



ARTÍCULO ORIGINAL

Electroforesis de proteínas en orina como herramienta en el diagnóstico de nefropatías

Amanda B. Mercado-Moreira,¹ Miguel M. Escobedo-Villarreal,² Ana M. Rivas-Estilla,³ Linda E. Muñoz-Espinosa,¹ Noemí Waksman-de Torres,⁴ Adelina A. Hernández-Hurtado,⁵ Rosario Salazar-Riojas,⁵ Concepción Sánchez-Martínez,⁶ Gabriela Alarcón-Galván,⁷ Paula Cordero-Pérez.¹

¹Unidad de Hígado, Hospital Universitario.

²Servicio de Trasplante de Órganos y Tejidos, Hospital Universitario.

³Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina.

⁴Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina.

⁵Departamento de Medicina Molecular y Terapia Celular, Oca Hospital.

⁶Unidad Renal, Hospital Universitario.

⁷Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario.
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Recibido: Marzo 2011. Aceptado: Julio 2011

PALABRAS CLAVE

Electroforesis bidimensional, rechazo agudo, nefropatía diabética, proteómica, proteinuria, México.

Resumen

El rechazo agudo al injerto renal sigue siendo la principal causa de fracaso en el trasplante renal de donador cadavérico. Actualmente, la forma de diagnosticarlo es a través de la biopsia renal; sin embargo, su obtención es costosa e invasiva. Nuestro objetivo fue desarrollar un método de electroforesis de doble dimensión para detectar proteínas en orina útiles en el diagnóstico de diferentes nefropatías. Se incluyeron tres grupos de estudio (n = 5 en cada uno): a) Grupo uno: Pacientes con trasplante renal con rechazo agudo al injerto confirmado por biopsia; b) Grupo dos: Pacientes con trasplante renal con evolución estable y c) Grupo tres: Pacientes con nefropatía diabética. Las proteínas urinarias fueron aisladas y separadas con un método casero estandarizado de electroforesis bidimensional validado con la determinación de precisión y exactitud. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se trató a las muestras con ultra-centrifugación seguida de la eliminación de albúmina y precipitación de las proteínas con acetona. Se identificaron proteínas urinarias por peso molecular y punto isoelectrico presentes diferenciadamente en cada grupo de estudio. Se encontraron siete proteínas típicas en el grupo uno y seis proteínas típicas en el grupo tres. Algunas de esas proteínas ya han sido reportadas previamente en grupos de pacientes similares donde utilizan también otras técnicas de proteómica, lo cual comprueba que la electroforesis bidimensional es una técnica confiable en la detección de proteínas urinarias. Estas proteínas podrían ser usadas como biomarcadores para identificar rechazo agudo al injerto y nefropatía diabética en pacientes susceptibles a estas condiciones.

Correspondencia: Dra. C. Paula Cordero Pérez. Avenida Gonzalitos No. 235, Col. Mitras Centro, Monterrey N.L. CP 64460. Teléfono: (81) 8329 4205, fax: (81) 8989 4088. Correo electrónico: paucordero@yahoo.com.mx

KEYWORDS

Two dimensional electrophoresis, acute graft rejection, diabetic nephropathy, proteomics, proteinuria, Mexico.

Urine protein electrophoresis as a diagnostic tool in nephropathies**Abstract**

Acute graft rejection remains the main cause of cadaveric kidney transplantation failure. Currently, the diagnosis can only be made by renal biopsy, which is costly and invasive. Our major objective was to develop a two-dimensional electrophoresis method to detect urine proteins useful in diagnosing different nephropathies. Three groups (five patients each one) were included and divided as follows: a) Group one: kidney transplanted patients with acute graft rejection confirmed by biopsy, b) Group two: kidney transplanted patients with stable graft function; and c) Group three: patients with diabetic nephropathy. Urine proteins were isolated and then separated by the in-house standardized two dimensional electrophoresis validated determining precision and accuracy. We identified the urine protein profile obtained in each studied group by identifying the protein isoelectric point and molecular weight. The best results were obtained when proteins were isolated by ultracentrifugation followed by albumin elimination and acetone precipitation. We found seven protein characteristics in group one and six proteins in group three. Some of these proteins have been reported previously in similar patients using proteomic tools, which endorse two dimensional electrophoresis as a reliable technique for detecting urine proteins. These proteins could be used as diagnostic biomarkers to identify acute graft rejection and diabetic nephropathy in suspected patients.

