

1

**MUTACIONES EN EL GEN QUE CODIFICA EL CANAL RENAL DE CLORO CIC-5 DE PACIENTES ESPAÑOLES CON ENFERMEDAD DE DENT**

Ramos-Trujillo E\*, González-Acosta H\*, Espinosa Román L\*\*, García Nieto V\*\*\*, Pérez Díaz V\*\*\*\*, Oliveros R\*\*\*\*\*, Claverie-Martin F\*  
\*Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Unidad de Investigación. \*\*Hospital Universitario La Paz, Nefrología Infantil. \*\*\*Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Nefrología Infantil. \*\*\*\*Hospital Universitario de Valladolid, Nefrología. \*\*\*\*\*Hospital de Cruces, Nefrología Infantil.

**Introducción:** La enfermedad de Dent está causada por mutaciones en el gen CLCN5 del cromosoma X, que codifica el canal renal de cloro CIC-5. Recientemente, hemos descrito las primeras mutaciones identificadas en pacientes españoles. Esta tubulopatía renal está caracterizada por proteinuria de bajo peso molecular, hipercalcemia, nefrocalcinosis, nefrolitiasis y raquitismo. En algunos pacientes también se observan otros defectos del túbulo proximal como hiperaminoaciduria, hiperfosfatemia y defecto en la capacidad de acidificación urinaria. La enfermedad de Dent se presenta en la infancia o en la adolescencia y afecta de manera más severa a los varones que a las hembras. En la edad adulta, los pacientes evolucionan con frecuencia hacia la insuficiencia renal crónica. El objetivo de este estudio fue identificar nuevas mutaciones en CLCN5 de pacientes españoles con esta enfermedad.

**Pacientes y métodos:** En este estudio hemos analizado el gen CLCN5 de otros seis pacientes que presentaron h2-microglobulina elevada en orina e hipercalcemia. En algunos de los pacientes también se observó nefrocalcinosis o nefrolitiasis, microhematuria e hiperaminoaciduria. Los exones codificantes y sus regiones intrónicas flanqueantes se amplificaron mediante PCR a partir de DNA de sangre. Los productos fueron analizados mediante secuenciación automática.

**Resultados:** En tres de los pacientes identificamos tres nuevas mutaciones puntuales: una transición de A a G en el sitio aceptor de splicing del intrón 2 que supone una alteración en el procesamiento del mRNA; una transición de A a T en la posición -6 del intrón 3 cuyo efecto es, probablemente también, un procesamiento defectuoso del mRNA y una transición de C a T en el exón 9 que predice el cambio de la arginina 467 por un codón de parada. El cuarto paciente presentó una transición de C a T que resulta en el cambio de la arginina 704 por un codón de parada. Esta mutación, que ya había sido descrita previamente, resulta en la pérdida de función del canal CIC-5. En los otros dos pacientes no detectamos ninguna mutación en el gen CLCN5.

**Conclusiones:** Las cuatro mutaciones detectadas predicen alteraciones estructurales importantes en el canal CIC-5 con pérdida de función. La ausencia de mutaciones en el gen CLCN5 en dos de nuestros pacientes y en otros pacientes analizados por distintos grupos indica que un nuevo gen o genes pueden estar asociados con la enfermedad de Dent.

Proyecto (40/02) financiado por la Fundación Canaria de Investigación y Salud FUNCIS.

**Palabras clave:** CIC-5, mutaciones, tubulopatía proximal.

2

**LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA 6-11 DE POLIQUISTINA 1. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA Y DETERMINACIÓN DE FUNCIÓN**

Banet JF, Rezende-Lima W, Parreira KS, Outeda P, Urisarri A, García-Vidal M, Lens XM  
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Laboratorio de Investigación en Nefrología, Departamento de Medicina.

**Introducción:** La Poliquistosis Renal Autosómica Dominante es causada por mutaciones en los genes PKD1 o PKD2. La proteína mutada en el 85% de casos es la poliquistina 1, que contiene 11 dominios transmembrana. El presente trabajo pretende la demostración, por medio del uso de herramientas informáticas, de que los dominios transmembrana 6-11 forman parte de un canal de cationes.

**Materiales y métodos:** Al alinear los dominios TM 6-11 de PKD1 con los 6 dominios TM de PKD2 (utilizando el algoritmo BLAST) se observa que existe un porcentaje de identidad muy elevado, entre el 45-60% en aquellos tramos que se corresponden con los aminoácidos que se encuentran en la membrana celular, esto, unido a que PKD2 se ha descrito como una proteína transportadora de cationes no específica regulada por Ca<sup>2+</sup> y a la conocida interacción entre PKD1 y PKD2 nos lleva a estudiar la posibilidad de que en realidad ambas proteínas formen parte de un canal heterodimérico.

Estudiando la estructura secundaria de los dominios TM 6-11 por el algoritmo de GARNIER determinamos que los dominios tienen una estructura en hélice-alfa, mientras que en las regiones de los lazos se observan estructuras en lámina-beta. Realizando un estudio de la estructura terciaria por modelado «ab initio» utilizando el servidor ROSETTA obtenemos una aproximación a la conformación tridimensional de los dominios TM 6-11.

Con la estructura obtenida realizamos un alineamiento estructural con la base de datos de proteínas PDB utilizando el servidor DALI. Se encontró que la «Proteína 1 mxxm», transportadora de cationes mecano-sensible, presenta un valor RMSD de 2,8. Seleccionando solo una cadena de la «Proteína 1 mxxm» (homoheptámero) y realizando un alineamiento flexible (FlexProt) con los dominios TM6-11, se obtuvo un alineamiento con un RMSD de 2,7, cubriendo una longitud del 75% de la secuencia.

**Conclusiones:** Comparando la información obtenida con la ya descrita para canales catiónicos y viendo la similitud entre los dominios TM de PKD1 y PKD2 concluimos que ambos dominios probablemente se encuentran formando un canal de cationes heterodimérico. El estudio de la estructura terciaria de los transmembrana de PKD2 y el ensamblaje («docking») de ambas moléculas se hace necesario para conocer la estructura y funciones definitivas de este canal.

