamación y daño isquémico del tejido en muchos órganos. Puede actuar como atrayente neutrofílico y desempeña un papel importante en la fisiopatología de la sepsis.

La IL-18 determinada en la orina es una prueba simple, confiable, precisa y barata para la detección temprana de lesión renal causada por isquemia o nefrotoxinas, que permite la exclusión de azotemia prerrenal, enfermedad renal crónica y enfermedades del tracto urinario. Es una valiosa herramienta para diagnosticar la gravedad de la LRA y la probabilidad de resultado fatal en pacientes críticamente enfermos sin sepsis. La determinación de IL-18 en la orina tiene una sensibilidad y especificidad de > 90% para el diagnóstico de la LRA en humanos. El aumento de las concentraciones de IL-18 en orina en adultos críticamente enfermos y en niños después de procedimientos cardiosúrgicos ocurrió 24-48 h antes de diagnosticar la LRA y estaban relacionados con el agravamiento de la condición (Parikh *et al*, 2005).

F-actina. Bajo condiciones fisiológicas, ni el factor de despolimerización de actina (ADF) ni F-actina se detectan en la orina, mientras que después de 30 minutos de hipoxia sí se encuentran en las muestras de orina (Schwartz *et al*, 1999).

NHE3. El NHE3 es el transportador de sodio más abundante en los túbulos renales, localizado en la membrana apical y en los endosomas subapicales de las células tubulares proximales renales, responsable del 60-70% de la reabsorción de sodio y bicarbonato filtrados.

La caída observada en la reabsorción de sodio tubular en el curso de la LRA sugirió que el perfil de los transportadores de sodio colocados a lo largo de la nefrona puede ser un marcador urinario útil utilizado para la detección y clasificación de la LRA. La reducción de la expresión de NHE3 en el riñón y una correlación significativa entre la excreción urinaria de NHE3 y las características clínicas de LRA en ATN experimental sugieren la pérdida de ese transportador de sodio con la orina. Un aumento de la secreción urinaria de NHE3 puede ser considerado como un marcador específico de lesión tubular aguda, utilizada para diferenciar LRA isquémica o tóxica de otras enfermedades renales y lesiones prerrenales (Rabb *et al*, 2003).



**Figura 1.** La imagen representa los biomarcadores de lesión renal aguda. Se distingue entre los biomarcadores urinarios para diagnosticar AKI antes de que se produzca muerte celular y entre los biomarcadores utilizados cuando ya hay muerte celular (Vaidya *et al*, 2008).

## 1.2. Enzimas aminopeptidásicas como biomarcadores urinarios.

Se ha visto que las enzimas liberadas por las células tubulares dañadas y excretadas a la orina constituyen los biomarcadores más prometedores para la detección temprana de LRA. Las ventajas que presentan es que su medida proporciona información detallada sobre la naturaleza, tamaño y sitio del daño de las células tubulares, así como su posible necrosis (Lisowska *et al*, 2010). Las enzimas más importantes son AlaAp (EC 3.4.11.2), GluAp (EC 3.4.11.7), CysAp (EC 3.4.11.3) y AspAp (EC 3.4.11.21). Debido a su alto peso molecular es difícil que estén presentes en orina, por lo que su presencia podría ser debida a alteraciones en la barrera glomerular (Albiston *et al*, 2011). Tienen función aminopeptidásica en el metabolismo de la angiotensina II, un péptido que se incrementa cuando hay enfermedades renales.

Un estudio con ratas a las que se les administra cisplatino (fármaco antineoplásico que induce nefrotoxicidad (Yao *et al*, 2007), y se ha utilizado ampliamente para evocar lesiones renales en modelos experimentales (Kawai *et al*, 2009)) demuestra que las actividades urinarias de AlaAp y GluAp se incrementan tempranamente ante el daño renal. De este estudio se concluye que las actividades de AlaAp, GluAp, CysAp y AspAp son biomarcadores urinarios tempranos y predictivos de LRA y su medición es muy útil para la

detección temprana y para ver el avance de la enfermedad (Quesada *et al*, 2012).

La excreción de estas enzimas en la orina está directamente correlacionada con el aumento de las concentraciones séricas de creatinina y con la disminución de la tasa de filtración glomerular. Debido a que la síntesis de la enzima ocurre antes, es mejor marcador que la proteinuria.

Estas investigaciones constituyen un método muy eficaz para detectar la lesión renal antes de que el daño sea irreversible, y así poder aplicar el tratamiento desde el primer momento.

### **1.3. Vesículas extracelulares como fuente de biomarcadores.**

Las vesículas extracelulares son de interés científico debido a sus papeles en la comunicación intercelular, patogénesis, administración de fármacos, pero sobre todo debido a su contenido en biomarcadores (Borges *et al*, 2013). Estas vesículas pueden ser liberadas de diferentes tipos de células, como plaquetas, células del sistema inmune y neuronas (Wang *et al*, 2014), y pueden encontrarse en varios fluidos corporales, incluyendo plasma, orina y saliva (Lässer *et al*, 2011).

En enfermedades renales, los EVs urinarios pueden concentrar biomarcadores potenciales que pueden reflejar el estado fisiológico del sistema renal y pueden ser relevantes en patologías que afectan el tracto urinario, desde el riñón hasta la vejiga (Gámez-Valero *et al*, 2015).

Los EV urinarios se han utilizado para el descubrimiento de biomarcadores y fines terapéuticos en varios trastornos renales, incluyendo lesión renal aguda (LRA o AKI en inglés), enfermedad glomerular, trastornos tubulares renales y enfermedad poliquística renal (PKD: Polycystic kidney disease).

El término EVs incluye diferentes tipos de vesículas, principalmente exosomas (EXs), ectosomas o microvesículas y cuerpos apoptóticos.

### 1.3.1. Biosíntesis de microvesículas y exosomas.

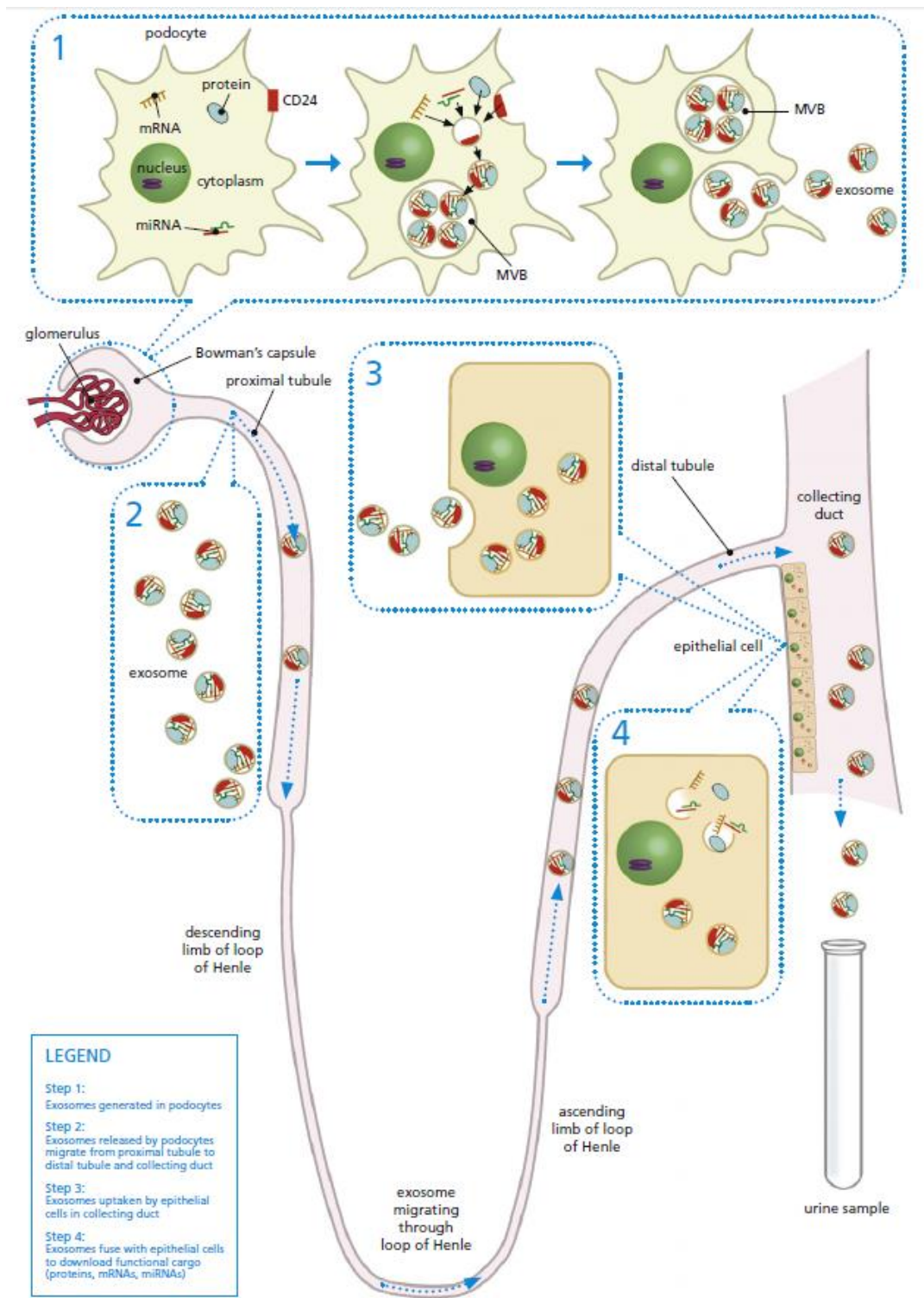
Las microvesículas (MV) tienen un tamaño de 100-1000 nm y son producidas por brote directo de la membrana plasmática (Tamai *et al*, 2010). Los exosomas son pequeñas vesículas con un diámetro de 30-150 nm y se encuentran en el interior de las microvesículas. Constan de una bicapa lipídica, proteínas transmembrana y un núcleo con proteínas, ARNm y miARN. Los exosomas se forman en la zona intraluminal de los compartimentos endosomales tardíos para crear microvesículas. A medida que las vesículas se van secretando, el lumen de los futuros exosomas va capturando citosol con proteínas, ARNm y otras moléculas citosólicas. La fusión de la membrana de los MVB con la membrana plasmática libera las vesículas, que ya reciben el nombre de exosomas (Mause *et al*, 2010). **Figura 2.** La liberación de exosomas está regulada por proteínas de transporte endosomal y vesicular, pequeñas GTPasas, ceramida y calcio (VanWijk *et al*, 2003).

