

83

NEW THERAPEUTIC APPROACH BASED IN INHIBITION OF METALLOPROTEASES IN POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

A. CORDIDO¹, C. DÍAZ², A. CARRACEDO³, MA. GARCÍA-GONZÁLEZ³

¹LABORATORIO DE GENÉTICA E BIOLoxÍA DE DESENVOLVIMIENTO DAS ENFERMEDADES RENAI. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE SANTIAGO (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), ²SERVICIO DE NEFROLOXÍA. COMPLEXO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (CHUS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), ³GRUPO DE MEDICINA XENOMICA. FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENOMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA)

Introducción: Polycystic Kidney Disease (PKD) is a group of genetic disorders characterized by the presence by multiple cysts in the renal parenchyma, as well as others extrarenal manifestations such as hepatic cysts (Polycystic Liver Disease or PLD). Mutations in genes PKD1 and PKD2 caused the dominant form called ADPKD, by other band mutation in PKHD1 caused the recessive form or ARPKD.

To this day, it have been reported several altered molecular pathways in the PKD but the key mechanism of cystogenesis (process by which cysts are formed) remains unmask. In that studio, with the use of animal models we reported a study about metalloproteases or MMPs of Extracellular Matrix (ECM) in the renal and hepatic cystogenesis and its therapeutic potential.

Material and methods: We use the rodent models Pkd1cond/cond TamCre y Pkdh1del3-4/del3-4, models of ADPKD and ARPKD respectively, as well as for the study at molecular level of the role of the MMPs, as models for the testing of a new therapeutic approach, called MTT. Furthermore, the understanding of the disease has been addressed by histological (immunofluorescent and immunohistochemical), pathophysiological (renal and/or hepatic function) and transcriptomic (RT-qPCR) techniques.

Results: We have realized a complete study of the MMPs present in kidney and liver of our animal models, as well as have studied different pro-fibrotic and inflammatory markers related to the enzymatic activity of MMPs. Our study indicates that in renal and hepatic cystogenesis the levels of these markers and genetic expression of MMPs are increased, and therefore that this molecular pathway may be a possibility of therapeutic approach.

MTT is an inhibitor of the extracellular matrix metalloproteinases that our group wanted to test as a possible therapy for ADPKD and ARPKD. We have seen that MTT inhibits the gene expression of several MMPs, reduces renal and hepatic fibrosis, improves renal function and inhibits renal and hepatic cystogenesis.

Conclusions: In this work, we evaluate the role of matrix metalloproteases (MMPs) in the cystogenesis of PKD. In addition, the MMP inhibitor MTT was examined in two different rodent models reducing hepatic and renal cystogenesis, and offering a new possible approach.

84

ANÁLISIS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN PACIENTES CON SOSPECHA DE SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO

J. NIETO¹, B. GONZÁLEZ², A. GONZÁLEZ SALINAS³, C. CUELLAR PEREZ-AVILA³, FA. GONZÁLEZ FERNÁNDEZ¹, A. VILLEGAS¹, R. MARTÍNEZ¹, R. TRELLES¹, M. IBARRA¹, P. ROPERO¹

¹HEMATOLOGÍA. HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS (MADRID), ²HEMATOLOGÍA. HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS (MADRID), ³HEMATOLOGÍA. HOSPITAL 12 OCTUBRE (MADRID)

Introducción: La Microangiopatía Trombótica (MAT) se caracteriza por anemia mecánica, trombopenia y daño orgánico, con la presencia de trombos en la microcirculación y puede estar causada por distintos procesos patológicos. Hoy en día el diagnóstico de Síndrome Hemolítico Urémico atípico (SHUa) es clínico y basado en la exclusión de otras causas de MAT. Alrededor del 50-60% de los pacientes con SHUa presentan alteraciones en la regulación de la vía alternativa del complemento. Los haplotipos de riesgo aumentan la penetrancia de la enfermedad en portadores de estas alteraciones, pero su papel en ausencia de mutaciones no está claro. Distintos casos publicados muestran que los pacientes con MAT pero sin diagnóstico de SHUa por exclusión pueden mostrar alteraciones del complemento, aunque existen muy pocos datos sobre como de común es esta situación.

Objetivo: Comparar la frecuencia de distintas alteraciones del complemento (mutaciones, autoanticuerpos y haplotipos de riesgo entre: I) Pacientes con SHUa por exclusión. II) Pacientes con sospecha de SHUa pero que presentan también otra posible causa de MAT.