**Palabras clave:** Policistina 1, transmembrana, canal catiónico.

3

**LA QUINASA SGK1 AUMENTA LA ACTIVIDAD DE NA,K-ATPASA Y NKCC EN CÉLULAS EPITELIALES RENALES**

Álvarez de la Rosa D\*, Giménez I\*\*, Macía M\*\*\*, Canessa CM\*\*\*\*  
\*Universidad de La Laguna, Tenerife, España. Unidad de Farmacología. \*\*Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. Departamento de Farmacología y Fisiología \*\*\*Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife, España. Servicio de Nefrología y Unidad de Investigación. \*\*\*\*Yale University, New Haven, CT, EE.UU. Department of Cellular & Molecular Physiology.

**Introducción:** Se ha propuesto que la quinasa inducida por suero y glucocorticoides (SGK1) juega un papel muy importante en la regulación de la reabsorción de sodio en el túbulo renal. SGK1 aumenta la actividad del canal epitelial de sodio en células renales (*Am J Physiol* 284:C404, 2003). La inactivación del gen de SGK1 en ratones provoca defectos en la retención de sodio en condiciones de dieta baja en sal y disminuye la presión arterial en un 20% (*J Clin Invest* 110:1263). Además, SGK1 también podría regular la actividad de transportadores implicados en el manejo renal de sodio, como la Na,K-ATPasa y el cotransportador de sodio, potasio y cloro (NKCC), si bien esto no ha sido confirmado aún en células epiteliales renales.

**Material y métodos:** Hemos examinado el efecto de SGK1 sobre la actividad de Na,K-ATPasa y NKCC en células A6 derivadas de túbulo distal de *Xenopus*, utilizando un sistema de expresión inducible dependiente de tetraciclina para controlar la expresión de la quinasa. La actividad de Na,K-ATPasa y de NKCC se estudió midiendo la captación por las células de rubidio-86, ión que se comporta de manera similar al potasio, en presencia o ausencia de ouabaina o bumetanida, inhibidores altamente específicos de estos transportadores. Con objeto de correlacionar los datos funcionales con la abundancia de los transportadores en la membrana plasmática, utilizamos biotinilación de proteínas de superficie seguida de Western blot con anticuerpos monoclonales específicos para Na,K-ATPasa o NKCC.

**Conclusiones:** La expresión de SGK1 aumentó aproximadamente 2,5 veces la actividad Na,K-ATPasa. Este efecto no es secundario a cambios en la concentración intracelular de sodio, ya que persiste en presencia de un ionóforo específico de sodio, la monensina. La activación de Na,K-ATPasa por SGK1 y por aldosterona fue aditiva, lo que implica que ambos estímulos actúan mediante mecanismos independientes entre sí. SGK1 también produjo un pequeño pero significativo aumento en la actividad de NKCC. Mediante biotinilación se detectó la expresión de ambos transportadores exclusivamente en la membrana basolateral de las células. Actualmente nos hallamos en proceso de comparar la abundancia de los transportadores en células control y en células que expresan SGK1, con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares de activación del transporte de sodio por SGK1.

**Palabras clave:** Reabsorción renal de sodio, aldosterona, hipertensión.

4

**MUTACIONES DEL EXÓN 5 EN LAS ENFERMEDADES DEL GEN DE LA UROMODULINA**

Rezende-Lima W\*, Parreira KS\*, Banet JF\*, Outeda P\*, Urisarri A\*, García-Vidal M\*, Barrio V\*\*, Lens XM\*  
\*Hospital Clínico de Santiago. Departamento de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. Laboratorio de Investigación en Nefrología. \*\*Fundación Hospital de Alcorcón. Madrid. Nefrología.

Las enfermedades Renal Quística Medular Autosómica Dominante tipo 2 (MCKD2), Nefropatía Juvenil Familiar Hiperuricémica (FJHN) y Renal Glomérulo-quística (GCKD) constituyen un grupo de trastornos hereditarios de transmisión y fenotipo común caracterizado por la presencia de hiperuricemia, baja fracción de excreción renal de urato, nefropatía intersticial con engrosamiento de la membrana basal tubular y evolución a la insuficiencia renal crónica terminal (IRCT).

La causa son mutaciones en el gen de la Uromodulina, la glicoproteína más abundante en la orina humana (50-100 mg/día), de 640 aa., que se expresa en la rama ascendente del asa de Henle. Se duda si contiene 3 ó 4 dominios del Factor de Crecimiento Epidérmico que se une al calcio (cbEGF). Salvo en 3 casos, las mutaciones han sido descritas en el exón 4, de manera que se ha propuesto que sería suficiente estudiar dicho exón para el diagnóstico genético de estas enfermedades.

Se estudiaron 27 familias con probable diagnóstico de MCKD2/FJHN/GCKD. Fueron utilizados 10 marcadores microsatélites para los análisis de ligamiento. El gen UMOD fue evaluado por secuenciación automática. En 4 familias se encontraron 3 diferentes mutaciones en el gen de la Uromodulina. Tan solo una familia (MCKD-2) presentaba la mutación en el exón 4: Cys255Tyr, el resto se hallaban en el exón 5: Cys300Gly (MCKD-30) y una mutación (Gln316Pro) presente en 2 familias (MCKD-8 y MCKD-21). Se compararon los fenotipos de las mutaciones en ambos exones, en cuanto a la edad de aparición de la IRCT, en nuestras familias y en las de la literatura.