La liberación de exosomas se produce en respuesta a hipoxia, pH ácido, choque térmico y estrés oxidativo. También se ha visto que p53 está implicado en la regulación de la liberación de exosomas, ya que los exosomas actúan como señales intercelulares para comunicarse durante el estrés celular (Clayton *et al*, 2005).

Los exosomas contienen proteínas implicadas en el transporte endosomal, transporte transmembrana y proteínas de fusión, así como tetraspaninas (CD63, CD81, CD9 y CD82), proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90), enzimas metabólicas, proteínas de transducción de señales, proteínas del citoesqueleto, proteínas del complejo de histocompatibilidad (MHC), antígeno 33 y prostaglandinas, entre otros (Gyorgy *et al*, 2011). Las prostaglandinas pueden contribuir a su función (Lee *et al*, 2011).

Podemos encontrar exosomas en los receptores de transferrina, linfocitos, células dendríticas, mastocitos, células endoteliales, plaquetas, así como en sangre y fluidos corporales como orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, leche materna, semen, líquido amniótico, ascitis malignas y líquido sinovial (Caby *et al*, 2005).

El análisis proteómico de los exosomas urinarios identificó proteínas características de los podocitos glomerulares, del túbulo proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal, conducto colector y epitelio de la vejiga urinaria, lo que sugiere que los exosomas urinarios derivan de todo el tracto renal (Pisitkun *et al*, 2004). Por lo tanto, el análisis de exosomas urinarios constituye un método no invasivo para adquirir información sobre el estado fisiopatológico de las células renales.



**Figura 2.** La imagen ilustra la formación de microvesículas y exosomas. También se puede observar la liberación de exosomas por los podocitos, su transporte a lo largo del túbulo renal y su captación por las células epiteliales del túbulo colector y su presencia en orina (Fang *et al*, 2013).



### 1.3.2. Funciones de los exosomas.

Actualmente se sabe que los exosomas desempeñan papeles significativos en:

- Comunicación intercelular. Siempre se ha pensado que la comunicación intercelular se limitaba al contacto célula-célula o a señales liberadas por hormonas, neurotransmisores y citoquinas, actuando de manera autocrina o paracrina. Sin embargo, los exosomas pueden mediar un nuevo mecanismo de comunicación intercelular. Los exosomas se pueden transportar entre diferentes células y adherirse a células diana, sin llegar a fusión de membrana y activando al receptor y la señalización aguas abajo. También pueden fusionarse con las células diana o ser incorporados por las células diana mediante endocitosis (Skog *et al*, 2008). La bicapa lipídica exosomal protege a las proteínas, al ARNm y al miARN de la degradación, por lo que esta vía de comunicación permite una mayor concentración de mensajero.
- Ruta de secreción no clásica de proteínas. Además de la secreción de proteínas innecesarias o dañadas, los exosomas proporcionan una vía de secreción no clásica para una amplia gama de proteínas fisiológicamente relevantes, incluyendo  $\beta$ -catenina (Johnstone *et al*, 1991).
- Funciones del sistema inmune. Los exosomas liberados por las células inmunitarias están implicados en la inmunomodulación tumoral (Iero *et al*, 2007). El efecto funcional de los exosomas sobre las células inmunitarias puede ser ejercido por la transferencia exosomal de miARN (Mittelbrunn *et al*, 2011).
- Biología patógena. Los exosomas son capaces de transferir proteínas virales que pueden promover la patogénesis o escape inmune, así como los miARN víricos funcionales y la diseminación de la infección por VIH-1 (Izquierdo-Useros *et al*, 2011). También se ha demostrado que la proteína patógena del prión se empaqueta en exosomas (Fevrier *et al*, 2004).
- Roles en la progresión del cáncer. Durante el desarrollo del tumor, las células tumorales interactúan con su microambiente circundante para promover su crecimiento, supervivencia e invasión. Los exosomas

derivados de tumores se describen como mediadores importantes de muchos de estos procesos, incluyendo la proliferación de células tumorales, angiogénesis, metástasis, remodelado del estroma e inmunomodulación. En los modelos experimentales de cáncer renal, las vesículas derivadas de células madre de cáncer parecen capaces de contribuir a desencadenar el cambio angiogénico y promover la metástasis (Grange *et al*, 2011).

Con la información que se tiene acerca de las enzimas aminopeptidásicas y su utilidad como marcadores de daño renal temprano, resulta de interés tener unos valores de referencia de la actividad enzimática con los cuales poder comparar en el caso de alguna enfermedad renal y así establecer un diagnóstico temprano antes de que el daño sea mayor.

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo principal de este estudio es establecer los valores de referencia de actividad enzimática AlaAp, GluAp y DPP4 en una población adulta sana. Además de este objetivo se pretende comprobar:

- Los valores de referencia de actividad enzimática AlaAp, GluAp y DPP4 en la fracción microvesicular de orina expresadas en mg de proteína y mg de Creatinina.
- Los valores de referencia de actividad enzimática AlaAp, GluAp y DPP4 en la fracción exosomal expresadas en mg de proteína y mg de Creatinina.
- Los valores de referencia de actividad enzimática AlaAp, GluAp y DPP4 en el sobrenadante de la orina centrifugada a 1000g expresada en mg de proteína y mg de Creatinina.
- Analizar si existen diferencias significativas en los valores de estas enzimas entre los hombres y las mujeres.
- Establecer correlaciones entre estas actividades enzimáticas y la edad, averiguando si existen diferencias significativas entre grupos de individuos de diferentes edades.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Población analizada.**

Las 19 muestras para realizar este estudio proceden de voluntarios adultos sanos de edad comprendida entre 19 y 79 años, los cuales no presentan ninguna enfermedad que pueda afectar a la funcionalidad del riñón como por ejemplo la diabetes, o cualquier enfermedad renal. En concreto se disponen de 11 muestras de mujer y 8 muestras de hombres.

A los voluntarios se les proporcionó un consentimiento informado en el cual se les informaba sobre los estudios que se iban a realizar sobre su muestra, así como un frasco estéril en el cual recogerían su muestra.

Es importante aclarar que la muestra de orina recogida fue la primera de la mañana, ya que esta contendría mayor concentración de enzimas aminopeptidásicas. Las muestras fueron analizadas de forma inmediata una vez obtenidas.

#### **3.2. Obtención de las fracciones urinarias.**

En este estudio se va a medir actividad aminopeptidásica de las enzimas AlaAp, GluAp y DPP4 en el sobrenadante de la orina centrifugada a 1000G, en la fracción microvesicular y en la fracción exosomal. Para obtenerlas se seguirá el siguiente protocolo descrito.

La muestra de orina total recibida de los distintos pacientes se centrifuga a 1000G durante 10 minutos y a una temperatura de 4°C para evitar que el sobrecalentamiento desnaturalice las proteínas presentes en la orina. Esta primera centrifugación se realiza en una centrífuga de alta capacidad ubicada en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) del campus Las Lagunillas. El objetivo de esta centrifugación es eliminar células de descamación, leucocitos, eritrocitos, bacterias...que puedan interferir en los análisis. Este pellet se desecha y se conserva el sobrenadante para seguir centrifugando.

De este sobrenadante se toma una cantidad de 10 ml y se centrifuga a 17000 G durante 15 minutos a 4°C en la centrifuga de alta capacidad del CICT. El precipitado obtenido contiene la fracción microvesicular, el cual se resuspenderá en 200 µl de tampón Tris 20 mM pH=8'6 y se prepararán 4 alícuotas de 50 µl.

El sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar a 180000G durante una hora y a una temperatura de 4°C en la ultracentrífuga ubicada en el CICT. El precipitado obtenido contiene la fracción exosomal, que se resuspenderá en 200 µl de tampón Tris 20 mM pH=8'6. Se Prepararán también 4 alícuotas de 50 µl cada una. El sobrenadante resultante de esta centrifugación se desecha.

De esta forma ya tenemos todas las fracciones urinarias que nos interesan para nuestro estudio. Estas fracciones se almacenan en un congelador a -80°C para preservarlas e ir utilizándolas para mediciones posteriores. Es importante que las muestras no se almacenen a -20°C ya que se ha comprobado que a esta temperatura las enzimas pierden por completo su actividad enzimática.

### **3.3. Medición de la actividad enzimática en las distintas fracciones.**

#### *3.3.1. Preparación del tampón Tris.*

El tampón Tris constituye el medio acuoso en el cual se van a resuspender las fracciones microvesicular y exosomal, así como para preparar los sustratos para medir la actividad enzimática. Se necesita preparar 1 litro 20 mM con pH= 8'6. Sabiendo el peso molecular del Tris, el cual es 121'14 g/mol, se necesita una cantidad de 2'42 g para preparar 1 litro de tampón Tris a concentración 20 mM.

