

## PROGRESION DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSOMICA DOMINANTE

Influencia de polimorfismos de genes de sintasa endotelial del óxido nítrico (ecNOS) y del sistema renina-angiotensina\*

PABLO AZURMENDI<sup>1</sup>, ADRIANA FRAGA<sup>1</sup>, CAROLINA MUCHNIK<sup>1</sup>, MARIA DOS RAMOS FARIAS<sup>1</sup>, FELICITA GALAN<sup>1</sup>, DANISA GUERRA<sup>1</sup>, MARTIN O'FLAHERTY<sup>2</sup>, ELVIRA ARRIZURIETA<sup>1</sup>, RODOLFO MARTIN<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires,<sup>2</sup>Hospital Universitario Austral, Universidad Austral, Pilar

**Resumen** La velocidad de progresión (VdP) de la poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es variable. Estudiamos la asociación de los polimorfismos *AGTM235T* (angiotensinógeno), *AT1A1166C* (*ATR1*) y *ecNOSGlu298Asp* (NO sintasa endotelial) con la VdP en 88 pacientes. VdP fue estimada por  $1/Cr_{cl}$  vs edad. Consideramos edades de  $Cr_{cl}$  2 y 6 mg/dl como comienzo de progresión ( $E_2$ ) y arribo a insuficiencia renal crónica terminal ( $E_6$ ), respectivamente. Los polimorfismos se estudiaron por PCR-RFLP. El grupo en su totalidad presentó VdP (ml/min/año) de  $6.9 \pm 0.5$ ,  $E_2$  y  $E_6$  de  $48.9 \pm 1.3$  y  $55.0 \pm 1.4$  años y tensión arterial media (TAM) de  $111.2 \pm 1.2$  mmHg. Según  $E_6$  observamos dos grupos ( $\leq$  y  $>$  a 55 años). En  $\leq 55$  (*fenotipo PKD1*,  $n=42$ ),  $E_2$  y  $E_6$  del genotipo CC de *AT1A1166C* fueron  $36.0 \pm 1.2$  y  $41.4 \pm 0.9$  años vs. AA-AC ( $42.8 \pm 1.0$  y  $47.5 \pm 0.8$ ,  $p < 0.001$ ).  $E_2$  y  $E_6$  del genotipo *ecNOS298Asp/Asp* fueron  $34.8 \pm 1.5$  y  $41.1 \pm 0.6$  años vs. Glu/Glu-Glu/Asp ( $42.4 \pm 0.9$  y  $47.1 \pm 0.8$ ,  $p < 0.02$ ). En el genotipo *AGT235TT*, la VdP fue  $12.4 \pm 2.2$  ml/min/año vs. MM-MT ( $7.9 \pm 0.7$ ,  $p < 0.03$ ). Esta diferencia también se observó cuando analizamos todos los pacientes PQRAD (TT:  $11.02 \pm 1.5$  vs. MM-MT:  $6.44 \pm 0.5$  ml/min/año,  $p < 0.003$ ). Los genotipos *AT1 1166CC* y *ecNOS 298Asp/Asp* anticipan  $E_2$  y  $E_6$  mientras que *AGT235TT* duplica VdP, sugiriendo la participación del sistema renina angiotensina y NO sintasa endotelial en la progresión de la PQRAD.

**Palabras clave:** velocidad de progresión, poliquistosis renal, *AT1A1166C*, *AGTM235T*, *ecNOSGlu298Asp*.

**Abstract** *Glomerular filtration rate decline in autosomic dominant polycystic kidney disease. Influence of endothelial NO synthase (ecNOS) and renin angiotensin system gene polymorphisms.*