Se describe una nueva mutación (Gln316Pro) en el gen de la Uromodulina. En la población española las mutaciones en el exón 5 representan el 75% de los casos. El exón 5 debe ser incluido en una estrategia de diagnóstico molecular de aplicación clínica. Los pacientes con mutaciones en el exón 5 tienden a un fenotipo ligeramente menos severo con edad de IRCT: 63 años, frente a 47 años en el exón 4. La localización de estas mutaciones refuerza la hipótesis de la existencia de un cuarto cbEGF imprescindible para la integridad funcional de esta proteína.

**Palabras clave:** Uromodulina, MCKD2/FJHN/GCKD, diagnóstico.

- Aceptado Póster
- Aceptado Presentación Oral

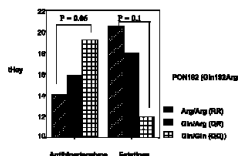
5

**LAS ISOFORMAS DE LA PARAOXONASA-1 DIFIEREN EN SU CAPACIDAD DE HIDRÓLISIS FRENTE A FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS E HIPOLIPEMIANTES**

Rodríguez Esparragón FJ\*, Rodríguez Pérez JC\*, Macías Reyes A\*, Hernández Trujillo Y\*, Losada A\*\*, Caballero Hidalgo A\*  
 \*Hospital de Gran Canaria Dr. Negrin. Unidad de Investigación. \*\*Hospital de Gran Canaria Dr. Negrin. Servicio de Análisis.

La enzima Paraoxonasa-1 (PON-1) constituye parte del mecanismo atero-defensivo. Se ha caracterizado su actividad fosfolipasa A2, hidrolítica hacia ésteres de ácidos carboxílicos y lactonas. Se ha confirmado la identidad molecular de las enzimas responsables de la actividad tiolactona-hidrolasa y paraoxonasa. La edición incorrecta de la homocisteína (Hcy), generaría homocisteína-tiolactona responsable de los mecanismos de homocisteinilación.

En humanos la variante Gln192Arg en el gen PON-1 genera dos isoformas proteicas (Q y R). Se valoró en sujetos hipertensos y/o hipercolesterolémicos en tratamiento con antihipertensivos y/o estatinas un efecto diferencial según genotipos PON-1 sobre los niveles plasmáticos de homocisteína total (tHcy). Los sujetos analizados pertenecen a la base de datos poblacional utilizada previamente (*J Am Coll Cardiol* 2001; 37:1536-42). La determinación de genotipos de PON-1 (Gln192Arg) se realizó por PCR y digestión enzimática (*Nat Genet* 1993;3:73-6). La tHcy se realizó mediante inmunofluorescencia polarizada. Analizamos 147 sujetos (98 varones), la diferenciación por tratamientos farmacológicos se realizó, sin consideración de clase, según la toma de antihipertensivos, antihipertensivos orales (ADO), estatinas, cualquiera de las posibles combinaciones u otros fármacos. Al excluir la combinación estatinas + antihipertensivos, analizamos 84 sujetos tratados con antihipertensivos (62 varones) frente a 13 sujetos (9 varones) tratados con estatinas en función de los genotipos PON-1. Se observó una diferencia gradual en los niveles de tHcy en función de los genotipos PON-1 y el tratamiento farmacológico (antihipertensivos versus estatinas) (figura). Los niveles de tHcy fueron diferentes en el grupo de hombres homocigóticos RR versus QQ tratados con antihipertensivos (U de Mann-Whitney, P = 0.037). En conclusión, estudios previos muestran que la actividad de distintas estatinas difiere en función de la actividad paraoxonasa, nuestros resultados sugieren que dicha actividad difiere además en función de determinados tratamientos antihipertensivos. Esta aproximación inicial plantea estudios de farmacogenómica dependiendo de los grupos específicos que caracterizan a un determinado antihipertensivo.



Concentración media de tHcy en función de los genotipos PON-1 (Gln192Arg) y del tratamiento farmacológico.

7

**C-FOS CONTRIBUYE AL DAÑO RENAL INDEPENDIEMENTE DE NF-KAPPA B**

Hernández Perera O\*, Rodríguez Pérez JC\*, Díaz Herrera P\*\*, Cabrera Galván JC\*\*, Álvarez Prats A\*, Marrero Callicó A\*  
 \*Hospital de G. C. Dr. Negrin. Unidad de Investigación \*\*Facultad de Ciencias de la Salud. ULPGC. Departamento de Morfología.

Las lesiones renales en el modelo de ablación renal (5/6 Nx) están asociadas con la activación de NF-kappaB (RelA), como se ha descrito en SEN-2003. En este estudio, se valora la contribución del factor nuclear AP-1 al desarrollo de la enfermedad renal. Ratas Sprague-Dawley sometidas a 5/6 Nx, se sacrificaron a las 6 semanas y se usaron piezas de corteza renal para determinar el índice de glomerulosclerosis (GIS) y de daño tubulointersticial (DTI), la actividad de AP-1 y de NF-kappaB (TransAM™) y la expresión de mediadores de fibrosis renal cuya tasa de transcripción está regulada por AP-1, como colágeno IV, fibronectina 1, pre-proendotelina-1 y MCP-1 (RT-PCR en Tiempo Real). En los extractos nucleares de las ratas Nx (n = 8) se encontraron niveles aumentados de c-Fos, pero no de otros componentes del factor nuclear AP-1 como FosB, c-Jun ni JunD. La expresión de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proendotelina-1 y MCP-1 fue claramente superior (2,2, 4,2, 2,7 y 3,6 veces, respectivamente) en las ratas con ablación renal en relación al grupo Sham (n = 10). A38 nuevos animales se les sometió a 5/6 Nx y tras 7 días se aleatorizaron a tratamiento con Losartán (200 mg/L,vo), Cerivastatina (0,1 mg/kg/d, sng), Losartán + Cerivastatina, Carvedilol (20 mg/kg/d, vo) y un antagonista no selectivo de los receptores ETA y ETB (RO 48-5695, 30 mg/kg/d, sng). Los animales que recibieron Losartán + Cerivastatina normalizaron las expresiones de los mediadores de fibrosis renal previamente citados. En el análisis global de todos los grupos experimentales, se observó que las ratas que se encontraban en el cuartil superior de c-Fos, presentaban niveles de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proendotelina-1 y MCP-1 significativamente incrementados con respecto a los animales de los tres cuartiles restantes (p < 0,05 para todas las comparaciones). En el cuarto cuartil de cFos también se encontraron valores aumentados de GIS (cuartil superior: 101 ± 19, resto cuartiles: 57 ± 9, p < 0,05) y de DTI (cuartil superior: 1,74 ± 0,33, resto cuartiles: 0,72 ± 0,14, p < 0,01). No se encontró asociación entre las actividades de c-Fos y NF-kappaB. Ambos factores nucleares resultaron variables predictoras independientes de los niveles de expresión de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proendotelina-1 y MCP-1 en análisis de regresión lineal, encontrándose una capacidad predictora global del 54, 59, 41 y 51%, respectivamente (p < 0,0001 para los cuatro modelos establecidos). En conclusión, en nuestro modelo c-Fos contribuye al desarrollo de la enfermedad renal. Este efecto es independiente de la activación de NF-kappaB.

