

1

ACELERACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DEL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN RENAL MEDIANTE ELECTROTRANSFERENCIA DIRECTA DEL GEN hHGF EN EL RIÑÓN

Franquesa M, Alperovich G, Herrero-Fresnedo I, Lloberas N, Bolaños N, Cruzado JM, Grinyó JM, Torras J
Nefrología experimental. Hospital de Bellvitge.

Introducción: En la fase temprana del trasplante renal, el injerto se expone a insultos tales como el de isquemia-reperfusión (I/R) produciéndole daño agudo que le predispone a la nefropatía crónica y pérdida de función a largo plazo. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) estimula la capacidad de regeneración renal en respuesta al daño gracias a su efecto mitogénico, morfogénico, motogénico y anti-apoptótico. Nuestro objetivo fue evaluar si la electrotransferencia de HGF humano (hHGF) ayuda a la recuperación de la función y acelera la regeneración en un modelo de ratas Sprague-Dawley sometido a isquemia caliente, considerando que el trasplante permite la manipulación del órgano *in vivo*. A la vez comparamos dos modelos de electrotransferencia: directa al riñón o aplicada sobre el músculo.

Material y métodos: Después de construir un plásmido de hHGF ADN, se dividió a los animales en 3 grupos (n = 11): Isq (45 minutos de isquemia caliente, sin tratamiento), Isq + EPM (inyección de hHGF en músculo seguido de electroporación y 3 días después 45 minutos de isquemia caliente), e Isq + EPR (inyección de hHGF en arteria renal seguida de electroporación y 3 días después 45 minutos de isquemia caliente). Se determinó el peso y la creatinina plasmática los días 1, 3, 5 y 7 luego de la isquemia, y a los 7 días se procesaron los riñones para análisis histológico (He, PAS, ED-1, Cd45Rc, Apoptag, PARP) y estudios moleculares (Real-time PCR, ELISA).

Conclusión: La electrotransferencia génica de hHGF acelera la recuperación de la función renal después del daño inducido por isquemia, cursando además con menor necrosis tubular, apoptosis y mayor regeneración y proliferación de las células tubulares. La electroporación con hHGF podría convertirse en un arma terapéutica para acelerar la recuperación del daño isquémico agudo, tanto en el riñón nativo como en el trasplantado.

| GRUPO | TGF-β/HGF | HGF/Rata (ng/mg prot) | sCR umol/L | | | | Necrosis | Regeneración | Apoptosis |
|--------------------------|-------------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------------|--------------|------------|
| | | | Día 1 | Día 3 | Día 5 | Día 7 | | | |
| Isquémico no tratado | 0.45 ± 0.25 | 1.01 ± 0.1 | 262.1 ± 32.2 | 216.4 ± 48.5 | 164.7 ± 55.5 | 77.9 ± 2.8 | 2.3 ± 0.3 | 1 ± 0.3 | 7.3 ± 1.9 |
| Electroporado en músculo | 0.4 ± 0.2 | 1.6 ± 0.2 | 228.9 ± 25.6 | 186.6 ± 31.1 | 109.7 ± 18.7 | 87.5 ± 10.4 | 1.9 ± 0.2 | 1.4 ± 0.5 | 2.9 ± 0.6* |
| Electroporado en riñón | 0.3 ± 0.2 | 1.6 ± 0.2 | 224.7 ± 18.7 | 108.3 ± 8.2* | 79.4 ± 4.3 | 75.5 ± 3.1 | 1.3 ± 0.2* | 1.4 ± 0.5 | 2.1 ± 0.8* |

Efectos de la electrotransferencia de hHGF en la expresión de TGF beta-HGF, en la función renal, necrosis, regeneración y apoptosis.

3

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN TRES FAMILIAS CON SÍNDROME DE GITELMAN

Aznar Y*, Fenollosa M.* A*, Lurbe E**, Torró I**, Aguilar F**, Oltra A*, Fernández M*, Pérez A*
**Nefrología. Hospital General de Valencia. **Pediatría. Hospital General de Valencia.*

Introducción: El Síndrome de Gitelman es un trastorno tubular caracterizado por alcalosis metabólica, hipocalcemia, hipomagnesemia de origen renal e hipocalciuria. Se ha asociado a mutaciones del gen que codifica el cotransportador Na-Cl tiazida sensible en el túbulo distal.

Objetivo: Establecer la relación fenotipo-genotipo del Síndrome de Gitelman, estudiando a tres familias, a partir del caso índice.

Material y métodos: Se estudian 3 familias, dos de ellas de etnia gitana, con un total de 18 miembros. Los casos índices fueron niños que cumplieron los criterios clínicos de síndrome de Gitelman (tabla 1). Las manifestaciones clínicas fueron inespecíficas y de carácter intermitente (debilidad muscular, fatiga o mareos). A los casos índice y familiares se les realizó historia clínica y obtención de muestras de sangre y orina para analizar los parámetros bioquímicos conducentes a la tipificación del síndrome. En los casos índice y familiares se han realizados estudios orientados a la tipificación genética mediante SSCP con posterior caracterización por secuenciación.

