

## 1 OBTENCIÓN DE UN "SCAFFOLD" RENAL MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS DE BIOINGENIERÍA REGENERATIVA

F. GUERRERO PAVÓN<sup>1</sup>, R. CRESPO MONTERO<sup>1</sup>, R. ORTEGA SALAS<sup>2</sup>, S. CAÑADILLAS LÓPEZ<sup>3</sup>, MD. CARMONA LUQUE<sup>4</sup>, MJ. JIMÉNEZ MORAL<sup>5</sup>, A. CARMONA MUÑOZ<sup>6</sup>, J. CARRACEDO AÑÓN<sup>7</sup>, C. HERREIRA ARROYO<sup>8</sup>, P. ALJAMA GARCÍA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA (CÓRDOBA), <sup>2</sup>ANATOMÍA PATOLÓGICA. HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA (CÓRDOBA), <sup>3</sup>HEMATOLOGÍA Y TERAPIA CELULAR. HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA (CÓRDOBA)

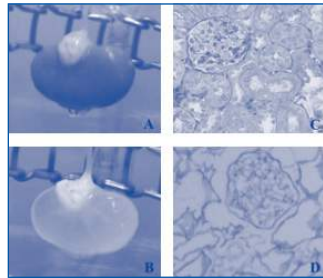
**Introducción:** Avances recientes en bioingeniería que implican la descelularización de los órganos nativos y la posterior recelularización de la matriz extracelular (MEC) resultante, proporcionarían una fuente de órganos bioartificiales que podrían ser utilizados para trasplante. Nos hemos propuesto desarrollar un riñón bioartificial que sea funcional, biocompatible y adecuado para aplicaciones posteriores de regeneración y trasplante. Hemos realizado la primera fase de este proceso desarrollando un protocolo de descelularización para la obtención de un scaffold renal biológico preservando las propiedades biomecánicas y las características de la MEC.

**Metodología:** Hemos elaborado un protocolo de descelularización de riñones de rata mediante perfusión continua con detergentes (Dodecilsulfato Sódico (SDS) y Triton X-100) a presiones fisiológicas bajas y constantes. El scaffold renal resultante ha sido caracterizado mediante técnicas histológicas básicas (Hematoxilina-Eosina, Metenamina Plata, Rojo Sirio) y mediante un análisis del proteoma por cromatografía líquida de masas.

**Resultados:** Nuestros resultados han demostrado que después de la eliminación de los componentes celulares, el scaffold renal conserva la microarquitectura renal incluyendo la vasculatura y los componentes esenciales de la MEC (Figura). El análisis proteómico revela componentes peptídicos tanto estructurales como funcionales que podrían ser la base para el llamamiento y el posicionamiento ("homing") específicos en el proceso de recelularización.

**Conclusiones:** Se ha establecido un protocolo eficiente de descelularización mediante perfusión de riñones de rata. El uso de este scaffold renal puede proporcionar un nicho de MEC ideal para su posterior recelularización, lo que representa el primer paso hacia el desarrollo de riñones bioartificiales trasplantables utilizando técnicas de ingeniería de tejidos.

■ **Figura.** Imagen de riñón de rata (A) y después (B) del proceso de descelularización Hematoxilina-Eosina de secciones de corteza renal antes (C) y después (D) de la descelularización, se muestra la ausencia de contenido celular y la integridad de la arquitectura glomerular y tubular dentro del scaffold.



## 2 INFLAMACIÓN E INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL INJERTO RENAL

I. DASILVA<sup>1</sup>, E. GUILLEN-GÓMEZ<sup>1</sup>, I. SILVA<sup>2</sup>, C. FACUNDO<sup>3</sup>, L. GUIRADO<sup>3</sup>, J. BALLARÍN<sup>1</sup>, M. DÍAZ-ENCARNACIÓN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. FUNDACIÓ PUIGVERT. IIB SANT PAU. REDINREN (BARCELONA), <sup>2</sup>BIOLOGÍA MOLECULAR. FUNDACIÓ PUIGVERT. IIB SANT PAU. REDINREN (BARCELONA), <sup>3</sup>UNIDAD TRASPLANTE RENAL. FUNDACIÓ PUIGVERT. IIB SANT PAU. REDINREN (BARCELONA)

**Introducción:** Los trasplantes renales de donantes vivos (DV) presentan mejor función renal del injerto y mayor supervivencia en comparación con los de donantes cadáveres (DC). Hay pocos datos publicados que comparen la condición inflamatoria de los riñones en el momento de la donación y su influencia en la disfunción crónica del injerto, aunque es conocido que, inmediatamente después del trasplante, injertos renales de DC presentan una respuesta inflamatoria asociada con el tiempo de isquemia fría y lesión por reperfusión.