Introducción

El rechazo agudo continúa siendo la principal causa de fracaso en el trasplante renal de donador cadavérico que causa pérdida del injerto en el primer año post-trasplante con una incidencia de 15% a 25%.¹ La función renal es vigilada post-trasplante comúnmente con el seguimiento de las variaciones de las concentraciones de creatinina en suero; sin embargo, éste es un indicador poco sensible ya que está influenciado por cambios en la masa muscular y la secreción tubular.²⁻⁵ Actualmente el diagnóstico de rechazo agudo sólo puede confirmarse a través de la biopsia renal, la cual es un método costoso, invasivo y acarrea el riesgo de complicaciones tales como dolor, hematuria, hematomas, fístulas arterio-venosas, sepsis y shock. Además no puede detectar cambios tempranamente porque la función renal no siempre correlaciona con las alteraciones histológicas. Un error de muestreo es otro problema conocido.^{6,7}

En años recientes se ha incrementado el interés en la exploración del proteoma urinario humano, particularmente para el establecimiento de mapas que ayuden en el descubrimiento de biomarcadores auxiliares en el diagnóstico de diversos padecimientos, entre los que se encuentran las enfermedades renales.^{8,9} Dentro de las herramientas de la proteómica para la detección de proteínas se encuentra la electroforesis bidimensional; que consta de dos procedimientos: el isoelectroenfoque (IEE) en el cual las proteínas contenidas en muestras se separan de acuerdo a su punto isoelectro (pI) y la

electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en la cual las proteínas se separan de acuerdo a su peso molecular (PM). Posteriormente se puede realizar la identificación de las proteínas con el empleo de herramientas como la ionización asistida por la matriz mediante desorción con láser - tiempo de vuelo (MALDI-TOF). La concentración y purificación de las proteínas de las muestras es una parte importante en la metodología de la electroforesis bidimensional, para eliminar las interferencias. La orina contiene aniones y cationes que interfieren con el isoelectroenfoque de proteínas cuando se desea realizar la electroforesis bidimensional, por lo que es necesario eliminarlos. Se han descrito diferentes métodos de concentración y purificación de proteínas en orina, entre los cuales se encuentra la diálisis, liofilización, filtración, ultrafiltración y la precipitación.¹⁰ Reichelt y colaboradores utilizaron SELDI-TOF y encontraron dos proteínas características en un grupo de pacientes con rechazo al injerto renal, una de 25.71 kDa y otra de 28.13 kDa.⁷ Con esta misma metodología O'riordan y colaboradores reportaron la presencia de siete proteínas específicas (2, 2.8, 4.8, 5.9, 7, 19 y 25.7 kDa) en la orina de un grupo de pacientes que presentaron rechazo al injerto renal con rechazo confirmado por histología de acuerdo a la clasificación de Banff.⁹ Jain y colaboradores utilizaron electroforesis bidimensional, MALDI-TOF y análisis de Western blot, y encontraron que la zinc $\alpha 2$ glucoproteína, $\alpha 1$ microglobulina, $\alpha 1$ glucoproteína ácida e inmunoglobulina G estaban presentes en los

pacientes con nefropatía diabética (ND) con microalbuminuria, y ausentes en pacientes sin microalbuminuria.¹¹

Objetivo

Desarrollar un método de electroforesis bidimensional para la detección de proteínas en orina que sea útil para el diagnóstico de nefropatías como el rechazo agudo al injerto y la nefropatía diabética.

Métodos

Pacientes: En este estudio se incluyeron pacientes que fueron trasplantados de riñón de donador cadavérico en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, durante el periodo junio de 2006 a junio de 2008. Se incluyeron tres grupos de pacientes, un grupo de pacientes trasplantados con evolución estable ($n = 5$) donde la edad promedio fue de 40 ± 5 años. El valor promedio de diuresis fue 3500 ± 1216 mL/24 horas y creatinina sérica 1.1 ± 0.1 mg/dL; un grupo de pacientes trasplantados con rechazo agudo al injerto renal (RAIR) ($n = 5$), con edad promedio de 55 ± 8 años, presentó un valor promedio de diuresis de 1580 ± 610 mL/24 horas y creatinina sérica de 5.7 ± 4.4 mg/dL. Se les realizó biopsia del injerto renal para su evaluación histológica de acuerdo a la clasificación de Banff,¹² tres pacientes fueron Banff 1, un paciente con Banff 2 y un paciente con Banff 3, y 3) un grupo de pacientes ($n = 5$) con diagnóstico de nefropatía diabética. La edad promedio fue de 64.5 ± 10 años y presentaron un valor promedio de creatinina de 2.7 ± 0.9 mg/dL, diuresis de 1628 ± 572 mL/24 horas, proteínas en orina de 16.6 ± 2.3 g/24 horas y depuración de creatinina de 27.5 ± 18.3 mL/min (Tabla 1).