6

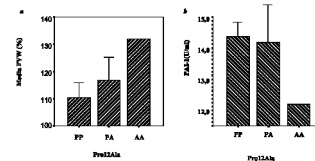
**LA VARIANTE PRO12ALA EN EL GEN PPAR-GAMMA 2 PODRÍA CONSTITUIR UN PREDICTOR EN SUJETOS CON ALTERACIONES VASCULARES**

Rodríguez Esparragón FJ, Rodríguez Pérez JC, Macías Reyes A, Hernández Trujillo Y, Anabartarte A, Caballero Hidalgo A  
 Hospital de Gran Canaria Dr. Negrin. Unidad de Investigación.

PPAR-gamma 2 (PPAR&#61543;2) es un gen cuya expresión se produce fundamentalmente en tejido adiposo. La variante Pro(P12Ala(A) en el gen PPARgamma-2 se ha asociado con un papel protector frente al desarrollo de diabetes mellitas (DM2). Recientemente hemos encontrado (J Hypertens 21: 1649-1655, 2003) mayores cifras de presión arterial diastólica (PAD), sistólica (PAS) y media (PAM) asociada a la homocigosis PP así como una mayor probabilidad de desarrollar hipertensión arterial esencial.

En este trabajo estudiamos la relación de la variante Pro12Ala con los marcadores endoteliales, factor von Willebrand e Inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) en sujetos sanos no diabéticos. Analizamos 263 individuos no sometidos a tratamiento farmacológico alguno. La determinación de los genotipos Pro12Ala se realizó por MS-PCR (mutagenesis separated PCR). Determinamos la actividad plasmática del cofactor ristocetina (Von Willebrand, %) y PAI-1 (U/ml) mediante kits convencionales a partir de sangre citrada. Obtuvimos una gradación en las actividades plasmáticas Von Willebrand de menor a mayor en función de los genotipos Pro12Ala (figura 1a). Obtuvimos una relación gradual por genotipos Pro12Ala para la actividad plasmática de PAI (figura 1b). Ninguna de estas correlaciones resultó estadísticamente relevante.

En conclusión, los individuos portadores de la homocigosis para el alelo Pro presentaron un menor porcentaje de actividad Von Willebrand y mayores valores promedio de actividad PAI. Estos datos sugieren la existencia de un mejor perfil de marcadores de la función endotelial en aquellos sujetos portadores del alelo Ala de la variante Pro12Ala. Probablemente, la variante Pro12Ala constituya un marcador de alguna otra variante génica en el propio gen o en PPAR-gamma&#61543;1 cuya importancia en el endotelio es mayor.



a) Media de valores genotipo + error (figura de la media para la actividad del cofactor ristocetina (Factor Von Willebrand) en función de los genotipos Pro12Ala del gen PPAR&#61543;2. b) Valores medios + error (figura de la media de la actividad plasmática del inhibidor del activador tisular del plasminógeno en función de las mutaciones Pro12Ala del gen PPAR&#61543;2).

8

**LA TERAPIA GÉNICA CON FACTOR DE CRECIMIENTO DE LOS HEPATOCITOS ATENUA LA PROGRESIÓN DE LA NEFROPATÍA CRÓNICA DEL ALOTRASPLANTE EXPERIMENTAL**

Torras J, Herrero-Fresneda I, Marcel.la Franquesa, Cruzado JM, Lloberas N, Rama I, Fillat C\*\*, Grinyo JM\*  
 \*Hospital de Bellvitge. Nefrología. \*\*Centre de Regulació Genòmica (CRG). Programa Gens i Malaltia.

En la nefropatía crónica del trasplante intervienen distintos mediadores y factores de crecimiento con acciones antagonicas. Uno de los relacionados con la lesión isquémica y la fibrosis renal es el HGF. La administración intramuscular de DNA de HGF humano (hHGF) en rata aumenta la producción renal del HGF endógeno (rHGF). Objetivo: Demostrar que la terapia génica con hHGF inhibe los mediadores pro-fibroticos para favorecer la reparación y regeneración tisular minimizando las lesiones de NCT.

**Metodos:** Se usó el modelo de alo-trasplante renal Fisher-to-Lewis con isquemia fría. Para la terapia génica, se inyectó/electroporó DNA plasmidico de hHGF intramuscular (800 µg) en dos pautas: pre-trasplante (citoprotección precoz peri trasplante de células tubulares) o a las 8 semanas (prevención retardada de mecanismos del daño crónico). Cada 4 semanas durante 24 semanas se midió creatinina (umol/l) y proteinuria (mg/24 h). A las 12 y 24 semanas, se evaluó glomerulosclerosis (%) y semicuantitativamente la vasculopatía y el daño tubulointersticial. A las 12 semanas se evaluaron miofibroblastos (α-SMA) e infiltrado inflamatorio (ED-1: macrófagos, CD45RC: linfocitos T/B). En tejido se cuantificó mRNA de rHGF y TGF-β por RT-real time-PCR (valor vs sham).