Para obtener el pH deseado primero se tiene que calibrar el pHmetro. Una vez realizado se irá ajustando el pH de nuestra preparación añadiendo una base o un ácido hasta alcanzar pH=8'6.

### 3.3.2. Preparación de los sustratos.

Se quiere medir la actividad de tres enzimas distintas. Para ello, lo primero que se debe de hacer es preparar los sustratos de cada enzima. Estos sustratos se preparan a concentración subsaturante del enzima para conseguir que el enzima alcance su velocidad máxima sin llegar a saturarse.

- AlaAp: se disuelven 2'14 mg de Ala- $\beta$ -naftilamida en 100  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO).
- GluAp: se disuelven 2'72 mg de Ala- $\beta$ -naftilamida en 100  $\mu$ l de DMSO.
- DPP4: se disuelven 3'64 mg de glicilprolil-4-metoxi- $\beta$ - naftilamida en 100  $\mu$ l de DMSO.

De cada una de las preparaciones, se toman 0'05 ml y se disuelven en 4.95 ml de tampón Tris 20 mM pH=8'6.

### 3.3.3. Cuantificación de actividad enzimática en las fracciones urinarias.

Se mide la actividad enzimática en la fracción microvesicular, fracción exosomal y en el sobrenadante de la orina centrifugada a 1000 G. En todos los casos se realiza de la misma forma.

Para ello se utiliza un método de fluorescencia, ya que los productos de la reacción enzimática son fluorescentes. En el caso de AlaAp y GluAp tienen el mismo producto:  $\beta$ -naftilamina; y en el caso de DPP4 el producto de la reacción es 4-metoxi- $\beta$ -naftilamina.

Para realizar la medición se ha utilizado un fluorímetro con una longitud de onda de emisión de 412 nm y una longitud de onda de excitación de 345 nm.

Se utilizará una placa multipocillo. En cada pocillo y por duplicado se añaden 20  $\mu$ l de muestra (orina total, fracción microvesicular y fracción exosomal) y 80  $\mu$ l de los sustratos preparados. Cuando estén cargadas todas las muestras se procederá a la medición en el fluorímetro.

Se medirá el incremento de fluorescencia cada minuto y durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C. Solo nos interesarán los datos de la zona lineal, correspondiente con el estado estacionario del enzima. Evitaremos coger los

primeros datos ya que se corresponden con el denominado “lag enzimático” en el cual aún se está estabilizando la reacción.

Los datos obtenidos de actividad enzimática de cada fracción se compararon con una recta patrón de  $\beta$ -naftilamina para AlaAp y GluAp y de 4-metoxi- $\beta$ -naftilamina para DPP4, con concentración de 0-200 nmoles/ ml.

### **3.4. Medición de proteína total en las fracciones microvesicular y exosomal.**

Tanto en la fracción microvesicular como en la fracción exosomal se procede de la misma forma. Para ello se utiliza el método de Lowry con un kit comercial Bio Rad DC Protein assay.

Para proceder con el método, primero hay que preparar una recta patrón con albúmina en concentraciones crecientes de 0'2, 0'4, 0'8, 1 y 2 mg/ml en tampón Tris 20 mM pH=8'6.

En una placa multipocillo se colocan 5  $\mu$ l de la recta patrón por duplicado, con un blanco que solo contiene 5  $\mu$ l de tampón Tris 20 mM pH=8'6. A continuación se añaden 5  $\mu$ l de las muestras y por duplicado. Se adicionan 25  $\mu$ l de reactivo A y 200  $\mu$ l del reactivo B en todos los pocillos, incluidos los de la recta patrón.

Durante 15 minutos se mantiene la placa en agitación. Transcurrido el tiempo se mide la absorbancia a 750 nm. Si alguna muestra sale por encima del máximo de la recta patrón, se diluye y se realiza de nuevo la medición.

### **3.5. Medición de proteína total en sobrenadante de orina centrifugada a 1000 G.**

La medición de proteína en orina se realiza en el autoanalizador SPIN 120 con una técnica basada en la reacción de las proteínas con el rojo de pirogalol, formando un complejo coloreado. Es un test colorimétrico en el cual la intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas. Se analizó una cantidad de 350  $\mu$ l. La razón de utilizar esta técnica es debido a que el color de la orina, producida por la proteína urobilina, interfiere en los métodos que utilizan el kit de Bio Rad.

### **3.6. Medición de creatinina en orina.**

La medición de creatinina en orina se realiza en el autoanalizador SPIN 120 con una técnica basada en la reacción de Jaffé. Es un test cinético-colorimétrico basado en la reacción de la creatinina con el ácido pícrico, formando un complejo amarillo-naranja cuya intensidad de color será medida por fotometría. La cantidad de muestra necesaria para la medición es de 350  $\mu\text{l}$ .

### **3.7. Análisis estadísticos realizados.**

El principal análisis a realizar son los valores de referencia con el 95% de la población. Aquí nos encontramos con el problema de que al ser solo 19 muestras no se puede realizar el percentil 95, por lo que realizaremos un análisis estadístico de los datos en los cuales obtendremos el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación entre otros.

Se realizará una correlación entre la edad y la actividad de cada fracción, así como una correlación entre la proteína total en cada fracción con la edad. Si hay correlación en algún caso, se compararán grupos de edades para ver si hay diferencias entre los distintos grupos de edad.

Por último se comparará la actividad entre hombres y mujeres para ver si hay diferencias entre sexos.

Todos estos análisis se han realizado en el software *Statgraphics Centurion XVII*.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Análisis estadístico de los datos.

	AlaAp	AlaAp (mU/mg prot)	AlaAp (mU/mg Crea)	GluAp	GluAp (mU/mg prot)	GluAp (mU/mg Crea)	DPP4	DPP4 (mU/mg prot)	DPP4 (mU/mg Crea)
<b>Promedio</b>	11	146,17	13,40	2,18	28,98	2,74	4,61	61,82	5,78
<b>Desviación estándar</b>	6,56	50,08	5,12	1,98	16,71	1,98	2,77	23,63	2,49
<b>Coficiente variación</b>	59,63%	34,26%	38,12%	90,65 %	57,67%	72,33%	60,05%	38,22%	43,11%
<b>Mínimo</b>	1,46	62,1	5,3	0,26	2,49	0,22	0,72	19,81	1,17
<b>Máximo</b>	25,78	224,42	21,79	7,25	60,07	7,44	9,58	102,85	9,25
<b>Sesgo</b>	1,46	-0,125	0,047	2,92	0,73	1,98	0,99	0,25	-0,15
<b>Curtosis</b>	0,08	-1,13	-1,022	1,89	-0,57	0,35	-0,75	-0,89	-1,134

**Tabla 1.** Análisis estadístico de los datos de actividad enzimática de la fracción del sobrenadante. Se muestra la actividad total, actividad/proteína y actividad/creatinina de cada enzima.

	AlaAp	AlaAp (mU/mg prot)	AlaAp (mU/mg crea)	GluAp	GluAp (mU/mg prot)	GluAp (mU/mg crea)	DPP4	DPP4 (mU/mg prot)	DPP4 (mU/mg crea)
<b>Promedio</b>	63,87	36,56	69,62	8,81	4,56	9,67	38,34	23,32	42,18
<b>Desviación estándar</b>	67,84	50,21	53,12	10,62	5,67	8,92	35,87	33,05	28,73
<b>Coficiente variación</b>	106,21%	137,35%	76,30%	120,59%	124,31%	92,27%	93,57%	141,76 %	68,11 %
<b>Mínimo</b>	7,15	3,17	21,98	0,53	0,45	1,34	2,65	1,47	3,74
<b>Máximo</b>	276,27	180,47	233,53	46,81	19,17	39,57	124,44	111,25	105,19
<b>Sesgo</b>	3,72	3,89	3,53	4,94	2,64	3,99	2,26	3,76	1,69
<b>Curtosis</b>	4,26	3,74	4,00	8,34	1,04	5,84	0,81	3,33	0,29

**Tabla 2.** Análisis estadístico de los datos de actividad enzimática de la fracción microvesicular. Se muestra la actividad total, actividad/proteína y actividad/creatinina de cada enzima.



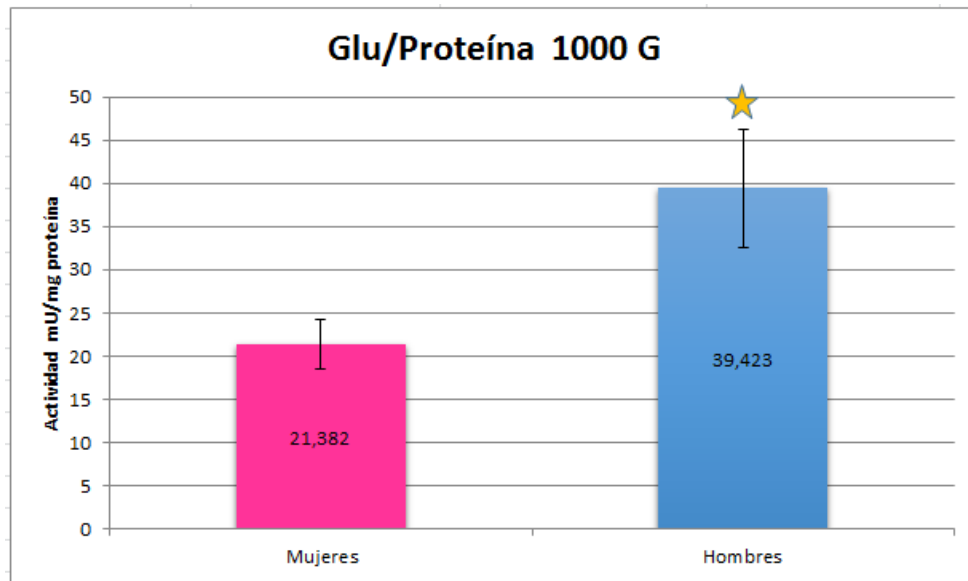
	AlaAp	AlaAp (mU/mg prot)	AlaAp (mU/mg crea)	GluAp	GluAp (mU/mg prot)	GluAp (mU/mg crea)	DPP4	DPP4 (mU/mg prot)	DPP4 (mU/mg crea)
<b>Promedio</b>	60,16	74,69	69,59	10,06	12,34	11,39	42,77	51,23	48,95
<b>Desviación estándar</b>	56,19	123,83	48,05	13,19	22,73	11,08	39,04	82,72	32,74
<b>Coficiente variación</b>	93,41 %	165,80 %	69,05 %	131,16%	184,26 %	97,27 %	91,28%	161,45 %	66,88 %
<b>Mínimo</b>	4,51	8,68	16,41	1,04	1,04	1,56	2,25	4,27	3,41
<b>Máximo</b>	179,82	479,81	161,04	55,4	79,14	46,83	136,6	317,85	121,52
<b>Sesgo</b>	2,71	4,44	1,67	4,69	4,49	3,67	2,19	4,44	1,19
<b>Curtosis</b>	1,10	5,47	-0,25	6,86	4,84	4,50	0,61	5,41	-0,05

