

1

**POLIMORFISMOS DE LA SUBUNIDAD BETA3 DE LA PROTEINA G Y ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CARDÍACA EN PACIENTES HIPERTENSOS OBESOS**

Martínez Vea, A, Bardají, A, Gutiérrez, C, Arasa, P, García, C, Peralta, C, Richart, C, Oliver, JA.  
*Nefrología. Hospital Joan XXIII de Tarragona*

El polimorfismo (C825T) en el gen que codifica la subunidad beta 3 de la proteína G (GN beta 3) está asociado a un aumento de la activación de la proteína G y del crecimiento celular. Este polimorfismo se ha asociado a una mayor prevalencia de hipertensión arterial (HTA) y obesidad, y se ha considerado, aunque no de manera uniforme, un marcador genético del aumento de masa ventricular izquierda (MVI) en la HTA esencial. No existen estudios que analicen la relación de este polimorfismo con la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) de los pacientes hipertensos obesos.

Objetivos: Investigar la asociación entre el alelo 825 T de la GN beta 3 y la estructura y función cardíaca en un grupo de pacientes hipertensos y obesos.

**Metodología:** Se estudiaron de forma consecutiva 106 pacientes obesos, hipertensos, no diabéticos, con función renal normal a los que se les determinó el polimorfismo C825T de la GN beta 3 y se realizó un estudio ecocardiográfico doppler-color. Ochenta y seis pacientes completaron el estudio. Se examinó además, la relación entre la resistencia a la insulina (índice de HOMA) y la excreción urinaria de albúmina con el polimorfismo genéticos y los parámetros ecocardiográficos.

**Resultados:** 77% de los pacientes tenían HVI y 71% disfunción diastólica. 41 pacientes (0,48) eran homocigotos para el alelo C (CC), 34 (0,39) heterocigotos (CT) y 11 (0,13) era homocigotos para el alelo T (TT). La distribución del genotipo entre la población estudiada estaba en equilibrio Hardy-Weinberg.

El índice de MVI (MVI/altura 2,7) en los pacientes CC (n = 41) y CT + TT (n = 45) fue similar: 59,4 + 15,2 y 61,5 + 20,8 g/m<sup>2</sup>.7, respect. p = 0,59. Las dimensiones del VI y los parámetros de función diastólica no estuvieron asociados a la variante C825T. La prevalencia de HVI y disfunción diastólica fue similar en los dos grupos: pacientes CC (83% y 77,5% respect), pacientes CT + TT (71% y 75% respect).

Las mujeres con el alelo T mostraron una mayor resistencia a la insulina y un mayor índice de masa corporal (IMC) que las mujeres sin el alelo T (3,7 + 1,4 vs 2,8 + 1,2, p = 0,03 y 34,1 + 3,4 vs 32,2+2,8 kg/m<sup>2</sup>, p = 0,04, respect).

En un modelo multivariante ajustado por la edad, sexo, IMC y tensión arterial no se demostró ninguna influencia del Gnbeta3-C825T en los diversos índices ecocardiográficos. La excreción urinaria de albúmina (p = 0,005) y el IMC (p = 0,05) fueron las únicas variables que se correlacionaron independientemente con el índice de MVI/altura 2,7. Conclusiones: Nuestros resultados indican que el alelo 825 T del GN beta 3 no contribuye a la HVI ni a la disfunción diastólica que está presente en la hipertensión asociada a obesidad.

2

**LA PROTEÍNA HSP-90 MEDIA UN MECANISMO DE PROTECCIÓN AL DAÑO ENDOTELIAL DURANTE EL FENÓMENO DE PRECONDICIONAMIENTO**

Carolina Carrasco, Juan Carlos de la Pinta, Sergio Alonso Orgaz, Luis Muñoz-Alameda, Inmaculada Millas, M<sup>a</sup> Mar González, Santos Casado Perez, Antonio López-Farré.