El objetivo de este estudio fue evaluar el estado inflamatorio y la expresión de factores fibróticos en los riñones de DC y DV y su asociación con la función renal (FR) a largo plazo.

**Materiales y métodos:** Se analizaron la infiltración y el fenotipo de los macrófagos y la expresión de marcadores inflamatorios y fibróticos en biopsias de 94 injertos renales (60 DC/34 DV) en el momento del trasplante y 4 meses después. La infiltración de macrófagos se evaluó mediante la tinción con CD68, mientras que la expresión de diferentes marcadores fibróticos e inflamatorios se realizó mediante PCR cuantitativa.

**Resultados:** Se observó mayor expresión de marcadores inflamatorios en muestras preimplantacionales de DC en comparación con DV. Estos resultados fueron confirmados por el elevado número de células CD68 positivas en los injertos renales de DC ( $p=0,007$ ), que correlacionaron negativamente con la FR a largo plazo. En las biopsias de 4 meses de DC, se observó una mayor expresión de marcadores pro-fibróticos, como vimentina, fibronectina y  $\alpha$ -SMA. La expresión génica de marcadores inflamatorios y fibróticos a los 4 meses y la diferencia entre los 4 meses y basal, correlacionaron de forma negativa con la FR a medio y largo plazo. A los 4 meses, la infiltración de macrófagos continúa elevada en DC, la expresión génica de inflamación empieza a disminuir mientras que hay un aumento de la expresión de marcadores pro-fibróticos. Por otro lado, en DV se observa un incremento de la inflamación, aunque sigue siendo menor que en los injertos de DC. El análisis multivariante muestra al TGF- $\beta$ 1 como el mejor predictor independiente de la función renal a largo plazo en DC.

**Conclusiones:** Se observa un mayor incremento en el infiltrado de macrófagos en riñones preimplantacionales de DC en comparación con DV. Este infiltrado precoz de macrófagos y la inflamación sostenida, estimula la fibrosis a través de la vía del TGF- $\beta$ 1, y todo ello contribuye significativamente a la diferencia de pronóstico entre DC y DV.

## 3 APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS DE LA ENFERMEDAD POLIQUÍSTICA HEPÁTICA (PLC) EN MODELOS ANIMALES PARA LA ENFERMEDAD POLIQUÍSTICA RENAL (PKD)

A. CORDIDO<sup>1</sup>, O. LAMAS-GONZÁLEZ<sup>2</sup>, J. BAÑALES<sup>3</sup>, A. BARCIA DE LA IGLESIA<sup>4</sup>, T. WATNICK<sup>5</sup>, G. GERMINO<sup>6</sup>, C. DÍAZ<sup>7</sup>, M. GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE SANTIAGO - IDIS (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>2</sup>DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y GASTROINTESTINALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE DONOSTIA (SAN SEBASTIÁN), <sup>3</sup>DIVISIÓN DE NEFROLOGÍA. UNIVERSIDAD DE MARYLAND (BALTIMORE (MARILAND, USA)), <sup>4</sup>DIVISIÓN DE NEFROLOGÍA-DEPARTAMENTO DE MEDICINA. JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE (BALTIMORE (MARYLAND, USA)), <sup>5</sup>SERVICIO DE NEFROLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO - CHUS (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

**Introducción:** La Enfermedad Poliquistica Hepática (PLD) es un conjunto de desórdenes genéticos que se pueden manifestar en su forma recesiva o dominante, y que se puede manifestar en solitario o como principal manifestación extrarrenal asociada a la Poliquistosis Renal Autómica Dominante (PQRDA o ADPKD). La PLD se caracteriza por la dilatación del ducto biliar y/o desarrollo de quistes derivados de células epiteliales del ducto biliar y/o colangiocitos, los cuales progresivamente se hacen más severos resultando en una alta morbilidad y mortalidad debido a la ausencia de tratamientos efectivos.

**Materiales y métodos:** Utilizamos un modelo animal para la PKD como medio para testar diferentes aproximaciones terapéuticas. Dicho modelo es el ratón knockout condicionado Pkd1<sup>cond/cond</sup> Cre que se considera el modelo animal de referencia para el estudio de la PKD, lo cual en parte es debido a que mimetiza las manifestaciones renales y extrarrenales presentes en humanos, como la PLD.

En base a estudios derivados de proteómica diferencial en riñón poliquistico (ASN/SEN 2015) profundizamos en el efecto fisiopatológico, histológico y funcional de varias aproximaciones terapéuticas, inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMT) e inhibidores de la vasopresina (Tolvaptan).

**Resultados:** Observamos que el MMT, un inhibidor específico de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) tiene un efecto beneficioso a nivel hepático a diferentes dosis (1-10 mg/kg), lo cual se manifiesta en una regresión completa de la citogénesis y la restauración de la función hepática. Recientemente se ha aprobado en distintos países el uso de la primera terapia para la PKD, el Tolvaptan, un inhibidor de la vasopresina.