**Tabla 3.** Análisis estadístico de los datos de actividad enzimática de la fracción exosomal. Se muestra la actividad total, actividad/proteína y actividad/creatinina de cada enzima.

#### 4.2. Comparación entre mujeres y hombres.

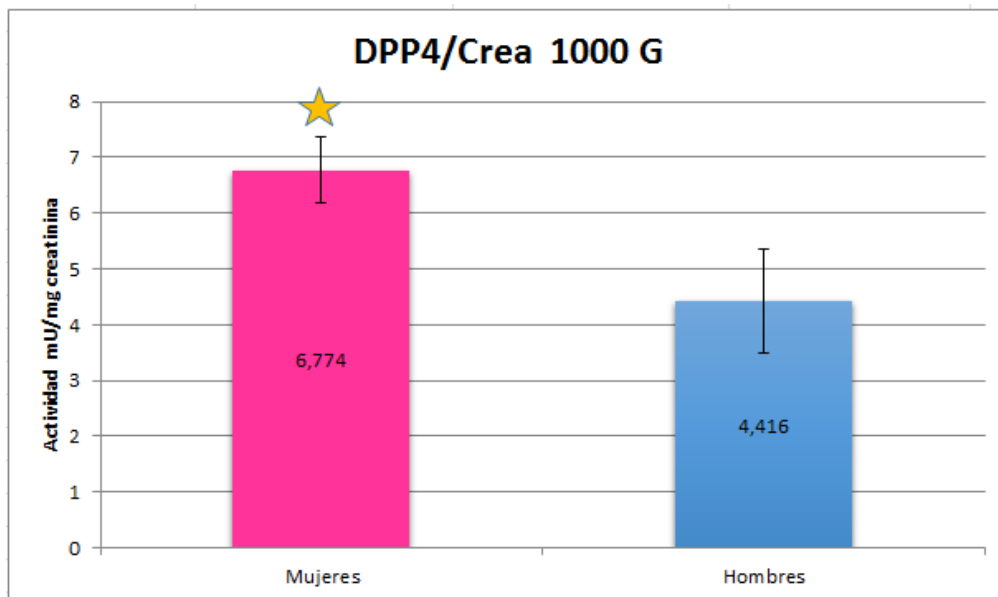
Lo primero que se realiza es comprobar si los datos siguen una distribución normal o no. Si la distribución es normal se realiza una t-student que compara las medias. Si no es normal, se hace un Mann-Whitney que compara las medianas.

Se comparó la actividad enzimática de cada enzima y en cada fracción entre hombres y mujeres, encontrando diferencias significativas en Glu Ap (mU/mg proteína) en el sobrenadante (**Gráfica 1**) y en DPP4 (mU/mg creatinina) en el sobrenadante (**Gráfica 2**).

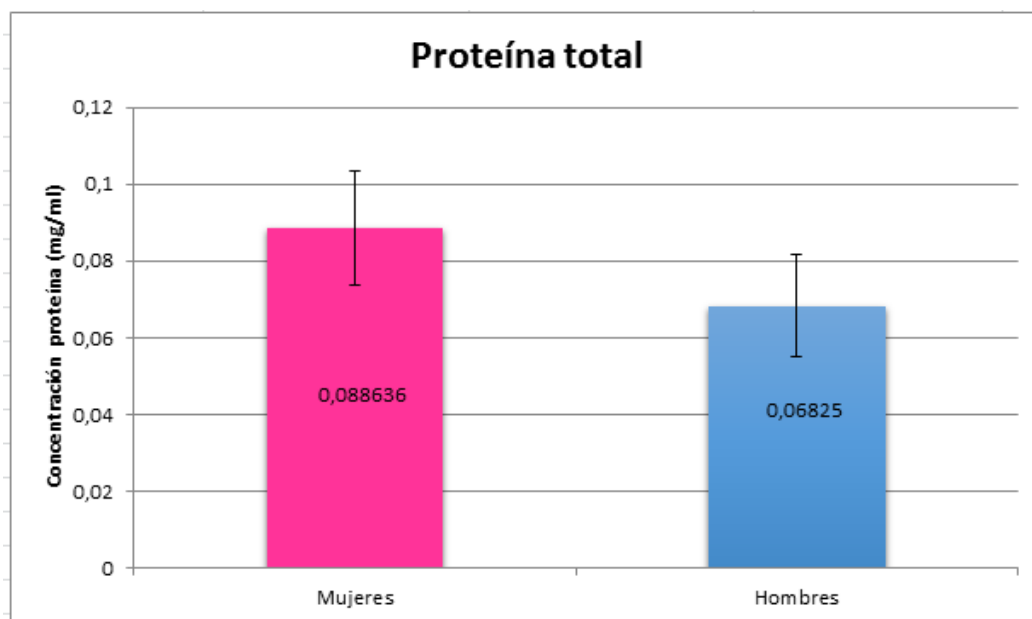


**Gráfica 1.** Comparación de la actividad Glu/proteína en el sobrenadante entre mujeres y hombres, donde \* significa que hay diferencias significativas entre los grupos ya que  $p < 0,05$ .

Para explicar esta diferencia se hizo una comparación de la concentración de proteína en la fracción del sobrenadante entre hombres y mujeres (**Gráfica 3**).



**Gráfica 2.** Comparación de la actividad DPP4/creatinina en el sobrenadante entre mujeres y hombres, donde \* significa que hay diferencias significativas entre los grupos ya que  $p < 0,05$ .



**Gráfica 3.** Comparación de la concentración de proteína en la fracción del sobrenadante entre mujeres y hombres. No se aprecian diferencias significativas.

#### 4.3. Correlación de la actividad con la edad.

Se ha realizado una correlación de la actividad de cada enzima y en cada fracción respecto a la edad.

	AlaAp	AlaAp (mU/mg Prot)	AlaAp (mU/mg Crea)	GluAp	GluAp (mU/mg Prot)	GluAp (mU/mg Crea)	DPP4	DPP4 (mU/mg Prot)	DPP4 (mU/mg Crea)
<b>E</b>	P=0,500	P = 0,806	P= 0,326	P=0,251	P=0,053	P=0,027 *	P=0,275	P=0,415	P=0,920
<b>d</b>	r= -0,165	r= 0,060	r=0,238	r=0,276	r=0,449	r=0,505	r=-0,263	r=-0,198	r= 0,024
<b>a</b>									
<b>d</b>									

**Tabla 4.** Correlación de la actividad enzimática de cada enzima en la fracción del sobrenadante respecto a la edad. Se marca con un \* aquella comparación con una correlación fuerte que presentan  $p < 0,05$  y  $r > 0.5$ .

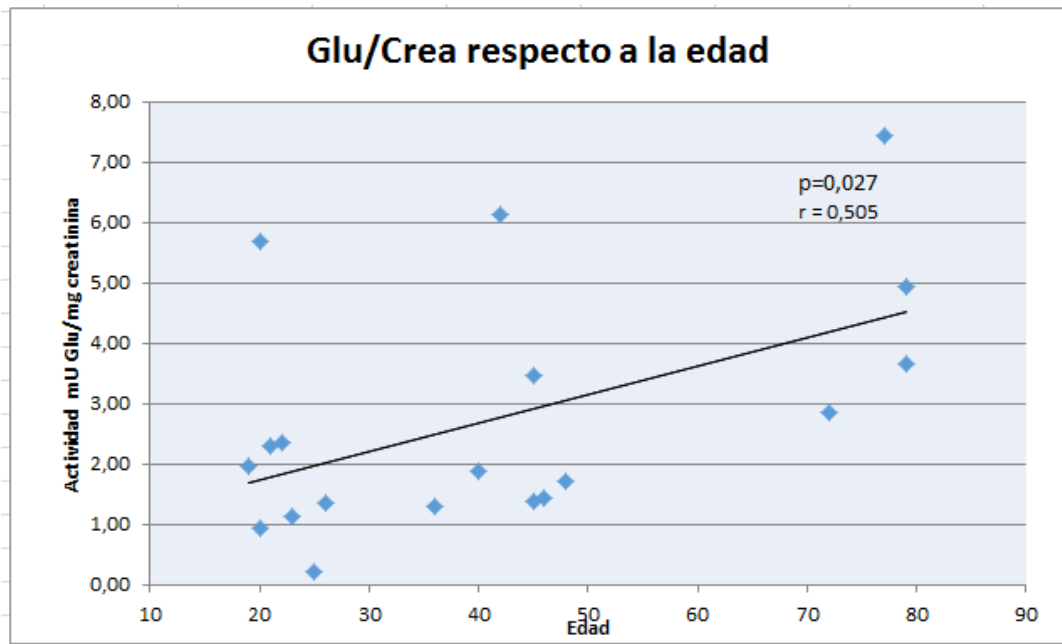
	AlaAp	AlaAp (mU/mg Prot)	AlaAp (mU/mg Crea)	GluAp	GluAp (mU/mgPr ot)	GluAp (mU/mg Crea)	DPP4	DPP4 (mU/mg Prot)	DPP4 (mU/mg Crea)
<b>E</b>	P=0,157	P=0,022 *	P=0,281	P=0,356	P=0,015 *	P=0,602	P=0,104	P=0,015 *	P=0,175
<b>d</b>	r= -0,338	r= -0,520	r= -0,261	r=-0,224	r=-0,550	r=-0,128	r=-0,385	r=-0,549	r=-0,325

**Tabla 5.** Correlación de la actividad enzimática de cada enzima en la fracción microvesicular respecto a la edad. Se marca con un \* aquella comparación con una correlación fuerte que presentan  $p < 0,05$  y  $r > 0.5$ .

