

1 EJE INTESTINO-MICROBIOTA-METABOLITOS EN EL DECLIVE TEMPRANO DE LA FUNCIÓN RENAL

C. BARRIOS¹, M. BEAUMONT², T. PALLISTER², J. VILLAR¹, E. RODRÍGUEZ¹, J. PASCUAL¹, E. LEY³, T.D. SPECTOR², J.T. BELL², C. MENNÉ⁴

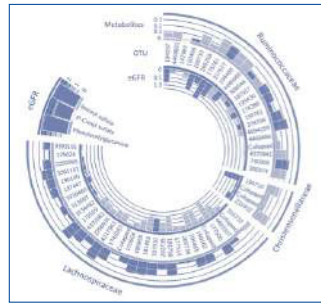
¹NEFROLOGÍA. INSTITUT MAR D'INVESTIGACIONS MÈDIQUES (BARCELONA), ²TWIN RESEARCH AND GENETIC EPIDEMIOLOGY. KING'S COLLEGE (LONDON (UK)), ³MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS. CORNELL UNIVERSITY (ITHACA (NY))

Antecedentes: Numerosos metabolitos circulantes derivados de la fermentación proteica se han asociado inversamente con la función renal pero el grado de afectación renal no está claro. El objetivo de este estudio es explorar la relación entre indoxyl-sulfato, p-cresyl-sulfato y phenylacetylglutamine con perfiles de microbios intestinales en el declive temprano del filtrado glomerular estimado (FGe).

Métodos: Los individuos estudiados son gemelos obtenidos del registro TwinsUK. Los metabolitos se obtuvieron de muestras de plasma de 4430 individuos, utilizando la plataforma Metabolon (LC/GC/MS). Las unidades operacionales taxonómicas (OTUs) se obtuvieron mediante secuenciación del 16S rRNA gen (909 perfiles, QIIME y Greengenes) de muestras de heces de una subpoblación de 855 individuos.

Resultados: Confirmamos que Indoxyl-sulfato (Beta(SE)=-2.50(0.21), P=8.8x10⁻³⁰), p-cresyl-sulfato (Beta(SE)=-1.73(0.21), P=3.4x10⁻¹⁵) y phenylacetylglutamine (Beta(SE)=-2.44(0.22), P=4.6x10⁻²⁶) están inversamente asociados con el FGe en una población de la con mínima afectación de la función renal. Después de ajuste de comparaciones múltiple, 3 OTUs se asociaron significativamente con Indoxyl-sulfato, 52 con phenylacetylglutamine y uno nominalmente con p-cresyl-sulfato. Los 56 miembros microbianos, pertenecen a la orden de los Clostridiales y están representados por tres familias anaeróbicas gram-positivas: Christensenellaceae, Ruminococcaceae y Lachnospiraceae. Entre ellos, 3 microbios se encontraron asociados significativamente con el FGe. Una mayor abundancia de estos microbios se relacionó con una disminución de los niveles circulantes de los metabolitos y mejor función renal. Nuestros hallazgos sugieren que estos metabolitos son marcadores tempranos de función renal y que cambios en la flora intestinal son igualmente detectables desde estadios iniciales de la disfunción renal. La mejora en el conocimiento de esta relación "intestino-renal" es fundamental para mejorar las estrategias terapéuticas.

■ **Figura.** El Histograma de Círcos representa las asociaciones positivas /negativas entre las OTUs (círculo intermedio), los metabolitos (círculo externo) y el FGe (círculo interno). Panel superior izquierdo representa los coeficientes Beta de las asociaciones entre el FGe y los metabolitos.



2 EL INHIBIDOR DE LOS BROMODOMINIOS BET JQ1 INHIBE LA INFLAMACIÓN EXPERIMENTAL RENAL

J. MORGADO-PASCUAL¹, B. SUAREZ-ÁLVAREZ¹, S. RAYEGO-MATEOS¹, R.M. RODRÍGUEZ LÓPEZ², L. MÁRQUEZ-EXPOSITO¹, M. ALIQUÉ¹, C. LAVOZ¹, C. LÓPEZ LARREA², M. RUIZ-ORTEGA¹

¹NEFROLOGÍA. IIS-FJD-UAM (MADRID), ²INMUNOLOGÍA. H.U. CENTRAL DE ASTURIAS (OVIEDO)

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

Introducción: La familia de proteínas BET "bromodomain and extra-terminal", formada por BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT, modulan las respuestas inflamatorias a través del reconocimiento específico de residuos de lisina acetilados, una modificación post-traduccional clave en la regulación de la expresión génica. Nuestro objetivo ha sido investigar si la inhibición de las proteínas BET podría ser beneficiosa en el daño renal experimental, con el fin de mejorar las actuales estrategias terapéuticas empleadas en la enfermedad renal.

Material y Método: Se ha empleado el compuesto JQ1, un inhibidor específico de los bromodominios BET (100 mg/ratón, i.p. diaria durante 5 días). Como modelo de daño renal se ha realizado el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO) en ratón. Los estudios *in vitro* se realizaron en células tubulointerstitiales humanas (línea HK2) estimuladas con TNF- α .

Resultados: A los 5 días de la obstrucción, se observó un aumento en la expresión renal de los marcadores de daño KIM-1 y NGAL que fue revertido en los ratones tratados con JQ1. Además, el tratamiento con JQ1 disminuyó el número de células inflamatorias infiltrantes (neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos T CD4+) y la sobreexpresión de genes proinflamatorios (IL-6, MCP-1 y RANTES) en los riñones obstruidos, alcanzando valores similares a observados en los controles. En experimentos *in vitro*, la inhibición de las proteínas BET, con JQ1 ó siRNA específicos de BRD2 y BRD4, disminuyó el aumento en la expresión de esos genes proinflamatorios en respuesta a la estimulación con TNF- α . Mediante técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) demostramos que BRD4 se une específicamente a las histonas acetiladas presentes en la región promotora de los genes inflamatorios IL-6, MCP-1, RANTES, regulando así su expresión. La activación de la vía clásica de NF- κ B es clave en la regulación de la respuesta inflamatoria renal. En estudios *in vivo* e *in vitro* hemos observado que JQ1 interviene en la ruta NF- κ B impidiendo la traslocación nuclear de p65, sin actuar a nivel de la fosforilación de p65 ó I κ B, inhibiendo la expresión de genes dependientes del complejo iniciador p-TFEB.