Métodos: Hemos recibido muestras de pacientes con sospecha de SHUa para realizar estudios genéticos e inmunológicos del complemento (n=39) en pacientes con un ADAMTS13 >10% y sin SHU típico. Los pacientes se han dividido en 2 grupos, aquellos que tienen diagnóstico de SHUa por exclusión (grupo I, n=17) y aquellos que no (grupo II, n=22). Se han analizado por secuenciación masiva 14 genes del complemento y la coagulación. El screening de deleciones en el locus CFH se ha realizado por MLPA y el de anticuerpos IgG antifactor H se ha hecho por ELISA.

Resultados: El 59% de los pacientes del grupo I tenía alteraciones (8 por mutaciones y 2 por anticuerpos). Hemos encontrado una tendencia a la significación estadística entre los pacientes con SHUa por exclusión y los controles tanto en el número total de haplotipos de riesgo (1,65 vs 1,14; p=0.065) como en la frecuencia del haplotipo de riesgo en MCP (47.1% vs 32.5%; p=0.08).

Por otro lado, solo 1 de los 22 pacientes del grupo II ha mostrado alteraciones (paciente con MAT asociada a HELLP no resuelto tras la inducción del parto). No hemos encontrado diferencias entre este grupo y los controles en relación a los haplotipos de riesgo.

Discusión: Los resultados en esta cohorte sugieren que es muy infrecuente que la MAT se deba a la pérdida de la regulación del complemento cuando no se alcanza un diagnóstico de SHUa por exclusión.

85

EXPRESIÓN DIFERENCIAL ADQUIRIDA EN EL FRACASO RENAL AGUDO DE GENES CAUSANTES DE NEFROPATÍAS HEREDITARIAS

SM. CARRIAZO JULIO¹, MV. PÉREZ GÓMEZ¹, A. ORTIZ¹, B. FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ¹, MD. SÁNCHEZ-NIÑO¹

¹NEFROLOGÍA. FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (MADRID/ESPAÑA)

Introducción: La secuenciación de genoma está surgiendo como primera línea diagnóstica en algunas disciplinas clínicas. Sin embargo, la interpretación de los resultados aún representa un reto para el clínico. Aun así, permite identificar genes relacionados con enfermedades Hereditarias, y servir de base para el estudio de su posible implicación en nefropatías adquiridas. Hipótesis: los genes causantes de Nefropatía Hereditaria, podrían contribuir a la patogenia de nefropatías adquiridas. Objetivo: Estudiar la expresión de genes responsables de nefropatías hereditarias en nefropatías adquiridas experimentales y humanas para priorizar genes expresados diferencialmente para ulteriores estudios de su función en nefropatías experimentales.

Materiales y Métodos: En un modelo de fracaso renal agudo (FRA) murino, inducido por ácido fólico, analizamos el transcriptoma renal a las 24 horas del daño. En esta base de datos transcriptómica estudiamos si 625 genes causantes de Nefropatías hereditarias estaban expresados diferencialmente. Luego evaluamos la correlación de los genes expresados diferencialmente con la función renal en bases de datos transcriptómicas de nefropatías humanas, utilizando Nephroseq, para identificar aquellos relevantes para nefropatías adquiridas humanas y experimentales. Se hizo un análisis de enriquecimiento funcional, mediante el programa Gorilla y se validaron algunos genes por RT-qPCR.

Resultados: Durante el FRA, la expresión renal de 3906/25051 (15,59%) genes aumentó y la de 3537 (14,11%) disminuyó de forma significativa (p<0.05). El porcentaje de genes expresados diferencialmente fue mayor entre los 625 genes responsables de nefropatías familiares, de los cuales identificamos 615 en el modelo murino: en 105/615 (17.07%) aumentó la expresión y en 155 (25.20%) disminuyó (p<0.05 vs la distribución del total de los 25051 genes). De los 260 genes expresados diferencialmente, 241 (92.69%) se asociaban significativamente con el filtrado glomerular en nefropatías humanas. Los procesos GO más enriquecidos fueron "complement activation", "protein activation cascade", "activation of immune response" y "RNA processing". Hemos validado la expresión diferencial en el FRA de 7 de éstos genes (SLC34A1, SLC34A3, Klotho, MAGED2, NLRP3, FN1, COL4A1), lo que apoya la relevancia de los resultados transcriptómicos.