Tras el uso combinado de ambas terapias, MMT+Tolvaptan, observamos una mejora aditiva a nivel fisiológico como funcional revirtiéndose el fenotipo quístico de manera todavía más significativa que ambas drogas por separado. Dicha terapia combinada se convierte en una esperanza para el tratamiento definitivo de la PLD y PKD.

**Conclusiones:** Nuestro trabajo demuestra que la terapia combinada de Tolvaptan y MMT tiene el efecto más potente demostrado hasta el momento inhibiendo la citogénesis y restaurando por completo la función hepática (y renal). Esta terapia combinada da luz a una nueva opción terapéutica y poniendo de manifiesto el rol clave de las metaloproteinasas y vasopresina en el desarrollo citogénico.

**Palabras clave:** PLD, PKD, Tolvaptan, MMT, citogénesis.

## 4 ANÁLISIS GENÉTICO POR PANELES DE GENES SE DESCUBRE COMO UNA HERRAMIENTA CLAVE PARA EN EL DIAGNÓSTICO DE CIERTAS GLOMERULOPATÍAS, TUBULOPATÍAS Y ENFERMEDADES QUÍSTICAS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO COMPLEJO

L. BESADA CERECEDO<sup>1</sup>, P. REGUEIRO CASUSO<sup>1</sup>, A. BARCIA DE LA IGLESIA<sup>1</sup>, B. SOBRINO<sup>2</sup>, J. AMIGO LECHUGA<sup>3</sup>, N. ARHDA<sup>3</sup>, C. VÁZQUEZ<sup>3</sup>, M. FIDALGO<sup>3</sup>, C. DÍAZ RODRÍGUEZ<sup>3</sup>, M. GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>2</sup>FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA. FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>3</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

**Introducción:** Una de las principales ventajas de la realización del estudio genético en las enfermedades hereditarias es la rotundidad en el diagnóstico clínico asociado a las mutaciones encontradas.

**Materiales y métodos:** Nuestro grupo ha sido pionero en el desarrollo de estrategias para el diagnóstico genético de las enfermedades renales hereditarias, en tres grandes grupos de enfermedad: enfermedades quísticas (hasta 72 genes), enfermedades glomerulares (26 genes) y enfermedades túbulo-intersticiales (36 genes), tomando ventaja de los nuevos métodos de Secuenciación Masiva de Nueva Generación (NGS).

**Resultados:** Tras someter a análisis genético a una cohorte de 73 pacientes sin antecedentes familiares de enfermedad, pero con un diagnóstico clínico compatible con características fenotípicas de enfermedades hereditarias, hemos llegado a identificar la mutación causante de la enfermedad renal en el 31% de los casos ( $n=23$ ). De estos, el 78% de los casos correlacionaba el diagnóstico genético con el diagnóstico clínico adjudicado. De los 18 individuos sometidos al panel de enfermedad quística renal común rara y ultra-rara, identificamos la mutación en el 83% ( $n=15$ ) de los casos, y de los cuales sólo un 47% concordaba con el diagnóstico clínico asignado. Con respecto a los pacientes sometidos al diagnóstico de enfermedades glomerular y de enfermedad tubular, el diagnóstico clínico concordaba con el genético en un 56% y 67% de los casos, respectivamente. En la mayoría de los casos, los errores de diagnóstico clínicos se asociaron con enfermedades sindrómicas con fenotipos muy parecidos, como por ejemplo Gitelman y Bartter. En algunos casos, se debía a fenómenos de interacción génica, donde la causa clínica se debe a la presencia de más de una mutación en distintos genes relacionados funcionalmente.

**Conclusión:** Gracias al diagnóstico genético panelizado por fenotipos de grupos de genes utilizando técnicas diagnósticas con elevado porcentaje de cobertura de los genes y una alta tasa de sensibilidad y especificidad, se pone de manifiesto la dificultad de proporcionar un diagnóstico clínico certero en ciertas patologías renales, especialmente las glomerulares y túbulo-intersticiales. Así mismo, esta estrategia desenmascara un alto número de casos asociados a fenómenos de interacción génica entre distintos genes, que actúan modulando la enfermedad y dificultando el diagnóstico clínico. Así pues, el diagnóstico genético por paneles demuestra ser una herramienta de incalculable valor para el diagnóstico clínico certero especialmente en patologías complejas como la enfermedad quística rara u ultrarara, las glomerulopatías y tubulopatías.