Conclusión: La inhibición de los bromodominios BET disminuye la respuesta inflamatoria renal, a través de la modificación de la cromatina genes específicos y/o inhibiendo la ruta de activación del NF- κ B. Estos resultados demuestran que el tratamiento con inhibidores de las proteínas BET como JQ1 podrían tener importantes aplicaciones terapéuticas en las enfermedades inflamatorias renales.

3 NUEVOS MODELOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE FENOTIPOS ASOCIADOS A LA POLIQUISTOSIS RENAL: GENERACIÓN DE "PSEUDONEFRONAS" Y "PSEUDOARTERIAS"

V. CALVIÑO LOUZA¹, R. COUCEIRO OTERO², B. PARADELA-DOBARRO³, JR. GONZÁLEZ JUANATEYA⁴, R. LÓPEZ LÓPEZ⁵, C. DÍAZ RODRÍGUEZ⁶, E. ÁLVAREZ⁷, M. ABAL POSADA⁸, A. GARCÍA GONZÁLEZ⁹

¹LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (IDS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²LABORATORIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA TRANSLACIONAL. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (IDS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ³LABORATORIO DE CARDIOLOGÍA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (IDS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ⁴CARDIOLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO U. DE SANTIAGO (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ⁵ONCOLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO U. DE SANTIAGO (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ⁶NEFROLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO U. DE SANTIAGO (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

La enfermedad poliquística renal (PKD) es un conjunto de enfermedades hereditarias crónicas que provocan fallo renal causado por la formación de un gran número de quistes, y asociada a otro tipo de manifestaciones extrarrenales, como aneurismas y hemorragia. Los quistes se originan a partir de las células epiteliales de la nefrona, las cuales presentan una tasa de proliferación incrementada y una pérdida de polaridad celular plana (PCP), es decir, pierden la característica de la división celular orientada. Esta desorientación es causada por la pérdida de la función sensor del cilio primario, orgánulo mecanosensor que detecta el flujo a través de la nefrona, y en el que se localizan las proteínas codificadas por los genes poliquísticos, facilitando la internalización de calcio.

Nuestro grupo ha desarrollado un modelo de cultivo en cuatro dimensiones siendo el flujo la cuarta dimensión, mimetizando así la generación de *pseudonefronas* y *pseudoarterias*. Este modelo consiste en la generación de canales fabricados mediante una técnica de bioimpresión 3D de armazones sacrificables de gelatina (con y sin células) embebidos en colágeno, el cual actúa de matriz extracelular. Esta nueva técnica permite imprimir células de los distintos segmentos de la nefrona (túbulo contorneado proximal, asa de Henle, y túbulo distal y colector). A su vez, hemos aplicado esta tecnología al desarrollo de *pseudoarterias* utilizando, de igual manera, células endoteliales primarias y/o condicionadas para los genes poliquísticos con el fin de mimetizar la formación de aneurismas. En ambos modelos observamos, mediante inmunofluorescencia, la orientación de cilio primario y cuerpo basal de las células en función del flujo, al igual que sucede *in vivo*. La impresión en matriz de colágeno remodelable de células inmortalizadas de ratón o derivadas de humanos en las que se induzca de manera específica mutaciones en los genes poliquísticos, y la aplicación de un flujo determinado, nos permitirá estudiar mecanismos de señalización a lo largo de la nefrona, modelar la formación de quistes y aneurismas, y mimetizar las condiciones fisiológicas que los modelos *in vitro* actuales no proporcionan en el estudio de ciliopatías.

Este nuevo modelo *in vitro* 4D abre una nueva vía para el estudio de los mecanismos moleculares y la modelización de los procesos patológicos implicados en estructuras tubulares dependientes de flujo y el testado directo de posibles dianas terapéuticas.

4 PAPEL DEL ESTADO INFLAMATORIO DEL RIÑÓN DEL DONANTE EN LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS M2 Y LA FIBROSIS.

M. DÍAZ-ENCARNACIÓN¹, E. GUILLÉN-GÓMEZ², IK. DA SILVA¹, I. SILVA¹, C. FACUNDO¹, LL. GUIRADO¹, M. PASTOR-ANGLADA³, J. BALLARÍN¹

¹NEFROLOGÍA. FUNDACIÓ PUIGVERT (BARCELONA), ²LABORATORIO. FUNDACIÓ PUIGVERT (BARCELONA), ³BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. UNIVERSIDAD DE BARCELONA (BARCELONA)

Introducción: Tanto los injertos como los pacientes trasplantados de donantes vivos (DV) muestran un mejor pronóstico que los de donantes cadáver (DC) sin embargo hay poca información acerca del estado inflamatorio del riñón del donante en el momento de la donación. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que los monocitos circulantes pueden estar implicados en el pronóstico de los receptores de DV. Por otro lado, hemos demostrado que la activación del purinoma participa en la transición epitelio mesenquimal y la fibrosis renal. El objetivo de este estudio es determinar la implicación de los diferentes componentes del purinoma en el desarrollo del estado inflamatorio y fibrosis en los riñones procedentes de DC y DV.