Conclusión: Los genes causantes de nefropatías familiares están sobrepresados entre los genes expresados diferencialmente en nefropatías adquiridas, sugiriendo que podrían jugar un papel en estas últimas, a través de la regulación del procesamiento de RNA activación de proteínas o regulación de la respuesta inmune y del complemento. El análisis de la función en las nefropatías adquiridas de genes causantes de nefropatías familiares puede identificar nuevas dianas terapéuticas en el daño renal.

86

TOLVAPTÁN UN TRATAMIENTO EFICAZ Y REVOLUCIONARIO EN LOS PACIENTES CON POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE: NUESTRA EXPERIENCIA AL AÑO

M. SÁNCHEZ-JAUREGUI¹, E. MONFÁ¹, JA. MENACHO MIGUEL¹, A. MARTÍN ARRIBAS¹, T. GARCÍA GARRIDO¹, RM. GUTIERREZ¹, C. BARNES¹, M. PRIETO¹, P. FRAILE GÓMEZ¹

¹NEFROLOGÍA. COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA (SALAMANCA (ESPAÑA)),²NEFROLOGÍA. COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE LEÓN (LEÓN (ESPAÑA))

Introducción: La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es la cuarta causa más prevalente de enfermedad renal crónica (ERC) terminal en adultos. En el estudio TEMPO, que evaluaba eficacia y seguridad del tolvaptán en pacientes con PQRAD, tolvaptán indujo acuresis, reducciones iniciales en el filtrado glomerular (FG) y menor incremento anual del volumen renal total (VRT) frente al grupo control (2.8vs5.5%). El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia del tolvaptán tras 12 meses de tratamiento.

Material y métodos: Se diseñó un estudio descriptivo, observacional y transversal. Se incluyeron pacientes con ERC estadio 1-3a secundario a PQRAD con factores de rápida progresión, que iniciaron tratamiento con 45/15 mg de tolvaptán, y según tolerabilidad, incrementamos dosis hasta 90/30 mg. Los controles se realizaron basalmente, semanalmente hasta alcanzar dosis máxima tolerada y bimensualmente hasta completar 12 meses. Se realizaron RMN basales y a los doce meses. Se registraron variables clínicas, analíticas, tolerabilidad y efectos adversos atribuibles al tolvaptán. Se utilizó el test de Wilcoxon para el análisis de variables no paramétricas. Se consideró significación estadística si p<0.05.

Resultados: Iniciaron tratamiento con tolvaptán 20 pacientes con PQRAD. Su edad media fue 40.55±8.4 años, 50% varones y FG 71.32±22.26 mL/min. Se constataron eventos adversos, con suspensión del tratamiento, en el 10%: uno por reacción alérgica y otro por hepatotoxicidad. La tolerabilidad fue buena en el 75%, el 10% no lo toleraron por poliuria y lo suspendieron, y fue regular en el 15%, reduciendo la dosis el 10%.

En los pacientes tratados con tolvaptán existió una disminución significativa de la osmolaridad urinaria e incremento de diuresis, ácido úrico, y aclaramiento agua libre. El filtrado glomerular, la presión arterial media, el aclaramiento osmolar, cociente albúmina/cr y proteína/cr no se modificó de forma significativa. El VRT basal fue 1392.29±643.17 mL/1.73m² y al año 1366.74±560.96 mL/1.73m² (p>0.05). El 25% de los pacientes tratados refirieron disminución del dolor lumbar.

Conclusiones:

- Tolvaptán es una medicación segura, con aceptable tolerancia, lo que permitió alcanzar dosis plenas en la mayoría de nuestros pacientes, y baja prevalencia de eventos adversos graves.
- Creemos que tolvaptán es una herramienta útil y revolucionaria en el tratamiento de la PQRAD. Su eficacia quedó demostrada por la estabilización del FG, del tamaño renal, descenso del dolor lumbar y de la osmolaridad urinaria.
- A pesar de que tolvaptán sólo ha demostrado frenar el crecimiento renal, en nuestra población el VRT disminuyó, lo que podría retrasar aún más de lo descrito la evolución a ERC terminal.

87 LAS DOS CARAS DE LA DISMINUCIÓN DE ILK RENAL: LA VÍA NEFRO-PROTECTORA DE GMPC ES INDEPENDIENTE DE LA DIABETES INSÍPIDA NEFROGÉNICA, AMBAS CONDICIONES MEDIADAS POR ILK.