Resultados: Los datos analíticos de los casos índice, dos de una misma familia, casos 3 y 4, en el momento del diagnóstico se muestran en la tabla siguiente:

| | Edad (años) | Sexo | K (p) mEq/L | K (o) mEq/L | Mg (p) g/l | Mg (o) mg/kg/día | Ca (o) mg/kg/día | Renina plasmática ng/ml/min |
|--------|-------------|------|-------------|-------------|------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| Caso 1 | 4 | M | 1,9 | 124 | 1,1 | 3,13 | 0,3 | 23 |
| Caso 2 | 6 | H | 2,4 | 46,2 | 0,9 | 3,2 | 0,8 | 15 |
| Caso 3 | 11 | M | 3 | 37,7 | 1,5 | 3,25 | 0,3 | 18 |
| Caso 4 | 7 | H | 3,2 | 32,3 | 1,6 | 3,1 | 0,9 | 24 |

Se analiza la relación entre las alteraciones bioquímicas y la presencia o ausencia de las diferentes mutaciones.

Conclusión: Dado que el diagnóstico del Síndrome de Gitelman suele ser por exclusión, sería conveniente trabajar sobre la posible relación entre la genética heterogénea y la variabilidad fenotípica que se viene observando en pacientes con la misma mutación.

- Aceptado Póster
- Aceptado Presentación Oral

2

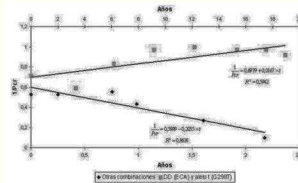
VARIANTES GÉNICAS Y PROGRESIÓN DE LA NEFROPATÍA IgA

Rodríguez-Pérez JC*, Macías-Reyes A**, Rodríguez-Esparragón F**, Caballero-Hidalgo A**, Anabitarte A**, Plaza C**, Cobo MA***, Checa-Andrés MD****
Nefrología-Investigación. HUGC. Dr. Negrín. **Investigación. HUGC. Dr. Negrín. *Nefrología. HUC. (Tenerife). ****Nefrología. HU. Insular (GC).*

El trabajo corresponde a un grupo de trabajo o un estudio multicéntrico: Estudio Multicéntrico Nefropatía IgA en Canarias.

Existe controversia en la progresión de la nefropatía IgA (nIgA) a la enfermedad renal crónica (ERC) debido a su presentación clínico-histológica y repuesta terapéutica. Esta controversia afecta al valor de los estudios genéticos. Estudiamos el papel de diferentes variantes genéticas en los genes: ECA, AGT y AT1R (del SRA), BR1 (Bradicinina) y eNOS (ON sintasa endotelial) y sus interacciones en la progresión de la nIgA. Llevamos a cabo un estudio (1999-2004) multicéntrico retrospectivo-prospectivo en la CCAA Canarias abarcando 3/4 hospitales (3º nivel). Se incluyeron los últimos 100 ptes con criterios histológicos de nIgA 1ª, no familiar (OMS, Haas M). En la distribución por genotipos comprobamos la escasa frecuencia de variantes génicas como homocigotos CC y aa de los genes BR1 y eNOS (4a/b). Esto ocurría igualmente en nuestra población control. Se realizaron agrupaciones génicas atendiendo al criterio de alelo menos favorable (Gen ECA: II vs alelo D; AGT: MM vs alelo T; Gen AT1R: AA vs alelo C; Gen BR1: GG vs alelo C; Gen 4a/b: bb vs alelo a y Gen G298T: GG vs alelo T). Para determinar la evolución de la función renal se utilizó (1/Pcr) = alfa + B x t.

No se encontró asociación entre tasa de progresión de la ERC y alguno de los genes estudiados. Cuando consideramos interacciones génicas, sólo aquellos homocigotos DD (gen ECA) y portadores del alelo T (variante G298T del gen eNOS) progresaron más lentamente a la ERC (p = 0,016). Estas diferencias no se explicaban por el tratamiento. Aunque sin diferencias significativas (p = 0,35) los ptes DD y portadores alelo T (G298T) en tratamiento con IECAs y/o ARA2 progresaron más lentamente a la ERC. Nuestros datos podrían sugerir que estos genes se asocian con la progresión de la nIgA y con la respuesta terapéutica a bloqueantes del SRA.



