



Original

Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares enriquecidas en exosomas en pacientes españoles con enfermedad de Dent 1

Carla Burballa^a, Mònica Duran^b, Cristina Martínez^{b,c}, Gema Ariceta^{d,e}, Gerard Cantero-Recasens^b y Anna Meseguer^{b,e,*}

^a Departamento de Nefrología, Hospital del Mar, Barcelona, España

^b Grupo de Fisiopatología Renal, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, España

^c Grupo de Investigación Traslacional Vascular y Renal, IRB-Lleida, Lérida, España

^d Servicio de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, España

^e Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 22 de febrero de 2023

Aceptado el 13 de junio de 2023

On-line el 15 de junio de 2023

Palabras clave:

Enfermedad de Dent

Exosomas

Vesículas extracelulares

CLCN5

RESUMEN

Antecedentes y objetivo: La enfermedad de Dent tipo 1 (DD1) es una enfermedad hereditaria rara ligada al cromosoma X causada por mutaciones en el CLCN5 que se caracteriza principalmente por una disfunción del túbulo proximal, hipercalciuria, nefrolitiasis o nefrocalcinosis, enfermedad renal crónica progresiva y proteinuria de bajo peso molecular, rasgo distintivo de la enfermedad. En la actualidad no existe un tratamiento curativo específico, únicamente sintomático, y no previene la progresión de la enfermedad. En este estudio hemos aislado y caracterizado las vesículas extracelulares urinarias (uEV) enriquecidas en exosomas que nos permitirán identificar biomarcadores asociados a la progresión de DD1 y ayudarán a una mejor comprensión de las bases fisiopatológicas.

Materiales y métodos: A través de una convocatoria nacional de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) y la Sociedad Española de Nefrología Pediátrica (AENP), se obtuvieron orinas de pacientes y controles de distintos hospitales españoles, las cuales se procesaron para obtener los uEV. Los datos de estos pacientes fueron proporcionados por los respectivos nefrólogos o extraídos del registro RENALTUBE. Los uEV se aislaron mediante ultracentrifugación, fueron caracterizados morfológicamente y se extrajo su contenido de proteína y micro-ARN.

Resultados: Se seleccionó a 25 pacientes y 10 controles, de los cuales se procesaron las orinas para aislar los uEV. Nuestros resultados mostraron que la concentración relativa de uEV/ml era menor en los pacientes que en los controles ($0,26 \times 10^6$ vs. $1,19 \times 10^6$ uEV/ml; $p < 0,01$). Además, se vio que los uEV de los pacientes eran significativamente más grandes que los de los sujetos control (diámetro medio: 187,8 vs. 143,6 nm; $p < 0,01$). Por último, nuestros datos demostraron que se había extraído correctamente el ARN tanto de los exosomas de pacientes como de los controles.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ana.meseguer@vhir.org (A. Meseguer).

<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2023.06.005>

0211-6995/© 2023 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conclusiones: En este trabajo describimos el aislamiento y caracterización de uEV de pacientes con DD 1 y controles sanos, útiles para el posterior estudio de moléculas cargo diferencialmente expresadas en esta enfermedad.

© 2023 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Isolation and characterization of exosome-enriched urinary extracellular vesicles from Dent's disease type 1 Spanish patients

A B S T R A C T

Keywords:

Dent's disease
Exosomes
Extracellular vesicles
CLCN5

Background and objectives: Dent's disease type 1 (DD1) is a rare X-linked hereditary pathology caused by *CLCN5* mutations that is characterized mainly by proximal tubule dysfunction, hypercalciuria, nephrolithiasis/nephrocalcinosis, progressive chronic kidney disease, and low-weight proteinuria, the molecular hallmark of the disease. Currently, there is no specific curative treatment, only symptomatic and does not prevent the progression of the disease. In this study we have isolated and characterized urinary extracellular vesicles (uEVs) enriched in exosomes that will allow us to identify biomarkers associated with DD1 progression and a better understanding of the pathophysiological bases of the disease.

Materials and methods: Through a national call from the Spanish Society of Nephrology (SEN) and the Spanish Society of Pediatric Nephrology (AENP), urine samples were obtained from patients and controls from different Spanish hospitals, which were processed to obtain the uEVs. The data of these patients were provided by the respective nephrologists and/or extracted from the RENALTUBE registry. The uEVs were isolated by ultracentrifugation, morphologically characterized and their protein and microRNA content extracted.

Results: Twenty-five patients and 10 controls were recruited, from which the urine was processed to isolate the uEVs. Our results showed that the relative concentration of uEVs/ml is lower in patients compared to controls (0.26×10^6 vs. 1.19×10^6 uEVs/ml, $P < 0.01$). In addition, the uEVs of the patients were found to be significantly larger than those of the control subjects (mean diameter: 187.8 vs. 143.6 nm, $P < 0.01$). Finally, our data demonstrated that RNA had been correctly extracted from both patient and control exosomes.