Glomerular filtration rate decline (GFRd) is variable in autosomic dominant polycystic kidney disease (ADPKD). In 88 ADPKD patients, GFRd was assessed by  $1/S_{cr}$  and compared with the association to *AT1A1166C* (*AT1R*), *AGTM235T* (angiotensinogen) and *ecNOSGlu298Asp* (NO endothelial synthase) polymorphisms. Age at  $S_{cr}$  values of 2 and 6 mg/dl were assumed as beginning of progressive phase ( $A_2$ ) and end-stage-renal disease ( $A_6$ ), respectively. Polymorphisms were studied by PCR-RFLP. The group as a whole showed GFRd (ml/min/year) of  $6.9 \pm 0.5$ ;  $A_2$  and  $A_6$  of  $48.9 \pm 1.3$  and  $55.0 \pm 1.4$  years and mean arterial pressure of  $111.2 \pm 1.2$  mmHg. When  $A_6$  was considered, two populations were defined ( $\leq$  and  $>$  55 years). In  $\leq 55$  (assumed as *PKD1 phenotype*) ( $n=42$ ),  $A_2$  and  $A_6$  of the *AT11166CC* genotype were  $36.0 \pm 1.2$  and  $41.4 \pm 0.9$  years vs AA-AC ( $42.8 \pm 1.0$  and  $47.5 \pm 0.8$ ,  $p < 0.001$ ).  $A_2$  and  $A_6$  of the *ecNOS298Asp/Asp* genotype were  $34.8 \pm 1.5$  and  $41.1 \pm 0.6$  years vs. Glu/Glu-Glu/Asp ( $42.4 \pm 0.9$  and  $47.1 \pm 0.8$ ,  $p < 0.02$ ). In *AGT235TT* genotype, GFRd was  $12.4 \pm 2.2$  ml/min/year vs MM-MT ( $7.9 \pm 0.7$ ,  $p < 0.03$ ). This difference was also observed when all ADPKD patients were considered (TT:  $11.02 \pm 1.5$  vs. MM-MT:  $6.44 \pm 0.5$  ml/min/year,  $p < 0.003$ ). *AT1 1166CC* and *ecNOS 298Asp/Asp* are associated with earlier  $A_2$  and  $A_6$  whereas *AGT 235TT* induce twofold increase in GFRd, suggesting that RAS and ecNOS are involved in ADPKD progression.

**Key words:** GFR decline, ADPKD, *AT1A1166C*, *AGTM235T*, *ecNOSGlu298Asp*

La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es la enfermedad renal hereditaria más frecuente y la

causa genética más común de insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en adultos, alcanzando el 7% de los enfermos en diálisis crónica en Argentina. La enfermedad presenta una primera fase donde la función renal se mantiene estable (fase no progresiva) y otra donde la función renal decae (fase progresiva). Aunque los genes responsables (*PKD1* en el cromosoma 16 y *PKD2* en el cromosoma 4) han sido identificados, existen factores genéticos aún no definidos que pueden influenciar la gran

\* Este trabajo mereció el Premio Cossio al mejor trabajo clínico otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica durante su reunión anual en Mar del Plata, noviembre 2003

**Dirección postal:** Dr. Rodolfo S. Martín, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4523-4963 e-mail: ilanari@pinos.com

variabilidad fenotípica inter e intra familiar observada, aun en presencia de una mutación idéntica.

El posible efecto de otros genes modificadores del fenotipo cobra entonces interés pronóstico en el estudio de la evolución de la PQRAD. En este sentido, el fenotipo ha sido comúnmente definido como la edad de entrada en diálisis del paciente, evento sujeto a situaciones clínicas no estrictamente relacionadas con la edad de comienzo de la fase progresiva y la velocidad de caída previa de la función renal. El empleo de estas últimas variables para el estudio de la influencia de otros genes ha sido poco utilizado previamente, debido a la dificultad de contar con series de pacientes con suficiente seguimiento longitudinal y poder estadístico.