*Laboratorio de Investigación Cardiovascular e Hipertensión. Fundación Jiménez Díaz*

La forma fosforilada en la serina 1177 de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSE) se ha asociado con su capacidad para formar óxido nítrico (NO). Para la fosforilación de la serina 1177 es necesaria la interacción con la proteína de choque térmico Hsp90. Nuestro objetivo fue analizar los niveles de fosforilación de NOSE sobre la serina 1177 en un modelo *in vitro* de preconditionamiento hipóxico en segmentos aórticos de rata. La vasorelajación a acetilcolina (ACh) estaba reducida de forma significativa en los anillos aórticos precontraídos con fenilefrina tras hipoxia-reperfusion (HR, 20 min de gaseo con una mezcla de gases conteniendo 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> seguidos de 20 min de reperfusion con 95% CO<sub>2</sub>/5% N<sub>2</sub>) comparada con los anillos controles. La menor respuesta vasorelajadora a la ACh mejoró con el preconditionamiento hipóxico (tres ciclos alternativos de 1 min de hipoxia mediante gaseo con 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> más 5 min de reperfusion seguidos de un periodo de 20 min de hipoxia y 20 min de reperfusion). La geldanamicina (10 µg/mL), un agente que interacciona con el lugar de unión del ATP al Hsp 90, revirtió el efecto protector del preconditionamiento hipóxico sobre la vasorelajación inducida por ACh. El contenido de NOSE fosforilada sobre su serina 1177 en los segmentos sometidos a HR fue menor que en los sometidos a un preconditionamiento hipóxico previo. Sin embargo, el nivel de interacción entre NOSE y Hsp 90 fue similar entre los segmentos preconditionados y los sometidos a HR. HR incrementó el contenido de anión superóxido en la pared vascular, efecto que fue reducido mediante el preconditionamiento hipóxico. La geldanamicina incrementó la acumulación de anión superóxido en los vasos aórticos sometidos a preconditionamiento hipóxico. La inhibición de la actividad NOSE con L-NAME (10-4 mol/L) redujo la producción de ión superóxido en los vasos sometidos a HR. Como conclusión existe un preconditionamiento endotelial en el que puede tener un papel importante la conservación de la interacción del Hsp 90-ATP con la NOSE lo que determinaría que la NOSE forme NO y no ión superóxido.

3

**ESTUDIO DEL PROTEOMA DE CÉLULAS ENDOTELIALES ESTIMULADAS CON TNF-ALFA**

Petra Mateos-Cáceres, Antonio García-Méndez, Laura Molero-García, Sergio Alonso-Orgaz, Carolina Carrasco-Martin, M<sup>a</sup> del Rosario Ramón Albalade, Santos Casado Pérez, Antonio López-Farré.

*Laboratorio de Investigación cardiovascular e Hipertensión. Fundación Jiménez Díaz*

La inflamación es un proceso íntimamente ligado a la patología cardiovascular. Para determinar modificaciones en el nivel de expresión de las proteínas se tenían que analizar individualmente cada una de ellas. Gracias a una nueva tecnología denominada proteómica, se puede confeccionar un mapa de las proteínas que se expresan en una célula ante un estímulo patológico en un momento determinado, no estando actualmente definido el mapa de expresión proteica del endotelio. El objetivo del presente estudio fue analizar las proteínas expresadas en un cultivo de células endoteliales de aorta bovina (BAEC), en situación basal y sometidas a estímulo inflamatorio mediante la incubación con Factor de Necrosis Tumoral - ? (TNF-?), (10 µg/mL) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron experimentos de electroforesis bidimensional con 1 mg de proteína total de las células control y las estimuladas con TNF-?. La primera dimensión se desarrolló sobre tiras IPG que tenían inmovilizado un gradiente de pH amplio (3-10). La segunda dimensión se realizó en SDS-PAGE (10%), tras lo cual las proteínas se visualizaron por tinción con plata. Detectamos un mayor número de proteínas en BAEC + TNF-? que en BAEC (113 vs. 68; p < 0,05), siendo únicamente 37 proteínas comunes en ambas muestras. Las proteínas conservadas se agruparon en un rango de punto isoelectrónico (pI) de entre 4 y 5, estando también en este mismo rango el mayor porcentaje de proteínas de nueva expresión inducidas por el TNF-?. Por otro lado el TNF-? indujo una reducción en el número de proteínas básicas de medio y bajo peso molecular. Debido a que en la actualidad no están disponibles bases de datos del mapa proteico del endotelio ni humano ni bovino, será necesario emplear espectrometría de masas para identificar las diferentes proteínas. El mejor conocimiento de las modificaciones en el mapa de expresión proteica en células endoteliales sometidas a un proceso inflamatorio facilitará el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

4

**DOMINIOS PKD Y PLAT EN LA POLIQUISTOSIS RENAL: MUTACIONES Y ANÁLISIS 3D**

Lens, X.M., Riveira, E., Rezende, W, Parreira, K.S., Banet, J.F.  
*Nefrología. Servicio Galego de Saúde*

