

¿Pueden el tratamiento con alanil-glutamina y el abordaje de depleción y enriquecimiento proteico peritoneal optimizar el análisis proteómico del efluente peritoneal y revelar nuevas aproximaciones fisiopatológicas?

Herzog R, Böhm M, Unterwurzacher M, Wagner A, Parapatics K, Májek P, et al. Effects of Alanyl-Glutamine Treatment on the Peritoneal Dialysis Effluent Proteome Reveal Pathomechanism-Associated Molecular Signatures. *Mol Cell Proteomics*. 2018;17:516-32.

Análisis crítico: **Marta Ossorio, Gloria del Peso, María Auxiliadora Bajo***

Servicio de Nefrología. Hospital Universitario La Paz. Madrid

NefroPlus 2018;10(2):42-44

© 2018 Sociedad Española de Nefrología. Servicios de edición de Elsevier España S.L.U.

■ Tipo de diseño y seguimiento

- Ensayo clínico fase I/II, prospectivo, abierto, aleatorizado y controlado de 2 períodos.

■ Asignación

- Aleatoria y cruzada.

■ Enmascaramiento

- Asignación y seguimiento no enmascarado.

■ Ámbito

- Departamento de Nefrología de la Universidad Médica de Viena (Austria).

■ Pacientes

- Se incluyeron 20 pacientes en diálisis peritoneal (DP), estables y sin episodios de peritonitis en los últimos 2 meses. Se recogieron 2 muestras de efluente peritoneal (EP) de cada paciente, que se obtuvieron tras la realización de 2 test de equilibrio peritoneal: uno con solución de DP convencional (Dianeal®, glucosa al 3,86%, Baxter IL, EE. UU.) y otro con dicha solución suplementada con alanil-glutamina (AlaGln) (8 mM, Dipeptiven, Fresenius). Los estudios se realizaron según un orden aleatorizado y con un intervalo entre ambos de 28 a 35 días.

■ Intervención

Se analizó la composición proteica del EP, y se comparó el estándar con el suplementado con AlaGln. Las muestras se procesaron mediante depleción de proteínas plasmáticas altamente prevalentes en EP y enriquecimiento posterior de proteínas de baja abundancia (CPLL), según la técnica desarrollada previamente en EP artificial. Inicialmente se incubó el EP enfrentándolo a una librería de péptidos ligando (CPLL), y se sometió a un análisis mediante electroforesis diferencial bidimensional (2D-DIGE), que permitió equilibrar la proporción de proteínas altamente prevalentes e identi-

car y retener a las proteínas menos abundantes, que, en consecuencia, quedaron relativamente enriquecidas. Posteriormente se realizó un análisis preciso de separación, detección y cuantificación de estas mediante preparación de muestra asistida por filtro (FASP), tinción en geles de inmunofluorescencia, etiquetado isobárico de masas en tándem (TMT) y marcado diferencial de las muestras (TMT 6-plex). Posteriormente se mezclaron y se analizaron mediante inversión bidimensional inversa con espectrometría de masas por cromatografía líquida en fase (2D RP/RP LC-MS), seguido de estimación de abundancia computacional (Skyline y Top3) y cálculo de relación (Isobar).

■ Variables de resultado

Las variables principales fueron:

- La identificación de proteínas del EP tras el procesamiento de depleción y enriquecimiento proteico peritoneal (CPLL), y su comparación en soluciones suplementadas con AlaGln frente a estándar.
- La interpretación de los procesos biológicos implicados en función de la expresión proteica peritoneal, con o sin tratamiento con AlaGln, con extrapolación de estos sobre el riesgo peritoneal.

■ Tamaño muestral



El cálculo del tamaño muestral se basó en el parámetro de resultado primario "expresión de proteína de choque térmico total (HSP)" en células del EP, esperando al menos un 30% de aumento en la medición de proteínas implicadas después del tratamiento con AlaGln en comparación con el grupo de control; con una desviación estándar menor a los 50 puntos porcentuales, según lo observado en estudios previos ex vivo y la bibliografía relacionada.

■ Promoción

No consta.

*Revisión por expertos bajo la responsabilidad de la Sociedad Española de Nefrología.