4

RIESGO HIPERTENSIVO Y VARIANTES GÉNICAS MTHFR (C677T) Y PARAOXONASA-1 (GLN192ARG) Y (MET55LEU). MÚLTIPLES DETERMINANTES

Rodríguez Esparragón F*, Rodríguez Pérez JC**, Hernández Trujillo Y*, Macías Reyes A*, Losada Cabrera A*, Caballero Hidalgo A*
**Investigación. HUGC. Dr. Negrín. **Investigación-Nefrología. HUGC. Dr. Negrín.*

El polimorfismo C677T del gen MTHFR constituye un marcador de riesgo hipertensivo de forma parcialmente independiente de la homocisteína plasmática total (tHcy) en nuestra población (*Clin Exp Hipertens* 2003; 25(4): 209-220).

Un metabolito de la Hcy, la homocisteína tialactona (Hcy-TL), produce afectación proteica modificando residuos de lisina. La actividad tialactonasa hidrolasa (HTasa) radica en la proteína polimórfica paraoxonasa-1 (PON-1) e hidroliza la Hcy-TL a Hcy. Dos son las variantes de mayor interés: Gln (alelo Q)¹⁹² -> Arg (alelo R) y Met55Leu. Se ha observado alta actividad paraoxonasa/HTasa asociada a los alelos R192 y L55 y baja asociada a los alelos Q192 y M55.

Nos propusimos determinar si la actividad HTasa representaría un factor de confusión en el riesgo hipertensivo asociado al genotipo TT del polimorfismo C677T del gen MTHFR. Genotipamos a 166 hombres hipertensos emparejados por edad con 162 normotensos para la variante MTHFR observando que la distribución de genotipos difería significativamente (p = 0,032) con un riesgo hipertensivo asociado a la presencia del alelo T de OR = 1,6; IC 95% (1,05-2,6). Las distribuciones de los genotipos PON-1 no diferían. Tampoco al considerar las diferentes agrupaciones de alelos o las interacciones.

Analizamos la distribución de genotipos MTHFR (C677T) agrupados como portadores del alelo T y homocigóticos CC en los grupos generados al dicotomizar según: a) la presencia conjunta de los alelos R y L y b) no ser poseedores conjuntamente de los alelos R y L (tabla 1).

De nuestros datos puede deducirse la utilidad del alelo T de la variante C677T del gen MTHFR como marcador de riesgo hipertensivo.

Palabras clave: Genes, Paraoxonasa, MTHFR, Homocisteína, Hipertensión arterial.

| Genotipos PON-1 | MTHFR (C677T) | | |
|--------------------------|---------------|--------------------|------------|
| | CC | Portadores alelo T | |
| a) No alelos R192 no L55 | Hipertensos | 21 (21,6%) | 76 (78,4%) |
| | Normotensos | 47 (48,0%) | 51 (52,0%) |
| b) Alelos R192 y L55 | Hipertensos | 57 (44,9%) | 70 (55,1%) |
| | Normotensos | 44(41,5%) | 62 (58,5%) |

$\chi^2 = 14,8; p < 0,001$
 $OR = 4; IC 95\% (1,9 - 8,4)$
 $\chi^2 = 0,26; p = 0,605$

5

POLIQUISTOSIS HEPÁTICA AUTOSÓMICA DOMINANTE SIN POLIQUISTOSIS RENAL ASOCIADA CON UNA NUEVA MUTACION DEL GEN PRKCSH

Peces R*, Drenth JPH**, Peces C***, Morsche RHM**, González P****
 *Servicio Nefrología. Hospital Universitario La Paz. Madrid. ** Division of Gastroenterology. Radboud University. Nijmegen. The Netherlands. ***Servicios Centrales. Centro de Innovación en Tecnologías de la Información del SESCAM. ****Servicio Digestivo. Hospital La Mancha-Centro. Alcazar de San Juan.

La poliquistosis hepática autosómica dominante (PHAD) aislada es una entidad genéticamente distinta de la poliquistosis hepatorenal, pero con una patogénesis y unas manifestaciones clínicas similares. La PHAD se ha observado en menos de 50 familias de ancestro finlandés, alemán, americano, belga e hispano-belga, habiéndose descrito un total de 9 mutaciones distintas en el gen PRKCSH (cromosoma 19p13.2-13.1) y un número menor en el gen SEC63 (cromosoma 6q21), como causantes de la enfermedad. El gen PRKCSH tiene 18 exones y codifica la proteína hepatocistina, que se expresa en el epitelio biliar.

Se presenta la primera familia española, compuesta del sujeto probando, sus padres y sus dos hijos, con una forma grave de PHAD no asociada con poliquistosis renal, en la que como manifestaciones clínicas más importantes destacaron la presencia de hipertensión portal y compresión de la vena cava inferior producida por los quistes hepáticos. La clonación reciente de los genes involucrados en la PHAD permitió un diagnóstico molecular firme en esta familia.