Material y Métodos: Hemos recogido 67 muestras de tejido renal pre-implante, 34 de DV y 33 de DC. Las muestras se homogenizaron y se extrajo el ARNm para obtener ADNc. El ADNc se procesó en placas para PCR a tiempo real con el sistema TaqMan[®] OpenArray[®], lo que nos ha permitido analizar el ARNm de 160 genes.

Resultados: El ATP extracelular puede activar a monocitos y macrófagos a través de los receptores purinérgicos. Este ATP se libera a través del canal de la panexina que se encuentra más elevada en DC respecto a los DV (p=0.0108). En DC, se observa un incremento de la expresión de CD14 (p=0.048) y CD163 (p=0.0146), lo que indica un mayor número de macrófagos M2 que en los DV. También se ha encontrado una correlación entre la panexina y el marcador de M2, CD206 (r=0.5147, p=0.0031). Además, el TGF- β 1, el principal inductor de fibrosis que es secretado por los macrófagos M2, está más elevado en DC (p=0.0459) y correlaciona con el transportador de adenosina ENT1 (r=0.7187, p<0.0001). La expresión de este transportador también correlaciona con el receptor de adenosina A2A (r= 0.6365, p<0.001), el que a su vez correlaciona a su vez con los niveles de fibronectina (r=0.7477, p<0.0001).

Conclusiones: El infiltrado de macrófagos M2 en el tejido renal de los DC podría estar implicado en la fibrosis del injerto a través de un aumento de la actividad del purinoma y del TGF- β 1. Este papel del estado inflamatorio del DC sobre el injerto no ha sido explorado previamente.

5 UNA NUEVA APROXIMACIÓN A LA DIABETES INSÍPIDA NEFRÓGÉNICA: LA KINASA LIGADA A INTEGRINAS MODIFICA LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINA 2 MEDIANTE NFATC.

M. GRIERA¹, W. GIEMAKOWSKA², M. HATEM VUQUERO¹, JL. CANO PEÑALVER¹, LV. GONZÁLEZ BOSQ², D. RODRÍGUEZ PUYOL³, M. RODRÍGUEZ PUYOL¹, S. DE FRUTOS GARCÍA¹

¹DEPARTMENT OF SYSTEMS BIOLOGY, PHYSIOLOGY UNIT. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, INSTITUTO REINA SOFÍA DE INVESTIGACIÓN RENAL Y REDINREN (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) (MADRID), ²VASCULAR PHYSIOLOGY GROUP, DPMT. OF CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY. UNIVERSITY OF NEW MEXICO HEALTH, ALBUQUERQUE, NEW MEXICO (USA), ³BIOMEDICAL RESEARCH FOUNDATION AND NEPHROLOGY DEPARTMENT. H.U. PRÍNCIPE DE ASTURIAS (ALCALÁ DE HENARES), INSTITUTO REINA SOFÍA DE INVESTIGACIÓN RENAL Y REDINREN (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) (MADRID)

Introducción: La delección transgénica de la kinasa ligada a integrinas (ILK) en ratones adultos (cKD-ILK) supone un cuadro compatible con la Diabetes Insípida Nefrogénica (DIN), debido a una disminución en la abundancia y la presencia en membrana apical del canal de agua tubular Acuaporina 2 (AQP2) (Cano-Peñalver et al. FASEB J 2014). La AQP2 es regulada transcripcionalmente entre otros por la familia de factores nucleares NFATc (Albertoni-Borguense et al. Nephron extra 2011), que son defosforilados por calcineurina (Cn) que permiten su internalización en el núcleo. Su salida la lleva a cabo la kinasa glicógeno sintasa 3 beta (GSK3 beta), que es inactivada por ILK. Aquí estudiamos cómo ILK regula la expresión de AQP2 mediante NFATc.

Materiales y Métodos: En médula de cKD-ILK y en células del túbulo mIMCD3, ILK delecionada mediante transfección de RNAs interferentes (siRNA-ILK), se determinaron los niveles basales de Cn, GSK3beta total y su isoforma inactiva (fosforilada en serina 9). mIMCD3 y extractos medulares de cKD-ILK se trataron durante 24 horas con el activador de Cn Ionomicina (Io) o el inhibidor ciclosporina A (CsA). Los mismos tratamientos se usaron en mIMCD3 transfectadas con plásmidos reporteros de la actividad del promotor de AQP2 (AQP2-Luc) o la actividad transcripcional de NFAT (NFAT-luc). Por último, en animales adultos KO para la isoforma de NFAT3 (NFAT3-KO), medimos los volúmenes de orina de 24 h y su osmolalidad.

Resultados: En mIMCD3 transfectadas con reporteros observamos que la delección de ILK disminuyó basalmente la actividad de NFAT y del promotor de AQP2. La activación de Cn con lo aumentó la actividad de ambos reporteros en células control, pero solo parcialmente en células sin ILK. La inhibición de los reporteros fue acumulativa al inhibir conjuntamente la Cn y deleccionar ILK. De manera similar, el tratamiento con Io en médulas de animales control aumentó los niveles de AQP2, sin conseguirse el mismo aumento en cKD-ILK. Los niveles de GSK3beta y Cn no se modifican al deleccionar ILK en células o en médula renal, sin embargo si disminuye la fosforilación de GSK3b. Por último, NFAT3-KO mostraron basalmente un cuadro de DIN (poliuria y baja osmolalidad en la orina) similar al publicado en el modelo cKD-ILK.

Conclusiones: La falta de ILK modula la actividad de NFATc en el túbulo modificando la expresión de AQP2, posiblemente por la regulación de la actividad de GSK3 beta, pero independientemente de Cn.

6 EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PKG EN RATONES 129/svj H-Ras^{-/-} SE PRODUCE A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CRE.