**5 DESARROLLO COMPLETO DE ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO COSTE/EFICIENTES PARA LA POLIQUISTOSIS RENAL EN BASE AL ÍNDICE DE MUTAGÉNESIS POBLACIONAL O NECESIDADES ESPECÍFICAS**

L. BESADA CERECEDO<sup>1</sup>, B. SOBRINO<sup>2</sup>, J. AMIGO LECHUGA<sup>3</sup>, P. REGUEIRO CASUSO<sup>1</sup>, A. BARCIA DE LA IGLESIA<sup>1</sup>, M. DURÁN BELOSÓ<sup>4</sup>, C. VÁZQUEZ<sup>5</sup>, A. CARRACEDO<sup>6</sup>, C. DÍAZ RODRÍGUEZ<sup>7</sup>, M. GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>8</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLÓGICA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>2</sup>FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA. FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA GENÓMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>3</sup>FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA. FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA GENÓMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>4</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>5</sup>FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA GENÓMICA. FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA GENÓMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

**Introducción:** La poliquistosis renal (PKD) se puede clasificar en tres grandes grupos: Autosómica Dominante (PQRAD), con mutaciones en PKD1 y PKD2, Autosómica Recesiva (PQRAR), mutaciones en el gen PKHD1, y sus formas atípicas. Nuestro grupo ha sido pionero en el desarrollo de estrategias genéticas para el diagnóstico de la poliquistosis. Dichas estrategias se basaron en métodos tradicionales de secuenciación del ADN (SANGER, Athena Diagnostics, Inc USA) y, recientemente, en métodos modernos de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) diseñados en base a incidencia poblacional de los genes más mutados: [1] panel con los 8 genes mutados más comunes en la población y otro [2] que engloba los 72 genes asociados a Poliquistosis Renal Rara y ultra-rara. La utilización de técnicas NGS en genes con pseudogenes como PKD1 (6 pseudogenes conocidos de alta homología, 98%), está altamente desaconsejada debido a la insalvable barrera de altas tasas de falsos positivos y falsos negativos.

**Material y métodos:** Para solventar este problema, nuestro grupo ha desarrollado recientemente dos estrategias considerando: a) Las regiones génicas con mayor índice mutagénico (incluyendo exclusivamente la región replicada de PKD1, exones 1-34), b) región completa de los genes PKD1 y PKD2.

**Resultados:** Aplicamos esta estrategia a una cohorte de 49 pacientes con PKD y variantes génicas conocidas previamente (casos control) y obtuvimos una cobertura real óptima del 100% (≥30X). Las variantes obtenidas tras la secuenciación se filtraron por medio de variant counter (algoritmo informático desarrollado para el filtrado de variantes reales y problemáticamente patogénicas, descartando aquellas que no lo son), y fueron validadas por secuenciación Sanger. De un total de 237 variantes identificadas, el 82,7% fueron descartadas por variant counter. El 17,3% restante, fueron validadas por Sanger, resultando el 70% verdaderos positivos, con una sensibilidad y especificidad del 100%.

**Conclusiones:** Poseemos todas las estrategias genéticas para abordar la secuenciación de las distintas Poliquistosis en base a cada caso, pensadas de manera coste/eficiente: 1) Panel para la región mutagénica responsable de la mayoría de poliquistosis recogidas en la población, 2) Panel para las Poliquistosis Autosómicas Dominantes (para casos con ADPKD donde se requiera exclusivamente el diagnóstico), 3) Panel para las enfermedades poliquísticas más comunes en la población y 4) Panel para enfermedad común, rara y ultrarara para todos los genes quísticos renales conocidos hasta el momento (útiles para la identificación de genes moduladores), 5) Exome Focused (exoma con eficiencia de panel que incluye todos los genes renales y no renales) y 6) Secuenciación SANGER (útil para casos puntuales e identificación de mutaciones puntuales).

**6 CARACTERIZACIÓN DE MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES INDUCIDAS POR TOXINAS URÉMICAS UNIDAS A PROTEÍNAS: EFECTO DEL INDOXYL SULFATO**

P. BUENDÍA<sup>1</sup>, A. CARMONA<sup>1</sup>, F. GUERRERO<sup>1</sup>, R. MOYANO<sup>1</sup>, M.J. JIMÉNEZ<sup>2</sup>, R. RAMÍREZ<sup>3</sup>, A. MARTÍN-MALO<sup>4</sup>, P. ALJAMA<sup>5</sup>, J. CARRACEDO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>GRUPO DE NEFROLOGÍA. DAÑO CELULAR EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA. INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE CÓRDOBA (IMIBIC) (CÓRDOBA), <sup>2</sup>DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES (MADRID), <sup>3</sup>UGC NEFROLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA (CÓRDOBA)

**Introducción:** Se ha descrito que la disfunción endotelial asociada a la uremia es uno de los principales factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Las células endoteliales (CE) de estos pacientes están expuestas a diferentes estímulos, como las toxinas urémicas, que inducen la producción de microvesículas (MVE). Estas MVE contienen en su interior proteínas, que reflejan el estado de la célula que las originó, y participan en la transmisión de señales biológicas entre distintos tipos celulares.