En la región extracelular de la poliquistina-1, responsable de la Poliquistosis Renal Autosómica Dominante tipo 1 (PKD-1) se localizan 16 dominios PKD que comparan una estructura de dos láminas beta en forma de sándwich con tres y cuatro hebras respectivamente y un núcleo hidrofóbico. En la región intracelular se encuentra el dominio PLAT/LH2 con homología a la familia de las lipoxigenasas y las lipasas. La función de ambos dominios no ha sido determinada, si bien existen indicios que sugieren una función de unión a ligando. Mediante el software INSIGHT II, y basándonos en la estructura 3D determinada para la lipasa pancreática humana, hemos determinado que la estructura de este dominio en la poliquistina-1 consiste en un sándwich formado por dos láminas beta de cuatro hebras cada una. Mediante PCR y secuenciación directa, (ABI PRISM 3100 Avant) se han localizado polimorfismos y mutaciones en la línea germinal de 200 pacientes diagnosticados como PKD1, con el objetivo de estudiar el cambio que se produce en la estructura tridimensional de los dominios PKD y PLAT/L2 en la proteína. Dominios PKD: cambios no encontrados en cromosomas normales y probablemente patogénicos: 21146del7bp (PKD d1), N3100D (PKD d4), G3067X (PKD d4), A1368V (PKD d7), R1436X (PKD d9), V1732I (PKD d12), R2051H (PKD d15), polimorfismos que no segregaron con la enfermedad: A320P (PKD d1), M1092T (PKD d4), A1516T (PKD d9), R1951Q (PKD d14). PLAT/LH2: 3199 Ins4 y S3132L, ambos probablemente patogénicos, y un polimorfismo: R3209C, que no segrega con la enfermedad. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas hemos determinado el impacto que causan estos cambios en la estructura tridimensional de ambas regiones de la poliquistina-1, comparándolas con las estructuras normales de la proteína salvaje. Así podemos determinar las zonas de la estructura del dominio críticas para desempeñar su función. Los resultados preliminares indican que los lazos que unen las hebras de cada lámina beta pueden soportar mayores cambios en su estructura primaria. Es el caso de los polimorfismos A320P y R1951Q, que aún siendo un cambio de grupo aminoácido no suponen alteración en la función proteica. Sin embargo las variaciones de grupo aminoácido que se localizan en el interior de las hebras suponen una mayor distorsión, como demuestra el estudio de la mutación S3132L. Se identifican 2 factores determinantes de patogenicidad: variaciones de grupo aminoácido en la estructura primaria y punto exacto de su localización, con mayor impacto en las hebras que en los lazos del dominio.

- Aceptado Póster
- Aceptado Presentación Oral

5

**POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE, GEN PKD1: TENDENCIA EVOLUTIVA Y PRESIÓN SELECTIVA EN LA POBLACIÓN HUMANA**

Lens, X.M., Parreira, K.S., Banet, J.F., Rezende, W, Riveira, E. *Nefroloxía. Servicio Galego de Saúde*

La Poliquistosis Renal es la enfermedad autosómica dominante monogénica más frecuente con un caso por cada 800 nacidos vivos. El tipo de mutaciones que se encuentran en la Poliquistosis Renal Autosómica Dominante tipo 1 (PKD 1) son variaciones puntuales en el DNA que en la mitad de los casos conducen a terminaciones prematuras de la cadena proteica y la otra mitad en cambios sin sentido. La distribución a lo largo del gen y la frecuencia de los diversos tipos de mutaciones sugiere que hay un elevado número de mutaciones «de novo» y que los alelos mutados tienen un ciclo de vida corto. Es de especial interés conocer si las mutaciones tuvieron su origen en una determinada zona geográfica, las razones de porqué el gen muta con tan elevada frecuencia, si hay presión selectiva negativa sobre los individuos afectados de manera que las mutaciones vayan desapareciendo y sean sustituidas por otras, para poder predecir cual va a ser la tendencia evolutiva de esta enfermedad. Se pretende definir cuales son los mecanismos genético-evolutivos responsables de la aparente variación en la tasa de crecimiento de la población afecta mediante un análisis de simulación computacional. Además de investigar si las mutaciones causantes de PKD1 han sido introducidas en el país por una ola migratoria durante la expansión poblacional, o si el origen de estas mutaciones es autóctono. La metodología que se está empleando es la secuenciación del gen PKD1 de 200 pacientes de familias españolas y belgas. A partir de la secuencias identificamos las mutaciones que producen la enfermedad y los más variados polimorfismos neutrales que sirven como fuente de variación para el estudio evolutivo. Cada variación individual es analizada en forma de haplotipos intragénicos y el conjunto de estos haplotipos son evaluados mediante programas informáticos, tales como el PHASE, HAPLO, Arlequin 2000 y DML+<sup>+</sup>, en los cuales los modelos estadísticos apropiados para cada análisis genético-poblacional ya se encuentran implementados. Se ha reunido un número de secuencias que ofrecen evidencias de una presión selectiva sobre los individuos con el gen enfermo y una tendencia al crecimiento de la población afecta. Todavía no se dispone de información que permita hacer un análisis bio-geográfico que indique la presencia de alelos migrados o un origen propiamente autóctono de las mutaciones.