■ RESULTADOS PRINCIPALES

Variables y resultados

- Mediante la técnica de depleción y enriquecimiento proteico (CPLL-FASP-TMT [CFT] LC-MS) se identificaron 2.506 proteínas en el EP, lo que supone un número 15 veces mayor del descrito en la bibliografía.
- De cada uno de los 20 pares de muestras que representan a un paciente, se identificaron 11.581 péptidos de promedio (rango, 7.574-14.234). Estos se asociaron a 1.289 proteínas identificadas (rango, 820-1.555) y a 1.322 grupos de proteínas (rango, 846-1.600).
- Con el enfoque CFT-LC-MS, la distribución de las proteínas identificadas se desplazó hacia la detección de las de origen celular, con una mayor proporción de las categorías “componente celular y organelas”, así como de los procesos biológicos metabólicos y celulares.
- El método CPLL no alteró la proporción proteica peritoneal, a diferencia de las técnicas de eliminación, y las proteínas plasmáticas (que se definieron con un patrón de proteínas típicas plasmáticas en relación con HPPDB [*human plasma proteome data base*]) se mantuvieron como las más prevalentes en EP.
- Se seleccionaron las 100 proteínas más abundantes y las 100 menos abundantes, en comparación con las plasmáticas, tratando de analizar sus roles biológicos. De entre las proteínas de mayor rango se identificaron 30 procesos con 13 subclases específicas (incluyendo “organización supramolecular fibrótica” y “desarrollo tisular”). De entre las proteínas de menor rango se identificaron 86 procesos con 21 subclases específicas (incluyendo la de “degranulación de neutrófilos”).
- En comparación con la suplementación de AlaGln sobre el EP, se identificaron 164 proteínas, de las que 85 estaban sobreexpresadas y 79, infraexpresadas. Esto incluyó 60 procesos biológicos asociados con 16 subclases específicas, principalmente relacionadas con la regulación inmune y del ARN.
- Las proteínas más abundantes en EP mostraron menos diferencias tras la suplementación con AlaGln y se centraron sobre todo en las redes IPA (*ingenuity pathway analysis*) de “Akt-Hsp”, “lipoproteínas y sistema del proteasoma” e “integrina B”. Los reguladores más fuertemente inhibidos incluyen interferón gamma (IFN- γ), factor transformador del crecimiento¹ y factor de crecimiento vascular (VEGF), lo que indica una regulación negativa de los procesos profibróticos y proangiogénicos. El uso de AlaGln también se relacionó con inhibición de la expresión de PRDM1 y VCAN (relacionados con fibrosis).
- El análisis de la variación de la muestra y la agrupación o *clustering* confirmaron que los cambios asociados con el tratamiento con AlaGln fueron más pequeños que el rango de variación entre pacientes.

Efectos secundarios

No se reportan y no se aplican al realizarse el estudio ex vivo.

■ CONCLUSIONES DE LOS AUTORES

El análisis proteómico del EP mediante la técnica (CPLL-FASP-TMT) permite identificar y cuantificar mayor número de proteínas (15 veces más de lo conocido) y mecanismos fisiopatogénicos derivados. La suplementación del EP con AlaGln se asocia con una menor actividad de los mecanismos asociados a la lesión de la membrana y con la restauración de los procesos biológicos implicados en las respuestas al estrés y la defensa del huésped.

■ COMENTARIOS DE LOS REVISORES

El estudio se basa en un potente análisis y enfoque metodológico a través de un ensayo clínico prospectivo y aleatorizado que cuenta con un tamaño muestral muy significativo dada la especificidad del tema que trata. Los autores aportan evidencias conceptuales en cuanto al tratamiento y análisis del EP como una de las más accesibles y directas fuentes de los biomarcadores implicados en los procesos biológicos relacionados con la DP (remodelado tisular y respuesta inmune de la membrana peritoneal). El estudio plantea el análisis del EP mediante la novedosa técnica de depleción y posterior enriquecimiento proteico CPLL, reforzando técnicas ya probadas sobre EP y ex vivo. Este abordaje permite salvar la excesiva prevalencia de proteínas plasmáticas y equilibrar las concentraciones de estas con las que derivan de procesos celulares, proporcionando la identificación de un mayor número de proteínas y procesos biológicos derivados, hasta 15 veces más que en abordajes previos. Además, el análisis individual de cada una de las 40 muestras de EP obtenidas minimiza la potencial pérdida de evidencia debida a la variabilidad interindividual entre pacientes y refuerza el tamaño muestral.

