

56

## GEN DE LA SINTETASA DEL OXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS): EFECTO MODIFICADOR EN LOS VARONES CON POLIQUISTOSIS RENAL.

A. Persu, S. Davila, M.S. Stoenoiu, O. Devuist, X.M. Lens y "Collaborative Group for Disease Modifying Genes in ADPKD. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, España, UCL Medical School, Brussels y U.Z.-Gasthuisberg, KUL, Leuven, Belgica; Hôpital Necker y Hôpital Européen Georges Pompidou Paris, Francia.

La Poliquistosis Renal Autosómica Dominante (ADPKD) es la enfermedad monogénica que causa con mayor frecuencia Insuficiencia Renal Crónica Terminal (ESRD). Se asocia a una alteración de la vasodilatación endotelio-dependiente y con frecuencia a Hipertensión Arterial.

La existencia de loci modificadores se demostró en modelos animales y podría ser responsable de las variaciones observadas en la edad de comienzo de la ESRD. Por tanto el gen eNOS sería un buen candidato. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de este gen en la severidad de la enfermedad renal mediante 2 abordajes: estudio genético de asociación y análisis del comportamiento proteico en tejido que proporcionase evidencia funcional a las diversas variantes de la normalidad.

225 pacientes con Poliquistosis Renal por mutaciones en el gen PKD1 en ESRD (comienzo:  $52.0 \pm 0.7$  a.) fueron genotipados para 3 polimorfismos de ENOS (Glu 298 Asp, intrón 4 VNTR y T-786C). Clínicamente se clasificaron como de Progresión Rápida, Intermedia o Lenta según la edad al inicio de ESRD:  $< 40$  a., 40-60 y  $\geq 60$ , respectivamente.

Asimismo se determinó la actividad de eNOS en tejido mediante el estudio en arterias renales obtenidas tras nefrectomía, de 2 parámetros: la actividad eNOS (método enzimático) y su expresión (Western blot e Inmunohistoquímica).

Los genotipos de los 3 polimorfismos se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los 3 polimorfismos se encontraban en ligamiento de disequilibrio parcial entre sí. Había una mayor proporción de los varones con el polimorfismo Asp 298 en el grupo de los de Rápida Progresión ( $p=0.04$ ). La edad de comienzo de ESRD era menor en los varones portadores de las variantes (Glu/Asp + Asp/Asp),  $49.0 \pm 1.2$  a. que en los pacientes con genotipo (Glu/Glu),  $53.5 \pm 1.5$  a.,  $p=0.02$ . No alcanzó significación en las pacientes de sexo femenino.

Se observó una disminución de la actividad y de la expresión de eNOS en las arterias renales de los varones con la variante Asp 298, posiblemente en relación con la degradación por una proteasa endógena.

El polimorfismo Asp 298 de ENOS se asocia con un peor pronóstico en la Poliquistosis Renal, especialmente marcado en los varones y probablemente relacionado a una inferior producción basal de eNOS.

El mecanismo estaría mediado por una disminución de la actividad y de la expresión de la enzima con alteración de la vasodilatación endotelio-dependiente, aumento de la tensión arterial y cambios hemodinámicos a nivel renal.

## INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL TGF-B EN LA PROGRESIÓN DE LA INSUFICIENCIA RENAL EN LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE.

L. Pérez-Oller(1), P. Iñigo(2), JM Campistol(2), A. Darnell(2), R. Torra(2). (1)Unidad de Nefrología del Hospital General de Vic (Barcelona). (2)Instituto de Nefrología y Urología del Hospital Clínic de Barcelona.