**Grupos:** No HGF (n = 14); sin hHGF; HGF-1NI (n = 11): hHGF previo al Tx; HGF-RET (n = 12): hHGF a 8 sem. del Tx.

**Resultados:** (\* p Conclusión: La terapia génica con hHGF intramuscular induce expresión renal de HGF endógeno y atenúa la progresión de la NCT.

9

••

**ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LAS LESIONES RENALES INDUCIDAS POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN EN RATONES C57/BJ PARP-1+/+ Y PARP-1-/- DEFICIENTES**

O'Valle F\*, Martín-Oliva D\*\*, Chamorro V\*\*\*, Gómez-Morales M\*\*\*\*, Vargas F\*\*\*, Oliver FJ\*\*\*\*\*. Del Moral RG\*\*\*\*\*  
 \*Facultad de Medicina, Universidad de Granada. \*\*Anatomía Patológica. \*\*CSIC, Granada - Inst. de Parasitología y Biocología. \*\*\*Facultad de Medicina, Universidad de Granada. - Bioquímica y Biología Molecular. \*\*\*\*H. Universitario San Cecilio de Granada. - Anatomía Patológica. \*\*Facultad de Medicina, Universidad de Granada. - Bioquímica y Biología Molecular. \*\*\*\*\*CSIC, Granada - Inst. de Parasitología y Biocología. \*\*\*\*H. Universitario San Cecilio de Granada - Anatomía Patológica.

El enzima nuclear Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP-1) es activado específicamente ante la ruptura del ADN propiciada por genotóxicos tales como los radicales libres derivados del oxígeno. La activación de PARP-1 consecutiva a la lesión en el ADN por radicales libres ha sido implicada en diversas condiciones fisiopatológicas renales como el daño por isquemia-reperfusión (I/R). Hasta la actualidad, no se ha establecido un modelo en ratón para estudiar la posible repercusión que tiene su activación o bloqueo sobre el daño morfológico y funcional del riñón. Nuestro propósito ha sido estudiar las lesiones histopatológicas renales achacables a la activación de PARP-1.

**Material y métodos:** Fueron utilizados 3 grupos de ratones C57/BJ PARP-1+/+ y PARP-1-/- deficientes de 24 semanas en un modelo de I/R consistente en clampar el pedículo vascular completo del riñón izquierdo durante 45 minutos seguido de 6 ó 48 horas de reperusión. A un tercer grupo de ratones les fue inoculado intraperitonealmente 10 mg/kg de peso de 3-aminobenzamida inhibidor de la PARP-1. En todos los animales, el riñón contralateral fue utilizado como control. Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% para su inclusión en parafina y posterior tinción con hematoxilina-eosina, PAS y fijadas en glutaraldehído para su estudio ultraestructural. Parte de la muestra fue congelada en nitrógeno líquido para estudio de la expresión de PARP-1 por Western-blotting (WB).

**Resultados:** Los riñones control no presentaron ninguna anomalía morfológica cortical o medular, en ningún caso se observó daño glomerular, tubulointersticial ni vascular. Los ratones deficientes en PARP-1-/- sólo mostraron leve e incipiente vacuolización celular en túbulos aislados. Los ratones PARP-1+/+ por el contrario tras 6 horas de reperusión presentaron moderada y difusa vacuolización en túbulos corticales, desprendimiento células tubulares con desestructuración del ribete en cepillo de túbulos con torneados proximales y numerosos glóbulos proteicos PAS+ (proteína de Tamm Horsfall) en túbulos corticales. Tras 48 horas de reperusión, amplias áreas de necrosis tubular y focos de infarto renal fueron evidentes. La expresión de PARP-1 por WB guardó relación con la isquemia/repercusión renal en los ratones PARP-1+/+.

**Conclusión:** La presencia de lesiones parenquimatosas renales similares a la necrosis tubular aguda incipiente indica que el modelo experimental es adecuado para valorar el daño por I/R y la demostración de la inducción de PARP-1 por WB junto con las escasas alteraciones renales en ratones deficientes en PARP-1 pone de manifiesto su relación con dichos cambios lesionales.

**Palabras clave:** PARP-1, isquemia/repercusión, necrosis tubular.

10

••

**REGRESIÓN DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA AVANZADA MEDIANTE TERAPIA GÉNICA CON HEPATOCYTE GROWTH FACTOR EN RATAS**

Cruzado JM\*, Lloberas N\*, Torras J\*, Herrero I\*, Riera M\*, Fillat C\*\*, Arán JM\*\*\*, Grinyó JM\*  
 \*Hospital Universitari Bellvitge. Nefrología. \*\*Centre de Regulació Genòmica. Genòmica. \*\*\*IRO. Genética.

La nefropatía diabética (ND) es la principal causa de enfermedad renal terminal en los países desarrollados. En este trabajo, demostramos el beneficio terapéutico de la terapia génica con hepatocyte growth factor (HGF) en la ND avanzada utilizando un modelo en la rata de diabetes inducida por estreptozotocina. La ND precoz (16 semanas después de la inducción de diabetes) se caracterizó por albuminuria, hiperfiltración e hipertrofia glomerular, mientras que la ND avanzada (32 semanas después de la inducción de diabetes) mostró una marcada sobreexpresión de transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1), expansión mesangial y glomerulosclerosis. En nuestro experimento administráramos por vía intramuscular el plásmido HGF humano formulado con el polímero SP1017 a la vez que se procedía a electroporar el músculo tibial anterior para facilitar la incorporación del DNA. El tratamiento se realizó en ratas con ND en fase precoz y con ND en fase tardía. El tratamiento cubría el periodo de 30 días de seguimiento, según demostramos mediante monitorización de los niveles de HGF humano circulantes (ELISA). La terapia génica con hHGF sobrerregulaba el HGF endógeno de la rata en el riñón diabético (el HGF de rata medido mediante RT-PCR era 3 veces mayor en las ratas diabéticas tratadas que en las no tratadas). La terapia génica con hHGF no mejoró las alteraciones morfológicas y funcionales que caracterizaban la ND precoz. En cambio, en la ND avanzada la terapia génica con hHGF redujo la albuminuria e indujo una marcada regresión de la expansión mesangial y de la glomerulosclerosis. Estos hallazgos, se asociaron a la supresión de la sobreexpresión renal de TGF-beta 1 y mesangial de connective tissue growth factor (CTGF), a la vez que a una inhibición de la expresión renal de tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) y a una reducción de número de miofibroblastos en el intersticio renal. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la terapia génica con hHGF puede ser una alternativa terapéutica eficaz e innovadora para tratar la ND avanzada.