**Objetivo:** Caracterizar el contenido proteico de MVE en respuesta a indoxyl sulfato (IS) y determinar la funcionalidad de las mismas en la regulación de procesos celulares.

**Metodología:** Mediante centrifugaciones seriadas se obtuvieron MVE de CE (HUVEC) tratadas con IS (MVE-IS) o no (MVE-C). Los estudios de proteómica se realizaron mediante cromatografía líquida de masas, para caracterizar las proteínas contenidas en las MVE. Posteriormente se realizó un análisis bioinformático de las proteínas encontradas para identificar la funcionalidad de las mismas.

**Resultados:** Las MVE-C contenían un total de 783 proteínas mientras que las MVE-IS contenían 501 proteínas. Las MVE-C presentaron 335 proteínas que no se hallaron en las MVE-IS y que estaban implicadas principalmente en procesos biológicos fundamentales en el metabolismo de la célula. Las MVE-IS mostraron 53 proteínas que no estaban en las MVE-C, relacionadas con procesos patológicos (factor IX y II de la coagulación, Integrinas, HSP-90, etc). Ambos tipos de MVE compartían 448 proteínas, implicadas principalmente en funciones estructurales.

**Conclusiones:** Las MVE generadas por el tratamiento con IS presentan un contenido proteico diferente de las MVE-C. Las características diferenciales de las MVE producidas por IS pueden jugar un papel importante en la identificación de nuevos marcadores biológicos, que nos permitan establecer estrategias en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad cardiovascular en pacientes con ERC.

Figura. Diagrama de Venn de las proteínas contenidas en MVE-C y MVE-IS.



**7 ANÁLISIS GENÉTICO DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE EN EL ÁREA SANITARIA DE GRANADA**

AI. MORALES GARCÍA<sup>1</sup>, R. ESTEBAN DE LA ROSA<sup>1</sup>, M. MARTINEZ ATIENZA<sup>1</sup>, MA. GARCIA GONZÁLEZ<sup>2</sup>, L. SILVA<sup>2</sup>, R. FERNÁNDEZ CASTILLO<sup>3</sup>, JA. BRAVO SOTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO DE GRANADA (GRANADA), <sup>2</sup>GENÉTICA. COMPLEJO HOSPITALARIO DE SANTIAGO (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>3</sup>CIENCIAS DE LA SALUD. UNIVERSIDAD DE GRANADA (GRANADA)

**Introducción:** Desconocemos cuáles son las mutaciones presentes en los pacientes con PQRAD en nuestro medio. El diagnóstico genético es necesario en candidatos a Diagnóstico Genético Preimplantacional (DPG) y en aquellos miembros de familias afectas en edad reproductiva y con dudas de sufrirla de cara a ofrecer adecuado consejo genético.

**Objetivo:** Analizar las variaciones genéticas de la PQRAD en el ámbito sanitario de Granada, y compararlas con las descritas a día de hoy en la PKD database.

**Material y métodos:** Analizamos los estudios genéticos PKD1, PKD2 y PKHD1 realizados a pacientes con diagnóstico de PQRAD entre enero 2007-abril 2016. Todos los estudios genéticos han sido externalizados. La gran mayoría (110) son estudios moleculares directos de la región codificante. Tan sólo dos se han realizado por marcadores polimórficos en ligamiento con el gen responsable.

**Resultados:** De los 1071 pacientes registrados con diagnóstico de PQRAD, 951 se agrupan en 240 familias. Analizamos estudios genéticos realizados en 111 (10.4%) correspondientes a 41 familias: en el 91.9% identificamos mutación en el gen PKD1, 1.8% en PKD2, 1.8% en ambos, y en el 4.5% no se identificó mutación. En el grupo PKD1, el tipo de variación en nucleótido más frecuente fue la sustitución-transición (35.8%). El 94% se localizó en exones, siendo el exón 15 el más afectado (19.2%). El 60% de las mutaciones identificadas no están descritas. El 54.6% de los pacientes son portadores de mutación truncante. En 3 casos se hubo cambio de diagnóstico de PQRAD a favor de PQRAR. Identificamos la misma mutación del gen PKD1 en 4 familias de la comarca de Loja y en 2 familias de la comarca de Alpujarra, sin parentesco aparente según genograma.

**Conclusiones:** Por el momento, continúan habiendo pocos estudios genéticos en los pacientes con PQRAD. La mutación del gen PKD1 es la causa genética más frecuente de PQRAD en nuestro medio. Se localiza principalmente en el exón, siendo el exón 15 es más afectado. Identificamos un elevado número de mutaciones PKD1 aún no descritas, por lo que es muy importante un registro de nuestras mutaciones para poder realizar tanto prevención primaria como secundaria de la enfermedad. El estudio genético PKD1-PKD2-PKHD1 nos ayudará a conseguir diagnósticos correctos y habrá que realizarlo contemplando el ámbito geográfico de la enfermedad así como la movilidad de las familias.