El estudio confirma la presencia de proteínas de mayor expresión relativa implicadas en procesos de fibrosis y formación de matriz extracelular derivados de la transición mesotelio mesenquimal (MMT) producida en la membrana peritoneal. Asimismo, se objetiva una menor expresión relativa de proteínas relacionadas con mecanismos de respuesta inmunitaria y al estrés oxidativo, que los autores proponen incluso como un primer paso para establecer el riesgo de infección peritoneal a nivel molecular. En el análisis com-

parativo de las muestras suplementadas o no con AlaGln, el estudio refuerza los resultados evidenciados en publicaciones previas, que asocian la suplementación con AlaGln con una mejor respuesta celular inmune, con menor riesgo de infecciones peritoneales, con un descenso de IFN- γ y un menor remodelado profibrótico, con menor expresión de TGF- β 1, VEGF, PRDM1 y VCAN. Desde los resultados obtenidos se plantean 2 abordajes de gran trascendencia clínica: *a*) la determinación de perfiles proteómicos que impliquen riesgo clínico para el paciente, tanto en términos de progresión a fibrosis o su mayor complicación (esclerosis peritoneal encapsulante), como de potencial riesgo incrementado de infecciones peritoneales, y *b*) la potencial modificación de los patrones proteicos del EP y, por tanto, de los procesos biológicos moleculares derivados, tras la suplementación de las soluciones de DP con factores como la AlaGln, propuestos como agentes dirigidos a nuevas dianas terapéuticas.

■ CONCLUSIONES DE LOS REVISORES

Ensayo clínico, prospectivo y aleatorizado, que analiza de forma novedosa el EP (mediante depleción y enriquecimiento proteico), que logra minimizar los sesgos relacionados con la variabilidad interindividual, los pequeños tamaños muestrales y la sobreexpresión de proteínas plasmáticas. Se identifican hasta 15 veces más proteínas en EP, asociándolas con procesos biológicos derivados, y se analizan comparativamente los efectos sobre estas de la suplementación de soluciones de DP con AlaGln, confirmando menor remodelado fibrótico y mayor inmunidad peritoneal.

■ CLASIFICACIÓN

Tema: Diálisis peritoneal

Subespecialidad: Análisis proteómico de efluente peritoneal

Tipo de artículo: Original

Palabras clave: Diálisis peritoneal. Efluente peritoneal. Ensayo clínico aleatorizado prospectivo. Estudio proteómico ex vivo. Depleción y enriquecimiento proteico de efluente peritoneal. Suplementación peritoneal con alanil-glutamina

NIVEL DE EVIDENCIA: Alto

GRADO DE RECOMENDACIÓN: Fuerte (Levels of Evidence CEBM. Universidad de Oxford: http://www.cebm.net/levels_of_evidence.asp o en la página web de Nefrología Basada en la Evidencia)

■ NOTAS CLÍNICAS

El EP es una fuente biológica inestimable, por su accesibilidad y riqueza biológica, para el estudio y seguimiento de los procesos asociados a la DP. Sin embargo, su procesamiento no ha sido fácil dadas sus características biológicas (abundancia de proteínas plasmáticas filtradas, concentración diluida en grandes volúmenes, variabilidad interindividual, etc.), y los abordajes realizados generalmente han incluido pequeños tamaños muestrales. Este estudio destaca por la optimización del abordaje proteómico del EP, y consigue la detección de un mayor espectro de proteínas implicadas en procesos biológicos claves, como la fibrosis y el remodelado peritoneal, y los mecanismos inmunes de defensa peritoneal. Además confirma la posibilidad de intervenir en estos procesos suplementando las soluciones de DP.

La suplementación del EP con AlaGln se relaciona con menor presencia de agentes importantes implicados en el remodelado profibrótico de la membrana peritoneal como TGF- β 1 y VEGF¹, que corrobora los datos obtenidos en un modelo de DP crónica en roedores². Además, la inhibición asociada a AlaGln de PRDM1 y VCAN, moléculas implicadas en el desarrollo de matriz extracelular y fibrosis, es también especialmente relevante.

Estos hallazgos plantean una nueva vía terapéutica a través del EP, de gran trascendencia clínica y accesibilidad, incluso extrapolable a otros procesos y líquidos peritoneales (ascitis, etc.), por lo que son necesarios más estudios.

Conflicto de intereses

Las autoras declaran que no tienen conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lopes Barreto D, Krediet RT. Current status and practical use of effluent biomarkers in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2013;62:823-33.
2. Ferrantelli E, Liappas G, Vila Cuenca M, Keuning ED, Foster TL, Vervloet MG, et al. The dipeptide alanyl-glutamine ameliorates peritoneal fibrosis and attenuates IL-17 dependent pathways during peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 2016;89:625-35.