Los genes del sistema renina-angiotensina (SRA) y de la sintasa endotelial del óxido nítrico (ecNOS) han sido los más estudiados debido al conocido rol biológico de los polimorfismos del SRA y a que la presencia de hipertensión arterial es un evento común en la enfermedad, asociada a actividad aumentada del SRA<sup>1</sup>. En poblaciones caucásicas sin PQRAD, se ha observado que el genotipo *AGT235TT* se asocia a mayor concentración plasmática de angiotensinógeno (AGT)<sup>2</sup> y a mayor respuesta vascular a la inhibición del SRA<sup>3</sup>. Además, el mRNA 235T está aumentado con respecto al mRNA 235M en arterias de decidua humana de heterocigotas<sup>4</sup>. En ratones recombinantes homólogos existe una correlación entre copias génicas de AGT, su concentración plasmática y las cifras de presión arterial<sup>5,6</sup>. En el caso de *AT1A1166C* se ha encontrado aumento de la sensibilidad a angiotensina II en la vasculatura renal de individuos con genotipo CC, en relación a los genotipos AA y AC<sup>7</sup>. El *ecNOSGlu298Asp* mostró distinta actividad Ca<sup>++</sup> dependiente entre los distintos genotipos en arterias renales de pacientes PQRAD<sup>8</sup>.

Hasta el momento los trabajos publicados sobre el efecto de *AT1A1166C*, *AGTM235T* y *ecNOSGlu298Asp* en la progresión de la enfermedad han sido discrepantes<sup>8-15</sup>. Parte de esta discrepancia puede ser atribuida a variabilidad poblacional, al pequeño tamaño de la muestra o a una medición poco precisa de la rapidez de la progresión de la enfermedad, como es el empleo de la entrada en diálisis crónica como única medida. En muy pocas series fue utilizada la velocidad de caída del filtrado glomerular a lo largo del tiempo<sup>12, 14</sup>.

Por estos motivos decidimos estudiar el efecto de los polimorfismos *AT1A1166C*, *AGTM235T* y *ecNOSGlu298Asp* en la velocidad de progresión (VdP) de la PQRAD, determinada con mayor exactitud a través de la caída del filtrado glomerular en el tiempo.

En 88 pacientes con un seguimiento ( $\bar{x} \pm SE$ ) de 5.7 $\pm$ 0.5 años y al menos 4 valores de Cr<sub>pl</sub>  $\geq$  2mg/dl (un promedio de 12 $\pm$ 1 Cr<sub>pl</sub>/paciente y un total de 1007 determinaciones de Cr<sub>pl</sub>), la VdP fue estimada por 1/Cr<sub>pl</sub> vs. edad. Consideramos edades de Cr<sub>pl</sub> 2 y 6 mg/dl, como comien-

zo de progresión (E<sub>2</sub>) y de IRCT (E<sub>6</sub>), respectivamente. Se registró la presión arterial y se calculó la presión arterial media (TAM) en cada paciente. Los polimorfismos *AGTM235T*, *AT1A1166C* y *ecNOSGlu298Asp* se realizaron por reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos y posterior digestión con enzimas de restricción que reconocen los alelos de cada uno (PCR-RFLP): *Bst*UI para el alelo 235T de *AGTM235T*, *Bcl*I para el 1166A de *AT1A1166C* y *Ban*II para 298Glu o *Nde*II para 298Asp de *ecNOSGlu298Asp*. Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

Los datos fueron analizados usando el software estadístico STATA 5.0 y valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos. Las pendientes de 1/Cr<sub>pl</sub> vs. edad se calcularon por regresión lineal simple y se aceptaron para el análisis aquéllas con un coeficiente de correlación mayor a 0.85. Las variables continuas se analizaron con test t de Student o Mann-Whitney, según su distribución. Las variables binomiales se analizaron con test exacto de Fisher y corrección de Yates y se usó regresión múltiple para estudiar el efecto confundidor de otras variables.