**8 LA HIPERFOSFATEMIA ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO RELACIONADA CON LA PÉRDIDA DE FUERZA MUSCULAR**

P. SOSA<sup>1</sup>, P. PLAZA<sup>1</sup>, D. MEDRANO<sup>1</sup>, P. LÓPEZ-LUNA<sup>1</sup>, P. VALENZUELA<sup>1</sup>, A. AROEIRA<sup>1</sup>, G. OLMOS<sup>1</sup>, M. RODRÍGUEZ-PUYOL<sup>1</sup>, S. LÓPEZ-ONGIL<sup>1</sup>, MP. RUIZ-TORRES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DPT BIOLOGÍA DE SISTEMAS. FACULTAD MEDICINA Y CIENCIAS SALUD.. UNIV. ALCALÁ Y UNIDAD INVEST. FUND. INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA, HOSPITAL PRÍNCIPE DE ASTURIAS (ALCALÁ DE HENARES, MADRID)

**Introducción:** La hiperfosfatemia y la sarcopenia son fenómenos relacionados con el envejecimiento, también están presentes en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). En dichos pacientes se ha descrito una alteración de la expresión de Klotho y del transportador NaPi2A del túbulo renal unido al aumento en la concentración de fósforo sérico. El objetivo de este trabajo fue evaluar si durante el envejecimiento existe una correlación entre los niveles de fosfato en sangre, la pérdida de fuerza muscular y la senescencia celular, analizando la regulación de Klotho y otras enzimas relacionadas con el metabolismo del fósforo.

**Material y métodos:** Se utilizaron ratones macho wild type C57BL6 de 19 meses (viejos) y 5 meses (jóvenes). Los niveles de fosfato en plasma se determinaron utilizando un kit comercial. La expresión de mRNA de Klotho, del transportador de fosfato NaPi2a, la enzima 1-hidroxilasa, fueron analizados mediante RT-qPCR en el riñón. La fuerza muscular se registró en las patas delanteras mediante el "test de agarre", y la fuerza trasera mediante la electroestimulación percutánea del nervio peroneo común. Los músculos gastrocnemio y cuádriceps fueron aislados para evaluar el contenido proteico del gen p53 mediante técnicas de western-blot.

**Resultados:** Los niveles de fosfato en plasma de los ratones viejos aumentaron un 30% respecto a los jóvenes. En cuanto a la expresión de los genes relacionados con la excreción del fósforo también se encontraron modificaciones, observándose una disminución de la expresión de Klotho del 20% en los viejos, así como un aumento en los niveles del transportador de fosfato NaPi2a, de la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa, de un 9% y un 71%, respectivamente. Además, los ratones viejos mostraron un 40% menos de fuerza muscular respecto a los jóvenes (test de agarre) y un 55% (por electroestimulación). Por último, la expresión de p53 aumentó significativamente en ambos músculos analizados.

**Discusión:** Con este trabajo, demostramos que los ratones viejos presentan hiperfosfatemia asociada a la disminución de la expresión de Klotho, que genera una alteración en los transportadores de NaPi2a y en las enzimas relacionadas con la activación de la vitamina D, provocando una menor excreción de fósforo. Estos niveles elevados de fósforo se correlacionan con una pérdida de fuerza muscular en los animales viejos, que a su vez podría estar mediada por la acumulación de células senescentes en el músculo esquelético, sugiriendo que la senescencia celular inducida por el fosfato estaría influyendo en la pérdida de la fuerza muscular asociada al envejecimiento.

## 9 ESTUDIO GENÉTICO-CLÍNICO DE PACIENTES CATALOGADOS DE HEMATURIA BENIGNA FAMILIAR: SÍNDROME DE ALPORT CON UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL COL4A3

A. COLOMA LÓPEZ<sup>1</sup>, M. SIERRA CARPIO<sup>1</sup>, E. DOMÍNGUEZ GARRIDO<sup>2</sup>, C. CERVERA ACEDO<sup>3</sup>, A. GIL PARAÍSO<sup>1</sup>, C. DALL'ANESE SIEGENTHALER<sup>1</sup>, M. ARTAMENDI LARRAÑAGA<sup>1</sup>, F. GIL CATALANAS<sup>1</sup>, E. HUARTE LOZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL SAN PEDRO (LOGROÑO), <sup>2</sup>DIAGNÓSTICO MOLECULAR. CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA RIOJA (CIBIR) (LOGROÑO)

**Introducción:** La hematuria benigna familiar (HBF) es una entidad clínica caracterizada por microhematuria persistente, mínima proteinuria o ausencia de ésta, función renal normal, adelgazamiento de la membrana basal glomerular (MBG) e historia familiar con un patrón de herencia autosómico. Debido a que comparte muchas similitudes con el Síndrome de Alport (SA), en la actualidad se habla de Nefropatía del colágeno IV como denominador común para formas del SA y la HBF.

