

**Universidad de Santiago de Compostela**

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría



**Primer estudio de la epigenética como un biomarcador  
en la estenosis pieloureteral.**

Memoria que presenta, para obtener el grado de Doctor,

María García Palacios

Santiago de Compostela, 2013



D. Adolfo Bautista Casasnovas, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Asociado del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Dña. Julia Cortés Hernández, Doctora en Medicina y Cirugía y Especialista en Medicina Nuclear.

**CERTIFICAMOS** que el trabajo de Tesis Doctoral titulado “**Primer estudio de la epigenética como un biomarcador en la estenosis pieloureteral**”, presentado por **Dña. María García Palacios**, ha sido realizado en el Departamento de Pediatría bajo nuestra dirección y cumple los requisitos legales para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 19 de abril de 2013.

Prof. Dr. Adolfo Bautista Casasnovas

Dra. Julia Cortés Hernández





**A Fran, por todo.**



# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Bautista, director de la Tesis, por confiar siempre en mí, transmitirme su espíritu de trabajo y esfuerzo, así como su estímulo constante para concluir la presente Tesis.

A la Dra. Cortés, codirectora de esta Tesis, por su apoyo, ánimo y consejos durante el continuo desarrollo de la Tesis.

Al Dr. Herranz, por su entusiasmo y su importantísima colaboración en el desarrollo de este trabajo. Por enseñarme tanto y permitirme aprender tantas cosas del apasionante mundo de la epigenética.

A los miembros del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Elina Estévez Martínez, Roberto Méndez Gallart y Pablo Rodríguez Barca. Por ser más que compañeros; por ser amigos y darme todo su apoyo a la hora de realizar este trabajo, en especial a Roberto Méndez Gallart, por sus consejos, apoyo e insistencia para realizar esta Tesis.

Al Servicio de Medicina Nuclear, al Servicio de Anatomía Patológica, a todo el personal del laboratorio, a la Dra. Padín y al Dr. Cameselles por su colaboración.

A mis padres, Pedro y Marga, y a mi hermana Raquel, por apoyarme en todos los momentos de mi vida de manera incondicional.

A Ignacio, por aprender de él lo importante que es la perseverancia.

A mi marido Fran, por estar siempre ahí, por no fallarme nunca y ser el pilar de mi vida.

A mi pequeño, que pronto estará con nosotros.

A todos los niños con estenosis pieloureteral.



# ÍNDICE





---

<b>ÍNDICE .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Características clínico-patológicas generales de la estenosis pieloureteral .....	3
1.1 Desarrollo embriológico del sistema renal.....	3
1.2 Función renal.....	7
1.2.1 Desarrollo de la función renal en periodo postnatal .....	7
1.2.2 Estimación de la función renal en el lactante y el niño.....	8
1.2.3 Sistema renina-angiotensina .....	8
1.2.4 Función renal en la obstrucción congénita del tracto urinario .....	10
1.3 Nefropatía obstructiva congénita .....	11
1.3.1 Fisiopatología de la obstrucción renal congénita .....	12
1.4 Estenosis pieloureteral .....	13
1.4.1 Definición de estenosis pieloureteral.....	13
1.4.2 Epidemiología de la estenosis pieloureteral .....	13
1.4.3 Características histopatológicas de la estenosis pieloureteral .....	14
1.4.4 Clínica.....	15
1.4.5 Orientación terapéutica de la estenosis pieloureteral.....	15
1.4.5.1 Actitud médica conservadora .....	15
1.4.5.2 Tratamiento quirúrgico.....	15
2. Bases moleculares de la nefropatía obstructiva.....	17
2.1 Desarrollo molecular del riñón.....	17
2.2 Biomarcadores de nefropatía obstructiva congénita .....	21
2.2.1 Anatómicos o estructurales .....	21
2.2.2 Funcionales .....	21
2.2.3 Celulares o Moleculares .....	22
2.2.3.1 Factor de crecimiento tumoral (TGF-β) .....	22
2.2.3.2 B-cell lymphoma-2 (BCL-2) .....	22
2.2.3.3 Receptor angiotensina II (AT II).....	23
2.2.3.4 Factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	23
2.2.3.5 Endotelina-1 (ET-1) .....	23
2.2.3.6 Enzimas urinarios .....	24
2.2.3.7 Microproteínas .....	25
2.3 Rutas implicadas en la génesis de la nefropatía obstructiva.....	25
2.3.1 Factor de crecimiento tumoral (TGF-β) .....	25
2.3.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	26
2.3.3 Apoptosis.....	27
2.4 Bases genéticas en el desarrollo de la obstrucción del tracto urinario.....	28
3. Diagnóstico por imagen de la estenosis pieloureteral .....	29
3.1 Ecografía .....	29
3.1.1 Ecografía doppler .....	31