	AlaAp	AlaAp (mU/mg Prot)	AlaAp (mU/mg Crea)	GluAp	GluAp (mU/mg Prot)	GluAp (mU/mg Crea)	DPP4	DPP4 (mU/mg Prot)	DPP4 (mU/mg Crea)
<b>E</b>	P=0,144	P=0,063	P=0,466	P=0,491	P=0,088	P=0,896	P=0,112	P=0,054	P=0,336
<b>d</b>	r= -0,348	r=-0,434	r=-0,178	r=-0,168	r=-0,402	r=-0,032	r=-0,376	r=-0,448	r=-0,233

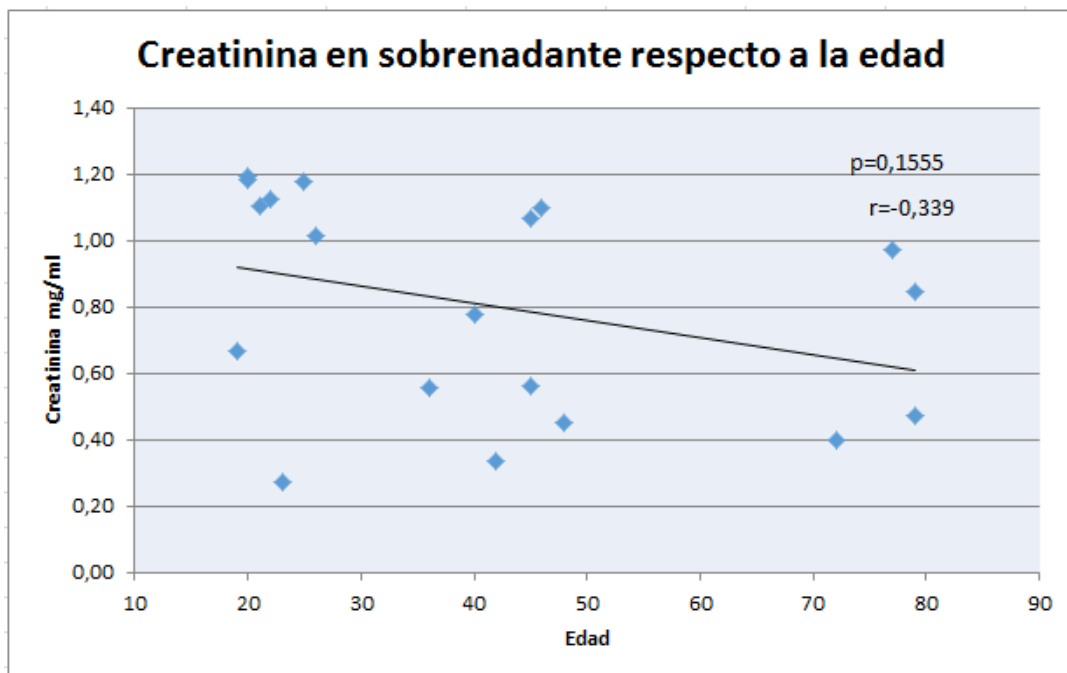
**Tabla 6.** Correlación de la actividad enzimática de cada enzima en la fracción exosomal respecto a la edad. Se marca con un \* aquella comparación con una correlación fuerte que presentan  $p < 0,05$  y  $r > 0.5$ .

A continuación se representan gráficamente las correlaciones obtenidas:

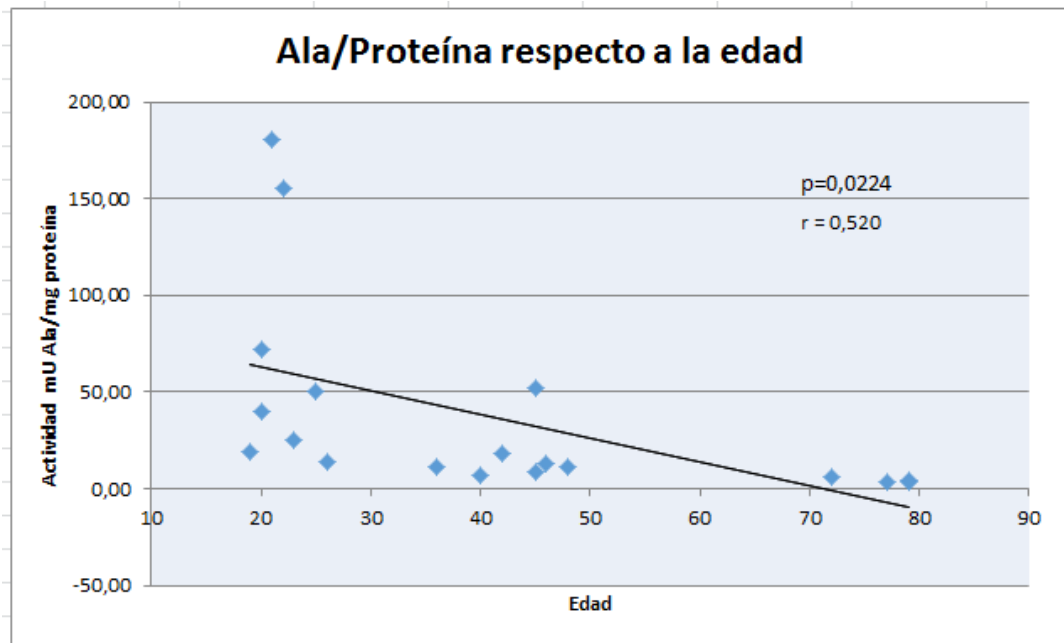


**Gráfica 4.** Correlación entre actividad Glu/Crea en la fracción del sobrenadante respecto a la edad.

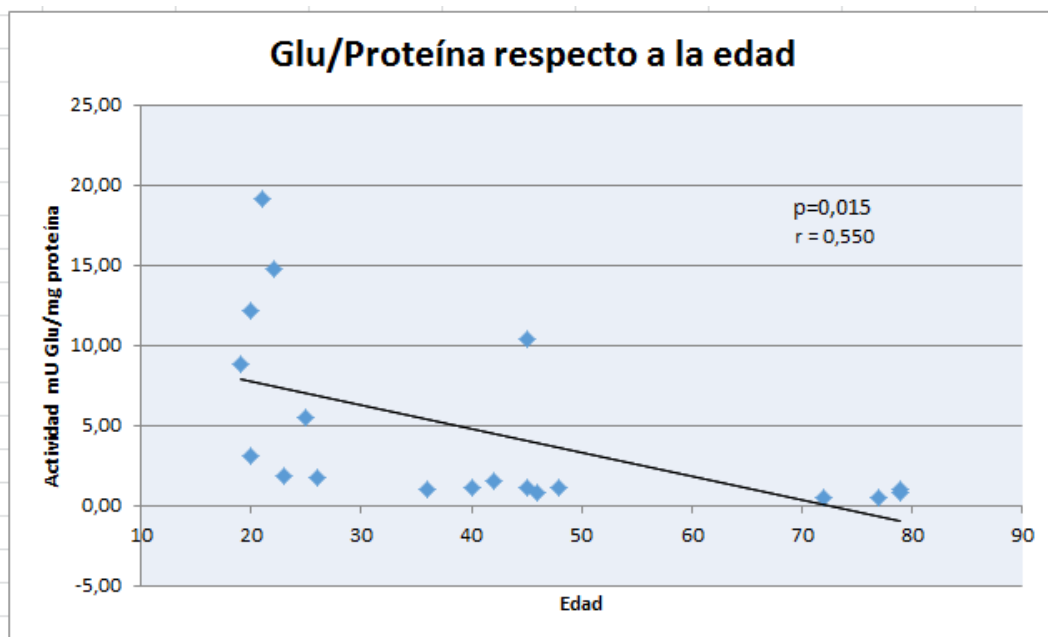
Para explicar este aumento de actividad GluAp (mU/mg Crea) se hace una correlación de creatinina total en el sobrenadante respecto a la edad.