M. GRIERA¹, D. GARCÍA-AYUSO¹, B. GARCÍA-CARRASCO¹, S. CAMPILLO¹, L. BOHÓRQUEZ¹, M. BARRIO-NUÑO GONZÁLEZ¹, L. CALLEROS¹, D. RODRÍGUEZ-PUYOL¹, M. RODRÍGUEZ-PUYOL¹, S. DE FRUTOS²,
¹DEPARTMENT OF SYSTEMS BIOLOGY, PHYSIOLOGY UNIT, UNIVERSIDAD DE ALCALÁ/ INSTITUTO RAMON Y CAJAL DE INVESTIGACIÓN SANITARIA (IRYCIS), FUNDACIÓN RENAL IÑIGO ÁLVAREZ DE TOLEDO (FRIAT) AND REDINREN FROM INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, MADRID, SPAIN. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (ALCALA DE HENARES/SPAIN), ²BIOMEDICAL RESEARCH FOUNDATION AND NEPHROLOGY DEPARTMENT, HOSPITAL PRÍNCIPE DE ASTURIAS, ALCALÁ DE HENARES, MADRID, SPAIN. HOSPITAL UNIVERSITARIO PRÍNCIPE DE ASTURIAS (ALCALA DE HENARES/SPAIN), ³BIOMEDICAL RESEARCH FOUNDATION AND NEPHROLOGY DEPARTMENT, HOSPITAL PRÍNCIPE DE ASTURIAS / INSTITUTO RAMON Y CAJAL DE INVESTIGACIÓN SANITARIA (IRYCIS), FUNDACIÓN RENAL IÑIGO ÁLVAREZ DE TOLEDO (FRIAT) AND REDINREN FROM INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, MADRID, SPAIN. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (ALCALA DE HENARES/SPAIN), ⁴DEPARTMENT OF SYSTEMS BIOLOGY, PHYSIOLOGY UNIT, UNIVERSIDAD DE ALCALÁ/ INSTITUTO RAMON Y CAJAL DE INVESTIGACIÓN SANITARIA (IRYCIS), FUNDACIÓN RENAL IÑIGO ÁLVAREZ DE TOLEDO (FRIAT) AND REDINREN FROM INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, MADRID, SPAIN. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (ALCALA DE HENARES/SPAIN)

Introducción: Diferentes mecanismos son responsables de regular transcripcional y post-translacionalmente al canal de agua tubular acuaporina 2 (AQP2), facilitando su presencia y traslocación en la membrana apical de las células principales para concentrar la orina. Estas vías son dependientes de AMPc y alternativamente del eje óxido nítrico (NO)/GMPC. Nosotros hemos publicado que la defeción transgénica de la proteína del adhesoma ILK en la etapa adulta en ratones (cKD-ILK) produce poliuria basal, debido a la disminución en la expresión y presencia en membrana de AQP2 de manera independiente al AMPc, originando un cuadro compatible con diabetes insípida nefrogénica (DIN) (Cano- Peñalver JL et al. FASEB J. 2014; Mamuya FA et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2016). En modelos de daño renal crónico (ERC) o agudo, hemos publicado que los riñones de cKD-ILK se encuentran más protegidos debido al aumento de GMPC y su capacidad nefro-protectora (Cano- Peñalver JL et al. Mol Med. 2016; de Frutos S et al. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019). Teniendo en cuenta que ERC presenta síntomas tempranos de DIN, aquí demostramos, en un contexto basal o de ERC, que la vía de regulación de la AQP2 por ILK es independiente de la mediación del GMPC, explicando la co-existencia en riñones de cKD-ILK de aumento de GMPC y disminución de AQP2.

Materiales y métodos: 1) cKD-ILK y controles (WT) basalmente fueron tratados oralmente con un donador de NO (IDN, 300mg/Kg/día) o vehículo durante 24 horas. Se determinó el volumen de orina como medida de funcionalidad tubular. 2) cKD-ILK y WT fueron sometidos durante 6 semanas a condiciones basales (dieta estándar) o a una dieta suplementada con 0.2% de adenina (A), inductora de ERC. Se determinó el volumen de orina y los niveles de AQP2 total en extractos proteicos medulares. 3) Medulas frescas de WT y cKD-ILK tratadas ex vivo 30 minutos con un donador de NO (SNP, 1 µM) o de GMPC (8Br-cGMP, 0.2 mM) se fijaron y se cuantificó la AQP2 en membrana apical de los túbulos por inmunohistoquímica.

Resultados: Activar el eje NO/GMPC in vivo no llegó a compensar la DIN basal presente en cKD-ILK. Animales sometidos a ERC mostraron poliuria exacerbada y disminución de los niveles tisulares de AQP2, sin diferencias claras entre A-cKD-ILK y A-WT. Estimular la vía NO/GMPC en los túbulos de cKD-ILK no mejoró la presencia apical de AQP2 comparado con los WT.