3.2 Estudios Isotópicos.....	32
3.2.1 Renograma diurético .....	33
3.2.2 Radiofármaco .....	33
3.2.3 Diurético .....	33
3.2.4 Evaluación curvas actividad/tiempo .....	34
3.2.4.1 Función renal diferencial .....	34
3.2.4.2 Curvas del renograma .....	34
3.2.5 Evaluación de la respuesta al diurético .....	35
3.2.5.1 Estudio normal.....	36
3.2.5.2 Ausencia de respuesta al diurético.....	36
3.2.5.3 Patrón de dilatación no obstructiva .....	36
3.2.6 Parámetros cuantitativos .....	36
3.3 Resonancia magnética .....	37
4. Epigenética .....	39
4.1 Definición.....	39
4.2 Visión histórica de la epigenética .....	39
4.3 Metilación .....	41
4.3.1 Bases bioquímicas de la metilación del ADN. Islas CpG .....	41
4.3.2 Papel de la metilación del ADN en procesos de desarrollo y enfermedad.....	43
4.4 Acetilación .....	45
4.5 Epigenética y sistema renal.....	47
4.5.1 Papel de la epigenética en el sistema renal .....	47
4.5.2 Alteraciones epigenéticas en la fibrosis renal .....	49
4.5.3 Metilación aberrante y la vía Ras en el sistema renal.....	50
4.6 Nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en alteraciones epigenéticas en la patología renal .....	52
<b>II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>III MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
1. Selección del material .....	61
1.1 Pacientes.....	61
1.2 Selección de muestras .....	62
2. Estudio histopatológico.....	62
3. Parámetros a estudio .....	62
3.1 Parámetros clínico-patológicos empleados en el estudio .....	62
3.2 Parámetros del estudio de imagen.....	63
4. Extracción del ADN .....	64
4.1 Protocolo de extracción del ADN.....	65
5. Microarray.....	65
5.1 Conceptos generales de Microarray.....	65
5.2 Protocolo microarray Agilent para el análisis de ADN metilado .....	67
5.3 Análisis de los datos.....	68
6. Prueba de metilación específica mediante PCR (MSP).....	69
6.1 Conceptos generales de la MSP y modificación del ADN con bisulfito.....	69
6.2 Protocolo de MSP.....	70
6.2.1 Tratamiento con bisulfito sódico .....	70
6.2.1.1 Modificación del ADN .....	70