P. MARTÍN SÁNCHEZ¹, A. LUENGO RODRÍGUEZ¹, M. GRIERA¹, A. GARCÍA JEREZ¹, JL. CANO PEÑALVER¹, L. CALLEROS BASILIO¹, D. RODRÍGUEZ PUYOL²

¹FISIOLÓGIA. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (ALCALÁ DE HENARES), ²FISIOLÓGIA. H.U. PRÍNCIPE DE ASTURIAS (ALCALÁ DE HENARES)

Introducción: Las proteínas Ras, con una masa molecular entre 20 y 40 kDa, pertenecen a la familia de las proteínas G con actividad GTPasa. Ejercen su función activando varias vías de señalización intracelular, principalmente a través de su efector Raf y ERK (MAPK) o AKT. Nuestro grupo demostró que los ratones H-Ras^{-/-} son hipotensos por aumento del contenido vascular de la proteína kinasa G (PKG). Sin embargo, los mecanismos moleculares que relacionan H-Ras y PKG no son conocidos. En el presente trabajo nos planteamos el siguiente

Objetivo: Estudiar la vía de señalización y los factores de transcripción implicados en el aumento de la expresión de la proteína PKG en este modelo animal.

Materiales y métodos: Se utilizaron fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones 129/svj H-Ras^{+/+} y H-Ras^{-/-}. Se realizaron transfecciones con el promotor completo de PKG-I (2 kb) y sus delecciones de 1.5, 1, 0.6 y 0.5 kb. El silenciamiento del factor de transcripción CRE se realizó mediante el siRNA específico. Los niveles intracelulares de PKG, P-CREB, P-ERK y P-GSK se analizaron mediante western blot.

Resultados: Al transfectar los fibroblastos embrionarios con delecciones seriadas del promotor de PKG-I, se observó que el aumento en la actividad del promotor que ocurría en los MEFs H-Ras^{-/-}, desaparecía cuando se eliminaba la región entre los fragmentos de 2 y 1,5 kb. Un análisis de esta región con software de predicción de sitios de unión del factor de transcripción (TFSEARCH, Computational Biology Research Center), reveló una secuencia de unión para el factor de transcripción CRE.

Mediante WB observamos que la expresión de PKG y la fosforilación de CREB aumenta en los MEF H-Ras^{-/-}. La implicación de CRE en el aumento de la expresión de PKG se demostró mediante transfección con siRNA específico de CRE. Por otro lado, la fosforilación de ERK y GSK disminuyó en los MEF H-Ras^{-/-}. Esto nos indica que, en ausencia de H-Ras, disminuye la activación de la vía canónica de Raf/MEK/ERK, lo que implica una menor fosforilación de su sustrato, GSK. De esta forma, GSK actúa como una kinasa que fosforila a CRE, activándolo.

Conclusiones: Este trabajo demuestra que la activación de PKG al deleccionar la proteína H-Ras, ocurre a través de la inactivación de la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK, y la activación del factor de transcripción CRE. La manipulación de este factor de transcripción, o del resto de proteínas implicadas en este mecanismo molecular, podría tener un gran valor clínico en el control de la hipertensión.

7 PERFIL DE LA GLICOSILACIÓN DE LA INMUNOGLOBULINA G EN LA DISFUNCIÓN RENAL MODERADA

C. BARRIOS¹, J. ZIERER², I. GUDELJ³, I. UGRINA³, MJ. SOLER¹, M. PUČIĆ-BAKOVIĆ³, J. PASCUAL¹, TD. SPECTOR⁴, G. LAUC⁴, C. MENN¹

¹NEFROLOGÍA. INSTITUT MAR D'INVESTIGACIONS MÈDIQUES (BARCELONA), ²TWIN RESEARCH AND GENETIC EPIDEMIOLOGY. KING'S COLLEGE (LONDON (UK)), ³GENOS. GLYCOSCIENCE RESEARCH LABORATORY (ZAGREB (CROACIA)), ⁴PHARMACY AND BIOCHEMISTRY. UNIVERSITY OF ZAGREB (ZAGREB (CROACIA))

Antecedentes: La glicosilación constituye la forma más abundante y diversa de las modificaciones post-transcripcionales. En este estudio exploramos la asociación entre la glicosilación de la Inmunoglobulina G (IgG) y la función renal en 3274 individuos de la cohorte del TwinsUK.

Métodos: Analizamos la correlación entre la función renal (eGFR) y 76 perfiles de glicosilación (N-glicanos) de la IgG usando una regresión lineal ajustada por co-variables y comparaciones múltiples (ajuste de Bonferroni; P<6.5x10⁻⁴) en 3212 sujetos. Replicamos nuestros resultados en 31 parejas de gemelos monoocigóticos, discordantes para la función renal. Los resultados de los dos análisis fueron posteriormente meta-analizados. Los glicanos de la IgG total fueron obtenidos mediante UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography).

Resultados: 14 perfiles de glicanos se encontraron asociados a la función renal en la población analizada y permanecieron significativos después de la validación en la población de réplica. Dichos glicanos pertenecen a tres procesos principales de la glicosilación de la IgG: galactosilación, sialilación y los niveles biosintéticos de la N-acetilglucosamina (GlcNAc).

Conclusión: Este es el primer estudio que muestra el papel de la glicosilación de la IgG en la valoración de la función renal. Los resultados aportan nuevos conocimientos sobre la pato-fisiología del daño renal y abren potenciales dianas terapéuticas.

