

## 71 NEW TARGETS FOR RENAL AND HEPATIC CYSTOGENESIS. THE ROLE OF PROTEOMICS IN THE KNOWLEDGE OF ADPKD

M. VIZOSO GONZÁLEZ<sup>1</sup>, A. CORDIDO<sup>1</sup>, V. CALVIÑO LOUZA<sup>1</sup>, C. DÍAZ RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, S. BRAVO<sup>2</sup>, MA. GARCÍA GONZÁLEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEPHROLOGY LABORATORY. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS-IDIS, COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>2</sup>PROTEOMIC UNIT. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS-IDIS, COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

**Introduction:** Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is the most common monogenic disorder characterized by developing fluid-filled cyst derived from the tubule epithelial cells in kidney, and several extrarenal manifestations as hepatic cysts (Polycystic Liver Disease, PLD). Different mechanisms have been related to the pathogenesis of renal and hepatic cystogenesis. The identification of the main cystogenic pathway has not been identified, and effective therapeutic approach to block cystogenesis remains undiscovered.

**Material and methods:** We have recollected kidney and livers from Pkd1<sup>cond/cond</sup>TamCre mice. This model has been used to describe developmental window for cystogenesis by the inactivation of Pkd1 gene at different points. We induced the inactivation of Pkd1 gene at postnatal day 10/11 (cystic window) and postnatal day 15/16 (non-cystic window) and sacrificed at postnatal day 30. Liver and kidney protein from wildtype and mutant animals were extracted for proteome analysis by mass spectrometry MALDI-TOF. We identified a number of protein and pathways related to cystogenesis by different bioinformatics approaches (Reactome, KEGG, FunRich, String).

**Results:** We have identified the renal and hepatic cystogenic proteome an ADPKD animal model. The Polycystic proteome is mainly characterized by 26 proteins that appear in cystic livers and 8 that disappeared according to the wildtype animals. The Polycystic kidney proteome identified 16 proteins that show up and 6 that disappear in mutants versus wildtypes. The major pathways related to these proteins involved signal transduction, immune system metabolism and metabolism of proteins. Moreover, specific signaling pathways like Vesicle-mediated transport and cell cycle have been identified related to polycystic development in liver, and in contrast to developmental biology and extracellular matrix organization seems to be implicated to in Polycystic kidney disease.

**Conclusion:** Our results described a list of new signaling pathways and possible targets for the development of specific therapeutic approaches for renal and hepatic phenotypes related to ADPKD. This data opens a new understanding of the molecular basis of the disease based on an organ specific protein profile of cystogenesis.

Key words (4): ADPKD, proteomics, novel targets, cystogenesis

## 72 BIOIMPRESIÓN 3D DE PSEUDONEFRONAS COMO UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA POLIQUISTOSIS RENAL

V. CALVIÑO LOUZA<sup>1</sup>, CR. TUBIO<sup>1</sup>, C. DÍAZ RODRÍGUEZ<sup>2</sup>, F. GUTIÁN<sup>3</sup>, A. GIL<sup>3</sup>, MA. GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE GENÉTICA Y DESARROLLO DE ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS DE SANTIAGO (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA (ESPAÑA)), <sup>2</sup>SERVICIO DE NEFROLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>3</sup>INSTITUTO DE CERÁMICA. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (USC) (SANTIAGO DE COMPOSTELA (ESPAÑA))

**Introducción:** La poliquistosis renal autosómica dominante es un grupo de enfermedades genéticas que causa fallo renal y que está caracterizada por la presencia de múltiples quistes a lo largo de la nefrona. Está asociada con otras manifestaciones extrarrenales (quistes hepáticos o pancreáticos, aneurismas, etc). Actualmente, los modelos in vitro para el estudio de la poliquistosis consisten en cultivos celulares en monocapa o en el interior de matrices. Es esencial un modelo de cultivo in vitro que reproduzca con mayor precisión las condiciones in vivo, tales como la forma y disposición celular, uniones célula-célula o célula-matriz extracelular y que permita aplicar flujo.

**Materiales y métodos:** Utilizando la tecnología de bioimpresión 3D creamos una estructura tubular en la que poder someter a células epiteliales renales a un flujo, mimetizando así, el ambiente de una nefrona. Este modelo consiste en la creación de un canal embebido en una matriz por impresión de filamentos de una biotinta sacrificable (con o sin células epiteliales). Esta biotinta sacrificable es un material que va a ser eliminado con el tiempo lo que conlleva a un canal hueco dentro de la matriz donde las células pueden crecer. Mediante la bioimpresión 3D será posible imprimir canales con diferentes tipos celulares y morfología mimetizando los diferentes segmentos de la nefrona.

**Resultados:** Esta técnica nos permite replicar pseudonefronas para monitorizar diferentes mecanismos relacionados a la detección del flujo por las células y la orientación celular. Hemos desarrollado un dispositivo por impresión 3D donde poder aplicar un flujo controlado a través de estos canales. Hemos estudiado las concentraciones óptimas para preparar diversas biotintas (gelatina, alginato) y matrices (colágeno, gelatina) que mejoren la resolución de la bioimpresión y la viabilidad celular.