La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es una enfermedad hereditaria caracterizada por la aparición de múltiples quistes renales que en la mayoría de casos conducen a la insuficiencia renal crónica terminal. Pero existe una importante variabilidad en su expresión clínica, no toda ella justificada por la heterogeneidad genética. Por otra parte el transforming growth factor B (TGF-B) 1 es una citoquina que modula el crecimiento y diferenciación celular, y también interviene en la producción y degradación de la matriz extracelular, habiendo sido implicada en la patogenia de varias enfermedades. Dado que en la poliquistosis renal parece jugar un papel importante la fibrosis del parénquima renal no ocupado por los quistes, hemos estudiado la influencia de los polimorfismos del gen del TGF-B en la progresión de la insuficiencia renal en la PQRAD. Hemos analizado en 166 muestras de DNA de pacientes afectados de PQRAD tipo PKD1 tres polimorfismos del gen del TGF-B situados en el codón 10, en el codón 25 y en la región flanqueante 5', por técnicas basadas en enzimas de restricción (MspA1 polimorfismo Leu/Prol, FseI polimorfismo Arg/Prol, ECO811 polimorfismo Cis/Tir). Los resultados han demostrado que no existen diferencias significativas en cuanto a la supervivencia renal en los pacientes con los distintos genotipos. Únicamente los enfermos homocigotos TT del polimorfismo C/T tienen aparentemente una supervivencia renal mayor pero con diferencias no significativas. Aun así, son necesarios estudios con una muestra más amplia para poder establecer conclusiones. Es importante llegar a conocer los genes que pueden actuar modificando la progresión de la IRC en la PQRAD. Esto debe permitir establecer mejor el pronóstico, y utilizar la herramientas terapéuticas adecuadas para intentar frenar la progresión de la enfermedad.

\*Presenta el primer autor (el sistema no permite subrayarlo).

57

58

## PREDICTORES DE SEVERIDAD EN FASE PRECLÍNICA DE LA POLIQUISTOSIS.

J.A. Casal, S. Davila, L. Pérez, M. A. García-González, P. Calo, J.C. Tutor, X.M. Lens.

Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

La genética y biología moleculares hacen previsible la aparición a medio plazo de una terapia específica en la Poliquistosis Renal Autosómica Dominante. Ha de conocerse la historia natural de la enfermedad para medir su potencial impacto. Es necesario disponer de parámetros de imagen o analíticos antes del desarrollo de insuficiencia renal (fase ya avanzada y probablemente difícil de retrogradar).

Este trabajo pretendió explorar el grado de lesión en los diferentes compartimentos estructurales y funcionales de riñón mediante su determinación en sangre u orina. El daño tubular se monitorizó mediante la B-Hexosaminidasa y la Glutatión-peroxidasa. La microalbuminuria fue utilizada como indicador del estado de la barrera glomerular. Se determinó su utilidad como marcadores predictivos de severidad de la enfermedad, concretamente de la inminente aparición de Hipertensión Arterial o Insuficiencia Renal.

Se han estudiado 60 pacientes con afectación en los genes PKD1 y PKD2 con diferentes grado de afectación: 1) Fase inicial, 2) Hipertensión Arterial y 3) Insuficiencia Renal. Los parámetros analizados en suero fueron: urea, creatinina, cistatina y glutatión-peroxidasa (ELISA). En orina: urea, creatinina, proteinuria, albuminuria y la B-Hexosaminidasa (HEX, método termodinámico).

Los valores de HEX:  $4.7 \pm 0.5$  (U/l,  $x \pm \text{SEM}$ ) fueron significativamente mayores que en los individuos sanos (V.N. hasta 1). Buena correlación entre niveles de creatinina sérica y HEX en orina,  $r = 0.8$ ,  $p < 0.001$ .

Sólo el 17% de los pacientes con tensión arterial y función renal normales presentaban una ligera elevación en la excreción urinaria de albúmina, microalbuminuria ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinina) con intervalo: 2 - 103.

La estratificación según la albuminuria mostró diferencias en los subgrupos (microalbuminuria/ Crea/ HEX orina): Intervalo Normal:  $< 30$ , HEX  $2.4 \pm 0.3$ , Crea:  $1 \pm 0.1$ ; Intervalo Medio:  $30 - 300$ , HEX:  $5.8 \pm 0.9$ , Crea:  $2.1 \pm 0.5$ ; Intervalo Muy Elevado:  $> 300$ , HEX:  $8.4 \pm 1$ , Crea:  $4 \pm 1$  (U Mann Whitney,  $p < 0.01$ ).