■ **Tabla.** Perfil glicanos de la IgG significativamente asociados con el FGe en la población de ensayo

Glicanos	Descripción	B[95%CI]	p
GP18	Porcentaje de glicanos FA2G2S1 en IgG total	1.48 [0.89;2.07]	8.60 x 10 ⁻⁷
GP14	Porcentaje de glicanos FA2G2 en IgG total	1.46 [0.85;2.07]	2.92 x 10 ⁻⁶
GP6 ^a	Porcentaje de glicanos FA2B en IgG total neutra (GP ^a)	-1.39 [-1.98;-0.80]	3.56 x 10 ⁻⁶
GP14 ^a	Porcentaje de glicanos FA2G2 en IgG total neutra (GP ^a)	1.29 [0.68;1.90]	3.06 x 10 ⁻⁵
FBS1/F51	Ratio de estructuras fucosiladas monosialiladas con y sin GlcNAc bisectada	-1.12 [-1.65;-0.59]	3.48 x 10 ⁻⁵
FBS1/	Incidencia de GlcNAc bisectada en todas las estructuras fucosiladas monosialiladas en IgG total	-1.10 [-1.63;-0.57]	4.63 x 10 ⁻⁵
(F51+FBS1)	Porcentaje de las estructuras digalactosiladas en IgG total neutra	1.20 [0.60;1.80]	8.81 x 10 ⁻⁵
GP6	Porcentaje de glicanos FA2B en IgG total	-1.14 [-1.71;-0.57]	8.90 x 10 ⁻⁵
FBS1 ^{total} /F51 ^{total}	Ratio de todas las estructuras fucosiladas sialiladas con y sin GlcNAc bisectada	-1.07 [-1.60;-0.54]	8.21 x 10 ⁻⁵
GP ^a	Porcentaje de las estructuras agalactosiladas en IgG total neutra	-1.16 [-1.76;-0.56]	1.52 x 10 ⁻⁴
GP2 ^a	Porcentaje de glicanos A2 en IgG total neutra (GP ^a)	-0.91 [-1.42;-0.40]	5.02 x 10 ⁻⁴
GP2	Porcentaje de glicanos A2 en IgG total	-0.90 [-1.42;-0.38]	6.28 x 10 ⁻⁴
FGS/	Porcentaje de la sialilación en todas las estructuras fucosiladas sin GlcNAc bisectada en IgG total	1.01 [0.46;1.56]	2.96 x 10 ⁻⁴
(F+FG+FGS)	Ratio de las estructuras fucosiladas digalactosiladas sin bisectación de GlcNAc en todas las estructuras digalactosiladas con GlcNAc bisectada	0.91 [0.38;1.44]	7.32 x 10 ⁻⁴

8 PAPEL DE LA QUIMIOQUINA MCP-2/CCL8 EN EL DAÑO RENAL Y VASCULAR EXPERIMENTAL

M. OREJUDO¹, RR. RODRIGUES-DIEZ², AB. GARCÍA REDONDO¹, M. ALIQUE¹, T. BELLÓN³, R. SELGAS¹, M. RUIZ-ORTIGA¹

¹NEFROLOGÍA. IIS-FJD-UAM (MADRID), ²NEFROLOGÍA. H.U. LA PAZ-IDIPAZ (MADRID), ³NEFROLOGÍA. H.U. LA PAZ-IDIPAZ (MADRID)

Introducción: La inflamación es una característica común a las enfermedades renales y a sus complicaciones cardiovasculares. Las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCPs) engloban una de las principales familias de citoquinas con motivo C-C, implicadas en la regulación de la respuesta inflamatoria. En estas proteínas se ha descrito diferencia de homología entre especies, que complica su estudio. La isoforma murina de MCP-2, también denominada CCL8, es una proteína quimioatrayente para monocitos, células T activadas y células dendríticas. La isoforma humana de MCP-2 se une al receptor CCR2, mientras que la murina utiliza CCR8. Nuestro objetivo ha sido estudiar si MCP-2 puede contribuir al daño vascular y renal.

Material y método: Se cuantificó la expresión génica de MCP-2 y CCR8 en varios modelos: obstrucción unilateral de uréter de 5 días y administración sistémica de Angiotensina II (100mg/kg/min subcutáneo) a 3, 7 y 14 días. Para evaluar la modulación de la respuesta inmune, se bloqueó la respuesta Th17 (con un anticuerpo neutralizante de su citoquina efectora IL-17A). In vitro se utilizaron células endoteliales de ratón (Mile Sven-1). Se realizó un modelo de administración de MCP-2 (550 ng/g ratón; i.p.), durante 48 horas. Un grupo se trató con el inhibidor de NF-κB parthenolide (3,5 mg/g, i.p diario, 24 horas antes). La expresión génica se evaluó por PCR cuantitativa.

Resultados: En los modelos animales de inflamación evaluados la expresión génica de MCP-2 aumenta cuando se produce el daño, comparado con el grupo control respectivo. Este aumento se revierte al bloquear IL-17A. En el modelo de administración sistémica de Angiotensina II la expresión génica del receptor CCR8 aumenta con respecto al grupo control. En células endoteliales, MCP-2 induce la expresión de algunos genes proinflamatorios y profibróticos y a la dosis de 100 ng/ml produce su mayor efecto proinflamatorio a 3-6 horas. En estas células observamos que la expresión génica de CCR8 es mínima y en presencia de CCL8 los niveles de mRNA aumentan exponencialmente.

Finalmente, en el modelo de administración sistémica de MCP-2 se analizó la expresión génica de los riñones y aortas. Observamos un incremento en los niveles de mRNA de factores proinflamatorios y de CCR8. El tratamiento con parthenolide disminuyó la sobreexpresión de estos genes, a niveles de los ratones control.

Conclusiones: In vitro e in vivo MCP-2 regula genes proinflamatorios vía NF-κB. En modelos de daño vascular y renal aumenta el eje MCP-2/CCR8 asociado con inflamación indicando su importancia en estas patologías.

9 GENETIC STUDY OF THE RENAL HEREDITARY TUBULOPATHIES IN THE GALICIAN POPULATION BY NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS).