Conclusión: ILK regula a la AQP2, tanto en un contexto basal como patológico (ERC) mediante un mecanismo independiente de GMPC.

88 CYSTANALYSER: A SOFTWARE TOOL FOR THE AUTOMATIC DETECTION AND QUANTIFICATION OF CYSTS IN POLYCYSTIC KIDNEY AND LIVER DISEASE

A. CORDIDO¹, E. CERNADAS², M. FERNÁNDEZ-DELGADO², MA. GARCÍA-GONZÁLEZ³
¹LABORATORIO DE XENÉTICA E BIOLOGÍA DE DESENVOLVIMENTO DAS ENFERMIDADES RENAIS. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE SANTIAGO (IDIS) (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), ²CENTRO SINGULAR DE INVESTIGACIÓN EN TECNOLOGÍAS INTELIXENTES DA USC (CITIUS). UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (USC) (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), ³GRUPO DE MEDICINA XENÓMICA. FUNDACIÓN PÚBLICA GALEGA DE MEDICINA XENOMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA)

Introduction: The Polycystic Kidney Disease (PKD) is characterized by progressive renal cyst development and other extrarenal manifestation as liver cysts (Polycystic Liver Disease or PLD). The principal biomarker of the disease progression is the total volume of kidney and liver, so the number and the area occupied by cysts are significant. Animal experimentation is used to study new therapeutic approaches or molecular mechanisms as genetic interaction. The parameter Cystic Index is used to quantify the severity of the disease. Biomedical researchers use, majority, the software tool ImageJ to estimate the cystic index counting the cystic areas obtained when the image is thresholded. This estimation is poorly accurate because many white regions in the image are wrongly counted as cystic area, without necessarily being cysts.

Material and methods: So, we propose a software tool, called CystAnalyser, to quantify histological images of cystic kidney and liver. It combines the automatic processing of the image with a friendly Graphical User Interface (GUI) to review the process before quantification. CystAnalyser provides the Cystic Index, the number of cysts and a profile of cysts according to their size, and it allows to review or share the analysis every time.

Results: CystAnalyser was used in a real environment during one year, analysing nearly 800 images belonging to cystic kidney and liver. The difference of Cystic Index calculated automatically by CystAnalyser or after user supervision is not significant, except to mild cystic liver images. For the number of cysts, sensitivities range from 76% to 93%, depending on the type of organ and cystic degree. The positive predictivity range from 63% to 89%. Nevertheless, the cysts diameter profiles provided by CystAnalyser working automatically or after user supervision are very close. CystAnalyser overcomes ImageJ to calculate cystic index, except to severely cystic organs, for which the difference is not statistically significant. The subjective user perception of CystAnalyser was evaluated using the System Usability Scale (SUS), achieving a score of 80.75, which means that the system is from good to excellent.

Conclusions: From all this analysis, we conclude that CystAnalyser is a software tool trustworthy to work on-line in the biomedical labs.

89 DIFFERENTIALLY METHYLATED CELL-FREE DNA MONITORING IN PANCREAS TRANSPLANT RECIPIENTS WITH FUNCTIONING GRAFT

MJ. RAMÍREZ-BAJO¹, J. ROVIRA¹, E. BAÑÓN-MANEUS¹, N. HIERRO¹, MA. GARCÍA-CRIADO², J. FERRELL³, E. ESMATJES⁴, JM. CAMPISTOL⁵, F. DIEKMANN⁶, P. VENTURA-AGUIAR⁶

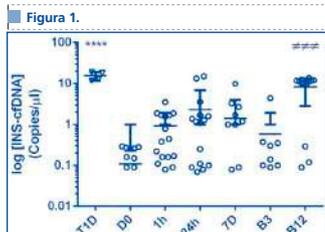
¹LABORATORIO EXPERIMENTAL DE NEFROLOGÍA I TRASPLANTAMIENTO RENAL (LENIT). IDIBAPS (ESPAÑA), ²SERVICIO DE RADIOLOGÍA. HOSPITAL CLÍNICO BARCELONA (ESPAÑA), ³UNIDAD DE CIRUGÍA HEPATOBILIOPANCREÁTICA. HOSPITAL CLÍNICO BARCELONA (ESPAÑA), ⁴SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA. HOSPITAL CLÍNICO BARCELONA (ESPAÑA), ⁵SERVICIO DE NEFROLOGÍA Y TRASPLANTE RENAL. HOSPITAL CLÍNICO BARCELONA (ESPAÑA)