En la población total estudiada (n=88) la VdP fue 6.9 $\pm$ 0.5 ml/min/año, E<sub>2</sub> y E<sub>6</sub> 48.9 $\pm$ 1.3 y 55.0 $\pm$ 1.4 años, respectivamente, y TAM 111.2 $\pm$ 1.2 mmHg. De acuerdo a E<sub>6</sub> observamos dos grupos:  $\leq$  y  $>$  de 55 años, con variables clínicas distintas. En los  $\leq$  de 55 años (n=49), VdP, E<sub>2</sub> y E<sub>6</sub> fueron 8.4 $\pm$ 0.7 ml/min/año, 41.6 $\pm$ 0.9 y 46.9 $\pm$ 0.7 años, respectivamente, distintas a los  $>$  de 55 (4.9 $\pm$ 0.6 ml/min/año, 60.0 $\pm$ 1.4 y 67.4 $\pm$ 1.7 años, respectivamente,  $p < 0.005$ ), sin diferencias en la TAM (110.9 $\pm$ 1.5 mmHg vs. 111.7 $\pm$ 1.9 mmHg,  $pNS$ ). Estos resultados permiten corroborar al grupo  $\leq$  de 55 años como fenotipo *PKD1*, correspondiéndose a lo descrito por Hateboer et al<sup>16</sup>.

La distribución alélica y genotípica de los tres polimorfismos no fue diferente en 76 pacientes PQRAD y 40 controles genotipados, encontrándose las poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En los pacientes con fenotipo *PKD1* genotipados para *AT1A1166C* (n=42), E<sub>2</sub> y E<sub>6</sub> del genotipo CC fueron 36.0 $\pm$ 1.2 y 41.4 $\pm$ 0.9 años vs. AA-AC (42.8 $\pm$ 1.0 y 47.5 $\pm$ 0.8 respectivamente,  $p < 0.001$ ), (Fig. 1, panel A). VdP y TAM no fueron distintas entre los genotipos CC (7.28 $\pm$ 1.38 ml/min/año y 115.3 $\pm$ 6.7 mmHg) y AA-AC (8.95 $\pm$ 0.79 y 108.4 $\pm$ 1.7), respectivamente.

En los pacientes con fenotipo *PKD1* genotipados para *ecNOSGlu298Asp*, E<sub>2</sub> y E<sub>6</sub> del genotipo Asp/Asp fueron 34.8 $\pm$ 1.5 y 41.1 $\pm$ 0.6 años vs. Glu/Glu-Glu/Asp (42.4 $\pm$ 0.9 y 47.1 $\pm$ 0.8 respectivamente,  $p < 0.02$ ), (Fig. 1, panel B). VdP y TAM no fueron distintas entre los genotipos Asp/Asp (5.67 $\pm$ 0.88 ml/min/año y 118.4 $\pm$ 20.1 mmHg) y Glu/Glu-Glu/Asp (9.0 $\pm$ 0.76 y 108.7 $\pm$ 1.6), respectivamente.

En contraste, el genotipo TT de *AGTM235T* mostró una mayor VdP en relación a MM-MT (12.4 $\pm$ 2.2 vs.

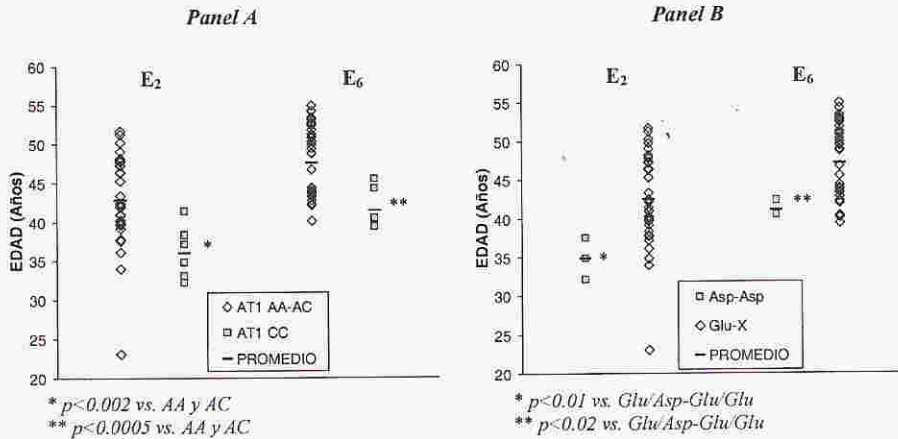


Fig. 1.— Edades de comienzo de progresión ( $E_2$ ) e insuficiencia renal crónica terminal ( $E_6$ ) en pacientes con fenotipo *PKD1* según polimorfismos *AT1A1166C* (panel A) y *ecNOSGlu298Asp* (panel B).