O. LAMAS GONZÁLEZ¹, L. SOUSA SILVA¹, L. BESADA CERECEDO¹, B. SOBRINO², P. REGUEIRO CASUSO¹, M. GIL³, G. ARICETA⁴, A. CARRACEDO⁵, C. DÍAZ RODRÍGUEZ², A. GARCÍA GONZÁLEZ¹
¹GROUP OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF RENAL DISEASES. HEALTH RESEARCH INSTITUTE (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²GALICIAN PUBLIC FOUNDATION OF XENOMIC MEDICINE, ³NEPHROLOGY. CLINICAL UNIVERSITY H. (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ⁴NEPHROLOGY. H. VALL D'HEBRON (BARCELONA)

Renal hereditary tubulopathies (primary tubulopathies) are a group of disorders with different clinical outcome but sharing as common feature the alteration of tubular function and the paediatric appearance. Most tubular inherited pathologies have overlapping symptoms, interfamilial and intrafamilial heterogeneity and the clinical diagnosis depends on the physician experience and biochemical abnormalities. Indeed, there are not specific therapeutic strategies and just the symptoms are treated, not the cause. Wrong diagnosis or treatment, nevertheless, may cause serious complications as sensorineural deafness, oculocerebralrenal abnormalities, severe maladaptive behaviors, epilepsy, ataxia, rickets, tetany or development delay as well.

Our aim was to develop a tool to anticipate, diagnose and fine-tune the treatment of the renal hereditary tubulopathies. We have previously shown the design and characterization of the first genetic test for all primary tubulopathies by a Haloplex design for Ion Torrent platform. This genetic test covered all the 36 genes implicated to date in primary tubulopathies and have reported high efficiency, sensitivity and specificity. Here we show the application of our genetic test in 43 patients with clinical diagnosis of renal tubulopathies, 34 of them belonging to 28 Galician families.

We applied our test to patients with a wide spread of clinical features that covered the most common primary tubulopathies. Most of them, 28.26%, came with previous diagnosis of Gitelman Disease, 13% had Diabetes Insipidus Nephrogenic and 19.6% showed an undetermined tubulopathy. Surprisingly, we have found an important lack of accordance, 44.8%, between their reported clinical diagnosis and our genetic diagnosis. Thus, 27.5% of clinical diagnoses were likely incorrect, 17.2% were uncompleted and just 20.68% coupled with our genetic results. In the 34.8% remain, we did not find any mutation suggesting influence of unknown genes in the reported tubulopathy phenotype.

Our results are pointing out the importance of an accurate diagnosis before starting any treatment. Since tubulopathy patients are not the easier population to diagnose, our genetic test would overcome this challenge in the clinical practice, thus improving their clinical management and quality of life.

10 NEFROCHUS: A NEW MODEL FOR GENETIC CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH HEREDITARY KIDNEY DISEASE.

L. SOUSA SILVA¹, L. BESADA CERECEDO¹, O. LAMAS GONZÁLEZ¹, P. REGUEIRO CASUSO¹, J. AMIGO LECHUGA², X. BARROS², A. CARRACEDO³, C. DÍAS RODRÍGUEZ², A. GARCÍA GONZÁLEZ¹
¹GROUP OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF RENAL DISEASES. HEALTH RESEARCH INSTITUTE (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²GALICIAN PUBLIC FOUNDATION OF GENOMIC MEDICINE, ³NEPHROLOGY. UNIVERSITY H. COMPLEX (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

Our group is mainly focused on the study of hereditary kidney diseases. These diseases are associated with mutations in a large number of genes. Sanger is a traditional and reliable method for sequencing, but next generation sequencing (NGS) has improved this method in a time and cost effective manner. Recently, we have developed new rapid genetic tests for all renal hereditary disorders in three main groups, hereditary cystic kidney disease, hereditary tubule-interstitial disease and hereditary glomerular disease. For hereditary cystic kidney disease we created 2 panels: a panel with the 8 genes associated with the most common hereditary cystic kidney diseases and a panel with the complete list of 72 genes associated with common, rare and ultra-rare hereditary cystic kidney diseases. The panels for tubule-interstitial and glomerular disease included 36 and 26 genes, respectively.

We apply these tests to 147 patients from University Hospital Complex of Santiago de Compostela (CHUS) and from other Spain hospitals. We prepared Haloplex libraries of 72 patients diagnosed or suspected of having common cystic disease, 18 patients diagnosed or suspected of having rare, ultra-rare cystic disease, 31 patients diagnosed or suspected of having glomerular disease, 26 diagnosed or suspected of having tubule-interstitial disease. These libraries were sequenced in Ion PGM or Ion Proton and the variants found were analyzed.

With these samples we obtained an optimal real coverage of 96.3% of the target region (coding regions +/-10bp of flanking exons) for common hereditary cystic kidney disease panel, 98.5% for common, rare and ultra-rare hereditary cystic kidney disease panel, 93.7% for hereditary glomerular disease panel, and 98.5% for hereditary tubule-interstitial disease panel. Variants that may be associated with the disease were found in 82 patients. For some of these patients we obtained samples from more family members in a way to study the co-segregation of the identified mutations. Some patients have mutations in 2 or 3 different genes that can explain the intra-familial phenotypic variability.

In our laboratory we have samples of members from more than 450 families diagnosed with a number of different hereditary kidney diseases. Many of these families are already genotypically characterized and we pretend characterize all Galician families diagnosed with hereditary kidney disease in order to reduce the time and cost of diagnostic. Here we describe the utility of this first strategy to diagnose all hereditary kidney disease.

11 IDENTIFICATION OF NEW SIGNALLING PATHWAYS RELATED TO POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE (PKD): FROM ANIMAL MODELS TO TREATMENT.