Conclusions: In this work we describe the isolation and characterization of uEVs from patients with DD1 and healthy controls, that shall be useful for the subsequent study of differentially expressed cargo molecules in this pathology.

© 2023 Sociedad Española de Nefrología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La enfermedad de Dent tipo 1 (DD1) es una enfermedad hereditaria rara descrita por primera vez en 1964¹, con unas 400 familias descritas hasta el momento. Se caracteriza por hipercalciuria y proteinuria de bajo peso molecular, que constituye el rasgo distintivo de la enfermedad². Los pacientes pueden desarrollar nefrocalcinosis, cálculos renales o enfermedad renal crónica³. En la DD1, el tráfico de vesículas y el transporte intracelular se interrumpen debido a mutaciones en el antiportador electrogénico $2Cl^- / H^+$ CLC-5 codificado por el gen *CLCN5*^{4,5} (OMIM # 300009). El *CLCN5* se encuentra en el cromosoma Xp11.22 y la isoforma más común contiene 746 aminoácidos⁶. El CLC-5 controla la acidificación y el reciclaje de los compartimentos endosomales, se expresa predominantemente en las células renales del túbulo proximal y se localiza en los endosomas y en la membrana apical⁶, aunque también se ha descrito en podocitos humanos⁶. La inactivación por

mutaciones en *CLCN5* produce una proteinuria de bajo peso molecular grave debido a una captación endocítica defectuosa en las células renales del túbulo proximal, que se ha asociado a la desaparición de megalina y cubilina en el *brush border* de dichas células renales⁵. Aunque la DD1 ha sido considerada como una enfermedad tubular, también se han descrito casos con lesiones de glomerulosclerosis focal en biopsias renales⁷.

El fenotipo de la DD1 se puede confundir con el de otros trastornos hereditarios relacionados que también conducen a enfermedad renal crónica, lo que dificulta el diagnóstico. Existe una considerable variabilidad intrafamiliar en la expresión clínica y progresión de la enfermedad, sin que haya sido posible establecer una correlación genotipo-fenotipo clara⁸⁻¹⁰. Actualmente, no hay tratamiento específico ni ensayos clínicos para esta enfermedad, por lo que la atención del paciente se centra en el tratamiento de la hipercalciuria y la prevención de la nefrolitiasis³.

Con el fin de entender en mayor profundidad las bases fisiopatológicas de la DD1, así como el de obtener nuevos

biomarcadores de progresión de la enfermedad, nuestro grupo ha propuesto un estudio basado en la obtención de vesículas extracelulares urinarias (uEV, por las siglas en inglés de *urinary extracellular vesicles*) enriquecidas en exosomas a partir de las cuales se puedan obtener perfiles de mi-ARN asociados a la enfermedad. Los exosomas parecen derivar de cada uno de los tipos de células epiteliales que se encuentran frente a la luz del túbulo renal¹¹ y, por lo tanto, pueden brindar información valiosa para monitorizar los cambios fisiológicos y patológicos en toda la nefrona a través de un procedimiento no invasivo como es la recolección y análisis de orina¹².

En este trabajo describimos la metodología utilizada para la obtención de las vesículas urinarias y su caracterización en pacientes con DD1 y en controles.

Materiales y métodos

Pacientes

Se recogieron las muestras de orina de 25 pacientes varones afectados de DD1 con diagnóstico genético confirmado y de 10 donantes sanos de la misma edad y sexo en diferentes hospitales de España para su procesamiento en el Hospital Universitari Vall d'Hebrón (Barcelona, España) (fig. 1A). El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Vall d'Hebrón (PR(AG)149/2020/ 314/C/2020). La tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) se calculó utilizando la fórmula CKD-EPI¹³.

Aislamiento de exosomas

El aislamiento de uEV se realizó de acuerdo con el protocolo previamente descrito por nuestro grupo¹⁴. Este proceso se muestra en el esquema de la figura 1B.

Nanoparticle tracking analysis

La cuantificación y distribución de la medida de los uEV se analizó mediante la técnica de *nanoparticle tracking analysis* (NTA) (NanoSight NS300, Malvern Instruments, Reino Unido). Dicho equipo utiliza la dispersión de la luz y el movimiento browniano para obtener la medida y la concentración de las partículas en suspensión^{15,16}. Dichos parámetros se registraron con una cámara de alta sensibilidad y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa NTA v3.1 (NanoSight Ltd., Malvern Instruments, Reino Unido) en el Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC), en la Universitat Autònoma de Barcelona (España).