El análisis secuencial del gen PRKCSH del ADN aislado del sujeto probando demostró un cambio en el par de bases (C > T) en un alelo en la posición 841. Esta mutación, C841T, localizada en el exón 10 resulta en un cambio en la composición de aminoácidos de la hepatocistina con reemplazamiento de arginina por triptófano en el codón (R281W). La mutación de cambio de sentido estaba también presente en la madre afectada del probando pero no en sus dos hijos.

Varias líneas de evidencia sugieren que R281W representa una auténtica mutación causante de enfermedad: 1) En esta familia existe segregación de la mutación con la enfermedad. 2) La arginina, un aminoácido positivamente cargado es reemplazado por triptófano que es neutro, y 3) C en la posición 841 está altamente conservado entre las diferentes especies. La identificación de mutaciones de los genes PRKCSH y SEC63 en la PHAD implica vías no cilíares en la enfermedad poliquística del hígado, y proporciona un nuevo punto de vista celular y molecular para entender los procesos de citogénesis en la enfermedad poliquística humana en general.

7

DISMINUCIÓN EN LA EXCRECIÓN URINARIA DE AQUAPORINAS EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA DESCOMPENSADA

Esteva-Font C*, Guevara M**, Baccaro ME**, Ars E*, Jiménez W***, Ballarín JA****, Ginés P**, Fernández-Llama P****
 *Laboratorio de Biología Molecular. Fundació Puigvert, Barcelona. **Servicio de Hepatología. Hospital Clínic, Barcelona. ***Laboratorio de Hormonal. Hospital Clínic, Barcelona. ****Servicio de Nefrología. Fundació Puigvert, Barcelona.

Las aquaporinas o canales de agua son proteínas de membrana que facilitan el transporte osmótico de agua en el epitelio tubular renal. En modelos animales de cirrosis hepática (CH) se han descrito alteraciones en la regulación de las aquaporinas. En condiciones fisiológicas se ha demostrado en el hombre la presencia de aquaporinas en la orina. El análisis de su excreción urinaria podría tener relevancia en el estudio de la fisiopatología de la retención hidrosalina en la CH. El objetivo de este trabajo era investigar si existe una alteración en la excreción urinaria de aquaporinas en pacientes con CH. Se recogieron muestras de orina de 24 h de 11 voluntarios sanos, 13 pacientes con CH sin ascitis (CH compensada) y 12 pacientes con CH ascitis (CH descompensada). Se analizó mediante inmunoblot la excreción urinaria de aquaporina-1 (canal de agua del túbulo proximal) y aquaporina-2 (canal de agua del túbulo colector regulado por la vasopresina). No se observaron diferencias en la excreción de aquaporina-1 y aquaporina-2 entre los controles y los cirróticos compensados. Sin embargo, en los pacientes con CH descompensada las excreciones medias de aquaporina-1 y de aquaporina-2 estaban disminuidas un 72% y un 94% en relación con los controles (p = 0,0001 y p = 0,0003 respectivamente). No se observaron, por otro lado, diferencias significativas en los niveles plasmáticos de vasopresina entre estos dos grupos (controles 1,15 ± 0,29 vs CH descompensado 2,62 ± 0,59 ng/L, p = 0,05). Estos resultados sugieren la presencia de menor cantidad de aquaporinas en el riñón y por tanto, de una disminución en la permeabilidad al agua del epitelio tubular. En conclusión, la excreción urinaria de aquaporinas estaba disminuida de forma significativa en los pacientes cirróticos descompensados. La disminución de la excreción de estas aquaporinas podría ser una respuesta compensadora del riñón a la expansión de volumen extracelular que se observa en los pacientes con CH y ascitis.

Palabras clave: Retención hidrosalina, aquaporinas, cirrosis hepática.

6

NEFROPATÍA INTERSTICIAL AUTOSÓMICA DOMINANTE NO LIGADA A LA UROMODULINA

Outeda P*, Banet JF*, Urisarri A*, García-Vidal M*, Barrio V**, Torres A***, Carreño A****, Lens XM*
 *Laboratorio de Investigación en Nefrología. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Universidad de Compostela. **Nefrología. Fundación Hospital de Alcorcón. Madrid. ***Nefrología. Hospital Universitario de Canarias. Tenerife. ****Nefrología. Hospital de Ciudad Real.

Introducción: Bajo el epígrafe de «Nefropatías Intersticiales Autosómicas Dominantes» se engloban 3 entidades denominadas: Enfermedad Renal Quística Medular Autosómica Dominante (ADMCKD), Nefropatía Familiar Juvenil Hiperuricémica (FJHN) y Enfermedad Renal Glomerulocística Autosómica Dominante (GCKD), que constituyen un grupo de trastornos renales hereditarios con transmisión autosómica dominante, de aparición en el adulto, y un fenotipo común con hiperuricemia y nefropatía intersticial que puede evolucionar a la insuficiencia renal crónica terminal (IRCT).