Hemos conseguido que las células epiteliales desarrollan el cilio primario en el interior de los canales sin necesidad de serodeprivar las células (lo cual sí es necesario en un cultivo en monocapa), independientemente de la biotinta o matriz que se use.

Con este modelo in vitro, se han sometido a las células a un flujo de 100 µl/min (similar al del túbulo proximal) durante un día y no se han observado diferencias en la disposición de las células epiteliales, lo que sí se observa cuando las células endoteliales están sometidas a flujo.

**Conclusiones:** Este nuevo modelo nos permitirá estudiar los mecanismos moleculares implicados en la citogénesis, en un contexto donde se puede aplicar flujo y que mimetice más fielmente las condiciones in vivo.

## 73 ACCIÓN ESTRATÉGICA EN GALICIA PARA LA POLIQUISTOSIS RENAL: ESTABLECIMIENTO DE UN REGISTRO GALLEGO Y DIAGNÓSTICO GENÉTICO COMO UNA MEDIDA DE PREVENCIÓN COSTE EFICIENTE: RESULTADOS AÑO 2

L. BESADA CERECEDO<sup>1</sup>, A. BARCIA DE LA IGLESIA<sup>1</sup>, M. GARCÍA MURIAS<sup>1</sup>, N. ARHDA<sup>2</sup>, C. VÁZQUEZ GÓMEZ<sup>3</sup>, B. SOBRINO REY<sup>3</sup>, J. AMIGO LECHUGA<sup>3</sup>, A. CARRACEDO ÁLVAREZ<sup>3</sup>, G. \*GRUPO INVESTIGACIÓN GALCYST<sup>4</sup>, MA. GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLÓGICA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), <sup>2</sup>SERVICIO DE NEFROLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), <sup>3</sup>FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA (FPGMX). FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA (FPGMX) (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), <sup>4</sup>GRUPO INVESTIGACIÓN GALCYST. GRUPO INVESTIGACIÓN GALCYST (GALICIA/ESPAÑA)

**El trabajo corresponde a un grupo de trabajo o un estudio multicéntrico:**

\*Grupo Investigación GAL-CIST Ángel Alonso Hernández (Jefe de Servicio del Hospital Clínico Universitario de la Coruña) Pablo Bouza Piñeiro (Jefe de Servicio del Hospital Arquitecto Marcede-Ferrol). Alfonso Otero González (Jefe de Servicio del Complejo Ho

**Introducción:** Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal(AEG-PQR) pretende establecer un modelo de estrategia poblacional coordinada entre los hospitales de referencia de las distintas áreas sanitarias de Galicia para identificar, registrar y diagnosticar genéticamente a todas las familias con poliquistosis renal, que permita un mejor conocimiento de la enfermedad y mejor seguimiento de nuestros pacientes, todo ello, a un coste reducido.

**Material y métodos:** AEG-PQR no parte de cero. NefroChus cuenta con un registro histórico de 236 familias gallegas con PQR. Desde el 1 de Enero de 2016, 286 nuevas familias PQR han sido identificadas desde los hospitales pertenecientes a las tres áreas sanitarias gallegas: Coruña-Ferrol (CHUAC(54 familias),CHUF(22 familias) y CEE(0 familias)), Vigo-Ourense (CHUOU(39 familias),CHUVI(22 familias),CHUP(45 familias) y Povisa(14 familias)) y Santiago-Lugo (HULA(32 familias),HCB(20 familias) y CHUS(38 familias)), formando un registro total de 522 familias PQR. Cada centro remite al Registro Gallego de Enfermedad Poliquistica(ReGEP) una muestra del individuo probando junto con el árbol genealógico detallado de la familia. Se realiza el estudio genético y se elabora un informe de cada paciente.

**Resultados:** Del total de familias analizadas genéticamente hasta ahora, un 64%(n=185) portan mutación en el gen PKD1, de las cuales el 52% son truncantes (54%frameshift ins/del, 37% nonsense, 9% splicing), y por tanto, posibles RAPIDOS PROGRESADORES, y el 48% son no-truncantes (94%missense, 6%in-frame ins/del). El 19% de las familias (n=54) portan mutaciones en PKD2, siendo truncantes el 89% (27% frameshift ins/del, 40% nonsense, 33% splicing) y no-truncantes el 11% (100% missense). Un 12% de las familias son negativas para PKD1, PKD2 y GANAB y un 5% portan mutaciones en otros genes asociados a las formas comunes, raras y ultra-raras de PQR. Identificamos 1 familia con mutación en GANAB, siendo la primera familia gallega descrita hasta el momento con mutación en dicho gen.