Preparación de las muestras: Las muestras de orina de los pacientes se recolectaron, centrifugaron a 3500 rpm durante siete minutos y almacenaron inmediatamente a -70°C en alícuotas de 4 mL. Se evaluaron cuatro procedimientos para el tratamientos de muestra: primero, precipitación con acetona; segundo, purificación de la muestra con un kit comercial (2D Clean up, Amersham) y precipitación con acetona; tercero, eliminación de albúmina con un kit comercial y precipitación con acetona y cuarto, ultrafiltración de muestra, eliminación de albúmina y precipitación con acetona. La precipitación con acetona se consistió en colocar 100 μL de muestra y 1 μL de coctel inhibidor de proteasas (CIP) (Amresco) con 1.5 mL de acetona a -20°C , se dejó precipitar durante 16 h a -20°C . Se centrifugó a 20°C durante 20 minutos a 3500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón de proteínas. Se re-suspendió en 100 μL de agua milliQ. Para el segundo tratamiento se utilizó el kit comercial para la purificación de las muestras, las proteínas de la solución obtenida se precipitaron con acetona. Para el tercer tratamiento se tomaron 100 μL de muestra adicionada con 1 μL de CIP y se usó el kit *Montage Albumin Deplete* (Millipore) para eliminar la albúmina, se precipitaron las proteínas con acetona. Para el cuarto tratamiento, 4 mL de muestra se ultracentrifugaron con

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio.

Variable	Estable (n = 5)	Rechazo Agudo (n = 5)	Nefropatía diabética (n = 5)
Edad (años)	40 ± 5	55 ± 8	65 ± 10
Género (M/F)	3/2	2/3	2/3
Creatinina sérica (mg/dL)	1.1 ± 0.1	5.7 ± 4.4	2.7 ± 0.9
Glucosa (mg/dL)	84 ± 14	150 ± 99	119.3 ± 47.1
Hemoglobina (g/dL)	10.4 ± 0.8	8.3 ± 0.5	10.5 ± 0.4
Diuresis (mL/24 horas)	3500 ± 1216	1580 ± 610	1628 ± 572

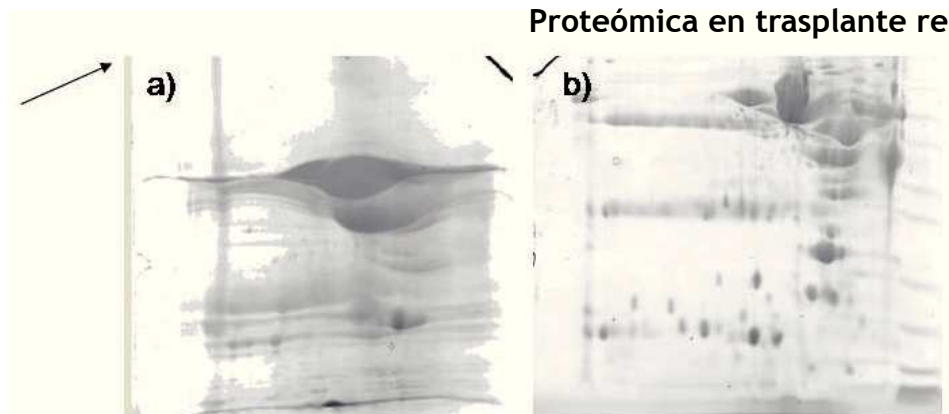
filtros de valor de corte de 10 KDa (Centricon, Millipore) a 9500 rpm a 20°C hasta que el volumen se redujo a 200 μL , se agregaron 2 μL de CIP. Se precipitaron las proteínas de acuerdo al protocolo antes mencionado. Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el kit 2D Quant (Amersham).