Actualmente se conoce la existencia de al menos 3 loci responsables de estas enfermedades: locus ADMCKD-1 localizado en el cromosoma 1q21 no habiendo sido identificado todavía el gen, locus ADMCKD-2 localizado en el cromosoma 16p11.2-12 donde se halla el gen UMOD que codifica la Uromodulina o proteína de Tamm-Horsfall la glicoproteína más abundante en la orina humana (50-100 mg por día), y locus 3 todavía no identificada su posición. Utilizando como criterios de inclusión: 1) historia familiar de insuficiencia renal; 2) patrón de herencia autosómica dominante, y 3) ausencia de proteinuria de rango glomerular; se identificaron un total de 26 familias a las que se les realizó el estudio genético por Análisis de Ligamiento o Búsqueda directa de mutaciones mediante Secuenciación del gen UMOD.

Resultados: El grupo «No UMOD» estaba formado por las 20 familias que no presentaron mutaciones en el gen de la Uromodulina y por 1 que estaba ligada al locus ADMCKD-1. El grupo «UMOD» estaba constituido por las 5 familias que tenían mutaciones en el gen de la Uromodulina, 2 en el exón 4: Cys255Tyr y Gly295Glu, y 3 en el exón 5: 1 Cys300Gly y 2 Gln316Pro. Al comparar los fenotipos del grupo «No UMOD» con el UMOD se observó que no había diferencias significativas en cuanto a la edad de aparición de la IRCT: 56,3 (27-77) vs 62,2 (42-74) años (p = NS). La presencia de gota fue detectada en el 65% vs 80% de las familias, y la de quistes renales en el 50% vs 60%, respectivamente. La aparición de Hipertensión Arterial y Nefropatía Perdedora de Sal fue esporádicamente observada en ambos grupos.

Conclusión: El gen de la Uromodulina es el responsable del 19% de las Nefropatías Intersticiales Autosómicas Dominantes. El fenotipo de las formas ligadas o no a la Uromodulina es similar. Es preciso identificar nuevos genes responsables de la enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad Renal Quística Medular Autosómica Dominante, Nefropatía Intersticial Hereditaria, Uromodulina.

8

«HÉLICE BETA PKD», NUEVO DOMINIO ESTRUCTURAL EN LA REGIÓN PKD-REJ DE LA POLIQUISTINA 1

Banet JF, Outeda P, Urisarri A, Lens, XM
 Laboratorio de Investigación en Nefrología. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

La poliquistina 1 es la proteína implicada en el 85% de los casos de Poliquistosis Renal Autosómica Dominante, en la que tradicionalmente se reconocían 36 áreas funcionales. En su región extracelular se encuentran los 16 dominios PKD y el módulo REJ. El estudio de la estructura secundaria y terciaria de dichas zonas y los análisis de homología podrían llevar a una nueva organización de la proteína.

Para determinar la estructura secundaria se han utilizado diversos algoritmos de predicción como Garnier, TMHMM y PredictProtein. El plegamiento de estructura terciaria se obtuvo mediante modelado «ab initio», empleando el servidor Robetta. Para investigar la plasticidad y patogénicidad de esta región se efectuó un estudio mutacional de la línea germinal en familias PKD1, se analizó su impacto en el fenotipo y se comparó éste con las mutaciones en la porción restante de la proteína.

Se descubrieron 4 nuevas estructuras circulares denominadas «Hélices Beta PKD», cada una de ellas está formada por 5 dominios PKD, 4 de ellos están agrupados en una «hélice beta de siete palas» (7 blades beta propeller) y el quinto adopta un plegamiento «tipo PKD».

La Hélice Beta PKD-1 incluiría los dominios PKD del 2 al 6 (a.a. 844-1292), la Hélice Beta PKD-2 los dominios PKD del 7 al 11 (a.a. 1305-1715), la Hélice Beta PKD-3 los dominios PKD del 12 al 16 (a.a. 1729-2142) y la Hélice Beta PKD-4 correspondería a la primera parte del dominio REJ (a.a. 2146-2581).

Se encontraron 17 terminaciones prematuras de cadena en esta región de las Hélices Beta PKD en 21 familias. Al comparar los fenotipos de esta área con los resultantes de mutaciones en la porción restante de la proteína no se encontraron diferencias en cuanto a: edad de aparición de la insuficiencia renal crónica terminal (53 vs 57 años), aneurismas cerebrales o complicaciones hepáticas. Sus posibles funciones son: adhesión celular, mecano-sensora, y regulación del estado del poro en el canal transmembrana formado por las poliquistinas 1 y 2.

Se definen 4 nuevos dominios estructurales en la zona PKD-REJ de la poliquistina 1 denominados «Hélices Beta PKD». Cada una está formado por 5 dominios PKD, 4 agrupados en una «Hélice Beta de 7 palas» y el quinto adoptando una estructura tipo «plegamiento PKD». El fenotipo resultante es similar al de la porción restante de la proteína.