O. LAMAS GONZÁLEZ¹, S. BRAVO², AB. SANZ³, A. BARCIA DE LA IGLESIA¹, M. PARDO⁴, A. ORTIZ⁵, T. WATNICK⁶, GG. GERMINO⁷, C. DÍAZ RODRÍGUEZ², A. GARCÍA GONZÁLEZ¹

¹GROUP OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF RENAL DISEASES. HEALTH RESEARCH INSTITUTE (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²PROTEOMICS UNIT. HEALTH RESEARCH INSTITUTE (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ³LABORATORY OF NEPHROLOGY. IIS- FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (MADRID), ⁴OBSIDOMICS. HEALTH RESEARCH INSTITUTE (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ⁵NEPHROLOGY. UNIVERSITY OF MARYLAND SCHOOL OF MEDICINE (BALTIMORE, MARYLAND (USA)), ⁶NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASE. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (BETHESDA, MARYLAND (USA)), ⁷NEPHROLOGY. CLÍNICAL UNIVERSITY H. (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

Polycystic Kidney Disease (PKD) is the most frequently inherited disease since 1/600 new born carry a mutation in autosomal dominant PKD genes (PKD1 or PKD2) or 1/64 in the autosomal recessive gene (PKHD1). ADPKD is characterized by the gradual replacement of renal tubules by cysts. The pathogenesis is not completely understood, but appears to involve altered cell proliferation and cell death, alterations in differentiation and in the polarity of tubular cells and inflammatory and pro-fibrotic factors.

In the US and Europe there is currently no therapy for ADPKD, although positive clinical trials with tolvaptan may lead to regulatory approval as it was approved in Japan. There are advances in controlling cyst volume and cyst progression but not in the complete control of the disease. Indeed, most patients require dialysis (10%) or kidney transplantation. This implies that more efforts are needed to understand the pathogenesis of the disease and new therapeutic approaches are required.

We use a mouse model in which the PKD1 gene is conditionally inactivated by Cre-mediated recombination and develops kidney cysts at different ages depending on when the disease is induced. We have also shown the age-dependent effects of TWEAK administration in cyst development. Here, we perform an exhaustive proteomics analysis of each developmental stage by MALDI-TOF/TOF analysis of peptides and proteins separated either by LC or 2D-PAGE, respectively, to detect the proteins directly related to cystogenesis. We were able to establish the proteomics fingerprint of each physiopathologic condition and refine new therapeutic targets to a very short list, not previously described as altered during cystogenesis in terms of upregulation, downregulation or posttranslational modifications. These proteins are involved in maintenance of normal cell architecture, signaling, regulation of apoptosis and metabolic processes as well. Our results coupled with those achieved by our collaborators and with those previously described in other processes but not related to cystogenesis. The more ahead to the appearance of cysts, easier is the control and prevention of the disease. Our goal was to define the proteomic profile of the early stages of change in genetic expression, organization and proliferation of cells deficient in polycystin 1 (product of PKD1 gene) and to refine it by the exogenous induction of cystogenesis (with the correct genetic background, i.e. PKD1 knockout) by a likely intermediary in ADPKD, TWEAK. Our data are invaluable to fine-tuning PKD therapies, such as Tolvaptan, and to determine new therapeutic approaches.

12 GENETIC CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH HEREDITARY GLOMERULAR DISEASE AS THE BASE FOR A GLOBAL ACTION IN DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND TREATMENT

L. SOUSA SILVA¹, L. BESADA CERECEDO¹, O. LAMAS GONZÁLEZ¹, F. ARROJO ALONSO², C. VÁZQUEZ², M. FIDALGO³, S. DAVILA⁴, C. HERNÁNDEZ VALLEJO⁵, C. DÍAZ RODRÍGUEZ², A. GARCÍA GONZÁLEZ¹

¹GROUP OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF RENAL DISEASES. HEALTH RESEARCH INSTITUTE (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²NEPHROLOGY. FERROL H. (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ³NEPHROLOGY. UNIVERSITY H. COMPLEX (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

Glomerular diseases are a complex group of disorders that share the feature of damage in the glomerular filtration barrier that leads to a heavy proteinuria in the affected patients. Hereditary glomerular diseases are caused by mutations in genes which codify proteins that are expressed in the podocyte or in the basement glomerular membrane. We developed the first genetic test to diagnose all hereditary glomerular disease based on Next Generation Sequencing (NGS) of Haloplex target enrichment libraries.

Our laboratory has generated a next generation sequencing (NGS) panel including the 26 known genes associated with hereditary glomerular disease. We have also developed an algorithm that allow us to reduce possible false positives associated to this technology, and abolish false negatives, critical for clinical decision. We screened a total of 31 patients diagnosed or suspected of having a hereditary glomerular disease with uncertain origin, 19 from University Hospital Complex of Santiago de Compostela (CHUS) and 12 from other Spanish hospitals. With these samples we obtained an optimal real coverage of 93.7% of the target regions (coding regions +/-10bp of flanking exons). Of the 31 patients analyzed we found variants possible associated with the disease in 22, suggesting the possible role of unknown. For some of these patients we obtained samples from more family members to study the co-segregation of the mutations. Some patients have mutations in 2 or 3 different genes that could explain the intra-familial phenotypic variability, and revealing genetic interaction underlying glomerular genes. In addition, we have established a GLOMERULAR MUTATION DATA BASE with all genetic variants identified in our cohort for common use of clinical decision making. From all 1367 genetic variants, 53% (727) were intronic variants, 23% (313) were UTRs variants, 9% (123) were synonymous, 11% (152) were nonsynonymous, 1% (18) were splicing, 2% (28) were frameshift deletion or insertion, 0.2% (3) were nonframeshift substitution and 0.2% (3) were stopgain. In order to complete genetic analysis, we performed exome sequencing in several families providing possible new genetic targets for glomerular disease.

This study, describes a powerful genetic test as the base for the establishment of a global action in health for the diagnosis and characterization of patients with hereditary glomerular diseases in an accurate, rapid and also cost-effective way.