6

**SOFTWARE PARA LA ANOTACIÓN AUTOMÁTICA DE CAMBIOS EN LA SECUENCIA DEL GEN PKD1**

Lens, X.M., Banet, J.F., Riveira, E., Rezende, W., Parreira, K.S. *Nefroloxía. Servicio Galego de Saúde*

Mutaciones en el gen PKD1 son las causantes del 85% de los casos de Poliquistosis Renal Autosómica Dominante (ADPKD). El gen PKD1 posee una longitud de 52 kb con 46 exones. Codifica la proteína poliquistina 1, de 4.302 aminoácidos, distribuidos en diversos dominios extracelulares, transmembrana e intracelulares. Partiendo de una base de secuencias de 200 familias, se realiza un estudio con el fin de poder anotar el mayor número de variaciones existentes a nivel de DNA en el gen PKD1, clasificar dichos cambios en polimorfismos o mutaciones y establecer correlaciones genotipo-fenotipo. Para automatizar la comparación de las secuencias obtenidas, con la del gen «wild-type» y la secuencia de aminoácidos descrita en GenBank, se desarrolla un software específico. La aplicación creada hace uso del software de comparación de secuencias BLAST y del paquete de aplicaciones para análisis biológico EMBOSS, siendo programado en el lenguaje PERL-BioPerl y corriendo sobre plataforma Linux (Red Hat 8.0). Para clasificar los cambios anotados en SNPs o mutaciones, se desarrolla un algoritmo complejo, el cual basándose en diferentes factores realiza una predicción sobre el tipo de cambio, anotando además, en caso de tratarse de una mutación, el tipo de mutación que representa (inserción, delección, etc). La información generada se carga automáticamente en una base de datos relacional, para lo cual se ha escogido el gestor de bases de datos MySQL por versatilidad y potencia, lo que facilitará la extracción de información como el establecimiento de haplotipos relacionados con la enfermedad y el estudio evolutivo de la enfermedad mediante dichos haplotipos. Para comprobar la efectividad del software desarrollado se comparan las predicciones obtenidas con los datos registrados para PKD1 en el HGMD (The Human Gene Mutation Data Base), obteniéndose un porcentaje de acierto en la clasificación de los cambios de aproximadamente el 95%. Como característica adicional a resaltar la flexibilidad del software creado, que permitiría realizar un estudio similar en otras enfermedades con ligeras modificaciones en el código del programa. Se presenta la implementación de una base de datos que integra fenotipo, anotación directa de la información generada mediante la secuenciación del DNA, establecimiento de haplotipos extra e intragénicos y consulta a bases externas mediante Internet, aplicada en un contexto de 200 familias con Poliquistosis Renal producida por el gen PKD1.

7

**MUTACIONES EN EL GEN DE LA UROMODULINA: ENFERMEDAD QUÍSTICA MEDULAR TIPO 2 Y NEFROPATÍA HIPERURICÉMICA FAMILIAR JUVENIL**

Lens, X.M., Rezende, W, Parreira, K.S., Riveira, E., Banet, J.F. *Nefroloxía. Servicio Galego de Saúde*