**Conclusiones:** AEG-PQR ha sumado esfuerzos en el establecimiento del mayor registro Español de familias genéticamente caracterizadas. Mediante una estrategia de diagnóstico en contexto familiar somos capaces de diagnosticar a nuestros pacientes. Estableciendo un coste medio del test de diagnóstico de 600€ y de 15€ por la validación de la mutación en cada familiar, sólo con disponer de una media de 5 afectos por familia (dato subestimado, ya que en algunos casos carecemos de árboles genealógicos completos e información fenotípica) podemos hablar de un ahorro de 1.221.480€ al Sistema de Salud (coste de 344.520€ frente a 1.566.000€ que costaría analizar a todas las familias en la rutina asistencial). En el último año centraremos esfuerzos en la caracterización fenotípica de los pacientes y el establecimiento de los estudios de correlación genotipo-fenotipo.

## 74 ESTUDIO PROTEÓMICO DIFERENCIAL ASOCIADO A POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE EN MODELOS EMBRIONARIOS DE RATÓN

V. CALVIÑO LOUZA<sup>1</sup>, A. CORDIDO EUJO<sup>1</sup>, M. VIZOSO GONZÁLEZ<sup>2</sup>, S. BRAVO<sup>2</sup>, C. DÍAZ RODRÍGUEZ<sup>2</sup>, MA. GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE GENÉTICA Y DESARROLLO DE ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS DE SANTIAGO (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA (ESPAÑA)); UNIDAD DE PROTEÓMICA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS DE SANTIAGO (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA (ESPAÑA)), <sup>2</sup>SERVICIO DE NEFROLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA (ESPAÑA))

**Introducción:** La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es una enfermedad genética que cursa con formación de quistes a lo largo de las nefronas y que pueden dar lugar a fallo renal. Está asociada a otras manifestaciones extrarrenales como son la formación de quistes hepáticos o pancreáticos, aneurismas, etc. La PQRAD está causada por mutaciones en los genes PKD1, PKD2 y GANAB. Las variantes homocigotas en los genes PKD1 y PKD2 son incompatibles con la vida, por lo que el estudio en edades embrionarias podría ser de utilidad para conocer los mecanismos moleculares implicados en el inicio de la formación del quiste.

**Materiales y métodos:** Se extrajeron los riñones de embriones a día 15,5 y 16,5 de dos modelos animales de PQRAD con mutaciones germinales en los genes PKD1 (PKD1 del2-4) y PKD2 (PKD2 11-13). A estas edades embrionarias se empiezan a formar quistes renales y en edades posteriores la mortalidad de los mutantes es muy elevada no sobreviviendo al nacimiento. Se realizó un estudio combinado de dos tecnologías de espectrometría de masas: LC-MALDI mediante un MALDI TOF-TOF 4800 y LC-MS/MS mediante un MALDI-TripleTOF 6600 de mayor sensibilidad y se identificó el proteoma diferencial de dobles mutantes y de ratones sanos y las vías en las que están implicadas mediante la herramienta bioinformática Reactome.

**Resultados:** Hemos analizado el proteoma diferencial de riñones de embriones mutantes vs. sanos, e identificado así posibles proteínas candidatas implicadas en citogénesis. En el modelo de PKD1 hemos identificado 1 proteína en E15,5 y 6 en E16,5 y en el modelo de PKD2, 2 proteínas en E15,5 y 19 en E16,5 que sólo son detectadas en los dobles mutantes. También hemos identificado 37 proteínas en PKD1 E15,5; 20 en PKD1 E16,5; 20 en PKD2 E15,5 y 5 en PKD2 E16,5 que sólo son detectadas en los individuos sanos. Se analizó los procesos biológicos de estas proteínas y se vio que estaban implicadas en diferentes vías como metabolismo, transducción de señales, transcripción y sistema inmune pero que también lo estaban en otras vías como biología del desarrollo, transporte mediado por vesículas, homeostasis, ciclo celular, etc.

**Conclusiones:** Nuestros resultados permitirán conocer mejor los mecanismos moleculares implicados en los procesos de citogénesis, así como identificar posibles dianas terapéuticas dirigidas a evitar la formación quística.

# Resúmenes

## Genética y biología molecular

### 75 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN PKD1 Y PKD2 E INVESTIGACIÓN DEL RIESGO EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE (PQRAD)

R. PECES<sup>1</sup>, R. MENA<sup>2</sup>, C. PECES<sup>3</sup>, S. AFONSO<sup>1</sup>, R. SELGAS<sup>1</sup>, P. LAPUNZINA<sup>2</sup>, J. NEVADO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (MADRID), <sup>2</sup>GENÉTICA. HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (MADRID), <sup>3</sup>-. SESCAM (TOLEDO)

**Introducción:** La PQRAD es la enfermedad renal hereditaria más común producida por mutaciones en PKD1 o PKD2. La alta heterogeneidad alélica y la duplicación de los exones 1-32 de PKD1 como 6 pseudogenes en el cromosoma 16 complica el análisis molecular. El objetivo del estudio fue identificar nuevas mutaciones en PKD1 y PKD2 en una población de pacientes españoles con PQRAD.