Electroforesis bidimensional: Para la primera dimensión se realizó el IEE con un equipo Protean IEF de Biorad durante cinco horas. Se utilizaron tiras de un gradiente de pH inmovilizado (IPG) de pH 3 a 10 de 7 cm (Amersham), se rehidrataron ($n = 3$) durante 12 horas con un volumen de muestra equivalente a 150 μg de proteína y buffer de rehidratación constituido por urea 8M, CHAPS 2%, buffer IPG 0.5%, DTT 20 mM y azul de bromofenol 0.002%. Se realizó la incubación de las tiras con un buffer de equilibrio constituido por 50mM Tris-HCl, 6M urea, 30% de glicerol, 2% de SDS y 0.002% de azul de bromofenol. La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE al 12% con un buffer de corrida constituido por 25mM de Tris-HCl, 192 mM de glicerina y 0.1% de SDS a un voltaje constante de 100V. La tinción de los geles se realizó con solución de azul de Coomassie.

Digitalización de geles: Los geles se digitalizaron con el equipo ImageScanner II (Amersham) a 300 dpi con un filtro rojo, y se analizaron con el programa ImageMaster 2D Platinum (Amersham) para verificar la presencia de proteínas características en cada grupo.

Validación del método: Se revisó la precisión y exactitud del método para el cálculo del PM y pl para lo cual se agregó a 15 muestras 20 μg de calibrador que contiene tripsinógeno, proteína con pl 9.3 y PM de 24 kDa. En el reporte de los geles adicionados, se buscó la mancha que correspondiera al calibrador. Se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de pl y PM para calcular la precisión del método para el cual se tomó como aceptable un $\text{CV} \leq 5\%$. Para verificar la exactitud del método para el cálculo de pl y PM se aplicó la prueba *t* de Student con el programa Excel.

Figura 1. a) Gel 2DE representativo de una muestra tratada con precipitación con acetona, limpieza con kit comercial y precipitación. b) Gel 2DE representativo de una muestra tratada con ultrafiltración para concentración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona.



Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de las proteínas que se catalogaron como características de cada grupo y considerando como grupo de verdaderos negativos a los pacientes con evolución estable.

Resultados

Procedimientos de pre-tratamiento: Pasos 1 y 2: Precipitación con acetona y purificación y precipitación con acetona. Los geles obtenidos no ofrecieron resolución, además presentaron dos o varias proteínas muy abundantes que pudieran enmascarar la presencia de otras proteínas presentes en menor concentración. Debido a la baja resolución de las manchas se descartó para emplearlos con las muestras antes del análisis definitivo de las muestras de los pacientes incluidos en este estudio. Paso 3: Eliminación de albúmina y precipitación con acetona. La concentración final obtenida de proteínas de las muestras, fue la cantidad mínima recomendada para la tinción con azul de Coomassie, de acuerdo al tamaño de tira de IPG que se utilizó en este trabajo, por lo que se decidió no realizar la electroforesis bidimensional.¹³ Paso 4: Ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona. Se pudo apreciar una mayor diversidad de las manchas presentes en la muestra; sin embargo la definición e intensidad de las mismas aún no se consideró suficiente, por lo que se aumentó la concentración de proteína añadida de 100 µg a 150 µg.

Este pre-tratamiento fue el que se utilizó para procesar todas las muestras incluidas en este proyecto para todos los grupos de estudio (Figura 1).

Precisión del método: Los resultados del cálculo de promedio, desviación estándar y coeficiente de variación se presentan en la Tabla 2. Tanto en pl como en PM el coeficiente de variación fue inferior a 5% por lo tanto se consideró que el método tuvo una precisión aceptable.

Proteómica en trasplante renal

Exactitud del método: Los resultados de la aplicación de la prueba *t* de Student para el cálculo de la exactitud de método en la determinación del PM y pl se muestran en la Tabla 2. El valor crítico de *t* (2.14) fue superior al valor del estadístico *t* (1.97) lo que significó que el método tuvo la exactitud requerida para un nivel de confianza $p = 0.05$ para el cálculo del pl y del PM.

Comparativo entre grupos, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN): En los grupos de ND y RAIR se observó mayor resolución de las manchas con PM abajo de 25 kDa; sin embargo, se observó mayor diversidad de proteínas en los geles del grupo de pacientes con RAIR.

En el grupo de pacientes con trasplante renal de evolución estable, un paciente presentó un patrón electroforético diferente al de los otros cuatro pacientes. En tres de los otros cuatro pacientes se pudo detectar la presencia de una mancha muy intensa a un pl de 6.3 y PM de 66.5 aproximadamente, que no puede considerarse como característica del grupo ya que también se presentó en los geles de los pacientes de los grupos de ND y RAIR. Después del análisis de las imágenes se encontraron tres proteínas en el grupo ND que estuvieron presentes en cuatro de cinco pacientes, con 4.8 y 50, 6.4 y 31.5 pl y PM respectivamente, que tuvieron resultados de sensibilidad 80%, especificidad 100%, VPP 100% y VPN 83%, y la otra de 5.9 pl y 14 kDa que mostró una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 80%, inferior a las otras ya que estuvo presente en uno de los pacientes con evolución estable (Tabla 3).