Introduction: Autoimmune Type 1 diabetes (T1D) is characterized by pancreatic βcells destruction. Pancreas and islet transplantation are an alternative therapeutic approach to revert this situation. Despite of use immunosuppressive therapy, allograft rejection continues being a risk. Cell-free DNA (cfDNA) poses as an attractive biomarker in solid organ transplantation. In T1D patients differentially methylated DNA encoding preproinsulin (INS) in the plasma correlates with β-cell death. In islet, quantification unmethylated-INS (INS-cfDNA) levels in plasma at 24h correlate with graft outcomes. We aimed at evaluating the dynamic of INS-cfDNA in pancreas transplant recipients with a functioning graft.

Methods: We conducted a prospective longitudinal study including all pancreas transplant recipients from our center from January 2017 to December 2018. Induction immunosuppression protocol in all patients included with thymoglobulin, tacrolimus, mycophenolate, and prednisone. Plasma samples were collected in PAXgene tubes before transplant (D0), 1h, 24h and 7 days (D7) post-transplant and at the moment of protocol biopsy (3 weeks and 12 months). Patients with biopsy-proven acute rejection were excluded from the analysis. cfDNA concentration was determined by Qubit dsDNA HS Assay Kit. INS-cfDNA was converted with a bisulfite and quantification performed by multiplex digital droplet PCR (ddPCR).

Results: A total of 22 of patients were included in the analysis. Total cfDNA levels increased significantly 1hour post-reperfusion compared to baseline (D0). Afterwards, the evolution of the cfDNA concentration over time reflected a progressive decrease until B3, and an increment at B12 (D0 (3,72±3,67), 1h (11,28±10,28), 24h (5,94±5,18), D7 (5,74±3,90), B3 (3,98±3,44) and B12 (7,04±2,29)). In de novo T1D patients INS-cfDNA was significantly increased compared to baseline (D0) of patients with long-standing T1D (15,63±3,78 vs 0,10±0,12; p<0.01), in accordance to previously reported studies using INS-cfDNA. On longitudinal analysis, there was a tendency towards an increment in cfDNA-INS at 1h (0,93±1) and 24h (2,30±4,51) (p>0.05). Interestingly, at B12 there was a significant increase in INS-cfDNA (8,19±5,39) compared to all previous determinations (p<0.001).

Conclusions: We describe a preliminary longitudinal analysis of the dynamic of circulating INS-cfDNA in a cohort of pancreas transplant recipients. The correlation with outcomes should be addressed in a larger cohort to evaluate its ability as a biomarker to predict graft function, acute rejection, or diabetes relapse.



90 DIFERENTE PENETRANCIA DE SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO (SHUA) EN LOS MIEMBROS DE UNA FAMILIA CON MUTACIÓN ASOCIADA EN MCP Y CFH

S. PIQUERAS SANCHEZ¹, ML. ILLESCAS FERNÁNDEZ-BERMEJO¹, E. LÓPEZ RUBIO¹, FJ. CENTELLAS PÉREZ¹, C. MARTÍNEZ ANTONILOS¹, PA. SARDUY CORONADO¹, A. PÉREZ RODRÍGUEZ², C. CAMPAYO ESCOLANO³, C. GÓMEZ ROLDAN¹, M. LÓPEZ TRASCASA³

¹NEFROLOGÍA. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE (ALBACETE), ²MEDICINA INTERNA. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE (ALBACETE), ³UNIDAD DE INMUNOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (MADRID)

Introduction: Desde la identificación de genes de susceptibilidad para desarrollar SHUA (Warwicker, 1998), se ha constatado que la etiología viene de la disregulación del complemento, siendo de causa genética o adquirida. Existen más de 400 mutaciones recogidas (www.complement-db.org), algunas suponen la pérdida de función (CFH, CFI y MCP), otras la ganancia (CFB y C3), además de variantes en trombomodulina. La herencia es autosómica dominante o recesiva, pero con penetrancia incompleta.

Materiales y método: Presentamos el perfil fenotípico y genético de una familia afectada por SHUA.