Microscopía electrónica de transmisión criogénica

La microscopía electrónica de transmisión criogénica (Cryo-TEM) se realizó en el Centro de Microscopía de la Universitat Autònoma de Barcelona. Se aplicaron 10 µl de uEV diluidos en PBS 1x en rejillas Formvar-Carbon EM y se congelaron en etanol líquido enfriado a -179 °C. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 2011 a un voltaje de aceleración de 200 kV.

Extracción de proteínas exosomales

Los uEV en suspensión se incubaron con tampón de lisis 1:1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, pH 8, NaCl 300 mM, SDS 0,2%, NP-40 2%, desoxicolato de sodio 0,5%, PIC 1:200, NaF 1 mM, Na 3VO 1 mM) a 4 °C en rotación constante durante 1 h. A continuación, las muestras se sonicaron a máxima amplitud durante 5 ciclos de 5 segundos y, luego, se centrifugaron a 13.000 xg durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20 °C. Los lisados de uEV se procesaron y analizaron por *western blot*.

Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción del ARN de los lisados de uEV previamente caracterizados se utilizó el kit miRNeasy Mini (Qiagen). La cuantificación de los niveles de ARN se realizó utilizando el BioAnalyzer 2100 en combinación con el kit ARN 6000 Pico LabChip.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media ± error estándar de la media (SEM). La prueba t de Student (2 colas) fue utilizada para el análisis estadístico. Un valor de *p* menor de 0,05 fue considerado para indicar diferencias estadísticamente significantes. Los análisis estadísticos se hicieron con programa comercial (GraphPad Prism, versión 9 para MacOS, GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU.).

Resultados

Población de estudio

La DD1 es una enfermedad ultrarrara con un bajo número de pacientes diagnosticados. Por ello, para conseguir un número suficiente de pacientes para este estudio, se hizo una convocatoria nacional a través de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) y la Sociedad Española de Nefrología Pediátrica (AENP). Un total de 25 pacientes con mutaciones confirmadas en el gen *CLCN5* procedentes de 14 hospitales de España participaron en este estudio, de los que se recogieron muestras y datos clínicos (fig. 1A). También se incluyó a 10 controles sanos emparejados por edad y raza (todos los individuos estudiados eran varones). Los datos demográficos y clínicos de los pacientes confirmaron que no había diferencias significativas en la edad entre los 2 grupos (*p* = 0,67), pero mostraron que el 44% de ellos (*p* = 0,012) presentaban una función renal reducida (TFGe < 90 ml/min/1,73 m²) y el 52%, nefrocalcinosis (*p* = 0,0052) (tabla 1). No había diferencias significativas en el resto de los parámetros estudiados entre pacientes y controles.

Caracterización de las vesículas extracelulares urinarias

Las orinas de los pacientes y controles se procesaron para obtener los uEV como nuestro grupo ya ha descrito (fig. 1B)¹⁴. Los uEV enriquecidos en exosomas obtenidos de pacientes y controles se caracterizaron morfológicamente utilizando la técnica de cryo-TEM, que permite una visualización directa de las vesículas sin la adición de metales pesados ni fijadores,