La Enfermedad Renal Quística Medular (Medular Cystic Kidney Disease, MCKD) se caracteriza por el desarrollo de Insuficiencia Renal Crónica entre la 3ª y la 6ª década de la vida. Puede acompañarse de aparición precoz de Hiperuricemia y Gota (Nefropatía Hiperuricémica Familiar Juvenil, NHFJ) y de quistes en la región medular. Se ha descrito heterogeneidad genética con al menos 3 loci responsables: MCKD-1, MCKD-2 y Factor 1-Beta Nuclear del Hepatocito. Recientemente fueron descritas mutaciones en el gen de la proteína Uromodulina (UMOD), como responsables de 2 entidades genético-clínicas: MCKD-2 y NHFJ. La Uromodulina está formada por 640 aa., contiene 24 puentes de sulfuro, se expresa en la rama ascendente del asa de Henle y túbulo distal, un anclaje GPI a la membrana celular permite su liberación a la orina y desarrolla sus potenciales funciones en el transporte de sal y agua y como gel citoprotector ante infecciones y litiasis. Se estudiaron 10 familias con probable diagnóstico de MCKD-2. Fueron utilizados un total de 14 marcadores microsatélites para análisis de ligamiento. Los marcadores microsatélites y el gen UMOD fueron evaluados en secuenciadores automáticos. Se obtuvo un Lod Score significativo para ligamiento de 4.13, 6.93 y 5.56, respectivamente, en 3 familias. Se identificaron dos mutaciones en el gen de la Uromodulina que co-segregan con la enfermedad. La mutación C255Y fue identificada en una familia, en el exón 4, en el dominio de unión a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, en todos los pacientes afectados. Se demostró que el fenotipo MCKD-2/- no es una condición letal, alcanzando la edad adulta los 3 individuos homocigotos para C255Y. Los pacientes homocigotos C255Y presentaron precozmente hiperuricemia, insuficiencia renal y necesidad de diálisis. La mutación Q316P en el exón 5, fue identificada en 2 familias independientes y localizada en el cuarto dominio del Factor de Crecimiento Epidérmico que se une al calcio (cbEGF) de la uromodulina. A resaltar el mecanismo mutagénico al repercutir en los puentes de sulfuro establecidos entre cisteínas en diferentes dominios proteicos. Se describe el genotipo-fenotipo de una enfermedad escasamente diagnosticada, producida por mutaciones en una proteína presente en la orina, y ya conocida desde hace 50 años. Se describe el fenotipo de una situación poco habitual como es la homocigosis para una enfermedad autosómica dominante. Se discute una patogenia relacionada con la alteración de los puentes desulfuro entre cisteínas y una nueva función en el transporte de ácido úrico a nivel del túbulo distal renal.

8

**EL RECHAZO AGUDO INDUCE SENESCENCIA REPLICATIVA EN LINFOCITOS T CD8+**

Jiménez R., Carracedo J., Sáinz S., Pérez R., Del Castillo D., Aljama P., Ramírez R. *Unidad de Investigación Hospital Universitario Reina Sofía*

El trasplante induce la activación de células T inmunocompetentes que participan en el rechazo del órgano trasplantado. Las células T activadas de forma crónica pueden acortar el telómero, modificar su fenotipo y su actividad funcional en un proceso denominado senescencia replicativa. El objetivo del presente estudio es determinar si los linfocitos T de enfermos con rechazo renal presentan un proceso de senescencia celular como consecuencia de una activación replicativa acelerada. El estudio se realizó en linfocitos de sangre periférica y biopsia renal de 37 enfermos trasplantados de riñón que presentaban necrosis tubular aguda (n = 18) y rechazo agudo (n = 19). Se analizaron características diferentes de senescencia replicativa como son: la expresión de la molécula coestimuladora CD28 en la superficie celular por medio de inmunofluorescencia directa y la longitud de telómero (Flow-FISH). Los resultados muestran que enfermos con rechazo agudo presentaban un aumento de linfocitos T CD8+ con baja expresión de CD28 en sangre periférica y tejido renal comparado con enfermos con necrosis tubular aguda. Además, esta población de linfocitos T CD8+ con baja expresión de CD28 se asociaba con un acortamiento telomérico en enfermos con rechazo agudo (TABLA). Nuestros resultados demuestran que los linfocitos T CD8+ de enfermos con rechazo agudo sufren un proceso de senescencia replicativa caracterizada por una baja expresión de CD28 y acortamiento telomérico.