LA ANGIOTENSINA II AUMENTA EL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF) EN RIÑÓN, POR UN PROCESO REGULADO POR LA INDUCCIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPÓXIA (HIF-1) Y MECANISMOS REDOX

Sánchez López E, López A, Esteban V, Yagüe S, Egido J, Álvarez Arrollo M.^a V, Ruiz Ortega M
Nefrología. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma Madrid.

La Angiotensina II (AngII) participa en la patogenia del daño renal. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) se expresa constitutivamente en riñón y está implicado en la progresión del daño renal. Aunque se ha investigado la relación entre la AngII y el VEGF, los datos del efecto del tratamiento con iECAs o ARA II son contradictorios. El gen del VEGF está regulado por hipoxia, citoquinas. En su promotor se han descrito sitios de unión a varios factores de transcripción: factor inducible por hipoxia (HIF-1a), factor nuclear-kappaB (NF-KB) y proteína activadora (AP-1). La especies reactivas de oxígeno (ROS) son segundos mensajeros de AngII, y regulan HIF-1. Nuestro objetivo ha sido investigar si la AngII regula el VEGF en riñón y los mecanismos implicados en este proceso. El efecto *in vivo* de la AngII en riñón se estudió mediante un modelo de infusión sistémica de AngII en ratones (1.000 ng/kg/min, durante 3 días). Los animales infundidos con AngII presentaron aumento del mRNA de VEGF y del receptor VEGFR2, pero no de VEGFR1 (PCR tiempo real). El tratamiento con el antagonista AT₁, Losartan, o con el AT₂, PD123319, disminuyó la expresión de VEGF (42% y 32% vs AngII, respectivamente), la expresión de VEGFR2 sólo se redujo con Losartan. En células tubulopiteliales (línea celular NRK52E), la AngII aumenta la expresión génica de VEGF. El bloqueo de ambos receptores AT₁ y AT₂ abolió esta inducción. La AngII aumenta la actividad del promotor del VEGF (transfecciones vector VEGF-Stu I/luciferasa). La co-transfección con un vector de expresión mutante de IκB o con un dominante negativo de c-jun (que bloquea NF-KB o AP-1, respectivamente) no modificó la respuesta de AngII. En ratones infundidos con AngII aumentó la actividad renal del HIF (unión al DNA: EMSA). En células tubulopiteliales la AngII activa el HIF (EMSA) e induce la síntesis de HIF-1 (Western blot). El empleo de un oligonucleótido antisentido del HIF-1, que bloquea su producción endógena, inhibió el aumento del VEGF causado por AngII. La infusión de AngII en ratones provocó oxidación renal. En células tubulopiteliales, antioxidantes (DPI: inhibidor de NADH/NADPH oxidasa, NAC y Tiron) y un oligoantisentido de p22phox/NADH/NADPH, disminuyeron la inducción de VEGF y HIF-1 causada por AngII. En resumen, estos datos muestran que la AngII *in vivo* e *in vitro* regula la expresión renal de VEGF por un mecanismo que implica la activación de HIF-1 y de estrés oxidativo.

MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA EN CÉLULAS MESANGIALES DE RATAS TRATADAS CON CICLOSPORINA

De Arriba G*, Pérez de Horno J**, Calvino M**, Parra T**
*Nefrología. Hospital Universitario de Guadalajara. Departamento de Medicina. UAH.
**Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Guadalajara.

Introducción: La Ciclosporina A aumenta el estrés oxidativo a nivel renal, y se ha demostrado que los antioxidantes previenen la nefrotoxicidad de la droga. También hemos demostrado que los radicales libres pueden originar peroxidación lipídica y aumento de tromboxano B2 en glomérulos. Las Ciclooxygenasas (COX) son enzimas cruciales en el metabolismo del ácido araquidónico y podrían tener un papel en este proceso.

Objetivo: Evaluar la expresión de Ciclooxygenasa en células mesangiales obtenidas de ratas tratadas con Ciclosporina A mediante hibridación *in situ*.

Métodos: Se trataron ratas Wistar con Ciclosporina (50 mg/kg/día, oral, n = 5) durante 4, 7 ó 10 días. El grupo control recibió solamente el vehículo de la Ciclosporina (etanol). Al final de cada periodo se obtuvieron los glomérulos aislados y posteriormente una suspensión de células mesangiales. Las células mesangiales se identificaron mediante un anticuerpo específico monoclonal. Las suspensiones de células se analizaron en un citómetro FACScanTM (BD Biosciences, S. José, CA), utilizando sondas específicas para COX-1 (constitutiva) y COX-2 (inducible).