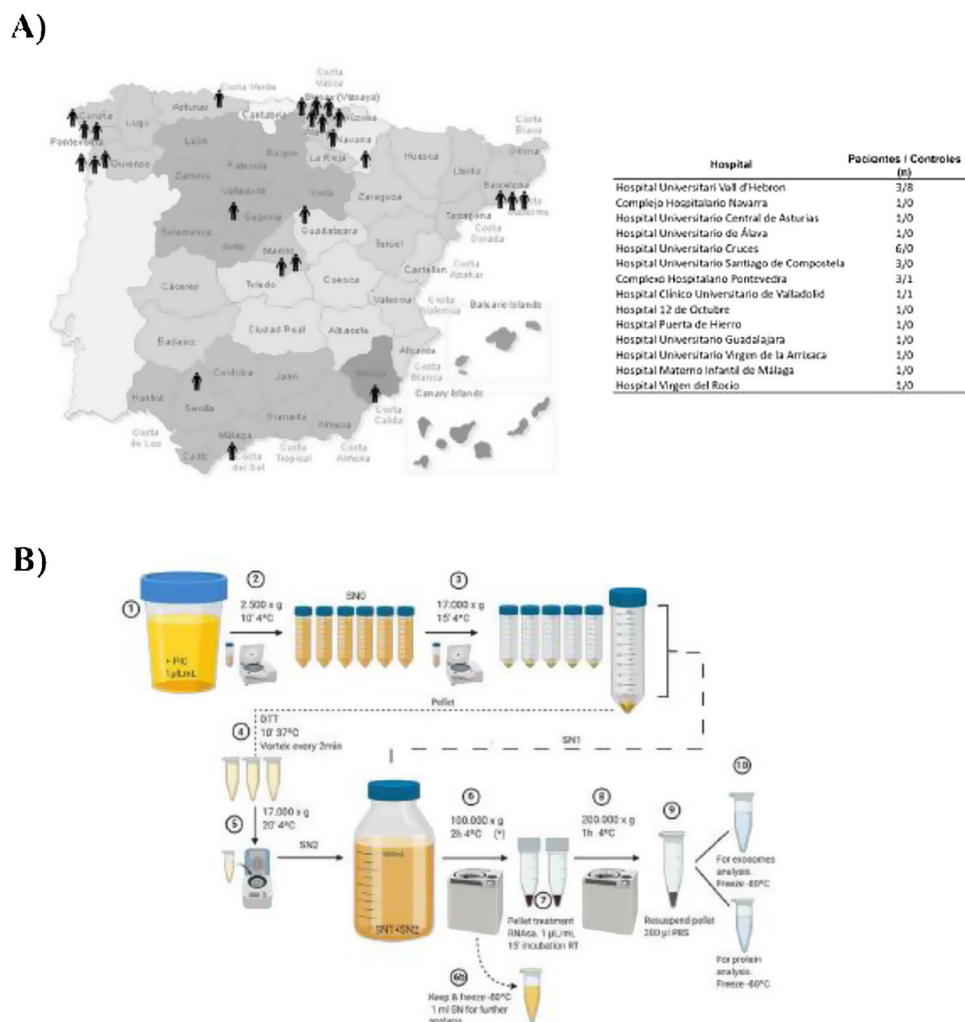


Figura 1 – Obtención de las muestras y aislamiento de uEV. A) Mapa de España con la distribución geográfica de los centros que participaron en este estudio. B) Representación gráfica del protocolo de extracción de uEV de la orina de pacientes o controles.

uEV: vesículas similares a exosomas urinarios.

Tabla 1 – Características clínicas de la cohorte (controles y pacientes)			
	Pacientes (n = 25)	Controles (n = 10)	p
Edad al último seguimiento, años mediana, [RIQ]	11,5 [4,75-19]	10 [8,5-25]	0,67
Sexo, masculino n (%)	25 (100)	10 (100)	>0,99
Enfermedad renal crónica			
Sin fallo renal (>90 ml/min/1,73 m ²)	12 (52,2)	10 (100)	0,0129
Estadio 2 (60-89 ml/min/1,73 m ²)	5 (21,7)	0 (0)	
Estadio 3 (30-59 ml/min/1,73 m ²)	3 (13)	0 (0)	
Estadio 4 (15-29 ml/min/1,73 m ²)	3 (13)	0 (0)	
Estadio 5 (<15 ml/min/1,73 m ²) o TRR	0 (0)	0 (0)	
Nefrocalcinosis, sí n (%)	13 (52)	0 (0)	0,0052
Litiasis, sí n (%)	4 (16)	0 (0)	0,303
Síndrome de Fanconi incompleto (glucosuria o aminoaciduria) n (%)	4 (16)	0 (0)	0,303
Raquitismo, sí n (%)	3 (12)	0 (0)	0,542

Negrita: diferencia significativa.
 RIQ: rango intercuartílico; TRR: terapias de reemplazo renal.