En el grupo de pacientes con RAIR se encontraron dos proteínas que estuvieron presentes en los cinco pacientes con 5.5 y 34, 6.8 y 14.4 pl y PM respectivamente para las cuales los resultados de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fue de 100% y otras dos proteínas estuvieron presentes en cuatro de los cinco pacientes con 5.2 y 32, 8.5 y 18 pl y PM respectivamente en las que tuvieron

Tabla 2. Análisis estadístico para la validación del método.

	PM	pl
Promedio	23.5	9.2
Desviación Estándar	1	0.2
Coefficiente de variación	4.2	2
Estadístico <i>t</i>	1.974	2.085
Valor crítico	2.145	2.145

PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico.

resultados de sensibilidad 80%, especificidad 100%, VPP 100% y VPN 83% para cada una de ellas (Tabla 3).

Discusión

Se han descrito diversos métodos para el pre-tratamiento de muestras de orina y algunos sugieren la combinación de técnicas de separación y concentración como la diálisis, la ultrafiltración y la precipitación con solventes.¹⁰ En este trabajo se probaron diferentes alternativas para el pre-tratamiento. Los mejores resultados se obtuvieron al combinar la ultrafiltración y la precipitación con acetona ya que se pudo obtener mejor resolución de las manchas y con 150 µg de proteína añadida a la tira se pudo apreciar mejor la diversidad de las manchas.

Khan y Packer utilizaron otras alternativas de pre-tratamiento de muestras de orina de sujetos sanos.⁸

Es importante hacer notar que el presente trabajo trata sobre pacientes con daño renal, en los que es común la alta excreción de albúmina a través de la orina. Debido a esto, el método de eliminación de albúmina en las muestras antes de someterse a la electroforesis bidimensional fue de vital importancia para poder visualizar las proteínas que se encontraban en menor proporción con respecto a la albúmina. Respecto a la precisión del método electroforético, se obtuvo un CV de 2% en el caso de pl y un CV de 4.2% para el PM; debido a que ambos valores de CV son inferiores a 5%, se estableció que el método es preciso para la determinación de pl y PM con un nivel de confianza de 95%. Y en el caso de la evaluación de la exactitud se aplicó la prueba *t* de Student a los valores obtenidos. El valor crítico de *t* (2.14) fue superior al valor del estadístico *t* (1.97) para el pl, al igual que para el PM se obtuvo que el valor crítico de *t* (2.14) fue superior al valor del estadístico *t* (2.08) lo que significó que el método tuvo la exactitud requerida para un nivel de confianza de 95%.

Diversos estudios, han evaluado la utilidad del análisis proteómico en pacientes con diversas nefropatías. Algunos de ellos emplearon SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time of Flight - Mass Spectrometry*) en pacientes con trasplante renal que presentaron rechazo agudo, donde identificaron proteínas de 6.5, 6.6, 6.7, 7.1 y 13.4 kDa;¹⁴ 19¹⁵ y de 25.7 kDa y 28.1 kDa⁷ como posibles biomarcadores de rechazo. En el presente estudio se encontraron proteínas de 14.4 kDa (pl 6.8), 18 kDa (4/5 pacientes) y 29 kDa en los cinco pacientes del grupo de rechazo, lo cual puede sugerir que se trate de las mismas proteínas.

Algunos estudios refieren la presencia en muestras de orina de α-1- microglobulina de pl 5.3 y PM 33 como

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de las manchas características en los grupos de rechazo agudo y nefropatía diabética.

Grupo	n pacientes	pl	MW (kDa)	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Rechazo agudo	5	5.5	34.0	100%	100%	100%	100%
	5	6.8	14.4	100%	100%	100%	100%
	4	5.2	32.0	80%	100%	100%	83%
	4	8.5	18.0	80%	100%	100%	83%
	3	4.6	23.0	60%	100%	100%	71%
	3	5.3	29.0	60%	100%	100%	71%
	3	5.5	22.5	60%	100%	100%	71%
Nefropatía diabética	4	4.8	50.0	80%	100%	100%	83%
	4	5.9	14.0	80%	80%	80%	80%
	4	6.4	31.5	80%	100%	100%	83%
	3	7.4	26.0	60%	100%	100%	71%
	3	4.9	14.0	60%	100%	100%	71%
	3	4.5	28.0	60%	100%	100%	71%

PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

característica de pacientes con daño tubular.^{16,17} En el presente trabajo se encontró una mancha de pI 5.5 y 34 kDa que podría corresponder a α -1-microglobulina.