11

••

**EFFECTO DE SIROLIMUS SOBRE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA INCIPIENTE EN RATAS**

Cruzado JM, Lloberas N, Herrero I, Marcel.la Franquesa, Rama I, Alperovich G, Torras J, Grinyó JM  
 Hospital Universitari de Bellvitge - Nefrología.

Datos recientes sugieren que inmunosupresores como MMF son capaces de reducir las lesiones glomerulares de nefropatía diabética (ND). Sirolimus (SRL), además de ser un potente inmunosupresor, inhibe la proliferación y fibrosis dependiente de factores de crecimiento en células de origen mesenquimal. El objetivo de éste trabajo es evaluar el efecto de SRL sobre la ND incipiente. La diabetes se indujo en ratas Sprague-Dawley mediante STZ. A las 16 semanas los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: D (n = 8, diabetes), D + SRL (n = 7, diabetes + 1 mg/kg/d de SRL), D + NG (n = 5, diabetes + implantes de insulina para conseguir normoglicemia), control (n = 6, animales no diabéticos de la misma edad). Los animales diabéticos presentaban hipertrofia glomerular (VGM 5,0 ± 0,4 en D vs 3,3 ± 0,2 µ.3/10,6 en control, P. En conclusión, SRL revierte las alteraciones funcionales de la ND incipiente. Este efecto no parece depender de la reducción del número de células inflamatorias sino de la disminución de células capaces de producir matriz extracelular.

12

••

**DESARROLLO DE UNA NEFROPATÍA IGA TRAS LA SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL-2 EN LINFOCITOS B**

Marquina R\*, Díez MA\*, López-Hoyos M\*\*, Buelta L\*\*\*, Villegas J\*\*\*\*, Arias M\*\*\*\*\*, Merino J\*, Merino R\*  
 \*Universidad de Cantabria. Departamento de Biología Molecular. \*\*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio de Inmunología. \*\*\*Universidad de Cantabria. Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. \*\*\*\*Universidad de Cantabria. Departamento de Anatomía y Biología Celular. \*\*\*\*\*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio de Nefrología.

A pesar de que la nefropatía IgA es la forma más prevalente de glomerulonefritis en el mundo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos patogénicos implicados en ella. En ratones (NZW x B6) F1, predispuestos a enfermedades autoinmunes, la hiperexpresión de Bcl-2 humano en células B promueve la aparición de un síndrome lúpico dependiente de células CD4 caracterizado por hipergammaglobulinemia IgG e IgA, producción de autoanticuerpos y el desarrollo de una glomerulonefritis fatal. El análisis de las lesiones glomerulares por microscopía óptica, electrónica e inmunofluorescencia indican que la glomerulonefritis observada en estos ratones es similar a la nefropatía IgA humana. La hiperexpresión de Bcl-2 en las células B también aumenta la respuesta inmune sistémica IgA frente a antígenos T dependientes. Además, la IgA purificada de ratones (NZW xB6) F1-hbcl-2 Tg, pero no la de (NZW x B6) F1 no Tg, presenta un patrón de galactosilación terminal reducido y una mayor capacidad para depositarse en el mesangio glomerular, como se observa en pacientes con nefropatía IgA. En conclusión, el presente estudio indica que defectos en la regulación de la supervivencia de los linfocitos B pueden estar involucrados en la patogénesis de la nefropatía IgA. Además, describimos un nuevo modelo experimental de nefropatía IgA útil para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la patogénesis de esta forma de glomerulonefritis.

13

**INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ALOANTICUERPOS MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON FK778 EN UN MODELO EXPERIMENTAL{ IN VIVO DE INTERACCIÓN ALOGÉNICA T-B**

Ramos MA\*, Santiuste I\*, Merino J\*\*, Arias M\*, Merino R\*\*  
 \*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Unidad de Investigación. \*\*Universidad de Cantabria. Departamento de Biología Molecular.

Múltiples evidencias indican que aloanticuerpos (alo-Ac) dirigidos frente a antígenos del donante juegan un papel patogénico importante en los rechazos agudos o crónicos de aloinjertos. Lesiones mediadas por alo-Ac surgen a pesar del empleo de potentes agentes farmacológicos, y su control precisa una terapia diferente. En el modelo experimental de inducción de tolerancia neonatal a aloantígenos, la inyección de células linfoides semialojénicas H-2d/b de ratones (BALB/Cx57BL/6) F1 en neonatos BALB/c (H-2d) origina la inducción de tolerancia específica de los linfocitos T citotóxicos frente a los aloantígenos. Sin embargo, las células T CD4+ alorreactivas del huésped, reconocen aloantígenos H-2b expresados en las células B semialojénicas del donante F1, activándolas para producir alo-Ac (en este caso auto-Ac).

**Objetivo:** Explorar *in vivo* los efectos del tratamiento con FK778 en la producción de Ac asociada con respuestas alorreactivas. Además, el modelo que utilizamos permite explorar si el tratamiento con FK778 estimula la inducción de tolerancia de las células T CD4+ alorreactivas.