El SA es una enfermedad renal hereditaria caracterizada por hematuria, deterioro de función renal, hipoacusia neurosensorial y alteraciones oculares. La enfermedad es genéticamente heterogénea, se produce por mutaciones en el colágeno tipo IV. Existen diferentes tipos de herencia: Ligada al X (HLX), autosómica recesiva (HAR) y dominante (HAD). El fenotipo de la HLX y de la HAR está bien definido, sin embargo no en la HAD, que se da por mutaciones en los genes de los cromosomas COL4A3 y COL4A4 de la región 2q35-q37.

**Material y método:** Estudiamos a una familia catalogada de HBF y se incluyeron a 19 miembros (11 hombres y 8 mujeres). Se realizó a cada uno de ellos estudio de función renal, sedimento urinario, evaluación auditiva y oftalmológica. Sólo se realizó biopsia renal en aquellos con indicación. La codificación de las secuencias de los genes COL4A3 y COL4A4 fue analizada por PCR y por secuenciación directa.

**Resultados:** El 100% de los pacientes presentaban hematuria y el 61.5% proteinuria. El 30.7% de los casos con proteinuria presentaban síndrome nefrótico, y de éstos el 76% insuficiencia renal. El 46.1% presentaban pérdida auditiva, y ningún paciente alteraciones oculares. En 2 de los miembros se realizó biopsia renal, mostrando una MBG adelgazada. El estudio genético reveló la presencia de una mutación heterogénea, c.998G>A en el exón 18 de la p.G333E del gen COL4A3, no descrita previamente en la literatura. El análisis del patrón de herencia fue HAD.

**Conclusiones:** Presentamos en nuestro estudio una familia catalogada inicialmente como HBF, la evolución posterior a insuficiencia renal de algunos miembros va a favor de que se trate de un SA con HAD. Además, detectamos una mutación en el gen COL4A3 (c.998G>A; p.G.333E), no descrita previamente. La identificación de nuevas mutaciones y su correlación con las manifestaciones clínicas son importantes para ofrecer un diagnóstico y consejo genético adecuado.

## 10 ACCIÓN ESTRATÉGICA EN GALICIA PARA LA POLIQUISTOSIS RENAL: ESTABLECIMIENTO DE UN REGISTRO GALLEGO Y DIAGNÓSTICO GENÉTICO COMO UNA MEDIDA DE PREVENCIÓN COSTE/EFICIENTE

L. BESADA CERECEDO<sup>1</sup>, P. REGUEIRO CASUSO<sup>1</sup>, A. BARCIA DE LA IGLESIA<sup>1</sup>, N. ARHDA<sup>2</sup>, F. ARROJO<sup>3</sup>, C. VÁZQUEZ<sup>4</sup>, A. CARRACEDO<sup>5</sup>, M. GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>6</sup>, A. DE PACIENTES ANASBABI CILIOPATÍAS<sup>7</sup>, I. DEL CONSORCIO GAL-CIST<sup>8</sup>

<sup>1</sup>LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>2</sup>NEFROLOGÍA. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>3</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL ARQUITECTO MARCIDE (FERROL), <sup>4</sup>NEFROLOGÍA. HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>5</sup>FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA. FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>6</sup>ASOCIACIÓN DE PACIENTES ANASBABI CILIOPATÍAS. ASOCIACIÓN DE PACIENTES ANASBABI CILIOPATÍAS (SANTIAGO DE COMPOSTELA), <sup>7</sup>INVESTIGADORES DEL CONSORCIO GAL-CIST. INVESTIGADORES DEL CONSORCIO GAL-CIST (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

**Introducción:** Las pruebas genéticas tienen el beneficio de asegurar un diagnóstico certero y adelantarse a la enfermedad pero, la limitación de un alto coste como para ser utilizadas en rutina diagnóstica.

**Material y métodos:** Este proyecto establece un modelo de estrategia poblacional (estudio genético en cascada) coordinada entre los hospitales de referencia de todas las áreas sanitarias de Galicia, que facilite la identificación, registro y diagnóstico genético de las familias con enfermedad poliquística renal, y que implique, un mejor conocimiento de la enfermedad y un mejor seguimiento de nuestros pacientes, todo ello, con un coste reducido

**Resultados:** 245 familias con sus respectivos 3820 individuos afectados han sido ya caracterizados. Tras la secuenciación completa de al menos un individuo afecto de cada familia, y el establecimiento de un estudio genético en cascada, podemos decir que tenemos caracterizadas genéticamente el 83% de las familias gallegas. Mediante el estudio de estas familias y el reanálisis de todas las variantes génicas conocidas hasta el momento, hemos establecido una base de datos de variantes génicas de PKD reclasificando un total de 3270 variantes en cuatro tipos: 1174 clase I (definitivamente patogénicas), 141 clase II (probablemente patogénicas), 1604 clase III (de significado incierto) y 351 SNPs (no asociados a patogénicidad).