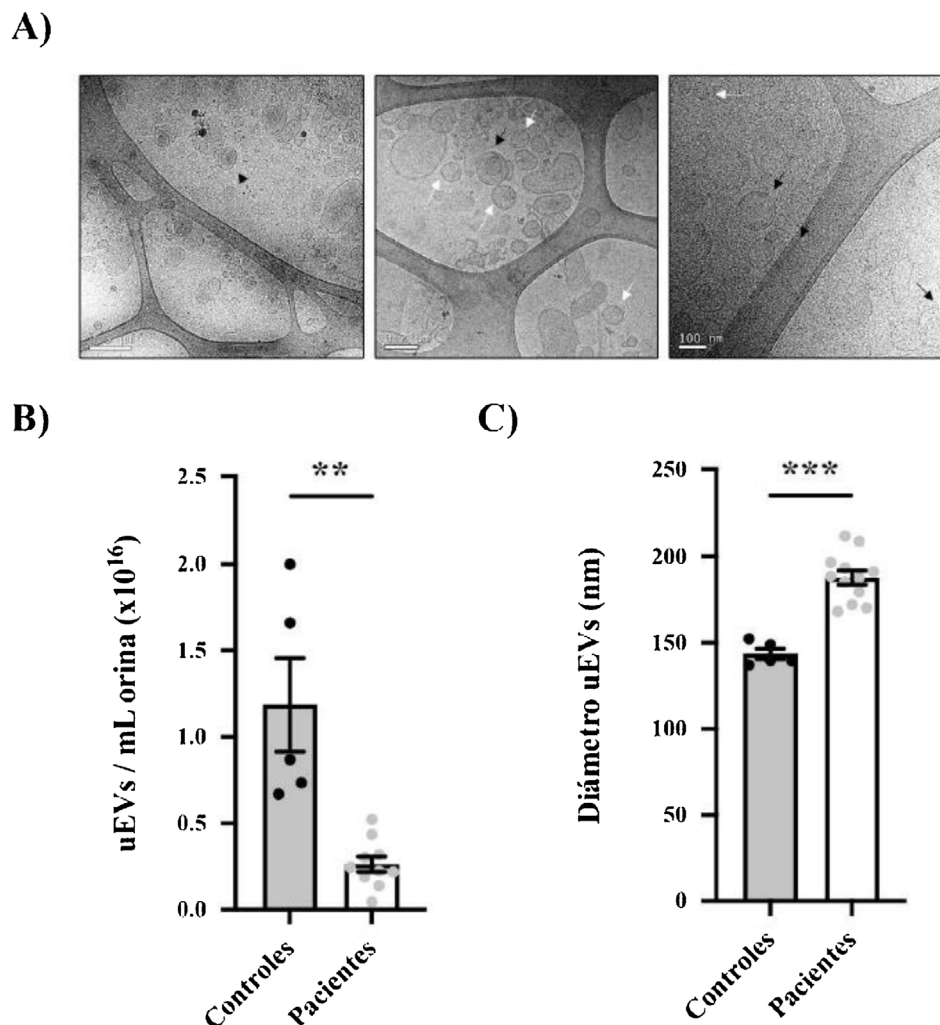


Figura 2 – Caracterización morfológica de los uEV de pacientes y controles. A) Micrografías de una muestra representativa con diferentes escalas (500 nm, 200 nm y 100 nm de izquierda a derecha) que muestran vesículas simples (flecha blanca), dobles (flecha negra continua) o multicapa (flecha negra discontinua). B) Cuantificación de la concentración de uEV por ml de orina en controles (círculos negros) o pacientes (círculos grises). Cada punto representa un sujeto. En la gráfica también se muestra la media \pm SEM. C) Cuantificación del diámetro de los uEV de controles (círculos negros) y pacientes (círculos grises). Cada punto representa la media del diámetro de los uEV para un único sujeto. La gráfica también muestra la media \pm SEM. CD81: grupo de diferenciación 81; GRP78: proteína reguladora de glucosa 78; HepG2: línea celular de carcinoma hepatocelular G2; uEV: vesículas similares a exosomas urinarios; SN: sobrenadante.

** $p < 0,01$.

*** $p < 0,001$.

que podrían causar artefactos. Nuestros resultados revelaron vesículas de una, 2 o varias capas, así como uEV de diferentes tamaños sin impurezas evidentes (fig. 2A).

La distribución de tamaño y la concentración relativa de uEV se evaluaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) en muestras seleccionadas al azar ($n=12$ pacientes, $n=5$ controles)^{15,16}. Fue muy interesante observar que la concentración relativa de uEV/ml era significativamente menor en pacientes que en controles ($0,26 \pm 0,04 \times 10^{16}$ vs. $1,19 \pm 0,27 \times 10^{16}$ uEV/ml; $p=0,0004$) (fig. 2B). Como se ve en la figura 2C, la mayoría de las vesículas detectadas tenían menos de 200 nm de diámetro, como se espera para los exosomas.

Cabe señalar como curiosidad que los exosomas de los pacientes eran significativamente más grandes que los de los sujetos control (diámetro medio $187,8 \pm 4,053$ vs. $143,6 \pm 2,994$ nm, respectivamente; $p < 0,0001$) (fig. 2C).

Por último, se evaluó la expresión de 2 marcadores asociados con exosomas (ALIX y CD81)¹⁷ mediante la técnica de western blot para confirmar la presencia de exosomas urinarios (fig. 3A). Ambos marcadores se detectaron en todas las muestras de exosomas (tanto en pacientes como en controles) y estuvieron ausentes en el sobrenadante de esas mismas muestras, que se utilizaron como control negativo para confirmar la ausencia de contaminación por restos celulares.