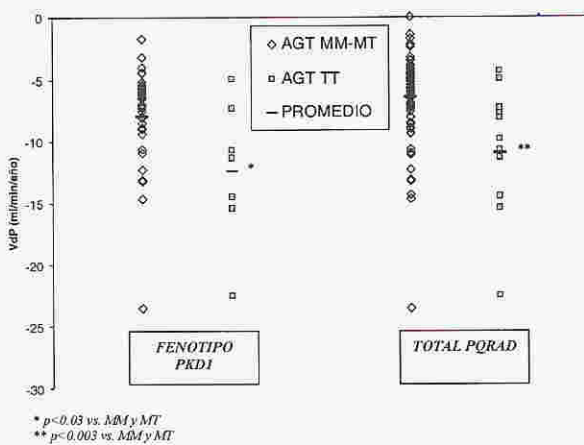


Fig. 2.— Velocidad de progresión (VdP) según polimorfismo *AGTM235T* en fenotipo *PKD1* (izquierda) y en la población total *PQRAD* (derecha).

7.93±0.7 ml/min/año,  $p < 0.03$ ), (Fig. 2). Esta diferencia en VdP de los TT vs. MM-MT se observa también en todos los pacientes (incluyendo el fenotipo no-*PKD1*) (11.02±1.5 vs. 6.44 ±0.5 ml/min/año,  $p < 0.003$ ). El polimorfismo *AGTM235T* no mostró diferencias en  $E_2$ ,  $E_6$  y TAM en fenotipo *PKD1* (TT: 40.9±1.2, 44.2±1.3 años y 112.1±3.1 mmHg; MM-MT: 41.8±1.1, 46.9±0.8 y 108.8±2.0).

En modelos de regresión múltiple, la VdP se correlacionó con *AGTM235T*, mientras que  $E_2$  y  $E_6$  lo hicieron con *AT1A1166C* y *ecNOSGlu298Asp*, independientemente de la TAM y las variables clínicas restantes en cada caso.

En conclusión, los genotipos CC de *AT1A1166C* y Asp/ Asp de *ecNOSGlu298Asp* se asocian a  $E_2$  y  $E_6$  menores en ~5 años, mientras que el TT de *AGTM235T* a una duplicación de la VdP, indicando un posible efecto de estos genes, tal vez por mecanismos independientes de la hipertensión arterial.

Estos resultados permiten concluir que el análisis de variables clínicas precoces poco estudiadas, tales como la edad de comienzo de la fase progresiva y la velocidad de caída del filtrado glomerular, permiten estudiar con mayor precisión el fenómeno de la progresión del daño renal en etapas tempranas, en la poliquistosis renal autosómica dominante.

El estudio de los polimorfismos del SRA y de la *ecNOS*, de conocida asociación a fenómenos de hipertensión arterial y daño intersticial, permiten así identificar factores genéticos y biológicos de riesgo importantes en la patogénesis, pronóstico y tratamiento de pacientes con poliquistosis renal autosómica dominante.