Pacientes	%Expresión CD8+ con bajo CD28		Telómero (kMESF)
	Sangre periférica	Biopsia	
Necrosis Tubular Aguda (n=18)	35 ± 3,4	44 ± 4,8	14,1 ± 0,8
Rechazo Agudo (n=19)	72 ± 3,5*	74 ± 2,8*	6 ± 0,7*

\*p<0,0001 vs Necrosis Tubular Aguda

**ESTUDIO MOLECULAR DE DOS FAMILIAS AFECTAS DE ENFERMEDAD DE BARTTER CON SORDERA NEUROSENSORIAL**

Gallego Mora-Esperanza E, García-Nieto V, Flores C, Luis-Yanes MI, Claverie-Martín F.  
Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria

**Introducción.** En 1995, Landau y cols. describieron una extensa familia beduina consanguínea de la que algunos de sus miembros fueron diagnosticados de síndrome de Bartter asociado a sordera neurosensorial. Posteriormente, se localizó el locus del gen en el cromosoma 1p. A finales de 2001, se confirmó que los pacientes con esa asociación son portadores de mutaciones en el gen BSND que codifica una nueva proteína denominada «Barttin». Ésta, actúa como una subunidad β necesaria para el funcionamiento de los canales de cloro CIC-Ka y CIC-Kb que se expresan en la membrana basolateral de las células de la rama ascendente del asa de Henle y en el epitelio secretor de potasio del oído interno. Hasta ahora sólo se han descrito siete mutaciones diferentes, casi todas situadas en el exón 1.

**Pacientes y Métodos.** Hemos estudiado dos familias aparentemente no relacionadas, procedentes de la misma área geográfica, ambas con miembros diagnosticados de enfermedad de Bartter con sordera neurosensorial. La primera familia consta de cuatro hermanos, de los cuales dos tienen la enfermedad. En la segunda familia, están afectados los descendientes de dos hermanas (dos hijos en un caso y otro en el segundo). A partir del DNA de diez miembros de ambas familias, se analizaron los cuatro exones del gen BSND mediante amplificación por PCR y secuenciación automática.

**Resultados.** Se observó en ambas familias la existencia de una mutación consistente en un cambio C a T en la primera base del codón 47 del exón 1, que se traduciría en la sustitución del aminoácido Gly por Arg (G47R). Tal y como había sido descrito, los individuos afectados resultaron homocigotos para la mutación G47R. En la primera familia, ambos padres y uno de los hijos son heterocigotos para la mutación y el otro hijo es sano. En la segunda familia, ambas madres son heterocigotas.

**Conclusiones.** Es la primera vez que se describen mutaciones en el gen BSND en pacientes españoles. Nuestros resultados y otros descritos recientemente, indican que la mutación G47R merma la actividad de los canales CIC-K, causando la enfermedad.

**ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE RAS-ERK1/2 EN LA FIBROSIS TUBULO-INTERSTICIAL RENAL INDUCIDA POR OBSTRUCCIÓN URETERAL UNILATERAL EN RATÓN**

Ana Rodríguez-Peña, Teresa Grande, Carmen Guerrero, Eugenio Santos, Nelida Eleno, Juan F. Macías Núñez, José M López Novoa, José M López-Novoa.  
Universidad de Salamanca

Las enfermedades renales crónicas, independientemente de su etiología, derivan en un proceso común de fibrosis y pérdida de función renal. Una característica de estos procesos fibróticos es la deposición de matriz extracelular. La proteína activada Ras dependiente de GTP, media la proliferación celular a través de la activación de las proteínas quinasas MAP (mitogen-activated protein) como ERK1/2 (extracelular signal-regulated kinase). Otro efector de Ras es la ruta de PI3quinas/Akt. Estudios recientes demuestran que Ki-Ras (4B) es la isoforma predominante en fibroblastos humanos renales y la mediadora de su proliferación en presencia de factores estimulantes. El objetivo de este estudio es comprobar si la vía Ras-MAP quinasas está implicada en el desarrollo de un proceso de fibrosis renal *in vivo*. Los experimentos se llevaron a cabo en ratones C-57 BL/6JICO macho sometidos a obstrucción unilateral del uréter (OUU). Este modelo induce una fibrosis tubulo-intersticial estable a los 15 días después de la obstrucción, caracterizada por un aumento de colágeno, laminina, fibronectina y TGF-β1. Tres días después de la OUU se observa un aumento (más de 3 veces) en la forma activada de la proteína Ras (Ras GTP) con respecto al riñón contralateral no obstruido. Este aumento va acompañado de una activación de ERK1/2 (2,5 veces), indicada por el aumento de las formas fosforiladas con respecto a la proteína total. También se observó en el riñón ligado un aumento de la activación de la ruta PI3K/Akt. El tratamiento de los animales con losartan (30 mg/kg peso/día), atorvastatina (70 mg/kg peso/día) o un inhibidor de la farnesil transferasa (L-744832; 40 mg/Kg peso/día) produjo en el riñón obstruido una inhibición de la activación de Ras, ERK1/2 y Akt, junto con una disminución de la acumulación de fibronectina. La administración intraperitoneal de angiotensina II (0,8 mg/kg peso/día) también indujo un aumento de la activación de Ras. Este trabajo demuestra que en el desarrollo *in vivo* de un proceso de fibrosis tubulo-intersticial experimental, hay una activación de la vía Ras-ERK1/2-Akt que podría estar implicada en la génesis de la fibrosis renal.