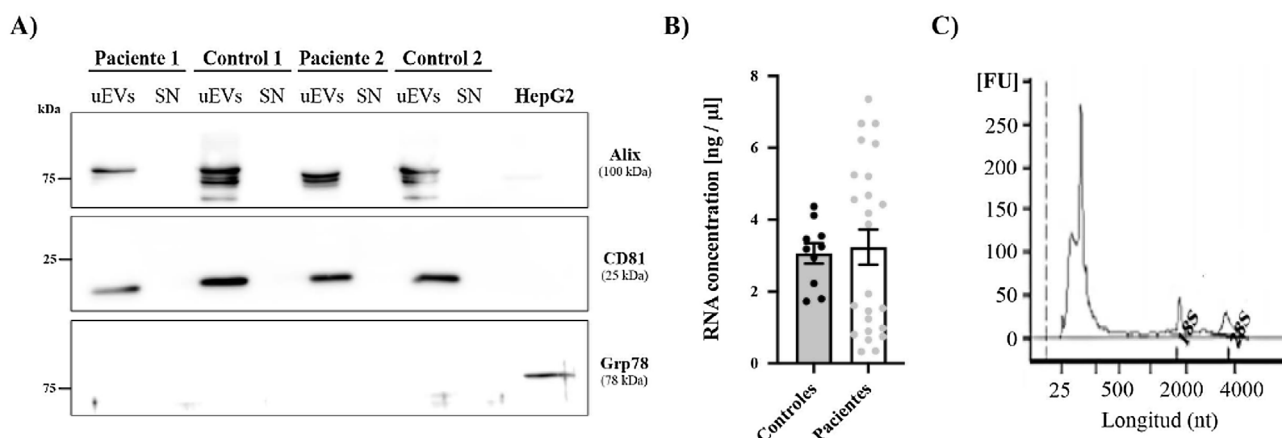


Figura 3 – ARN y proteína obtenidos de los uEV. A) Los niveles de Alix y CD81 (marcadores de exosomas) fueron analizados por *western blot* en muestras de pacientes y controles. El lisado de la línea celular HepG2 se utilizó como control positivo para la detección de Grp78, un marcador de retículo. **B)** Concentración de ARN ($\text{ng}/\mu\text{l}$) en muestras de controles (círculos negros) y pacientes (círculos grises). Cada punto representa un único sujeto. La gráfica también muestra la media \pm SEM. **C)** Electroferograma representativo que muestra una buena integridad del ARN obtenido de los uEV. En la gráfica se marcan los picos correspondientes al ARN ribosomal 18S o 28S.

FU: unidades arbitrarias de fluorescencia; nt: nucleótidos.

Además, utilizamos un marcador de retículo endoplásmico (GRP78) para demostrar la ausencia de estructuras intracelulares en las suspensiones de exosomas.

Cuantificación e integridad del ARN

El ARN extraído de los uEV se cuantificó utilizando el BioAnalyzer 2100. La cuantificación total de ARN no mostró diferencias entre controles y pacientes (fig. 3B) y se obtuvieron electroferogramas similares en todas las muestras, así como una buena integridad del ARN en todos los casos. Tal como se expone en el ejemplo de la figura 3C, se observa un pico alto correspondiente a ARN de 250 nt y 2 picos más bajos pero de mayor tamaño correspondientes al ARN ribosomal 18S o 28S (fig. 3C).

Discusión

El objetivo de este estudio ha sido identificar y seleccionar a pacientes españoles con diagnóstico genético confirmado de DD1 para el aislamiento y la caracterización de los uEV enriquecidos en exosomas tanto en su orina como en la de controles sanos. Además, se ha extraído el ARN de los uEV para determinar en un futuro el posible perfil diferencial de expresión entre pacientes y controles con el fin de identificar biomarcadores diagnósticos y de progresión, así como posibles dianas terapéuticas contra la DD1. De hecho, el análisis de muestras de orina es insustituible como método no invasivo para el diagnóstico y el seguimiento de algunas enfermedades, en particular, de las renales. A diferencia de la biopsia de tejido, procedimiento invasivo y no exento de complicaciones que solo permite obtener una muestra parcial del órgano, los uEV enriquecidos en exosomas proporcionan una representación completa de todo el sistema urinario y su estudio resulta atractivo en el campo del descubrimiento de biomarcadores. Se ha evaluado el uso potencial de los uEV como marcadores diagnósticos y pronósticos en estudios clínicos, así como su

contribución en procesos fisiopatológicos utilizando modelos experimentales¹⁸⁻²⁰.

Aislamiento de exosomas

Las muestras de orina procedentes de pacientes de toda la geografía española fueron congeladas, tras una primera centrifugación, hasta su procesamiento. Aunque algunos autores han señalado que la congelación directa a -80°C podría conservar mejor los exosomas²¹, otros han demostrado que los exosomas y sus cargos son estables en la orina en diferentes condiciones de almacenamiento, al obtener resultados comparables con muestras recién procesadas o después de ciclos repetidos de congelación-descongelación²². Para el aislamiento de uEV, se prefirió el método de centrifugación diferencial a otras técnicas²³. No se han publicado datos previos sobre uEV en pacientes con DD1 y, por lo tanto, se desconocía la eficiencia del aislamiento de exosomas por muestra de orina en estos pacientes poliúricos, que, además, tienen la endocitosis y la vía endolisosomal afectadas (las cuales están involucradas en la formación de exosomas).