Resultados: En una familia tres varones han presentado clínica compatible con SHUA (Fig.1). Sólo uno (Hermano 3) comenzó durante la infancia, presentándose con poca recuperación. Siendo adulto las recurrencias mostraron alteraciones analíticas graves que se recuperaron sin ningún tratamiento específico. Los otros hermanos han tenido un único episodio. Se realiza estudio genético de los tres, identificando: Gen MCP: mutación en heterocigosis (c.286+1G>C) descrita como patogénica. Gen CFH: dos cambios no descritos previamente. En el exón 21 un cambio en heterocigosis (c.3160G>A; p.Val11054Ile) catalogado como “probablemente dañino” con estudio de predicción de efectos funcionales (PolyPhen2). En el intrón 19 (dominio SCR16) otro cambio en heterocigosis (c.2957-1G>A) que podría afectar al procesamiento del ARNm produciendo una proteína aberrante. Posteriormente se estudia a los hijos (19, 21 años) asintomáticos de uno de ellos (Hermano 4), siendo portadores de riesgo en heterocigosis de la mutación de MCP.

Figura 1.

Individual	Genotype	Clinical Notes
I-1 (Hermano 1)	MCP c.286+1G>C	SHUA en infancia, buena recuperación
I-2 (Hermano 2)	MCP c.286+1G>C	SHUA en infancia, buena recuperación
I-3 (Hermano 3)	MCP c.286+1G>C	SHUA en infancia, poca recuperación
II-1 (Hijo 1)	MCP c.286+1G>C	SHUA en adulto, grave
II-2 (Hija 2)	MCP c.286+1G>C	SHUA en adulto, grave
II-3 (Hijo 3)	MCP c.286+1G>C	SHUA en adulto, grave
II-4 (Hija 4)	MCP c.286+1G>C	SHUA en adulto, grave
II-5 (Hijo 5)	MCP c.286+1G>C	SHUA en adulto, grave

91 MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN UNIDA A GLUCOSAMINOGLICANOS Y SUS APLICACIONES EN ENFERMEDAD RENAL

M. VIZOSO GONZÁLEZ¹, V. ÁLVAREZ GONZÁLEZ², S. BRAVO LÓPEZ³, O. LAMAS GONZÁLEZ¹, C. COLLÓN MEJERAS⁴, MA. GARCÍA GONZÁLEZ⁴

¹LABORATORIO NEFROLOGÍA. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE SANTIAGO (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ²LABORATORIO METABOLOPATÍAS. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE SANTIAGO (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ³PROTEÓMICA. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE SANTIAGO (SANTIAGO DE COMPOSTELA), ⁴LABORATORIO NEFROLOGÍA. FUNDACIÓN GALEGA DE MEDICINA XENÓMICA (SANTIAGO DE COMPOSTELA)

Introducción: Los glucosaminoglicanos (GAG) son grandes polisacáridos no ramificados conformados por secuencias repetidas de disacáridos, donde uno de los componentes siempre es un aminoazúcar y el otro componente es un ácido urónico. Los GAG se encuentran formando parte de proteoglicanos y lípidos y, por motivos funcionales e interacciones mecánicas, aparecen asociados a otras moléculas y orgánulos como el retículo endoplasmático o la membrana celular. Existen enfermedades relacionadas con alteraciones de la glicosilación, de forma congénita las mucopolisacaridosis, y adquirida la enfermedad renal (ER).

Se ha desarrollado un nuevo método (KITGAG) para la separación de los GAG libres y la fracción unida a ellos. Se basa en la propiedad del "azul de dimetilmileno" (DMB), un colorante catiónico, de unir y precipitar específicamente los GAG sulfatados en cualquier tipo de muestra biológica (orina, suero, plasma, tejidos, células, etc.). A partir de la precipitación se pueden identificar patrones o perfiles de proteínas o lípidos, de forma cuantitativa, cualitativa o ambos.

Material y Métodos: Se han recolectado muestras de orina de pacientes con diferentes patologías renales (poliquistosis tipo I y tipo II) y en distintos estadios de la enfermedad renal. Con el uso del KITGAG se ha aislado la fracción unida a GAG y se ha caracterizado por diferentes técnicas, tanto con un abordaje del estudio de proteómica con Western Blot y espectrometría de masas, como de imagen con microscopía electrónica.

Resultados: Se han identificado una serie de marcadores en la orina de sujetos que padecen enfermedad renal que aparecen alterados en comparación al perfil de marcadores de población sana. Así mismo, también se han descubierto diversos complejos formados por vesículas extracelulares (ELVs) y una o más glicoproteínas (uromodulina, albúmina, IgA o IgG) en muestras de orina, que pueden estar modulando el diálogo entre los distintos segmentos de la nefrona que se ven alterados en pacientes renales.