**Métodos:** Se empleó el modelo experimental de inducción de tolerancia neonatal a aloantígenos. El tratamiento administrado fue FK778 20 mg/kg/2 días, por vía ip desde el día 1 de vida. Los niveles séricos de Ac anti-ssDNA, usados como marcador de la interacción semialojénica T/B, fueron analizados mediante ELISA.

**Resultados:** El tratamiento de ratones BALB/c tolerizados neonatalmente con 20 mg/kg de FK778 cada 2 días origina la completa inhibición de la producción de auto-Ac anti-ssDNA a las 3 semanas de vida. Sin embargo, la interrupción del tratamiento en la 3ª semana de vida promueve la producción de los auto-Ac anti-DNA, indicando que este tratamiento no es eficiente para inducir la tolerancia de las células T CD4+.

**Conclusión:** Nuestros resultados muestran claramente que FK778 es un agente inmunosupresor útil para evitar la producción de alo-Ac asociados con alo-reconocimiento.

**Palabras clave:** Célula endotelial, VEGF, medio condicionado tumoral.

14

**LA INSERCIÓN DE UNA SECUENCIA ALU EN EL GEN CLCN5 DE UN PACIENTE CON ENFERMEDAD DE DENT CAUSA LA PÉRDIDA DEL EXÓN 11 EN EL MRNA**

Claverie-Martín, F\*, Flores, C\*, Antón Gamero, M\*\*, García Nieto, V.  
 Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Unidad de Investigación. \*\*Hospital Universitario Reina Sofía. Pediatría.

**Introducción:** La enfermedad de Dent es una tubulopatía renal caracterizada por proteinuria de bajo peso molecular, hipercalcemia, nefrocalcinosis, nefrolitiasis, raquitismo, y fallo renal. Mutaciones en el gen CLCN5 del cromosoma X son la causa de esta enfermedad. Este gen codifica la proteína CIC-5 que se expresa en la membrana de los endosomas apicales de las células epiteliales del túbulo proximal. Un defecto en este canal impide la endocitosis, lo cual explica la proteinuria de bajo peso molecular en estos pacientes. Recientemente, nuestro grupo ha identificado un nuevo tipo de mutación en el gen CLCN5 que consiste en la inserción de una secuencia Alu en el exón 11. Las secuencias Alu son elementos móviles que han generado más de un millón de copias en nuestro genoma. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la inserción en el procesamiento del mRNA de CLCN5.

**Paciente y métodos:** El paciente presenta hipercalcemia y proteinuria de bajo peso molecular. El RNA total se extrajo de la sangre del paciente y de su madre. Para el análisis del mRNA utilizamos RT-PCR con hexámeros alazar. El cDNA resultante se amplificó por PCR y se analizó mediante secuenciación automática. Para comparar los transcritos procedentes de linfocitos y de riñón utilizamos tres pares de oligonucleótidos específicos que abarcan la región codificante del gen CLCN5.

**Resultados:** El análisis previo del mRNA procedente de sangre y de riñón indicó que ambos son equivalentes. El mRNA del paciente mostró la escisión completa del exón 11. Esta alteración predice una proteína CIC-5 que carece del segundo dominio CBS del extremo carboxilo citoplasmático. Estos dominios están implicados en la interacción de CIC-5 con otras proteínas y, posiblemente, en la apertura del canal. Los ensayos con el RNA de la madre del paciente mostraron una predominancia en la expresión del mRNA truncado. Utilizando el programa informático ESE finder, pudimos determinar que la secuencia Alu está insertada en una región reguladora del splicing.

**Conclusiones:** El elemento Alu está insertado en una región codificante de CLCN5 que además participa en la regulación del procesamiento del mRNA. El efecto de esta mutación es la pérdida del exón 11 en el mRNA. El transcrito alterado daría lugar a una proteína CIC-5 sin el dominio CBS2, con la consiguiente pérdida de función del canal.

Proyecto (40/02) financiado por la Fundación Canaria de Investigación y Salud FUNCIS.

**Palabras clave:** Tubulopatía proximal, CLCN5, procesamiento del mRNA.

15

**DIFERENTES INFLUENCIAS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL Y DEL FACTOR DECRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) EN LA SUPERVIVENCIA ENDOTELIAL FRENTE A ANOIKIS**

Neria, F\*, Castilla, MA\*, González-Pacheco, FR\*, Pereira, D\*\*, Deudero, JJP\*, De Solís, AJ\*, Peñate, S\*, Caramelo, C\*  
 Fundación Jiménez Díaz. Nefrología e Hipertensión. \*\*Imclone Systems Inc. Research Department.

**Introducción:** Las uniones intercelulares y con la matriz extracelular son esenciales para la supervivencia de las células endoteliales (CE). La rotura de estas uniones induce un tipo particular de apoptosis conocida como anoikis. La pérdida de sensibilidad a anoikis es un elemento clave para el proceso de reendotelización a partir de CE circulantes. No se conoce cómo influye un medio tumoral y, específicamente, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), presente en la mayoría de los tumores, sobre la anoikis endotelial.

**Materiales y métodos:** Medio condicionado (MC) de células tumorales de una línea (MG-63) productora de VEGF, con similitudes biológicas y de mediadores con los carcinomas de células renales. Células endoteliales (CE) en cultivo primario y confluentes, depletadas de suero fetal (SF) y tratadas, durante 24 h, con MC o VEGF, así como con inhibidores de posibles rutas implicadas. Posteriormente, cultivo en suspensión, para provocar anoikis, en frascos agitadores tratados con SigmaCote y placas pretratadas con Poly-HEMA, no adhesivas. Se utilizó un medio de cultivo suplementado con 1% de SF, con el fin de evitar el efecto debido a la falta de suero. La muerte celular se analizó por citometría de flujo. Activación de CE por diversos métodos.