**Métodos:** El análisis mutacional de ambos genes PKD se realizó en 70 familias, no relacionadas, con PQRAD utilizando la técnica de next-generation secuenciación (NGS). Para confirmar las mutaciones positivas se realizó secuenciación Sanger, mientras que en aquellos casos sin mutaciones, para examinar la presencia de grandes deleciones se adoptó la técnica de multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Resultados: Se identificaron 56 mutaciones en PKD1 (80%) (10 nonsense, 17 frameshift, 8 splicing, 4 in-frame in/del, 15 missense y 2 grandes deleciones) y 14 mutaciones en PKD2 (20%) (2 nonsense, 5 frameshift, 2 splicing, 1 in-frame in/del y 4 missense). Se identificaron mutaciones altamente patogénicas (proteína truncada) en el 51 % (36/70) de los pacientes de las cuales 29 fueron en PKD1 (52%) y 7 en PKD2 (50%). De todas las variantes identificadas el 50% fueron nuevas variantes y el 50% fueron variantes conocidas. Los pacientes con mutaciones en PKD2 tenían enfermedad más leve y fenotipos indistinguibles entre sí. Entre los varios tipos de mutaciones en PKD1 se observaron diferencias fenotípicas significativas.

**Conclusiones:** Este estudio demuestra la efectividad de estas técnicas en reducir, significativamente, el tiempo y el coste para el análisis simultáneo de la secuencia de PKD1 y PKD2, simplificando el diagnóstico genético de la PQRAD. El análisis de mutaciones en la población española con PQRAD, expande el entendimiento de la diversidad genética de los diferentes grupos étnicos, enriquece las bases de datos con las mutaciones y contribuye al consejo genético. Ello facilita en estos pacientes el diagnóstico precoz y la predicción de un pronóstico, proporcionando una información genética fundamental para establecer una intervención clínica.

### 76 INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN CaRS EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE RESPUESTA A CINACALCET EN DIÁLISIS

R. DE ALARCÓN<sup>1</sup>, P. CONESA<sup>2</sup>, S. ROCA<sup>1</sup>, B. ALBURQUERQUE<sup>2</sup>, MA. ROS<sup>2</sup>, J. PEDREGOSA<sup>2</sup>, G. ALVAREZ<sup>2</sup>, M. MOLINA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. HU. SANTA LUCIA (CARTAGENA), <sup>2</sup>BIOLOGÍA MOLECULAR. ANATOMÍA PATOLÓGICA. HU. SANTA LUCIA (CARTAGENA)

**Introducción:** Cinacalcet es un agente calcimimético que se une al receptor del calcio (CaRS) de la paratiroides y lo hace más sensible a las acciones del calcio extracelular y así reduce de forma significativa los niveles de paratohormona (PTH).

**Objetivo:** Determinar si los polimorfismos del gen CaRS (rs1501899; rs1042636; rs1801725; rs1801726; rs7652589), influyen en la variabilidad de respuesta a cinacalcet según niveles de PTH (100-500pg/ml) en pacientes en diálisis.

**Material y métodos:** Estudio observacional descriptivo de corte transversal, monocéntrico. 158 pacientes en tratamiento con cinacalcet, durante 12 meses (dosis inicial 30 mg). Variables: Etiología de enfermedad renal (ERC), tiempo en tratamiento sustitutivo (TSR), factores (FRCV) y eventos cardiovasculares (EVC), parámetros bioquímicos basales y a los 12 meses (PTH, Calcio, fósforo, albumina, PCR y ferritina, hemoglobina, metabolismo del hierro y perfil lipídico) y dosis a los 12 meses de cinacalcet. Análisis de genotipado de los polimorfismos estudiados del gen CaRS. Análisis estadístico por SPSS. 20 (nivel de significación p<0,05) y test de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para las frecuencias genotípicas y alélicas (p >0,05, cumple equilibrio, lo esperado no es diferente de lo observado).

**Resultados:** 158 pacientes en diálisis (143 hemodiálisis y 15 diálisis peritoneal). Mujeres (57; 36,1%) y varones (101; 63,9%); Edad media 63,92 ±15,5 años; tiempo TSR 63,54±56,4 meses. 41 pacientes (25,9%) no respondieron a cinacalcet vs 117 (74,1%), según niveles de PTH (665,80±335,07 vs 246,18±89,34; p=0,00). Las diferencias entre respondedores y no respondedores cada uno de los polimorfismos, se determinó por tablas de contingencia para los cuatro modelos de análisis genético (codominante, dominante, recesivo y por alelos), no hallándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ellos (p> 0,05) y observando de manera significativa menores dosis de tratamiento en aquellos pacientes con respuesta óptima a cinacalcet (p> 0,05). Las frecuencias de genotipos y haplotipos de cada uno de los polimorfismos, cumplen el HWE con p > 0,05.

**Conclusiones:** La Farmacogenética es todavía una herramienta incipiente en la investigación clínica, que podría dar datos de interés para el médico en la toma de decisiones. En nuestra muestra no existe influencia de los polimorfismos estudiados del gen CaRS en la susceptibilidad de respuesta a tratamiento con cinacalcet. La limitación de nuestro estudio y probablemente la falta de resultados, esté en relación al tamaño muestral, por lo que se hace necesario estudios con población más amplia.

