

Estudio de los polimorfismos de los genes del factor beta-1 de crecimiento transformador, la enzima conversiva de la angiotensina y *Par1/Emk1* como marcadores moleculares para el diagnóstico precoz de la nefropatía crónica del trasplante

M. Hueso-Val

Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Bellvitge L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

Introducción: La nefropatía crónica del trasplante (NCT) es una enfermedad degenerativa caracterizada por el depósito de matriz extracelular. Aunque su patogenia es desconocida, se ha propuesto que en ella participan el factor beta-1 de crecimiento transformador (TGF β_1) y el sistema renina-angiotensina. Además, pueden intervenir otras proteínas relacionadas con la inflamación, como la cinasa Par1/Emk1. Los polimorfismos de estos genes se han asociado con una predisposición a enfermedades caracterizadas por inflamación y fibrosis.

Objetivos: Estudiar la asociación de los polimorfismos del TGF β_1 , la enzima conversiva de la angiotensina (ECA) y *Par1/Emk1* con las lesiones renales, con el fin de identificar marcadores diagnósticos precoces de NCT.

Diseño: Estudio de asociación prospectivo en biopsias renales de protocolo procedentes de pacientes receptores de un trasplante renal.

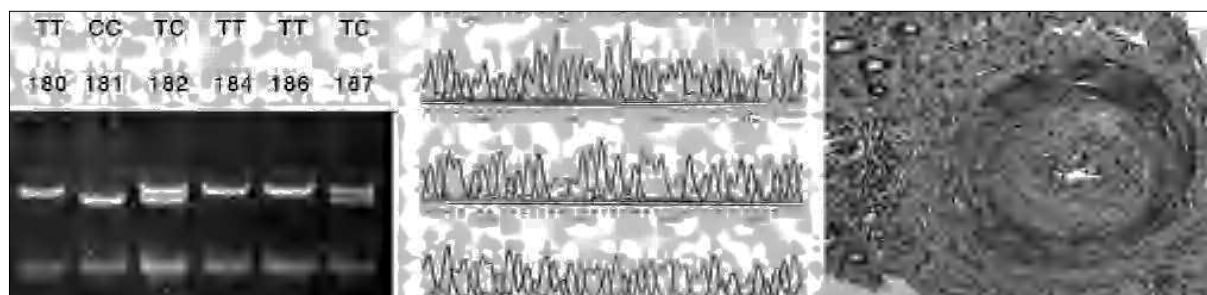
Material y método: Biopsias de protocolo. Población sin insuficiencia renal como control. La histología se evaluó según los criterios de Banff y utilizando técnicas morfométricas. El genotipo del TGF β_1 se determinó con PCR-RFLP. El genotipo de la ECA y el patrón de expresión del Par1/Emk1 se analizaron por PCR. El ARNm y el TGF β_1 intrarrenales y la ECA se cuantificaron mediante PCR a tiempo real, y los valores plasmáticos de TGF β_1 , por ELISA.

Resultados: La prevalencia de NCT es del 38,3 % y su incidencia, del 22,6 %. Las biopsias de protocolo permiten reducir el tamaño muestral en estudios de prevención primaria y de prevención secundaria. El alelo T del codón

10 del TGF β_1 (RR = 6,4; p = 0,02) y el rechazo agudo (RR = 5,6 %; p = 0,01) son predictores independientes de rechazo subclínico. La concentración plasmática de TGF β_1 , pero no el ARNm tisular, está aumentado en los pacientes con rechazo subclínico ($2,59 \pm 0,91$ [n = 22] frente a $2,05 \pm 0,76$ ng/ml [n = 43]; p = 0,01), pero no se encontró asociación entre el alelo T y los valores de TGF β_1 . Por otra parte, el genotipo DD de la ECA era más frecuente en los pacientes trasplantados que en el grupo control (el 43,3 y el 30,1 %; p = 0,026), aunque la prevalencia (DD, 42,7 %; no-DD, 42,2 %) y la incidencia (DD, 24,6 %; no-DD, 29,9 %) de la NCT no fue diferente según el genotipo. Los pacientes con genotipo DD y NCT tenían la peor supervivencia (II-normal, 100 %; ID-normal, 91 %; DD-normal, 84 %; II-NCT, 100 %; ID-NCT, 66 %; DD-NCT, 36 %; p = 0,034) y concentraciones intrarrenales de ARNm de ECA más elevadas que los pacientes con genotipo no-DD y NCT (DD, $-3,36 \pm 2,35$ frente a no-DD, $-5,65 \pm 1,72$ copias de ECA; p = 0,012). Finalmente, se detectaron alteraciones en el patrón de expresión del gen *Par1/Emk1* que consistían en la pérdida de isoformas expresadas constitutivamente y la inclusión de un exón generalmente reprimido que generaba una nueva isoforma (Emk1C). Emk1C se asoció con un aumento en la extensión del infiltrado intersticial ($0,88 \pm 0,33$ en Emk1C⁺ frente a $0,41 \pm 0,50$ en Emk1C⁻; p = 0,01), una mayor tendencia a la fibrosis intersticial ($0,66 \pm 0,70$ en Emk1C⁺ frente a $0,29 \pm 0,52$ en Emk1C⁻, p = 0,09), y una presión arterial media más elevada (110 ± 11 en Emk1C⁺ frente a 99 ± 11 en Emk1C⁻; p = 0,012).