Resultados: La Ciclosporina indujo un aumento de la Cr sérica y un descenso del aclaramiento de creatinina en los animales tratados en relación con los controles. Además la Ciclosporina produjo un aumento de la síntesis glomerular de radicales libres, MDA y tromboxano B2. Se observó un aumento en la expresión de COX-2 en las células mesangiales obtenidas de animales tratados durante 7 y 10 días en relación con los controles. La expresión de COX-1 en las células mesangiales aumentó discretamente al cabo de 10 días de tratamiento con respecto al grupo control.

Conclusión: La Ciclosporina A aumenta la síntesis de especies reactivas de oxígeno en glomérulos de ratas tratadas. Hemos demostrado que en células mesangiales provenientes de ratas tratadas con Ciclosporina aumenta expresión de COX-2 y este fenómeno podría ser consecuencia del aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno a nivel mesangial.

LA PODOCINA EN EL SÍNDROME NEFRÓTICO ESPORÁDICO

Urisarri A*, Ariceta G*, Outeda P**, Banet JF**, Gil M*, Lens XM**
*Pediatria. CHUS. **Nefrología. CHUS.

El trabajo corresponde a un grupo de trabajo o un estudio multicéntrico: Málaga S, Vallo A, Peña A, Rodríguez do Forno A, Ubetagoyena M, Valenciano B, García-Nieto V.

Introducción: El gen de la Podocina es el responsable de algunas formas de Síndrome Nefrótico con herencia autosómica recesiva, córtico-resistencia, inicio temprano de la proteinuria, rápida evolución a la Insuficiencia Renal Crónica Terminal y ausencia de recidiva en el trasplante. La podocina es un componente del diafragma de hendidura inter-podocitario. Es una proteína integral de membrana de 383 aa, posee un único dominio transmembrana, tiene gran homología con la familia de las estomatinas, y es codificada por el gen NPHS2, de 1.152 pares de bases en 8 exones.

Objetivo: Establecer el papel de la podocina en el Síndrome Nefrótico Esporádico en una muestra de población española.

Material y métodos: Se estudió una muestra consecutiva de 106 pacientes con Síndrome Nefrótico Esporádico. Las formas histológicas incluidas fueron: Cambios Mínimos, Proliferativa Mesangial Difusa, Gloméruloesclerosis Segmentaria y Focal, y Esclerosis Mesangial Difusa. Se excluyeron los pacientes que presentaban otras glomerulopatías del tipo Nefropatía IgA, Membranosa, Mesangio-capilar, Lupus Eritematoso Sistémico, Amiloidosis, Diabetes. A su presentación, 73 tenían menos de 18 años y 33 eran adultos. Todos los pacientes adultos pertenecían al Hospital Clínico de Santiago de Compostela y se disponía del resultado de biopsia renal. Los pacientes menores de 18 años pertenecían a un total de 8 Servicios de Nefrología Pediátrica y había estudio histológico en 41 de ellos.

Se realizó análisis mutacional mediante secuenciación directa de los productos obtenidos por PCR de los 8 exones, área codificadora y los bordes intrón-exón, del gen NPHS2.

Resultados: Se encontraron a nivel proteico los siguientes cambios potencialmente patogénicos: P20L, R229Q, E281A y E310K. No se observó ningún cambio en homocigosis. En heterocigosis compuesta se hallaron 2 pacientes: R229Q y E281A en un niño de 7 meses con Síndrome Nefrótico córtico-resistente e histología de Gloméruloesclerosis Segmentaria y Focal; y R229Q acompañado de E310K en un paciente de 25 años también con Síndrome Nefrótico córtico-resistente e histología de Gloméruloesclerosis Segmentaria y Focal. Se observó heterocigosis simple (R229Q ó P20L) en 4 pacientes (2 córtico-sensibles y 2 córtico-resistentes) con edades de 2, 9, 54, y 56 años.

Conclusiones: El papel patogénico de la podocina en el Síndrome Nefrótico Esporádico es muy escaso, sólo el 2% de pacientes presentan una mutación en ambos alelos. Aunque raramente, puede detectarse alteración molecular en la edad adulta. No se encontraron cambios en ambos alelos en ninguno de los pacientes con Síndrome Nefrótico córtico-sensible.

Palabras clave: Podocina, Gen NPHS2, Síndrome Nefrótico.

PARTICIPACIÓN DE GLICOPROTEÍNA-P EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA NEFROTOXICIDAD CRÓNICA POR CICLOSPORINA

Gutiérrez Dalmau A*, Carreras J**, Ramírez JM**, Jiménez O***, Lario S*, Roca M****, Brunet M****, Campistol JM
*Servicio de Nefrología y Trasplante Renal. Hospital Clínic, Barcelona. España. **Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic, Barcelona. España. ***Unidad de Toxicología - Hospital Clínic, Barcelona. España. ****Servicio de Farmacia. Hospital Clínic, Barcelona. España.