### 77 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO MEDIADO POR CYP-450: CORRELACIÓN CON LOS HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS EN RIÑONES DE DONANTES CADAVER

J. VALLADARES<sup>1</sup>, S. MOTA<sup>2</sup>, E. LUNA<sup>1</sup>, R. HERNANDEZ GALLEGO<sup>1</sup>, R. MARTINEZ GALLARDO<sup>1</sup>, G. GERVASINI<sup>2</sup>, NR. ROBLES<sup>1</sup>, JJ. CUBERO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. HOSP INFANTA CRISTINA (BADAJOZ), <sup>2</sup>FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA (BADAJOZ)

**Objetivos:** En estudios previos hemos demostrado que los genes envueltos en la síntesis de eicosanoides vasoactivos se relacionan con la aparición de eventos cardiovasculares en los receptores de trasplante renal. En este estudio hemos correlacionado los hallazgos histopatológicos de la biopsia de injertos renales con la variabilidad genética de los donantes respecto al metabolismo del ácido araquidónico.

**Diseño y métodos:** Para este estudio se han utilizado muestras sanguíneas de 142 donantes cadáver a cuyos riñones se realizó biopsia renal pre-trasplante. La edad media de los donantes era 60,9±9,8 años, siendo 85 varones y 57 mujeres. En todos los casos se realizaron determinaciones de polimorfismos comunes en las vías que generan eicosanoides (CYP2C8\*3, CYP2J2\*7, CYP4A11 T8590C, CYP4F2 V433M, EPHX2 K55R, EPHX2 R287Q y EPHX2 3'UTR A/G) y se compararon con los hallazgos de lesiones arterioscleróticas, glomerulares e intersticiales en la biopsia así como con la puntuación final total.

**Resultados:** Se encontraron tres asociaciones significativas. El polimorfismo CYP4F2 V433M se asoció con lesiones arterioscleróticas (p=0.014), mientras que el polimorfismo EPHX2 R287Q se asoció con lesiones glomerulares e intersticiales (p=0.021 en los dos casos). No se encontraron asociaciones con el score total de daño.

**Conclusiones:** Los polimorfismos CYP4F2 V433M y EPHX2 R287Q estaban relacionados con lesiones glomerulares, intersticiales y arterioscleróticas en las biopsias pre-trasplante estudiadas. Estas variantes genéticas pueden afectar a la producción de eicosanoides vasoactivos y antiinflamatorios en el riñón y por lo tanto contribuir al desarrollo de lesiones en el injerto.

### 78 PAPEL DE LA CITOQUINA INTERLEUQUINA-17A EN EL DAÑO RENAL ASOCIADO A HIPERTENSIÓN

M. OREJUDO DEL RÍO<sup>1</sup>, RR. RODRIGUES DÍEZ<sup>2</sup>, R. RODRIGUES DÍEZ<sup>2</sup>, C. LAVOZ BARRIA<sup>4</sup>, J. EGIDO DE LOS RÍOS<sup>1</sup>, M. RUIZ ORTEGA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (MADRID), <sup>2</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PAZ-IDIPAZ (MADRID), <sup>3</sup>FARMACOLOGÍA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (MADRID), <sup>4</sup>NEFROLOGÍA. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (VALDIVIA, CHILE)

**Objetivos:** La nefropatía hipertensiva se caracteriza por alteraciones renales como fibrosis intersticial y periglomerular, atrofia tubular e inflamación. En este último mecanismo participan gran cantidad de citoquinas, quimioquinas y células del sistema inmune para reparar el tejido. Los linfocitos Th17 están implicados en la respuesta a patógenos extracelulares, en enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico y en enfermedades inflamatorias crónicas como la hipertensión. Actualmente, faltan aspectos por conocer acerca de la implicación de su principal citoquina efectora, interleuquina-17A (IL-17A), en estas patologías. Nuestro propósito es estudiar la participación de IL-17A en la progresión del daño renal asociado a hipertensión.

**Métodos:** Se evaluó la presencia de IL-17A mediante inmunohistoquímica en biopsias renales de pacientes diagnosticados con nefropatía hipertensiva y en riñones de un modelo de administración sistémica de Angiotensina II (dosis de 100 ng/Kg/min) en ratas Wistar durante dos semanas. Además, se realizó un modelo experimental en ratones macho C57Bl/6, administrando subcutáneamente IL-17A (dosis de 1,5 ng/g ratón) durante 15 días, midiéndose la tensión arterial y procesando los riñones para análisis por inmunohistoquímica y PCR cuantitativa.