**Resultados:** 1. El pretratamiento de las CE con MC activa las CE e induce un aumento de la supervivencia endotelial en suspensión. 2. Al pretratar las CE con anticuerpos específicos frente a VEGF o frente a su receptor principal VEGFR2/KDR, o con un inhibidor de PI3K-Akt (LY294002), el porcentaje de muerte de CE en suspensión se reduce. 3. Al contrario de lo esperado, el pretratamiento de las CE con VEGF (20 ng/ml) induce un claro aumento de la muerte celular en suspensión. 4. Este efecto del VEGF desaparece por completo cuando sepretrata simultáneamente con VEGF y AG490, un inhibidor específico de la ruta JAK-STAT.

**Conclusiones:** 1. El MC promueve la supervivencia de CE desarraigadas de la monocapa. 2. Por el contrario, el empleo aislado de VEGF favorece la anoikis; lo opuesto se consigue con el bloqueo de VEGF. 3. Estos últimos efectos parecen involucrar a la vía JAK-STAT. 4. En conjunto, los resultados sugieren que la activación individual de vías protectoras en condiciones confluentes provoca un efecto paradójico favorecedor de la anoikis. La prevención de esta última parece requerir una combinación de múltiples factores de crecimiento, como la existente en el MC.

**Palabras clave:** Célula endotelial, VEGF, medio condicionado tumoral.

16

**EFFECTO DE RAPAMICINA EN LA PREVENCIÓN DE LA NEFROPATÍA LÚPICA DEL MODELO DE LUPUS MURINO NZB/WF1**

Piñera C\*, Ramos A\*, Buelta L\*\*, De Cos MA\*\*\*, Setián MA\*, Merino R\*, De Francisco ALM\*, Arias M\*  
 \*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio de Nefrología. \*\*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio de Patología. \*\*\*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio de Farmacología.

**Introducción:** Las hembras de los ratones NZB/WF1 presentan un síndrome autoinmune severo que se comporta como una nefritis lúpica, con proteinuria importante, títulos elevados de distintos autoAc y muerte precoz de los ratones. Las lesiones renales se caracterizan por aumento de la matriz mesangial acompañado de proliferación celular. Distintos trabajos demuestran la mejoría clínica, serológica y anatomopatológica de esta estirpe de ratones cuando son tratados con esteroides u otros inmunosupresores.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de rapamicina en el tratamiento de esta patología en los ratones NZB/WF1.

**Material y métodos:** Los animales se agruparon en: 25 ratones NZB/WF1 que recibieron tratamiento con rapamicina (1 mg/kg/día) y, 20 ratones que recibieron el solvente utilizado en la solubilización de la rapamicina (grupo control). El tratamiento se administró entre las semanas 12 y 45 de vida. La evaluación se realizó mediante el análisis de parámetros clínicos (proteinuria y supervivencia), serológicos (títulos de Ac antiDNA, y concentración de Ig tanto IgG total como subclases) y, anatomopatológicos.

**Resultados:** En el grupo de ratones tratados con rapamicina se consiguió: 1) Evitar la aparición de proteinuria (0,7 en los tratados con rapamicina frente a 3,3 en el grupo control). 2) Mejorar de forma significativa la supervivencia, que al finalizar nuestro seguimiento (en la semana 45 de vida) fue del 96% en los ratones tratados frente a un 15% en los ratones no tratados (grupo control). 3) Evitar la aparición de las lesiones anatomopatológicas características de este modelo murino. 4) Impedir la aparición de los autoAc antiDNA, característicos de este modelo experimental; Además, se observó un cambio en las proporciones relativas de las subclases de IgG (disminución de IgG2a e IgG3 y elevación de IgG1) que producían estos ratones.

**Conclusión:** El tratamiento con rapamicina previene la aparición de lesiones en los ratones NZB/WF1. Esto sugiere que la rapamicina podría ser un agente terapéutico útil en el tratamiento de la nefritis lúpica en humanos.

**Palabras clave:** Lupus murino, rapamicina, proteinuria.

17  
••

**PAPEL DEL CTGF EN LA FIBROSIS RENAL EN SHR. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CANDESARTAN**

De las Heras N\*, Sanz-Rosa D\*, Ruiz-Ortega M\*\*, Rupérez M\*\*\*, Cediel E\*, Miana M\*, Lahera V\*, Cachofeiro V\*  
\*Facultad de Medicina, UCM. Dpto. Fisiología. \*\*Fundación Jiménez Díaz, UAM. Lab. Investigación Vascular y Renal. \*\*\*Fundación Jiménez Díaz, UAM. Lab. Investigación Vascular y Renal.

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) está implicado en la fibrosis en diversas nefritis humanas, sin embargo no hay apenas estudios en hipertensión.

*Objetivo:* Estudiar el efecto del bloqueo de la angiotensina II en las alteraciones renales asociadas a hipertensión en ratas, evaluando la fibrosis renal y la regulación del factor profibrótico CTGF.

*Metodología:* Se utilizaron ratas macho (n = 8) espontáneamente hipertensas (SHR) de 18 semanas de edad, tratadas durante 10 semanas con el antagonista del receptor AT1 candesartan (2 mg/kg/día) y ratas normotensas (WKY) (n = 8) como grupo control. Al final del tratamiento se midió la presión arterial sistólica (PAS), los niveles de creatinina plasmática y de proteínas en orina. Para evaluar la fibrosis se determinó la expresión renal del CTGF, evaluando la expresión génica mediante la técnica de RT-PCR y los niveles de proteína por inmunohistoquímica.

*Resultados:* Las SHR presentaron unos valores de PAS mayores que las ratas controles WKY (208,13 ± 4,93 vs 130,38 ± 0,68 mmHg; p.

*Conclusiones:* 1) La angiotensina II, a través del receptor AT1, participa en el proceso fibrótico renal mediante la estimulación del CTGF. 2) La angiotensina II está implicada en el daño renal asociado a hipertensión arterial.

*Palabras clave:* Hipertensión, fibrosis, angiotensina II.