Introducción: La nefrotoxicidad crónica por inhibidores de la calcineurina (ICN) constituye un importante problema clínico en el trasplante renal, que es todavía más prominente en el uso combinado de ICN y sirolimus (SRL). Actualmente no disponemos de evidencias de la participación de Glicoproteína-P (GpP) en las lesiones de nefrotoxicidad por ICN y su asociación a SRL de forma independiente a las interacciones farmacocinéticas encontradas.

Material y métodos: Ratones macho FVB (WT) y FVB deficientes en GpP (KO) —knockout para *mdrla/b*— fueron sometidos durante 42 días a dieta hiposódica y administración diaria vía sc de CSA (75 mg/kg), SRL (0,4 mg/kg), o vehículo (aceite de oliva). Tras este periodo se determinaron creatinina, BUN, concentraciones sanguíneas y títulos renales de CSA y SRL, y valoración de fibrosis tubulointersticial (FTI). El análisis estadístico de comparación entre los grupos fue realizado mediante test no paramétricos.

Resultados: No existieron diferencias entre las concentraciones sanguíneas de drogas de ratones KO y WT; CSA 3.581 ± 1.025 vs 2.952 ± 845 ng/mL (p = ns) y SRL 76,7 ± 72,4 vs 100,5 ± 66,0 ng/mL (p = ns), respectivamente. Tampoco alcanzaron diferencias estadísticamente significativas las cifras de BUN (90,0 ± 39,5 vs 51,0 ± 10,8 mg/dL. P = 0,09) o Cr (0,46 ± 0,06 vs 0,46 ± 0,05 mg/dL. P = ns) entre ratones KO y WT tratados con CSA. Sin embargo los ratones KO tratados con CSA mostraron un claro incremento en el grado de fibrosis tubulointersticial (48,9 ± 15,7%) respecto a los ratones WT tratados con CSA (7,5 ± 3,5%) (p = 0,003). No existieron diferencias de función renal o FTI entre ratones KO y WT tratados con SRL o vehículo, ni tampoco de las concentraciones tisulares de drogas entre ratones KO y WT.

Conclusiones: Los ratones carentes de GpP muestran un claro aumento de las lesiones de nefrotoxicidad por CSA, que no es atribuible únicamente al aumento de las concentraciones tisulares del fármaco. Estos datos demuestran la relación de GpP con la nefrotoxicidad por ACN y sugieren la participación de mecanismos independientes al transporte del fármaco.

13

HERRAMIENTA SOFTWARE INTEGRADA EN EL SISTEMA DE INFORMACIÓN DE UN HOSPITAL PARA LA ELABORACIÓN DE ÁRBOLES GENEALÓGICOS EN LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE

Peces C*, Peces R**
 *Servicios Centrales. Centro de Innovación en Tecnologías de la Información del SES-CAM. **Servicio de Nefrología. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

La poliquistosis renal autosómica dominante (PRAD) es la enfermedad hereditaria monogénica más frecuente que afecta a 1/400-1.000 individuos y representa 8-10% de los enfermos en hemodiálisis y trasplante renal. En el área sanitaria del Hospital La Paz, con una población de 600.000 habitantes, deben existir 600-1.200 pacientes con PRAD. La mayoría de ellos, sin diagnosticar y sin controlar, no reciben ningún tratamiento ni consejo genético familiar. El análisis genético de una enfermedad comienza con la construcción de un árbol genealógico para mostrar la estructura global de la población, la relación entre los individuos y los flujos genéticos de generación a generación. Esta representación gráfica de un árbol genealógico es esencial para comprender la naturaleza de la enfermedad y el modo de herencia, permitiendo deducir la fuente del gen mutado, así como la identificación de los fundadores de la población.

Se ha diseñado una herramienta software para la construcción de árboles genealógicos de familias con PRAD, que permite interactuar con un editor gráfico via WEB de una forma sencilla e intuitiva. La información creada puede ser almacenada en una base de datos para su posterior inserción en la historia clínica electrónica y la integración con el resto de sistemas de información del hospital. La aplicación cumple la iniciativa internacional IHE (Integrating the Healthcare Enterprise) que utiliza los estándares médicos (HL7, CDA y DICOM). Para la creación de la aplicación se ha optado por un lenguaje de programación como JAVA, que es un lenguaje multiplataforma soportado por todos los navegadores WEB, y además es de libre uso.

La aplicación permite crear el árbol de una nueva familia con PRAD, modificar un árbol ya existente añadiendo nuevos individuos o modificando los que ya había, e incluso la exportación del árbol construido a una imagen con formato JPG o PNG. Además, la herramienta resulta de utilidad para la creación de un registro de PRAD, para la detección de nuevos casos, para la realización de estudios con marcadores microsatélites y de las mutaciones en las distintas familias, así como para analizar las variaciones fenotípicas intra e interfamiliares.