Conclusiones: Las biopsias de protocolo permiten reducir el tamaño de la muestra en estudios clínicos. Los pacientes con el alelo T en el codón 10 del TGF β_1 presentan mayor in-

Correspondencia: Dr. M. Hueso-Val.
Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Bellvitge.
Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.
Correo electrónico: miguel_hueso@yahoo.es



cidencia de rechazo subclínico. Los injertos con NCT y genotipo DD de la ECA presentan mayores cantidades tisulares de ARNm y peor pronóstico. La isoforma C del gen *Par1/Emk1* se asocia a rechazo subclínico, NCT y mayor presión arterial media. Los polimorfismos de genes fundamentales en las vías moleculares responsables de la NCT contribuyen a la variabilidad individual de las lesiones y el pronóstico. Los polimorfismos del $TGF\beta_1$ y la *Par1/Emk1* podrían ser útiles como marcadores moleculares para el diagnóstico precoz de lesiones del aloinjerto renal.

POLYMORPHISMS OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 ($TGF\beta_1$), ACE (ANGIOTENSINE CONVERTING ENZYME) AND *PAR1/EMK1* SUCH AS MOLECULAR MARKERS IN THE DIAGNOSES OF CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY (CAN)

Introduction: $TGF\beta_1$ and renin-angiotensin system have been suggested as the common pathway leading to CAN, an unknown disease characterized by fibrosis and inflammation. Proteins related with inflammation such as *Par1/Emk1*, may have also a role. Polymorphisms in these genes have been associated with diseases characterized by fibrosis and inflammation.

Objective: Association of polymorphisms of $TGF\beta_1$, ACE and *Par1/Emk1* genes with allograft lesions in protocol biopsies.

Design: Prospective associative study in renal protocol biopsies from patients who have received a renal transplant.

Method: Protocol biopsies. $TGF\beta_1$ genotype were analysed by PCR-RFLP. ACE genotype and expression pattern of *Par1/Emk1* were analysed by PCR. Intragraft $TGF\beta_1$ and ACE mRNA levels were measured by real-time PCR and $TGF\beta_1$ plasma levels by ELISA.

Results: CAN prevalence were 38,3 % and CAN incidence 22,6 %. $TGF\beta_1$ allele T at codon 10 and a previous acute rejection episode were independent predictors of subclinical rejection (SCR). $TGF\beta_1$ plasma levels were increased in patients with SCR (2.59 ± 0.91 , $n = 22$ vs. 2.05 ± 0.76 ng/ml, $n = 43$; $p = 0.01$) but not intragraft mRNA $TGF\beta_1$ levels. However, there were no association among allele T and $TGF\beta_1$ levels. Otherwise, ACE-DD genotype were more frequent in transplanted patients than in controls (43,3 % vs 30,1 %, $p = 0.026$), but prevalence or incidence was not different regarding recipient ACE genotype. Furthermore, patients with the ACE-DD genotype and CAN had the poorest graft survival and higher ACE mRNA levels than non-DD and CAN. Finally, it has been detected alterations in the normal pattern of alternative splicing of the *Par1/Emk1* transcript. Expression of Emk1C was associated with an increased interstitial infiltrate, higher interstitial scarring and higher mean arterial pressure.

Conclusions: Protocol biopsies reduces the number of patients required in clinical studies. Allele T at codon 10 of the $TGF\beta_1$ gene was associated with higher incidence of SCR. ACE-DD genotype was not associated with an increased prevalence or incidence of CAN but was associated with higher ACE mRNA levels and poorer graft survival in patients who already display CAN. *Par1/Emk1* could have a role in the development of CAN. Polymorphisms seems to contribute in the individual variability of CAN. Polymorphisms of $TGF\beta_1$ and *Par1/Emk1* may be useful such as molecular marker in the diagnose of CAN.

Esta tesis, dirigida por los doctores Daniel Seván y Josep M. Grau, fue presentada en la Unidad docente de Bellvitge de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona el 3 de marzo de 2006 y recibió la calificación de sobresaliente cum laude por unanimidad.