La diferencia observada entre los niveles de HEX en orina no alcanzó significación estadística entre el subgrupo con tensión arterial normal y el subgrupo que únicamente presentaba Hipertensión Arterial  $2.9 \pm 0.5$  vs.  $3.5 \pm 0.5$ .

La Glutatión-peroxidasa no fue informativa.

La Poliquistosis Renal se caracteriza por un importante daño tubular ya presente en sus fases iniciales. La B-Hexosaminidasa urinaria aumenta a medida que la enfermedad está más avanzada y tiene por tanto un valor predictivo de severidad. Podría ser útil en el seguimiento de los pacientes para advertir de la inminente aparición de Hipertensión Arterial o Insuficiencia Renal. La barrera glomerular no suele alterarse hasta un estado avanzado.

## "PLASTICIDAD PROTEICA DE LA POLICISTINA 1".

P. Calo-Mata, M.A. García-González, T.Cordal, M.A., M. García Vidal, S. Davila, C. Quinteiro, T. Watnick, F. Barros, G. Germino, X.M. Lens. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago y Medicina Molecular FINGO, Santiago de Compostela y Johns Hopkins University, Baltimore, USA.

El gen de la Poliquistosis Autosómica Dominante más frecuente y severa PKD1, se localiza en el cromosoma 16. El análisis de mutaciones y polimorfismos en el gen responsable de una enfermedad y su traducción a la proteína codificada permitiría distinguir zonas de su estructura primaria que pueden sufrir variaciones anatómicas sin acompañarse de alteración en su función y observar los cambios en el curso evolutivo de la especie humana.

Se analizaron en 140 pacientes de otras tantas familias los exones 15,16,17, 18, 19, 23, 24 y 25 del gen, localizados en la zona replicada, usando un template específico de PKD1. Para ello se amplificaron por PCR dos fragmentos del gen: uno de 3.5 Kb desde el exón 15 al 21, usando un primer específico del gen con otro primer de la zona replicada; y un segundo fragmento de 10 Kb, desde el exón 23 al 34. Posteriormente se realizó una segunda PCR sobre estos templates para amplificar cada exón. Se efectuó secuenciación automática de ADN, enzimas de restricción y análisis de co-segregación en las familias.

## Mutaciones:

Exón 15: familia 145, ESRD: 66 a., C4517T, Arg1436Stop. Exón 17: 7287delG, familia 78 ESRD: 44 y 47 a., Intraútero e Infantil, Alteración marco lectura tras 2359. Exón 20: G8072T, familia 114, Glu2621Stop. Exón 21: C8126T, familia 39, ESRD: 53 a. Aneurisma Arg2639Stop. Exón 23, familias JHU1 y JHU2: T8446G, T8490C, G8493C, T8688C. Además se encontró otra mutación en la familia JHU1 T8502C y en la Familia JHU2, C8498G. En la familia JHU3: G8583A. Exón 24, familia JHU4: T9124C y A38.794G.

## Polimorfismos:

A. Variación en secuencia sin cambio de aminoácido. Exón 15, en heterocigosis: C4141T, 1/140. G4282T, 1/140. C4314T, 2/140. C4509T, 1/140. C4734T, 1/140. A4876C, 3/140. Exón 17: T7376C, 35/140. Exón 18: C7652T, 29/91. Exón 20, en homocigosis: T7919C, 2/91. Exón 21, en homocigosis: A8124G, 13/91. Exón 25, en heterocigosis: G9233C, 1/10.

B. Cambios conservativos de aminoácido. Exón 25, en heterocigosis: Val 3008Leu 1/10 C. Cambios no-conservativos de aminoácido. Exón 15: Trp1399Arg, homocigotos y heterocigotos, 16/140. Exón 21: His 2638Arg, 13/91.