Esta técnica ha sido muy utilizada en nuestro laboratorio y ya ha demostrado su eficacia en el aislamiento de exosomas para estudiar otra tubulopatía rara renal que cursa con poliuria¹⁴.

Diferencias en el número y tamaño de los exosomas

La cuantificación de los uEV mediante la técnica de NTA mostró una concentración sustancial de ellos, aunque muy variable entre muestras individuales. Esta variación fue independiente del filtrado glomerular o del grado de proteinuria, pero otros factores podrían desempeñar un papel, como la cantidad de proteína Tamm Horsfall. Es interesante constatar que se observó que los pacientes tenían casi 5 veces

menos concentración de uEV/ml de orina que los controles. Este hecho puede estar relacionado con la poliuria con la que cursan los sujetos afectados por DD1.

No obstante, también se observaron diferencias significativas en el tamaño de los exosomas de los pacientes en comparación con los de los controles, como ya ha sido comentado. Una posible hipótesis sería que algunos defectos en la vía endolisosomal, resultado de la disfunción de ClC-5, produjeran, por algún mecanismo aún desconocido, la liberación de vesículas de mayor tamaño en pacientes con DD1 que en controles. De hecho, este cambio en el tamaño también podría explicar la reducción en el número de partículas entre pacientes y controles: se libera menos cantidad de exosomas, pero estos son más grandes.

La disfunción tubular que se produce en la enfermedad de Dent podría tener impacto en la producción y liberación de exosomas, ya que su biogénesis comienza en el sistema endosomal, donde los endosomas tempranos maduran a endosomas tardíos o a cuerpos multivesiculares²⁴. El antiportador electrogénico ($2\text{Cl}^-/\text{H}^+$) ClC-5 se localiza en los endosomas tempranos y tiene un papel muy relevante en el tráfico de vesículas y el transporte intracelular^{4,5}, que se altera cuando se producen mutaciones en el gen *CLCN5*, como ocurre en la enfermedad de Dent. Asimismo, se ha señalado que el destino de los cuerpos multivesiculares, ya sea su degradación o la secreción de exosomas, depende de la homeostasis celular, probablemente alterada en pacientes con enfermedad de Dent. Los cuerpos multivesiculares pueden dirigirse a los lisosomas, donde su contenido es degradado, o transportados a la membrana plasmática para la liberación de exosomas²⁵. Poco se sabe sobre los mecanismos moleculares y celulares que regulan este equilibrio y el rol de ClC-5 en estos procesos está por determinar.

En otras enfermedades, como las demencias neurodegenerativas, se ha visto también una reducción en la concentración de vesículas extracelulares en el plasma, con un incremento de su tamaño²⁶. Sin embargo, aún no se ha reportado en la literatura ningún mecanismo que explique este cambio. Por otro lado, Paulaitis et al. han caracterizado las distribuciones de tamaño de exosomas basándose en la escala dinámica del crecimiento de cuerpos multivesiculares en la vía de biogénesis de exosomas²⁷. Estos autores encuentran diferencias estadísticamente significativas en los exponentes de escala que caracterizan las distribuciones de tamaño de exosomas en muestras de suero de pacientes con cáncer comparados con los de donantes sanos. Estos autores consideran que tales cambios podrían reflejar alteraciones en la composición de la membrana de los exosomas y proponen que se podría considerar el exponente de escala como un biomarcador biofísico comparable a los biomarcadores bioquímicos de exosomas y complementario a ellos, en particular, las proteínas de membrana específicas, como las tetraspaninas.

Conclusiones

En este estudio hemos aislado y caracterizado por primera vez exosomas de pacientes con DD1. De hecho, la caracterización morfológica de dichos exosomas ha mostrado que hay una disminución de su concentración en la orina conjunta-

mente con un incremento de su tamaño. Aunque no tenemos una explicación para justificarlo, un estudio en profundidad con relación a esta observación debería permitir observar el posible papel de ClC-5 en la biogénesis de los exosomas. Finalmente, estos resultados permitirán estudiar los micro-ARN obtenidos de los exosomas urinarios para obtener posibles biomarcadores y dianas terapéuticas para la enfermedad de Dent.

Contribución de los autores

AM concibió y diseñó el proyecto. CB y MD llevaron a cabo la parte experimental. AM, CB y GCR analizaron e interpretaron los datos. AM preparó el borrador del artículo. CB, MD, CM, GCR, GA y AM participaron en la revisión y la redacción del manuscrito final.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado principalmente por la fundación SENEPRO (SEN2019 a AM), por ASDENT y por subvenciones del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF201789989 a AM) y de la Red de Investigación Renal REDinREN (12/0021/0013). El Grupo de Fisiopatología Renal tiene la Mención de Calidad de la Generalitat de Cataluña (2017 SGR).