**Resultados:** Se observaron tinciones positivas de IL-17A tanto en los pacientes hipertensos como en el modelo de administración de Angiotensina II. Por otro lado, la administración sistémica de IL-17A aumentó la tensión arterial de los ratones a los 15 días comparados con los controles (117 ± 4 vs 88 ± 3, n=7 p ≤ 0,05). El análisis por inmunohistoquímica del infiltrado inflamatorio en los riñones de estos ratones mostró un aumento significativo de los marcadores de linfocitos CD3, CD4 y de neutrófilos. Posteriormente, se evaluaron los niveles génicos renales de los componentes de la matriz extracelular fibronectina y colágeno-1 y los marcadores asociados a daño renal Kim-1 y N-gal. Los ratones tratados con IL-17A tenían niveles aumentados de estos dos últimos marcadores, mientras que no había cambios en los marcadores profibróticos comparados con los controles. Finalmente, estudiamos el marcador kaliceína-1, asociado a regulación de la presión arterial, y se observó en los ratones tratados con IL-17A un incremento, tanto en la expresión génica como por inmunohistoquímica, comparados con los controles.

**Conclusiones:** El aumento de la presión arterial incrementa la expresión de células que expresan IL-17A en el riñón. La infusión sistémica de IL-17A induce un daño renal, caracterizado por la presencia de células inflamatorias, el aumento de la expresión génica de marcadores de daño renal y el incremento en kaliceína-1, regulador de la presión arterial.

**79 LA DELECIÓN DEL LIGANDO DLK1 PROMUEVE LA APARICIÓN DE INFILTRADO INFLAMATORIO TRAS CATORCE DÍAS DE DAÑO RENAL EXPERIMENTAL**

L. MARQUEZ-EXPOSITO<sup>1</sup>, C. LAVOZ<sup>2</sup>, S. RAYEGO-MATEOS<sup>1</sup>, RR. RODRIGUES-DIEZ<sup>3</sup>, M. FIERRO<sup>4</sup>, R. RODRIGUES-DIEZ<sup>5</sup>, J. LABORDA<sup>6</sup>, S. MEZZANO<sup>7</sup>, S. LAMAS<sup>8</sup>, M. RUIZ-ORTEGA<sup>9</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGIA. IIS-FJD (MADRID), <sup>2</sup>NEFROLOGIA. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (CHILE), <sup>3</sup>IDI-PAZ. HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (MADRID), <sup>4</sup>INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (MADRID), <sup>5</sup>FARMACOLOGÍA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (MADRID), <sup>6</sup>BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. UNIVERSIDAD CASTILLA-LA MANCHA (ALBACETE), <sup>7</sup>INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (MADRID), <sup>8</sup>FACULTAD DE MEDICINA. UNICERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (MADRID)

**Objetivos e introducción:** El objetivo principal es estudiar el papel del ligando no canónico de la ruta Notch, DLK1 (epidermal growth factor-like protein Delta-like 1) en el daño renal experimental. Esta vía está altamente activada durante la embriogénesis, sin embargo, en el adulto se encuentra inhibida.

Recientemente se ha demostrado que en las patologías renales esta vía se sobreactiva. Se ha sugerido que DLK1 es un inhibidor de la vía de Notch *in vitro*; sin embargo, no hay estudios acerca de su papel *in vivo*.

**Métodos:** Se realizó el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UO) en ratones wild-type y en ratones con delección en el gen de DLK1 en la cepa SvJ-129. Se analizaron los resultados a los 2, 5, 10 y 14 días de la obstrucción.

**Resultados:** Se analizaron los ligandos Dlk1 y Dlk2 (homólogo de DLK1). A partir de 5 días de obstrucción, ambos genes aumentaron en los wild-type vs contralateral (Dlk1) y en los riñones obstruidos de los delecionados en DLK1 vs los riñones obstruidos de los wild-type (Dlk2).

Además, los riñones obstruidos en ausencia de DLK1 presentaron un aumento de NICD (Notch intracellular domain), fragmento de Notch que activa la expresión de los genes efectores, Hes y Hey. Se observó un aumento significativo en la expresión de dichos genes en los riñones obstruidos ausentes en DLK1 a 14 días al compararlos con los wild-type de Hes-1, y a 5 días en el gen de Hey-1. La tinción PAS reveló un aumento del infiltrado inflamatorio en forma de agregados focales en los riñones obstruidos delecionados en DLK1 a los 14 días. Estos agregados se asociaron a un aumento significativo de células infiltrantes CD3+, CD4+, F4/80+ y neutrófilos, así como de los linfocitos Th17. Además, se observó un ligero aumento en la expresión de MCP-1 y de la ruta NF-κB, destacando el aumento de la respuesta Th17 en los riñones obstruidos de los ratones deficientes en DLK1 vs wild-type, por aumento de la producción de IL17A y de los factores de transcripción Rorγt y STAT3.

**Conclusiones:** La delección de DLK1 promueve la sobreactivación de la ruta Notch en el UO, confirmando que DLK actúa como un antagonista endógeno de Notch en el riñón en procesos patológicos. Esta activación está asociada a una mayor presencia de infiltrado inflamatorio y activación de la respuesta Th17, demostrando la importancia de la vía Notch en procesos inflamatorios renales.