Se describe una amplia gama de variantes, de la normalidad y patogénicas, en la estructura primaria de la Policistina 1, responsable de la Poliquistosis Renal Autosómica Dominante. La existencia de múltiples cambios no-conservativos a nivel de sus aminoácidos muestra: 1) su estructura acumuló gran cantidad de variaciones en la evolución de la especie humana, y 2) áreas identificadas que pueden experimentar cambios sin acompañarse de alteraciones en su función. Se desconoce si pueden modificar el fenotipo.

59

60

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA NEFRONOPTISIS JUVENIL

Roser Torra, Cèlia Badenas, Juan Bravo Soto\*, Montse Milà, Bárbara Tazón. Alejandro Darnell.  
Servicios de Nefrología y Genética. Hospital Clínico. Barcelona. Servicio de Nefrología. Hospital Virgen de las Nieves. Granada\*

La nefronoptosis (NPH) representa la enfermedad renal hereditaria más frecuente causante de IRCT en la infancia. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva, causada por mutaciones en al menos tres genes diferentes: NPH1 (causante de NPH juvenil, edad media de IRCT 13 años), NPH2 (infantil, 1 a 3 años) y NPH3 (adolescente, 19 años). Entre el 65 y el 86% de los casos de NPH están causados por una delección homocigota de 250 kb en 2q13 (donde se localiza NPH1).

En estos estudios se han analizado 11 individuos no emparentados diagnosticados de NPH por criterios clínicos o anatomopatológicos. Se ha realizado el estudio molecular por PCR, utilizando primers que se encuentran tanto dentro como flanqueando la zona delecionada. La amplificación por PCR utilizando todos los primers, descarta la delección en homocigosis. La no amplificación utilizando los primers de la región delecionada junto con la amplificación de la región flanqueante, demuestra la presencia de la delección en homocigosis descartando a la vez posibles falsos positivos.

Se ha confirmado el diagnóstico de NPH causado por delecciones homocigotas de NPH1 en 5 de los 11 pacientes estudiados. La edad media de IRCT en este grupo ha sido de 14.5 años. Dos pacientes a los cuales no se les ha detectado la delección presentan retinitis pigmentaria, y por lo tanto, un síndrome de Senior-Lorken, considerado como otra entidad. Otros pacientes sin la delección presentaron edades de inicio de IRCT de 11 meses y 23 años. En los otros dos casos sin la delección la edad de IRCT es compatible con NPH juvenil (11 y 12 años). Por lo tanto, si delimitamos la edad de IRCT como definitoria de NPH juvenil entre 10 y 20 años y excluimos el síndrome de Senior-Lorken, se detecta la delección en homocigosis en un 71% de los pacientes (5/7 individuos).

Este estudio muestra la utilidad del diagnóstico molecular de NPH juvenil, pudiendo evitar en muchos casos la práctica de una biopsia renal.

61

## SOBREEXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 EN LAS ENFERMEDADES QUISTICAS RENALES HEREDITARIAS.

M.A. García-González, M. García Vidal, S. Davila, P. Calo-Mata, A. Vázquez-Boquete, M. Fraga, J. Cameselle-Teijeiro, T. García-Caballero, E. Pintos, J. Forteza, J.J. Gómez-Reino, X.M. Lens.

Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

La Ciclooxigenasa (COX) es una enzima intermediaria de la biosíntesis de prostaglandinas. Se conocen 2 isoformas: COX-1 (forma constitutiva localizada en el endotelio vascular y túbulos colectores) y COX-2 (proteína inhibidora de apoptosis, habitualmente inducible, aunque en el riñón se encuentra de manera constitutiva en la mácula densa y la rama gruesa ascendente del Asa de Henle).

El modelo "knock out" de COX-2 en el ratón presenta un fenotipo caracterizado fundamentalmente por anomalías en el desarrollo renal. El uso de inhibidores de la ciclooxigenasa durante el embarazo también puede dar lugar a anomalías renales y disminuye la tasa de aparición de nuevos pólipos en una enfermedad de tipo proliferativo como es la Poliposis Familiar Colónica.