**PROTEINURIA HUÉRFANA**

Martínez F, Del Pino, MD, Castro, F, Guerrero FJ, Prados MC, Gonzalez FJ, Orozco F.  
Torrecárdenas

**Introducción:** En la actualidad se han descrito 50 enfermedades renales hereditarias gracias al Proyecto Genoma Humano. Conocer la genética va a permitir diagnosticar, tratar y sobre todo prevenir muchas de estas enfermedades. La enfermedad de Anderson-Fabry, descrita en 1808, es una enfermedad rara, afecta a 1/117.000 nacidos vivos. Es causada por el déficit de alfa-galactosidasa, lo que trae como consecuencia la acumulación de globotriaosilceramida en el endotelio vascular de los riñones, corazón, SN y piel. Se transmite de forma recesiva ligada a X, aunque pueda presentarse en mujeres debido a la Hipótesis de Lyon. Se han descrito numerosas formas clínicas y aunque hay grandes mutaciones se trata de un espectro clínico continuado. Hoy se dispone de tratamiento sustitutivo: agalsidasa alfa y beta, que representan el primer tratamiento enzimático específico para una enfermedad genética grave. El coste del tratamiento supone unos 7.180 euros/paciente/15 días.

**Caso Clínico:** Varón de 21 años, sin AF ni AP de interés. Clínicamente asintomático. Exploración física sin hallazgos patológicos. No lesiones dérmicas ni neuropatía periférica. Se inicia estudio por el S. Nefrología ante el hallazgo por su médico de cabecera, al que acudió por ocasionales molestias articulares, de proteinuria de 2 g/24 horas.

**Exploraciones Complementarias:** Analítica: Filtrado glomerular, coulter, estudio inmunológico y serología vírica normal. Sedimento de orina: 5-10 hematíes/campo. Proteinuria, siempre de rango no nefrítico, entorno a 1,5 g/24 h. Ecocardiograma normal. Estudio de fondo de ojo normal. Exploración neurofisiológica normal. Biopsia renal percutánea: MO todas las células epiteliales viscerales con citoplasma amplio vacuolado espumoso, los túbulos no muestran alteración del epitelio. ME células epiteliales globulosas con abundantes cuerpos mielínicos intraplásmicos, mb, endotelios y meangios sin lesiones. ANÁLISIS ENZIMÁTICO: alfa-GALACTOSIDASA A: 42 (CONTROL 1274). ANÁLISIS ENZIMÁTICO MATERNO alfa-GALACTOSIDASA A: 275 Pendiente de estudio molecular familiar y estudio enzimático del único hermano, varón.

**Conclusiones:**  
1. Importancia del informe de la biopsia renal en el diagnóstico de las enfermedades renales.  
2. ¿Se trata de una variante de la Enfermedad de Anderson-Fabry o es una forma de inicio?  
3. Indicado el aporte sustitutivo, que el paciente rechazó, se consideraran: los efectos secundarios, duración de por vida, vía de administración, coste, resultados a largo plazo.

**INSERCIÓN DE UNA SECUENCIA ALU EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN DEL CANAL RENAL DE CLORO CLCN5, EN UNA FAMILIA CON ENFERMEDAD DE DENT**

García Nieto V, Antón M, González Acosta H, Méndez Álvarez S, Moreno Platero A, Claverie Martín F.  
Hospital Ntra. Sra. de Candelaria

**Introducción:** Los elementos Alu son repeticiones cortas, interpuestas, que se han agrupado a lo largo de todo el genoma de los primates, por retrotransposición, durante los últimos 65 millones de años. En humanos, existen casi un millón de secuencias Alu por genoma haploide. Estos elementos repetitivos se detectan, preferentemente, dentro de los intrones o en las regiones no codificantes de los genes 5'- y 3'. La enfermedad de Dent es una tubulopatía ligada al cromosoma X, caracterizada por la presencia de proteinuria de bajo peso molecular, hipercalcemia, nefrocalcinosis, nefrolitiasis y, eventualmente, fallo renal crónico. La enfermedad está causada por mutaciones en el gen del canal renal de cloro CLCN5. La mayoría de las mutaciones descritas en el CLCN5 consisten en sustituciones de nucleótidos.