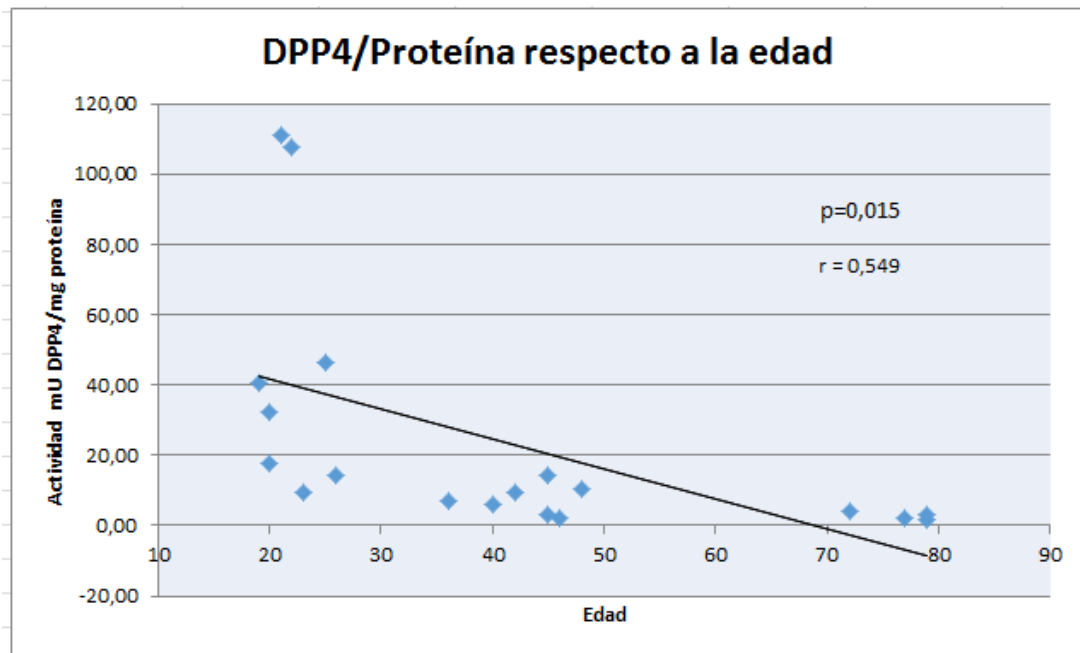
**Gráfica 5.** Correlación entre la concentración de creatinina en la fracción del sobrenadante respecto a la edad.



**Gráfica 6.** Correlación entre actividad Ala/Proteína en la fracción microvesicular respecto a la edad.

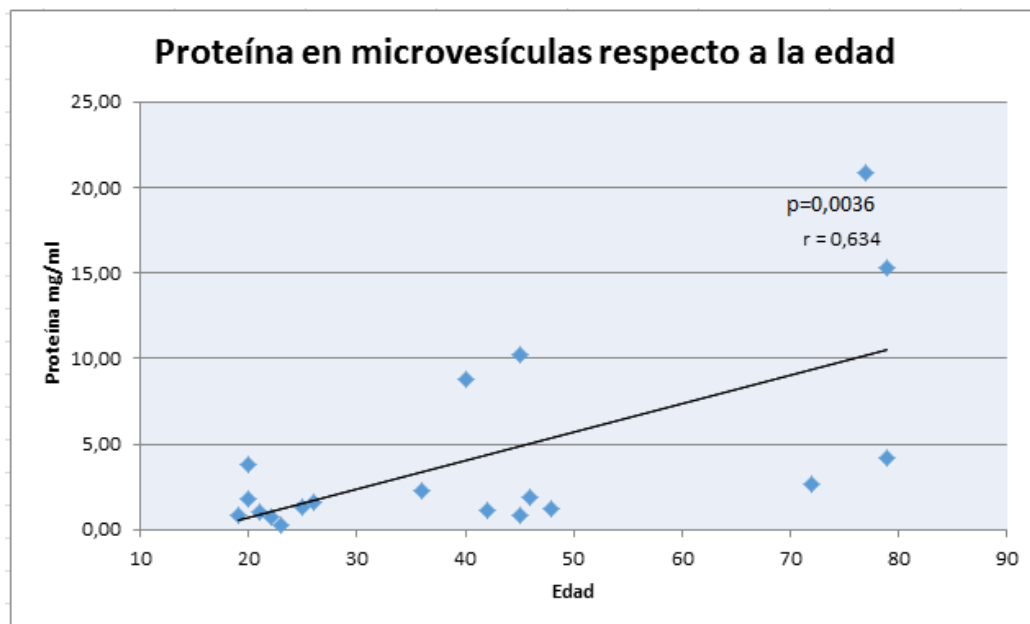


**Gráfica 7.** Correlación entre actividad Glu/Proteína en la fracción microvesicular respecto a la edad.



**Gráfica 8.** Correlación entre actividad DPP4/Proteína en la fracción microvesicular respecto a la edad.

Para poder explicar estas correlaciones negativas, se realizó una correlación entre la concentración de proteína de la fracción microvesicular respecto a la edad.

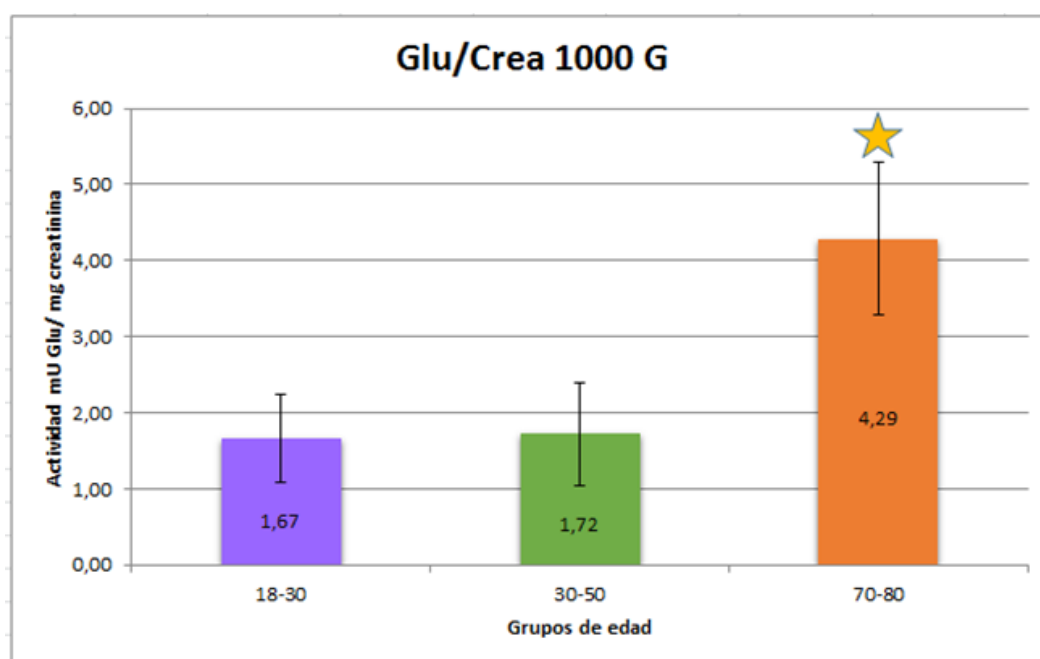


**Gráfica 9.** Correlación de la concentración de proteína en la fracción microvesicular respecto a la edad.

Por último, se han establecido 3 grupos de edad:

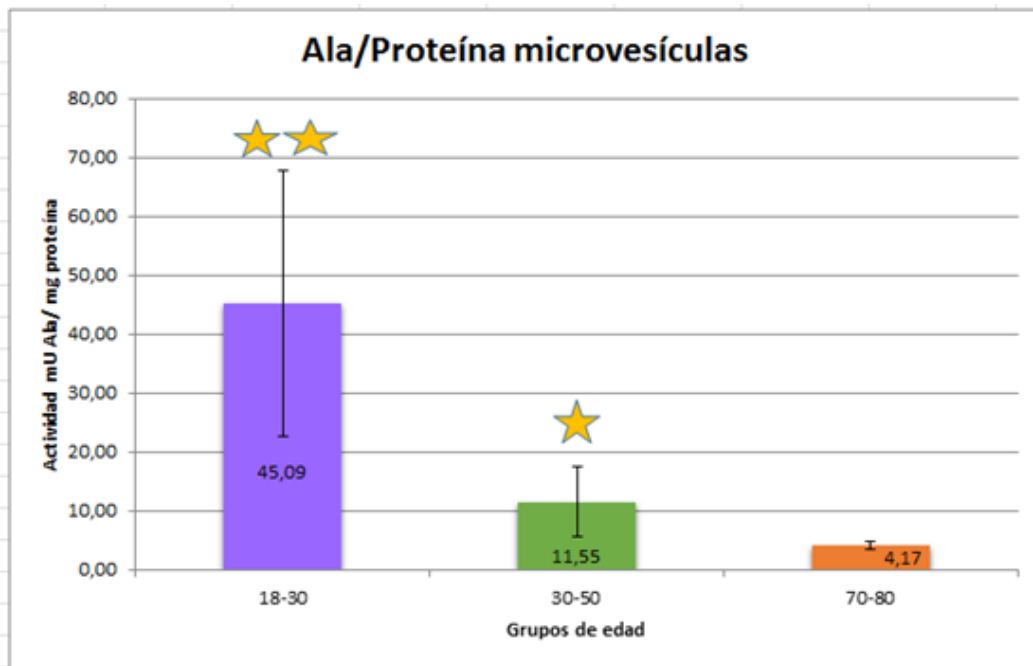
- 1) Entre 18 y 30 años.
- 2) Entre 30 y 50 años.
- 3) Entre 70 y 80 años.

Se ha realizado una comparación de los distintos grupos de edad con la actividad enzimática en la cual hay correlación para ver como varía la actividad dependiendo de los grupos de edad.