Estas piezas de evidencia nos han llevado al estudio del comportamiento de esta proteína en cuanto a su expresión y localización tisular, en un grupo de enfermedades renales que tienen en común una etiología genética y la formación de quistes (en la Poliquistosis Renal Autosómica Dominante, ADPKD, está establecido que corresponden a una proliferación monoclonal).

Se han estudiado muestras de pacientes con ADPKD, n:21; Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva, ARPKD, n:4; y E. Quística Medular Autosómica Dominante, ADMCKD, n:5. Los controles fueron de 2 tipos: a) 10 piezas de riñón y colon normales, y b) muestras de amígdala, Linfoma de Hodgkin y Adenocarcinoma de colon.

La inmunohistoquímica con anti-COX-2 policlonal (CAYMAN) y la hibridación "in situ" con sonda de 40 bp de RNA marcada con Fluoresceína mostraron un aumento de su expresión en las 3 enfermedades. En la ADPKD y ADMCKD posee un comportamiento similar: expresión focal en epitelio tubular y quístico y en el intersticio. En la ARPKD: expresión selectiva únicamente en el epitelio quístico y negatividad absoluta en el intersticio. Los hallazgos se correlacionaron con: el grado de apoptosis (Apoptaq), las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y p53, y con el marcador de proliferación celular (MIB-1).

La peculiar distribución en la ARPKD se puso en relación con la diferente edad de los pacientes y la ausencia de infiltrado inflamatorio en el estroma que sustenta la dilatación generalizada de los túbulos colectores, dado que el nivel observado de apoptosis fue similar al de las formas dominantes. Otro posible mecanismo sería un efecto específico producido por la proteína alterada responsable de esta dolencia, desconocida al no haberse identificado todavía el gen.

La Ciclooxigenasa-2 presenta un comportamiento diferente en la Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva con una distribución selectiva en el epitelio quístico. En la Dominante y en la E. Quística Medular está aumentada su expresión de una manera generalizada. Se añade evidencia a su fundamental papel en el desarrollo renal y la citogénesis.

62

## MUTACIONES EN LOS GENES COL4A3 Y COL4A4 SON CAUSA DE HEMATURIA FAMILIAR BENIGNA

Roser Torra, Manuel Praga, Cèlia Badenas, Bárbara Tazón, Amado Andres, Enrique Morales, Montserrat Milà, Alejandro Darnell.  
Servicios de Nefrología y Genética. Hospital Clínic. Barcelona. Servicio de Nefrología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

La hematuria familiar benigna (HFB) es una enfermedad autosómica dominante común, caracterizada por la presencia de hematuria persistente o recurrente. Los hallazgos anatomopatológicos en esta enfermedad se parecen mucho a los del síndrome de Alport en fase precoz. Por esta razón se ha apuntado la posibilidad de un defecto molecular común. De esta manera los genes COL4A3/4 parecen estar implicados tanto en el síndrome de Alport como en la HFB.

Hemos realizado el análisis de ligamiento para el locus COL4A3/4 y hemos buscado mutaciones en estos genes en 11 familias con HFB demostrada mediante biopsia renal. Los resultados del análisis de ligamiento han demostrado que 6 de las 11 familias estaban ligadas al locus COL4A3/4 y una no estaba ligada (las otras eran demasiado pequeñas, pero en 2 de ellas el ligamiento con COL4A3/4 era posible). La familia no ligada incluye 3 mujeres afectas que en realidad podrían ser portadoras de un síndrome de Alport. El estudio de mutaciones ha puesto de manifiesto 2 nuevas mutaciones en el gen COL4A3 (G985V, G1015E) y 4 nuevas mutaciones en el gen COL4A4 (3222insA, IVS23-1G\*C, 31del11, G960R).

Esta es la primera vez en la que se describen mutaciones en el gen COL4A3 en familias con HFB. Este estudio claramente demuestra la implicación de los genes COL4A4 i COL4A3 en la patogenia de la HFB.