**Paciente, Material y Métodos:** El paciente, fue estudiado a la edad de 7 años tras el hallazgo de proteinuria en un estudio rutinario. Se comprobó la presencia de hipercalcemia (12,5 mg/kg/día), proteinuria (36,5 mg/m<sup>2</sup>/hora) e incremento de la eliminación urinaria de β<sub>2</sub>-microglobulina (41.000 µg/l). La ecografía renal fue normal, así como el GFR. Los padres del paciente y su hermana tenían hipercalcemia. Su madre, además, mostró proteinuria moderada (630 mg/día). Se estudiaron las regiones codificantes del CLCN5 mediante análisis con PCR y SSCP.

**Resultados:** Se comprobó que el exón 11 del paciente era anormalmente grande conteniendo, aproximadamente, trescientos nucleótidos más de lo normal. La secuenciación, reveló que el exón 11 estaba interrumpido por la inserción en el codón 650 de un elemento Alu de la subfamilia joven Ya5. La inserción surgió de novo en el cromosoma materno (heterocigota). Esta mutación predice una proteína CLC-5 interrumpida que pierde la porción carboxiterminal.

**Conclusiones:** La presencia de una secuencia Alu en una región codificante es extremadamente rara. En nuestro conocimiento, es la primera vez que se describe la inserción de un elemento Alu, por retrotransposición, en la región codificante del gen CLCN5 en una familia con enfermedad de Dent.

13

**POLIMORFISMO A1166C DEL RECEPTOR AT1 Y TGFbeta EN ORINA. RELACIÓN CON INDICADORES DE DISFUNCIÓN RENAL EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 1.**

Artamendi M, Sánchez-Molina M, Gómez-Alamillo C, Bengoa A, Zalba G, Diez J. *Hospital San Millán.*

**INTRODUCCIÓN:** La nefropatía diabética (ND) se presenta en un 40% de los diabéticos tipo 1 (DM1). Esto hace pensar en el papel de factores genéticos en su aparición. El polimorfismo del ECA, el polimorfismo del receptor tipo 1 de la angiotensina II (AT1) y el del TGFbeta, se han implicado en el desarrollo y progresión de la ND.

**Material y metodos:** Se estudian los polimorfismos I/D del ECA, A1166C del receptor AT1 y el del TGFbeta (Prolina/Arginina, codón 25) por PCR, en 65 pacientes con DM1 en estadios I y II de Mogensen. Se discriminan por presión arterial (normal < 130/80 y alta > = 130/80 mmHg); albuminuria (normo y microalbuminuria), y por el percentil 70 del TGFbeta en orina (TGFbetau) en un grupo control de sujetos sanos (enzimoinmunoanálisis). Se comparan los grupos en relación con el aclaramiento de creatinina corregido (CCr), como marcador de función renal.

**Conclusiones:** El genotipo CC para el polimorfismo A1166C del receptor AT1 es más frecuente en los sujetos DM1 que en los sanos (12,5% vs 6%). Este genotipo CC se asocia a mayor porcentaje de diabéticos con más excreción de TGFbetau (percentil 70) (75% vs 33%, p = 0,02), a igualdad de cifras de presión arterial. No encontramos diferencias en los parámetros de función renal (CCr 88,4(14) vs 99(23) ml/minx 1,73 m<sup>2</sup>, p = 0,18), ni para la microalbuminuria. No observamos diferencias en CCr, PA, Malb y TGFbetau respecto a los genotipos para el gen del ECA y del TGFbeta. Aquellos diabéticos con mayor TGFbetau presentan peor control metabólico (HbA1c 8,5 (1,8) % vs 7,6 (1,4) % (p = 0,04) y CCr más bajo [89,6 (21,0) vs 103,7 (22,5)] (p = 0,01). El polimorfismo CC del receptor AT1 en la DM1 supondría un estímulo para la activación renal de TGFbeta y más susceptibilidad al daño renal, manifestado por una tendencia a presentar menor CCr, a igualdad de cifras de PA. pudiendo estar ante una subpoblación de riesgo.

**Palabras clave:** Polimorfismos, Diabetes tipo 1, TGFbeta urinario.