**Conclusiones:** A través de este proyecto se ha conseguido aunar los esfuerzos de los especialistas de los servicios de nefrología de las distintas áreas asistenciales de Galicia, laboratorios de referencia en diagnóstico, registro de bases de datos de patologías hereditarias e implicación de los Sistemas Autonómicos de Salud que canalicen una acción estratégica conjunta en salud con el objetivo del diagnóstico completo de las familias PKD gallegas antes del 2019.

## 11 MEDIACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR A TRAVÉS DE ILK Y SU CONEXIÓN CON NFATC3 COMO REGULADOR TRANSCRIPCIONAL DE AQP2 EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

M. HATEM-VAQUERO<sup>1</sup>, M. GRIERA<sup>1</sup>, A. GARCÍA-JEREZ<sup>1</sup>, A. LUENGO<sup>1</sup>, W. GIEMAKOWSKA<sup>2</sup>, L. GONZÁLEZ-BOSC<sup>3</sup>, L. CALLEROS<sup>4</sup>, D. RODRÍGUEZ-PUYOL<sup>5</sup>, M. RODRÍGUEZ-PUYOL<sup>5</sup>, S. DE FRUTOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BIOLOGÍA DE SISTEMAS. UAH-FRIAT-IRSN-REDINREN-ISCIH (MADRID); <sup>2</sup>BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGICA. UNIVERSIDAD DE NUEVO MÉXICO (ALBUQUERQUE), <sup>3</sup>NEFROLOGÍA. HUPA-FRIAT-IRSN-REDINREN-ISCIH (MADRID)

**Introducción:** Dos de las alteraciones presentes durante la enfermedad renal crónica (ERC) son la diabetes insípida nefrogénica (DIN) y la fibrosis intersticial. La matriz extracelular modula a la célula mediante proteínas del adhesoma como la quinaasa ligada a integrinas (ILK). La deleción parcial de ILK en ratones adultos (cKD-ILK) disminuye los niveles totales de la proteína Acuaporina 2 (AQP2) originando un cuadro compatible con la DIN (Cano-Peñalver et al. FASEB.J 2014). La expresión de AQP2 está regulada por los factores nucleares NFATc, cuya fosforilación y salida del núcleo es mediada por la quinaasa glicógeno sintasa 3-beta (GSK3beta), un sustrato directo de AKT e ILK. Aquí estudiamos en un modelo murino de ERC la expresión de AQP2 y de las proteínas que conforman el eje ILK-AKT-GSK-NFATc3 durante su regulación.

**Material y métodos:** Los ratones fueron sometidos a un modelo de ERC mediante una dieta suplementada con adenina durante 6 semanas (A-WT) o alimentados con dieta convencional (WT). Se cuantificaron los niveles totales de ILK, AKT, GSK y AQP2 mediante RT-qPCR e inmunoblot de la médula renal. Se analizó la fibrosis medular a través de tinciones histológicas y la determinación de las proteínas fibróticas colágeno I y fibronectina por RT-qPCR e inmunoblot. En la médula renal de ratones KO para la isoforma NFATc3 (NFATc3-KO) se obtuvieron los niveles basales de AQP2 respecto a sus controles (NFATc3-WT) y en células tubulares (mIMCD3) con ILK deleciónada mediante RNAs interferentes (SiRNA-ILK) se midió la actividad transcripcional de NFATc3 en relación a sus controles.

**Resultados:** Los ratones A-WT mostraron mayores signos de fibrosis en médula que los WT. Comparado con WT, la expresión de AQP2 disminuyó en A-WT en contraste con el incremento en los niveles de las proteínas ILK, AKT y GSK3beta. La actividad transcripcional de NFATc3 en células SiRNA-ILK fue menor que en sus controles y los niveles basales de AQP2 en las médulas renales de NFATc3-KO fueron menores en comparación con NFATc3-WT

**Conclusión:** Durante la fibrosis medular en nuestro modelo de ERC se produce una disminución de la expresión de AQP2 regulada por ILK, muy posiblemente debido a una disminución de la actividad de NFATc3 durante la transcripción. Sin embargo, el mecanismo compensatorio que provoca el aumento de ILK y de proteínas reguladoras de NFATc3 como la GSK3beta no es suficiente para evitar la aparición de DIN.