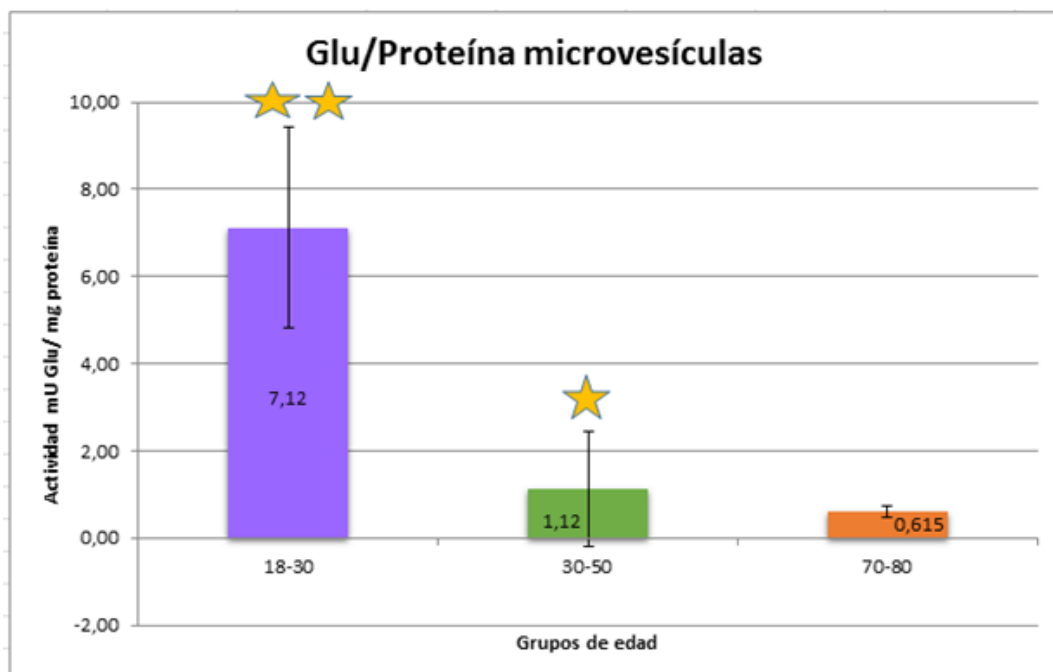


**Gráfica 10.** Comparación de los distintos grupos de edad respecto a la actividad Glu/Crea en el sobrenadante. \* significa que hay diferencias significativas entre el grupo de 18-30 años y el de 70-80 años, ya que  $p < 0,05$ .

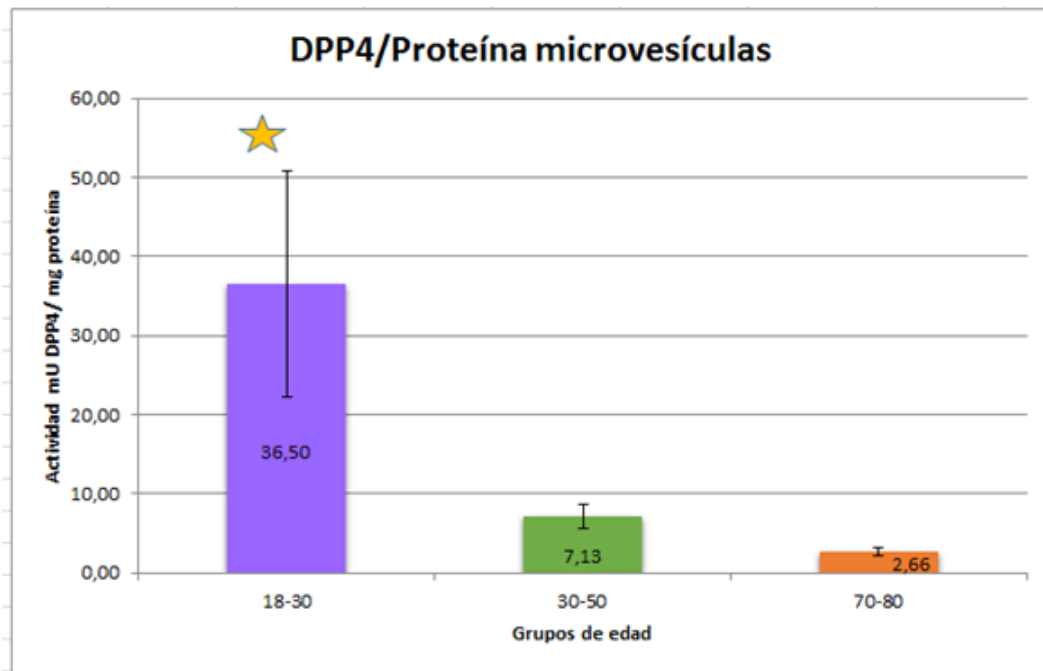




**Gráfica 11.** Comparación de los distintos grupos de edad respecto a la actividad Ala/Proteína en la fracción microvesicular. \* significa que hay diferencias significativas entre el grupo de 30-50 años y el de 70-80 años, ya que  $p < 0,05$ . \*\* significa que hay diferencias significativas entre el grupo de 18-30 años y el de 70-80 años, ya que  $p < 0,01$ .



**Gráfica 12.** Comparación de los distintos grupos de edad respecto a la actividad Glu/Proteína en la fracción microvesicular. \* significa que hay diferencias significativas entre el grupo de 30-50 años y el de 70-80 años, ya que  $p < 0,05$ . \*\* significa que hay diferencias significativas entre el grupo de 18-30 años y el de 70-80 años, ya que  $p < 0,01$ .



**Gráfica 13.** Comparación de los distintos grupos de edad respecto a la actividad DPP4/Proteína en la fracción microvesicular. \* significa que hay diferencias significativas entre el grupo de 18-30 años y el de 70-80 años, ya que  $p < 0,01$ .

## 5. DISCUSIÓN.

El principal objetivo de este trabajo era obtener unos valores de referencia de actividad aminopeptidásica para las enzimas AlaAp, GluAp y DPP4 en la fracción del sobrenadante centrifugado a 1000 G, en la fracción microvesicular y en la fracción exosomal en una población adulta sana. Aunque lo ideal sería tener una muestra de 120 pacientes, este trabajo se ha restringido a la obtención de resultados en 19 personas sanas.

En la **tabla 1** podemos observar que la actividad AlaAp (mU/mg prot) está más alta que las demás, seguido de DPP4 (mU/mg prot) y de GluAp (mU/mg prot). Hay algunos casos en los que el coeficiente de variación es muy elevado, como en el caso de actividad GluAp (90,65 %) o el caso de GluAp (mU/mg crea) (72,33 %). Estas variaciones probablemente estén causadas por un valor elevado de desviación estándar debido a que los resultados proceden de una población de 19 casos.

En la fracción microvesicular y exosomal (**tabla 2 y tabla 3**) encontramos que la actividad AlaAp está más elevada que DPP4 y GluAp. Los coeficientes de variación también son muy elevados, debido a la variabilidad de los datos y a que solo tenemos 19 muestras. Probablemente un aumento de la muestra reduciría el coeficiente de variación.

Como se puede observar, la actividad más elevada que aparece es la de AlaAp seguida de DPP4 y GluAp en todas las fracciones, siendo en la fracción exosomal más elevada que en la fracción microvesicular y que la del sobrenadante centrifugado a 1000 G.

Al hacer la comparación de actividades aminopeptidásicas entre mujeres y hombres solo obtenemos diferencias significativas en GluAp (mU/mg proteína) en el sobrenadante y en DPP4 (mU/mg Crea) del sobrenadante. En los demás casos no se obtienen diferencias significativas.

En el caso de GluAp (mU/mg proteína) (**Gráfica 1**) se obtiene que es mayor en hombres que en mujeres. Al ser en el sobrenadante, esta diferencia no tiene un significado biológico ya que los altos niveles de proteína se asocian a

enfermedad renal y en este caso el aumento de actividad puede ser debido a alteraciones en la proteína total excretada.

Para comprobar este hecho, se ha realizado una comparación de la proteína total del sobrenadante entre mujeres y hombres (**Gráfica 3**), obteniendo como resultado que no hay diferencias entre ambos. Por lo tanto, no se podría achacar el aumento en GluAp (mU/mg prot) a un aumento en la proteinuria, sino a diferencias sexuales provocadas por la presencia y/o por la ausencia de estrógenos. Estos resultados sí que concordarían con el estudio de Sainz *et al*, 2004, ya que se concluye que la presencia de testosterona incide negativamente en el desarrollo de daño renal de los animales tratados con L-NAME, inhibidor del óxido nítrico. Por lo tanto, esto podría explicar que en el caso de los hombres de nuestro estudio la actividad GluAp se encuentre aumentada, ya que se ha publicado que la GluAp es un marcador de daño tubular renal (Quesada *et al*, 2012, Montoro-Molina *et al*, 2015, Quesada *et al*, 2017).

En el caso de DPP4 (mU/mg creatinina) (**Gráfica 2**) se ha obtenido que es mayor en mujeres que en hombres. El papel de la DPP4 es hidrolizar péptidos procedentes del colágeno. Por lo tanto, la disminución de actividad DPP4 que encontramos en los hombres podría ser debido a una mayor presencia de péptidos derivados del colágeno, que competirían con el centro activo de la enzima y provocarían la saturación del enzima. Esto también podría estar influenciado por las diferencias hormonales entre ambos sexos, y habría que realizar más estudios para comprobar si estas alteraciones son debidas a la presencia de testosterona o a la ausencia de estrógenos (Sainz *et al*, 2004).

Además, se ha obtenido una correlación positiva entre la actividad GluAp (mU/mg crea) en el sobrenadante y la edad (**Tabla 4** y **Gráfica 4**). Esto puede ser debido a que hay una alteración en la excreción de creatinina, habiendo menor excreción de creatinina con la edad, ya que la función de filtración glomerular puede sufrir deterioros con el paso del tiempo. Para demostrar este hecho, se hace una correlación entre la excreción de creatinina y la edad (**Gráfica 5**), cuyo resultado es negativo, no existe correlación. Por lo tanto esta

alteración en la excreción de creatinina puede deberse a cierto grado de lesión tubular que se produciría con el paso del tiempo.