**80 EL BLOQUEO DE VEGFR2 EMPEORA EL DAÑO RENAL AGUDO INDUCIDO POR ÁCIDO FÓLICO**

RR. RODRIGUES-DIEZ<sup>1</sup>, L. MARQUEZ-EXPOSITO<sup>2</sup>, J. POVEDA<sup>3</sup>, L. OPAZO<sup>3</sup>, S. RAYEGO-MATEOS<sup>4</sup>, C. LAVOZ<sup>5</sup>, A. ORTIZ<sup>6</sup>, J. EGIDO<sup>7</sup>, S. MEZZANO<sup>8</sup>, M. RUIZ-ORTEGA<sup>9</sup>

<sup>1</sup>IDI-PAZ. HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (MADRID), <sup>2</sup>NEFROLOGIA. IIS-FJD (MADRID), <sup>3</sup>NEFROLOGIA. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (CHILE), <sup>4</sup>NEFROLOGIA. IIS-FJD (MADRID), <sup>5</sup>NEFROLOGIA. IIS-FJD, UAM (MADRID), <sup>6</sup>NEFROLOGIA. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (MADRID), <sup>7</sup>FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (MADRID)

**Introducción y objetivos:** El fracaso renal agudo (FRA) es una patología multifactorial para la que no existe tratamiento efectivo, y para la que se ha sugerido recientemente que estrategias que se dirijan a controlar la inflamación o procesos de muerte celular podrían ser potenciales opciones terapéuticas. Recientemente nuestro grupo ha demostrado que el bloqueo del receptor VEGFR2 disminuye el daño renal experimental, en los modelos de obstrucción unilateral ureteral y de daño mediado por Gremlin, al inhibir la respuesta inflamatoria, pero no hay datos en FRA. Nuestro objetivo ahora es el efecto del bloqueo del VEGFR2 en el FRA experimental.

**Métodos:** Se realizó un modelo de fracaso renal agudo por inyección intraperitoneal de ácido fólico [250mg/kg] en ratones de la cepa C57BL/6. Un grupo de ratones fueron inyectados diariamente con el inhibidor de la quinasa del VEGFR2, SU5416 [10mg/kg], comenzando 24h antes. Los ratones se sacrificaron a los dos días de la administración de ácido fólico para analizar los resultados.

**Resultados:** Se evaluó el daño histológico por PAS, observando que había más daño tubular agudo e infiltrado inflamatorio difuso en el grupo de ratones pinchados con ácido fólico tratados con el inhibidor SU5416 cuando los comparamos con los no tratados y con los controles sanos (estos últimos no presentaron lesiones). Por esta razón se decidió analizar por qRT-PCR los marcadores de daño renal KIM-1 y NGAL, cuya expresión génica estaba muy aumentada para ambos genes en los riñones tratados con el inhibidor SU5416 con respecto a los no tratados. La expresión proteica de NGAL aumentó de manera significativa en los ratones tratados con SU5416 vs los no tratados. También se estudió la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como MCP-1 y Rantes. No se vieron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque en MCP-1 se observó un ligero aumento con respecto a los no tratados. Sí que hubo un aumento significativo en los ratones inyectados con SU5416 con respecto a los no inyectados cuando se analizó el infiltrado inflamatorio por inmunohistoquímica del marcador de neutrófilos mieloperoxidasa. Sin embargo, no se observaron diferencias entre estos grupos en el marcador de linfocitos CD3.

**Conclusión:** La inhibición de la vía VEGFR2 por el SU5416 en el FRA induce mayor daño renal lo que demuestra que el bloqueo de esta ruta no es una buena opción terapéutica para el FRA, a diferencia de lo observado en modelos de daño renal progresivo.

**81 VÍAS INFLAMATORIAS IMPLICADAS EN LA DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO RENAL PROCEDENTE DE DONANTES FALLECIDOS**

E. GUILLEN-GÓMEZ<sup>1</sup>, I. DASILVA<sup>2</sup>, I. SILVA<sup>2</sup>, L. GUIRADO<sup>3</sup>, N. SERRA<sup>2</sup>, M. PASTOR-ANGLADA<sup>3</sup>, J. BALLARÍN<sup>3</sup>, MM. DÍAZ-ENCARNACIÓN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. FUNDACIÓ PUIGVERT (BARCELONA/ESPAÑA), <sup>2</sup>NEFROLOGIA. FUNDACIÓ PUIGVERT (BARCELONA/ESPAÑA), <sup>3</sup>DEPT. BIOQUÍMICA I BIOLOGÍA MOLECULAR. UNIVERSITAT DE BARCELONA (BARCELONA/ESPAÑA)

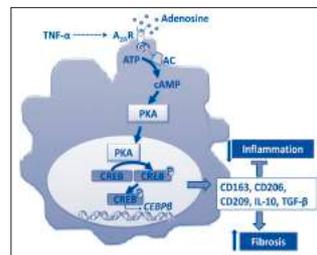
**Introducción:** En el trasplante renal de donantes fallecidos (DF) se genera una respuesta inflamatoria previa a la nefrectomía que produce la infiltración de macrófagos y que se ha asociado al desarrollo de fibrosis. La adenosina ejerce su actividad antiinflamatoria principalmente a través del receptor A<sub>2A</sub>. Monocitos y macrófagos liberan TNF-α que induce la actividad de A<sub>2A</sub> e interviene en la fibrosis intersticial renal a través de un aumento de TGF-β. El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la inflamación del DF sobre la disfunción crónica del injerto renal.