13 CYTOKINE TWEAK AS AN INTERMEDIARY IN AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE (ADPKD)

O. LAMAS GONZÁLEZ¹, AB. SANZ², MD. SÁNCHEZ NIÑO³, A. BARCIA DE LA IGLESIA¹, A. CORDIDO EUJO¹, P. VIAÑO³, A. ORTIZ², A. GARCÍA GONZÁLEZ¹

¹GROUP OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF RENAL DISEASES. HEALTH RESEARCH INSTITUTE (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²LABORATORY OF NEPHROLOGY. IIS- FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (MADRID), ³PATHOLOGY. CLÍNICAL UNIVERSITY H. (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is the most frequent inherited kidney disease (1/600 newborns carry a mutation in PKD1 or PKD2 genes) that accounts for 10% of patients requiring renal replacement therapy. ADPKD is characterized by the gradual replacement of renal tubules by cysts. The pathogenesis is not completely understood, but appears to involve altered tubular cell proliferation, cell death, cell differentiation and polarity as well as inflammatory and pro-fibrotic factors. It has been reported that acute kidney injury (AKI) and inflammation accelerate cystogenesis.

TWEAK is a TNF-like cytokine that has a key role in AKI since anti-TWEAK antibodies prevented experimental loss of kidney function and renal inflammation, cell death and proliferation.

We hypothesize that response to treatment and cyst progression depend on a particular developmental window, so the correct dose and timing of a drug may prevent cystogenesis and make chronic treatment unnecessary.

Here, we use a mouse model in which conditional inactivation of the PKD1 gene by Cre-mediated recombination results in kidney cystogenesis at different ages depending on when PKD1 is inactivated. We observed age-dependent effects of TWEAK administration in cyst development. PKD1 inactivation at day 12 resulted in massive cyst growth by day 30. Under these conditions systemic TWEAK administration for 10 days decreased cystogenesis. By contrast, PKD1 inactivation at day 14 did not result in cyst growth by day 30. Under these conditions systemic TWEAK administration for 10 days promoted cystogenesis.

These results demonstrate a developmental stage development impact of PKD1 inactivation and TWEAK in cystogenesis. Under the conditions of early PKD1 inactivation of the human condition, TWEAK may protect from cystogenesis if administered early in the disease course. However, detailed time course are needed before human extrapolation given that TWEAK cystogenesis in some settings.

14 ESTUDIO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD POLIQUÍSTICA RENAL EN GALICIA

L. BESADA CERECEDO¹, L. SOUSA SILVA¹, O. LAMAS GONZÁLEZ¹, B. SOBRINO², L. SANTOME³, P. REGUEIRO CASUSO¹, R. ESTEBAN DE LA ROSA³, A. CARRACEDO³, C. DÍAZ RODRÍGUEZ⁴, A. GARCÍA GONZÁLEZ¹

¹LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA, ³GRUPO PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD POLIQUÍSTICA AUTOSÓMICA DOMINANTE. COMPLEJO HOSPITALARIO U. (GRANADA), ⁴NEFROLOGÍA. H. CLÍNICO U. (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

La poliquistosis renal (PKD) se puede clasificar en tres grandes grupos: autosómica dominante (PQRAD), recesiva (PQRAR), y formas atípicas. Nuestro grupo ha sido pionero en el desarrollo de herramientas de diagnóstico genético para esta enfermedad: 1) Test diagnóstico para la PQRAD, genes PKD1 y PKD2 (PKDx test, Athena Diagnostics, USA), 2) Panel para la enfermedad poliquística común (8 genes mutados más prevalentes en la población) 3) y Panel para la PKD rara y ultra-rara (72 genes conocidos asociados a cilopatías renales).

Combinando una estrategia que engloba un registro de 245 familias (con 3820 individuos afectados y una media de 60 individuos sanos por familia, recogidos en árboles genealógicos de hasta 6 generaciones), la secuenciación completa de al menos un individuo afecto de cada familia, y el establecimiento de un estudio genético en cascada (portadores y no portadores de las respectivas mutaciones), estamos en disposición de decir que tenemos caracterizadas genéticamente el 81% de las familias gallegas, y detectado 260 variantes génicas detectadas en dichos individuos. En solo un año, el análisis del individuo probando de cada familia supuso un coste medio de 1200€, mientras que cada siguiente miembro de cada familia 50€, suponiendo un ahorro de más de 2.5 millones de euros al Sistema Gallego de Salud (SERGAS) y un diagnóstico certero de los pacientes incluso 50 años antes de padecer la enfermedad. El estudio de estas familias nos ha ayudado al establecimiento de una base de datos de variantes génicas de PKD clasificadas en cuatro tipos, tipo-I (definitivamente patogénicas), -II (probablemente patogénicas), -III (de significado incierto) y -SNP (no asociadas a patogenicidad). Hemos sido capaces de reanalizar todas y cada una de las variantes génicas mundiales conocidas hasta el momento, para el establecimiento definitivo de una base de datos completa y de acceso público, reclasificando un total de 3270 variantes génicas distribuidas en 1174 clase-I, 141 clase II, 1604 clase III y 351 SNPs o polimorfismos.

Este estudio, pone de manifiesto la necesidad del establecimiento de estrategias conjuntas para el diagnóstico genético de enfermedades por áreas geográficas nacionales como modelo productivo y coste eficiente en diagnóstico y tratamiento de pacientes con enfermedades hereditarias. Dichas estrategias deben aunar esfuerzos de especialistas de servicios de nefrología de las distintas áreas asistenciales, laboratorios de referencia en diagnóstico, registro de bases de datos de patologías hereditarias e implicación de los Sistemas Autonómicos de Salud que canalicen acción estratégica en salud de la enfermedad renal hereditaria.