Se han obtenido correlaciones negativas entre la actividad AlaAp (mU/mg Prot), GluAp (mU/mg Prot) y DPP4 (mU/mg Prot) en la fracción microvesicular respecto a la edad, es decir, conforme aumenta la edad va disminuyendo la actividad (**Tabla 5, Gráficas 6, 7 y 8**). Esto puede ser debido a que con la edad, la cantidad de proteína presente en la fracción microvesicular es mayor, lo que implicaría que con el paso del tiempo se secreta un mayor número de microvesículas en la orina. Para poder afirmar este dato, se ha hecho una correlación entre la concentración de proteína en la fracción microvesicular y la edad, y podemos afirmar que aumenta con la edad (**Gráfica 9**).

Se han hecho grupos de edad para ver si hay algún punto en el cual se produce un cambio en el aumento o disminución de actividad. Como se puede ver en la **gráfica 10**, se aprecia que en el rango de edad de mayores de 70 años es cuando se produce un aumento significativo de la actividad de GluAp (mU/mg crea) en el sobrenadante de la orina. Esto podría indicar un cierto deterioro de la función tubular renal a partir de dicha edad. Las disminuciones en las actividades de las tres enzimas en la fracción microvesicular cuando se expresan en mU/mg prot se explicarían por el aumento en la secreción de microvesículas que se produce con la edad y que se ha descrito en el párrafo anterior. Estos resultados demuestran que el aumento en la liberación de microvesículas no iría acompañado de un aumento en la presencia de estas enzimas.

## 6. CONCLUSIÓN.

Se han obtenido los valores de referencia de las tres enzimas (AlaAp, GluAp y DPP4) en las tres fracciones urinarias (sobrenadante, microvesículas y exosomas).

La excreción de GluAp en el sobrenadante aumenta con la edad y también está aumentada en los hombres con respecto a las mujeres.

## 7. AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén por permitirme hacer uso de sus instalaciones para poder desarrollar este Trabajo de Fin de Grado. También agradezco a mi tutora Rosemary Wangenstein Fuentes y su grupo de investigación por permitir realizar mi Trabajo de Fin de Grado.

## 8. REFERENCIAS.

1. Albiston AL, Yeatman HR, Pham V, Fuller SJ, Diwakarla S, *et al.* (2011). *Distinct distribution of GLUT4 and insulin regulated aminopeptidase in the mouse kidney.* Regul Pept 166: 83–89.
2. Bagshaw SM, George C, Dinu I, Bellomo R. 2008. *A multi-centre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients.* Nephrol Dial Transplant; 23: 1203–1210.
3. Bolignano D, Coppolino G, Campo S, Aloisi C, Nicocia G, Frisina N, Buemi M. 2008. *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients.* Nephrol Dial Transplant; 23: 414–416.
4. Borges FT, Reis LA, Schor N. *Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases.* Braz J Med Biol Res (2013) 46 (10): 824–30. doi: 10.1590/1414-431X20132964.

5. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. 2005. *Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma*. *Int. Immunol*; 17: 879–87.
6. Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. 2005. *Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes*. *J. Cell Sci.*; 118: 3631–8.
7. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR: *Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: systematic review*. *Kidney Int* 2008; 73: 1008–1016.
8. Ejaz AA, Mu W, Kang DH, Roncal C, Sautin YY, Henderson G, Tabah-Fisch I, Keller B, Beaver TM, Nakagawa T, Johnson RJ: *Could uric acid have a role in acute renal failure?* *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 16–21.
9. Fevrier B, Raposo G. *Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16:415–21.
10. Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R and Borràs FE. *Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases*. *Frontiers in immunology* (2015). Volume 6. Article 6.
11. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. *N Engl J Med* (2004) 351 (13): 1296–305. doi: 10.1056/NEJMoa041031.
12. Grange C, Tapparo M, Collino F *et al.* *Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche*. *Cancer Res.* 2011; 71: 5346–56.
13. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M *et al.* *Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68: 2667–88.
14. Iero M, Valenti R, Huber V *et al.* *Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity*. *Cell Death Differ.* 2007; 15: 80–88.
15. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Archer J *et al.* *Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway*. *Blood* 2009; 113:2732–41.

16. Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K. *Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: Evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins.* J. Cell. Physiol. 1991; 147: 27–36.
17. Kawai Y, Satoh T, Hibi D, Ohno Y, Kohda Y, Miura K, et al. 2009. *The effect of antioxidant on development of fibrosis by cisplatin in rats.* J Pharmacol Sci. 2009; 111: 433±439. PMID: 19966510.
18. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. *Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages.* J Transl Med (2011) 9:9. doi: 10.1186/1479-5876-9-9.
19. Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. *Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – The emerging science of cellular ‘debris’.* Semin. Immunopathol. 2011; 33: 455–67.
20. Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han WK, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon RW, Li L, Balakrishnan VS, Pereira BJG, Bonventre JV, Jaber BL: *Urinary N-acetyl- $\beta$  - ( D )-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure.* J Am Soc Nephrol 2007; 18: 904–912.
21. Lisowska-Myjak B (2010). *Serum and urinary biomarker of acute kidney injury.* Blood purif 29: 357–365.
22. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, et al. 2010. *Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis.* Lancet 375 (9731): 2073–81. doi: 10.1016/S0140-6736 (10) 60674-5.
23. Mause SF, Weber C. *Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange.* Circ. Res. 2010; 107: 1047–57.
24. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P: *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury.* J Am Soc Nephrol 2003; 14: 2534–2543.



25. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C *et al.* *Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells.* Nat. Commun. 2011; 2: 1–13.
26. Montoro-Molina S, Quesada A, Zafra-Ruiz PV, O'Valle F, Vargas F, de Gracia MC, *et al.* *Immunological detection of glutamyl aminopeptidase in urine samples from cisplatin-treated rats.* Proteomics Clin. Appl. 2015; 9: 630±635. <https://doi.org/10.1002/prca.201400096> PMID: 25470983
27. Nguyen MT, Devarajan P: *Biomarkers for the early detection of acute kidney injury.* Pediatr Nephrol 2008; 23: 2151–2157.
28. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL: *Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit.* J Am Soc Nephrol 2005; 16: 3046–3052.
29. Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. *Discovery of urinary biomarkers.* Mol Cell Proteomics (2006) 5 (10): 1760–71. doi: 10.1074/mcp.R600004-MCP200
30. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.* Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 2004; 101: 13368–73.
31. Quesada A, Vargas F, Montoro-Molina S, O'Valle F, Rodríguez-Martínez MD, Osuna A, Prieto I, Ramírez M, Wangensteen R. *Urinary aminopeptidase activities as early and predictive biomarkers of renal dysfunction in cisplatin-treated rats.* PLoS One. 2012; 7: e40402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040402> PMID: 22792302
32. Quesada A, Segarra AB, Montoro-Molina S, de Gracia MdC, Osuna A, O'Valle F, *et al.* (2017). *Glutamyl aminopeptidase in microvesicular and exosomal fractions of urine is related with renal dysfunction in cisplatin-treated rats.* PLoS ONE 12 (4): e0175462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175462>
33. Rabb H: *Novel urinary markers for early diagnosis of ARF.* Am J Kidney Dis 2003; 42: 599–600.
34. Royakkers AA, van Suijlen JD, Hofstra LS, Kuiper MA, Bouman CS, Spronk PE, Schultz MJ: *Serum cystatin C – A useful endogenous marker of renal function in intensive care unit patients at risk for or with acute renal failure?* Curr Med Chem 2007; 14: 2314–2317.

35. Sáinz J, Osuna A, Wangenstein R, Luna JD, Rodríguez-Gómez I, Duarte J, Moreno JM and Vargas F. *Role of sex, gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced hypertension*. Exp Physiol 89.2 pp 155–162. The Physiological Society (2004). DOI: 10.1113/expphysiol.2003.002652
36. Skog J, Würdinger T, van Rijn S et al. *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat. Cell Biol. 2008; 10: 1470–76.
37. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A: *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. J Clin Invest 2004; 114: 5–14.
38. Schwartz N, Hosford M, Sandoval RM, Wagner MC, Atkinson SJ, Bamburg J, Molitoris BA: *Ischemia activates actin depolymerizing factor: role in proximal tubule microvillar actin alterations*. Am J Physiol Renal Physiol 1999; 276:F544–F551.
39. Soni SS, Ronco C, Katz N, Cruz DN: *Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers*. Blood Purif 2009; 28: 165–174.
40. Tamai K, Tanaka N, Nakano T et al. *Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010; 399: 384–90.
41. Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld ABJ: *Biomarkers of acute renal injury and renal failure*. Shock 2006; 26: 245–253.
42. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV: *Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury*. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 290:F517–F529.
43. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc. Res. 2003; 59: 277–87.
44. Venkataraman R, Kellum JA: *Defining acute renal failure: the RIFLE criteria*. J Intensive Care Med 2007; 22: 187–193.
45. Wang D, Sun W. *Urinary extracellular microvesicles: isolation methods and prospects for urinary proteome*. Proteomics (2014) 14 (16): 1922–32. doi: 10.1002/pmic.201300371.

46. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. *Cisplatin nephrotoxicity: a review.* Am J Med Sci. 2007; 334: 115±124.  
<https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e> PMID: 17700201
47. Zhang Z, Humphreys BD, Bonventre JV: *Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region.* J Am Soc Nephrol 2007; 18: 2704–2714.