Conflicto de intereses

Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos a la asociación de pacientes ASDENT (www.asdent.es) por su apoyo continuado; sin ellos, este proyecto no habría sido posible. Damos las gracias también a todos los miembros del Grupo de Fisiopatología Renal por las valiosas discusiones. Este trabajo refleja solamente el punto de vista de los autores.

MD fue contratada gracias a la generosa contribución de ASDENT y CB consiguió una beca del programa PhD4MD para médicos del VHIR y el CRG.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dent CE, Friedman M. Hypercalcuric rickets associated with renal tubular damage. *Arch Dis Child*. 1964;39:240-9.
2. Beara-Lasic L, Cogal A, Mara K, Enders F, Mehta RA, Haskic Z, et al. Prevalence of low molecular weight proteinuria and Dent disease 1 *CLCN5* mutations in proteinuric cohorts. *Pediatr Nephrol*. 2020;35:633-40.
3. Devuyst O, Thakker RV. Dent's disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:28.
4. Günther W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8075-80.
5. Christensen EI, Devuyst O, Dom G, Nielsen R, van der Smissen P, Verroust P, et al. Loss of chloride channel ClC-5 impairs

- endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:8472–7.
6. Devuyst O, Christie PT, Courtoy PJ, Beauwens R, Thakker RV. Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet.* 1999;8:247–57.
 7. Wang X, Anglani F, Beara-Lasic L, Mehta AJ, Vaughan LE, Herrera Hernández L, et al. Glomerular pathology in dent disease and its association with kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11:2168–76.
 8. Claverie-Martín F, Ramos-Trujillo E, García-Nieto V. Dent's disease: Clinical features and molecular basis. *Pediatr Nephrol.* 2011, <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-010-1657-0>.
 9. Lourdel S, Grand T, Burgos J, González W, Sepúlveda FV, Teulon J. CLC-5 mutations associated with Dent's disease: A major role of the dimer interface. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2012;463:247–56.
 10. Gianesello L, Ceol M, Bertoldi L, Terrin L, Priante G, Luisa Murer L, et al. Genetic analyses in dent disease and characterization of CLCN5 mutations in kidney biopsies. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1–20.
 11. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:13368–73.
 12. Yáñez-M. M, Siljander PR, Zoraida Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:1–60.
 13. Coresh J, Astor BC, McQuillan G, Kusek J, Greene T, van Lente F, et al. Calibration and random variation of the serum creatinine assay as critical elements of using equations to estimate glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:920–9.
 14. Vall-Palomar, Arévalo J, Ariceta G, Meseguer F A. Establishment of urinary exosome-like vesicles isolation protocol for FHHNC patients and evaluation of different exosomal RNA extraction methods. *J Transl Med.* 2018;16:278.
 15. Vestad B, Llorente A, Neurauter A, Phuyal S, Kierulf B, Kierulf P, et al. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: A variation study. *J Extracell Vesicles.* 2017;6.
 16. Kastelowitz N, Yin H. Exosomes and microvesicles: Identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. *ChemBiochem.* 2014;15:923–8.
 17. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol.* 2018;9:738.
 18. Tang T-T, Lv L-L, Lan H-Y, Liu B-C. Extracellular vesicles: Opportunities and challenges for the treatment of renal diseases. *Front Physiol.* 2019;10:226.
 19. Behrens F, Holle J, Kuebler WM, Simmons S. Extracellular vesicles as regulators of kidney function and disease. *Intensive Care Med Exp.* 2020;8 Suppl 1:22.
 20. Jing H, Tang S, Lin S, Liao M, Chen H, Zhou J. The role of extracellular vesicles in renal fibrosis. *Cell Death Dis.* 2019;10:367.
 21. Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* 2006;69:1471–6.
 22. Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, Weiss RH. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark Med.* 2013;7:623–31.
 23. Fang S, Tian H, Li X, Jin D, Li X, Kong J, et al. Clinical application of a microfluidic chip for immunocapture and quantification of circulating exosomes to assist breast cancer diagnosis and molecular classification. *PLoS One.* 2017;12:7–9.
 24. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011;30:3481–500.
 25. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, Fernandez-Delgado I, Torralba D, Moreno-Gonzalo O, Baldanta S, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun.* 2016;7:13588.
 26. Longobardi A, Benussi L, Nicsanu R, Bellini S, Ferrari C, Saraceno C, et al. Plasma extracellular vesicle size and concentration are altered in Alzheimer's disease, dementia with lewy bodies, and frontotemporal dementia. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:667369.
 27. Paulaitis M, Kitty Agarwal K, Nana-Sinkam P. Dynamic scaling of exosome sizes. *Langmuir.* 2018;34:9387–93.