**Material y métodos:** Se analizaron 57 muestras de tejido renal pre-implante, 17 de donante vivo (DV) y 40 de DF. Se realizó PCR a tiempo real con el sistema TaqMan® OpenArray®, western-blot.

**Resultados:** En los riñones procedentes de los DF la infiltración de macrófagos fue significativamente superior que en DV. La expresión de TNF-α, TGF-1β y A<sub>2A</sub> fue también más elevada y correlacionaron de forma positiva entre sí. El receptor A<sub>2A</sub> correlacionó también con: marcadores pro-fibróticos como α-SMA, fibronectina, vimentina y colágeno; el enzima adenilato ciclasa y con el marcador de macrófagos M2 CD163, C/EBPβ e IL-10, que están más expresados en los riñones de DF. Los resultados de western-blot muestran una activación de PKA y CREB y una mayor traducción de las proteínas CD163 y A<sub>2A</sub>.

**Conclusiones:** La expresión de TNF-α en los riñones procedentes de DF se asocia a factores anti-inflamatorios como el TGF-β1 y el receptor de adenosina A<sub>2A</sub>. Nuestros resultados apuntan a que la activación de esta vía induce la fosforilación de CREB mediada por PKA, que a su vez estimula la transcripción de C/EBPβ y promueve la inducción de factores que podrían generar fibrosis en el injerto renal.

Figura.



**82 EL BISFENOL A (BPA) INDUCE AUTOFAGIA Y ESTRÉS OXIDATIVO EN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y EN CÉLULAS TUBULARES**

A. RUIZ PRIEGO<sup>1</sup>, S. RAYEGO MATEOS<sup>1</sup>, E. BOSCH PANADERO<sup>1</sup>, S. MAS FONTAO<sup>1</sup>, M. RUIZ ORTEGA<sup>1</sup>, E. GONZÁLEZ PARRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE NEFROLOGÍA. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (MADRID/ESPAÑA), <sup>2</sup>SERVICIO DE NEFROLOGÍA. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (MADRID/ESPAÑA)

**Introducción:** Las toxinas urémicas, acumuladas como resultado de la enfermedad crónica renal (ECR), contribuyen a las complicaciones de la enfermedad y su progresión. El bisfenol A (BPA) es una toxina ambiental ubicua acumulada en dicha enfermedad. La autofagia es un proceso lisosomal degradativo que elimina los agregados de proteínas mal plegadas o organelos dañados para mantener la homeostasis intracelular y la integridad celular. Evidencias recientes sugieren que la autofagia está implicada en el daño de la células tubulares y glomerulares en las enfermedades renales. Sin embargo, el papel de la autofagia en la fisiopatología de la enfermedad renal aún se desconoce. El objetivo de este estudio es explorar el papel de la autofagia como mecanismo de toxicidad del BPA en un modelo experimental de enfermedad renal crónica.

**Materiales y métodos:** El papel del BPA en la enfermedad renal crónica se estudió en un modelo experimental de nefrectomía subtotal en ratones c57b/6. A algunos animales se les inyectó BPA (120mg/kg/día) por vía intraperitoneal durante 5 semanas. Además, se desarrollaron estudios *in vitro* en células túbulo epiteliales humanas (HK-2) estimuladas con BPA a diferentes concentraciones (100 μM y 200 μM). La expresión génica se midió por qRT-PCR y los niveles de proteínas se analizaron mediante diversas técnicas, tales como western blot e inmunohistoquímica.

**Resultados:** Observamos como en los ratones operados, la exposición al BPA durante 5 semanas produjo estrés oxidativo, autofagia e inflamación al aumentar la expresión génica de marcadores de autofagia específicos tales como Atg5, Atg7, LC3B y Beclin. Por otro lado, la exposición a BPA en ratones aumento el estrés oxidativo, incrementando la expresión génica de Nrf2 así como sus genes dianas como Hemo-oxigenasa 1 (HO-1) y NAD(P)H Deshidrogenasa [quinona]-1 (NQO-1). Además, en cultivo celular, la estimulación con BPA aumentó de manera dosis dependiente la expresión génica de factores proinflamatorios como CCL2, CCL5 e IL6 y los marcadores de autofagia LC3B y Beclin.

**Conclusión:** Estos datos sugieren que el BPA causa estrés oxidativo, inflamación y autofagia en el modelo experimental de enfermedad renal crónica, desarrollando un papel fundamental en la progresión de la enfermedad renal crónica.