**Agradecimientos:** Agradecemos a los siguientes nefrólogos e investigadores que desde distintos puntos de nuestro país han aportado datos para este estudio: Cristina Aguirre, Mirta Barreneche, Carlos Braccalenti, Eduardo Castiglione, Ana Cusumano, Graciela del Valle, Elisa del Valle, Juan Di Bernardo, Eduardo Dos Ramos Fariás, Carlos Ferreyra, Gustavo Ferricher, Jorge Gambino Villada, Héctor Marone, Carlos Najún Zarazaga, José Osso, Irene Pindulli, Adriana Prado, Generoso Santoro, Esteban Siga, Leonardo Sivak, Carlos Triay, Delma Verón y Alfredo Zucchini. Adriana Scerbo y Susana Cesáreo brindaron su experta asistencia técnica. Ellecer Coto (Oviedo, España) brindó entrenamiento en técnicas de biología molecular. Esta investigación fue apoyada por subsidios del Ministerio de Salud (Beca Carrillo-Oñativía), Fundación Alberto Roemmers y Fundación Florencio Fiorini, Argentina.

## Bibliografía

1. Chapman AB, Johnson A, Gabow PA, et al. The renin-angiotensin-aldosterone system and autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1990; 323: 1091-6.
2. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewskbury DA, et al. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest* 1995; 95: 948-53.
3. Hopkins PN, Lifton RP, Hollenberg NK, et al. Blunted renal vascular response to angiotensin II is associated with a common variant of the angiotensinogen gene and obesity. *J Hypertens* 1996; 14: 199-207.
4. Morgan T, Craven C, Nelson L, et al. Angiotensinogen T235 expression is elevated in decidual spiral arteries. *J Clin Invest* 1997; 100: 1406-5.
5. Smithies O, Kim HS. Targeted gene duplication and disruption for analyzing quantitative genetic traits in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3612-5.
6. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2735-9.
7. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MJJ, et al. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor A<sup>166</sup>C polymorphism in essential hypertensives on a high sodium diet. *Hypertension* 2000; 36: 411-6.
8. Persu A, Stoenoiu T, Messiaen T, et al. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genetics* 2002; 11: 229-41.
9. Peters DJ, Breuning MH. Autosomal dominant polycystic kidney disease: modification of disease progression. *Lancet* 2001; 358: 1439-44.
10. Baboolal K, Ravine D, Daniels J, et al. Association of the angiotensin I converting enzyme deletion polymorphism with early onset ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. *Kidney Internat* 1997; 52: 607-13.
11. Perez-Oller L, Torra R, Badenas C, et al. Influence of the ACE gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 273-8.
12. van Dijk MA, Breuning MH, Peters DJ, et al. The ACE insertion/deletion polymorphism has no influence on progression of renal function loss in autosomal polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transpl* 2000; 15: 836-9.
13. Saggarr-Malik AK, Afzal AR, Jeffery S, et al. Lack of association of ACE/angiotensinogen genotype with renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genet Test* 2000; 4: 299-303.
14. Konoshita T, Miyagi K, Onoe T et al. Effect of ACE gene polymorphism on age at renal death in polycystic kidney disease in Japan. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 113-8.
15. Walker D, Consugar M, Slezak J, et al. The ENOS polymorphism is not associated with severity of renal disease in polycystic kidney disease 1. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 90-4.
16. Hateboer N, van Dijk MA, Bogdanova N, et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *Lancet* 1999; 353: 103.

----

### FE DE ERRATAS

En el **ARTICULO ORIGINAL** publicado en *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64 (1): 7-12.

El título dice, en inglés: EPIDEMIOLOGY OF PALPABLE GOITER IN GREATER BUENOS AIRES IN AN IODINE-SUFFICIENT AREA.

Debe decir: EPIDEMIOLOGY OF PALPABLE GOITER IN GREATER BUENOS AIRES, AN IODINE-SUFFICIENT AREA.

El título dice, en castellano: **Epidemiología del bocio palpable en el Gran Buenos Aires en un área suficiente en yodo.**

Debe decir: **Epidemiología del bocio palpable en el Gran Buenos Aires, un área suficiente en yodo.**

La imagen publicada en el mismo número, en **IMAGENES EN MEDICINA** (*Medicina (Buenos Aires)*) 2004; 64 (1): 57), Afagia por isquemia bulbar, está repetida. Es la misma que se publicó en *Medicina (Buenos Aires)* 2003; 63 (6): 730.