Conclusión: Los resultados del análisis de la fracción unida o asociada a los GAG en muestras de orina sirven para la identificación de nuevos biomarcadores indicadores de pronóstico o diagnóstico tanto de enfermedad renal como de diferentes patologías, o para descubrir o monitorizar el efecto de una terapia. Asimismo se ha descubierto su potencial como método de aislamiento de las EVLs unidas a GAG para su uso en el estudio de nuevas vías de comunicación celular o mecanismos celulares.

92 DATOS CLÍNICOS Y DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PACIENTES AFECTOS DE POLIQUISTOSIS RENAL EN LA EOXI DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ML. BESADA CERECEDO¹, N. ARHDA², A. NARVAEZ BENITEZ², M. PAIS SEIJAS², M. GARCIA MURIAS¹, C. VAZQUEZ GOMEZ², S. PUELLO MARTINEZ², I. ABUWARD ABU SHARK², MA. GARCIA-GONZALEZ², C. DIAZ RODRIGUEZ²

¹LABORATORIO DE GENETICA Y BIOLOGIA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), ²SERVICIO DE NEFROLOGIA. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA), ³FUNDACION PUBLICA GALEGA DE MEDICINA XENOMICA Y LABORATORIO DE GENETICA Y BIOLOGIA DEL DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES RENALES. FUNDACION PUBLICA GALEGA DE MEDICINA XENOMICA E INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (SANTIAGO DE COMPOSTELA/ESPAÑA)

Introducción: La Poliquistosis Renal Autosómica Dominante (PQRAD) es una enfermedad hereditaria y crónica caracterizada por la formación de múltiples quistes que limitan progresivamente la función renal. En 2016 iniciamos la Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal (AEG-PQR), una forma eficaz y coste-efectiva de diagnóstico poblacional para identificar genéticamente a las familias gallegas.

Material y métodos: Desarrollamos paneles para el estudio simultáneo mediante tecnologías de ultrasecuenciación (NGS) de los genes candidatos conocidos. Cada probando se analiza mediante NGS y en el resto de familiares se analiza mediante Sanger la presencia/ausencia de la eventual mutación identificada. Se seleccionó una cohorte a partir de estos individuos, de los cuales recogimos datos clínicos para establecer la correlación genotipo-fenotipo.

Resultados: Caracterizamos fenotípicamente a 200 pacientes seleccionados aleatoriamente (111 mujeres y 89 hombres en un rango de edad entre 11-92 años) pertenecientes a 73 familias. La edad promedio al diagnóstico fue de 36 años, siendo el principal motivo la sospecha familiar (n=132) de los cuales 91 pacientes tenían función renal normal. La hipertensión arterial (HTA) es un hallazgo observado en el 66.5% con edad promedio de detección de 42 años (rango 6-73 años), recibiendo tratamiento farmacológico el 95.5%. Del total de pacientes, 23 iniciaron terapia renal sustitutiva con edad promedio de 53 años. Dentro de las manifestaciones extrarrenales observadas destacan: aneurismas intracraneales (2.5%), hemorragia subaracnoidea (2%), quistes hepáticos (70%), nefrolitiasis (23.5%) e infecciones urinarias (29%). De los pacientes con diagnóstico genético (n=167; 80%) el 56.9% (n=95) portan mutación en el gen PKD1 (de los cuales el 66.3% (n=63) portan mutación de tipo truncante), el 38.3% (n=64) portan mutación en PKD2 y un 4.8% (n=8) fueron negativos. Basándonos en el PROPKD Score el 19% cumplen criterios de rápidos progresadores. Un total de 12 pacientes clasificados como rápidamente progresadores reciben tratamiento con tolvaptan, todos presentaron poliuria, 7 hiperuricemia y ninguno hipernatremia; en 3 se suspendió temporalmente el tolvaptan. La función renal al inicio se corresponde con el estadio G3b en 5, G3a en 4, G4, G2 y G1 en 1 respectivamente.

Conclusiones: PQRAD es la enfermedad renal hereditaria más frecuente. En nuestra cohorte la edad promedio de diagnóstico es de 36 años y se confirma que la presencia de quistes hepáticos es muy frecuente en pacientes poliquísticos (coincidiendo con los datos descritos para la población poliquística española). Por el contrario, la tasa de aneurismas fue menor (2.5% frente al 8-12%) así como la presencia de hipertensión arterial antes de la alteración de la función renal (23.5% frente al 60% descrito para la población con poliquistosis en España).