En Rao y colaboradores realizaron el análisis proteómico de muestras de orina de pacientes con diabetes mellitus (DM) tipo 2 con macroalbuminuria, donde encontraron 11 proteínas expresadas diferencialmente por comparación de éste grupo con un grupo de pacientes con DM tipo 2, sin albuminuria. Entre las proteínas que encontraron, se identificó a calgranulina B, la cual tiene pI 6 y 13.2 kDa. En el presente trabajo en el grupo de pacientes con ND se detectó en cuatro pacientes una mancha de pI 5.9 y 14 kDa, es posible que se trate de la misma proteína.¹⁸

La biopsia renal es el *estándar de oro* para el diagnóstico de las nefropatías; sin embargo, su indicación es muy reservada debido a las complicaciones que pueden derivarse del procedimiento de su obtención. Por ello, no es frecuente indicar una biopsia renal en un paciente que clínicamente presenta una evolución satisfactoria en el pos-trasplante, tampoco en el paciente con la historia clínica típica de una ND. El objetivo de incluir a este grupo de estudio fue evaluar si la expresión de las proteínas era diferente con respecto al grupo RAIR, ya que también valdría la pena verificar la expresión de estas proteínas en cada nefropatía pre y pos-trasplante.

En el caso del paciente del grupo de evolución estable que presentó un patrón electroforético distinto del resto del grupo, dicho paciente presentó un proceso infeccioso de vías urinarias una semana posterior a la toma de la muestra de orina utilizada en este estudio. Lo que podría sugerir que esta técnica también puede ser de utilidad en la detección temprana de estos procesos.

Conclusión

La electroforesis bidimensional resultó tener una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN superiores a 80% en la detección de proteínas en orina, la cual podría llegar a ser parte de las herramientas de diagnóstico de las enfermedades renales y en el diagnóstico de rechazo al injerto; sin embargo, se requiere aumentar la cantidad de pacientes para definir si estas proteínas son específicas de cada grupo de estudio para poder considerarlos como biomarcadores.

Referencias

1. Clarke W. Proteomic research in renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2006;28:19-22.
2. Lamiere N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005;365:417-430.
3. Hewitt S, Dear J, Star R. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1677-1689.
4. Oetting W, Rogers T, Krick T, et al. Urinary B-2 Microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis* 2006;47:898-904.
5. Essaway B, Otu H, Choy B, et al. Proteomic analysis of the allograft response. *Transplantation* 2006;82:267-274.
6. Li B, Hartono Ch, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *NEJM* 2001;344:947-954.
7. Reichelt O, Müller J, Von Eggeling F, et al. Prediction of renal allograft rejection by urinary protein analysis using protein-chip arrays (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time of Flight-Mass Spectrometry). *Urology* 2006;67:472-475.
8. Khan A, Packer N. Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J Proteome Res* 2006;5:2824-2838.
9. O'riordan E, Orlova T, Mei J, et al. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004;12:3240-3248.
10. Thongboonkerd V, McLeish K, Arthur J, Klein J. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 2002;62:1461-1469.
11. Jain S, Rajput A, Kumar Y, et al. Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorders. *JAPI* 2005;53:513-520.
12. Colvin R, Cohen A, Saiontz C, et al. Evaluation of Pathologic criteria for Acute Renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1930-1941.
13. Berkelman T, Stenstedt T. 2-D Electrophoresis: using immobilized pH gradients. *Principles and Methods*. Amersham Biosciences; 1998.
14. Clarke W, Silverman B, Zhang Z, et al. Characterization of Renal Allograft Rejection by Urinary Proteomic Analysis. *Ann Surg* 2003;237:660-665.
15. Schaub S, Rush D, Wilkins J, et al. Proteomic-Based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:219-227.
16. Weber M, Verwiebe R. α 1-Microglobulin (protein HC): features of a promising indicator of proximal tubular dysfunction. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:683-691.
17. Tomlinson P, Dalton R, Hartley B, et al. Low molecular weight protein excretion in glomerular disease: a comparative analysis. *Pediatric Nephrol* 1997;11:285-290.
18. Rao P, Lu X, Standley M, et al. Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2007;30:629-637.