6.2.1.2 Purificación: DNA-Clean-UP .....	71
6.2.2 Precipitación y purificación del ADN tratado .....	74
6.3 PCR específica de metilación (MSP) .....	74
6.4 Elección de las condiciones de reacción .....	75
6.5 Electroforesis del producto de PCR y visualización del resultado.....	76
7. Selección y descripción de los genes seleccionados .....	77
7.1 p16 ( Cycline–depended kinase inhibitor 2A) .....	78
7.2 RASSF1A (Ras association domain family isoform A) .....	78
7.3 MGMT (O6-metilguanina ADN metiltransferasa).....	79
7.4 E-Cadherina .....	79
7.5 Ciclina-D2 .....	79
7.6 HIN-1 (High –in normal-1) .....	80
7.7 RASAL1 (Ras protein activator like 1) .....	80
8. Estadística .....	81
8.1 Programa PHYLIP .....	81
<b>IV RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
1. Datos clínico-patológicos.....	89
1.1 Análisis descriptivo .....	89
1.2 Análisis aplicando el programa Phylip.....	91
2. Datos epigenéticos .....	100
2.1 Microarray.....	100
2.2 Perfiles de metilación .....	103
2.3 Clusters epigenéticos .....	106
3. Correlación entre parámetros clínico-patológicos y metilación .....	109
<b>V DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
1. Aspectos clínico-patológicos de la estenosis pieloureteral .....	113
1.1 Características de nuestro grupo de estudio.....	114
1.2 Análisis de las características de nuestro estudio según los clusters clínicos de asociación .....	117
2. Epigenética.....	121
2.1 Características epigenéticas .....	121
2.1.1 Utilidad de la epigenética en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento ..	121
2.1.2 Epigenética en patología humana .....	122
2.1.3 Epigenética en la estenosis pieloureteral .....	122
2.2 Genes de estudio .....	123
2.2.1 p16 (Cycline–depended kinase inhibitor 2A).....	124
2.2.2 RASSF1A (Ras association domain family isoform A) .....	125
2.2.3 MGMT(O6-metilguanina ADN metiltransferasa).....	125
2.2.4 E-Cadherina .....	126
2.2.5 Ciclina-D2 .....	127
2.2.6 HIN-1 (High –in normal-1) .....	127
2.2.7 RASAL1 (Ras protein activator like 1).....	128
2.3 Agrupaciones epigenéticas y perfiles epigenéticos en nuestro estudio .....	129
2.3.1 p16 (Cycline–depended kinase inhibitor 2A) .....	129
2.3.2 MGMT(O6-metilguanina ADN metiltransferasa).....	130
2.3.3 E-Cadherina .....	130

2.3.4 Ciclina- D2 .....	131
2.3.5 HIN-1 (High –in normal-1) .....	131
2.3.6 RASAL1 (Ras protein activator like 1) .....	131
2.4 Visión global .....	132
3. Correlación entre parámetros clínicos y epigenéticos.....	134
4. Visión global del trabajo .....	139
<b>VI CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>145</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS





Figura 1: Desarrollo embriológico del sistema renal .....	3
Figura 2: Desarrollo embriológico del pronefros.....	4
Figura 3: Desarrollo embriológico del pronefros y mesonefros .....	5
Figura 4: Desarrollo embriológico del metanefros.....	6
Figura 5: Desarrollo embriológico del sistema excretor .....	7
Figura 6. Sistema renina angiotensina .....	10
Figura 7. Papel del TGF- $\beta$ en la fibrosis renal.....	13
Figura 8: Aspectos macro y microscópicos de la estenosis pieloureteral .....	14
Figura 9: Pieloplastia de Anderson-Hynes .....	16
Figura 10: Imagen intraoperatoria de una pieloplastia .....	16
Figura 11: Rutas implicadas en la génesis de la nefropatía obstructiva .....	27
Figura 12 Ecografía renal .....	31
Figura 13: Ecografía doppler renal.....	32
Figura 14: Renograma diurético.....	37
Figura 15: Uroresonancia magnética .....	38
Figura 16: Fenómenos epigenéticos .....	39
Figura 17: Metilación del ADN.....	41
Figura 18: Metilación de novo .....	42
Figura 19: Metilación del promotor.....	45
Figura 20: Nucleosoma .....	46
Figura 21. Fenómenos epigenéticos .....	47
Figura 22: Vía Ras en el sistema renal .....	52
Figura 23. Futuros caminos de desarrollo de la epigenética.....	54
Figura 24. Microarray .....	67
Figura 25. Normalización de datos del array.....	69
Figura 26. Sistema múltiple de vacío .....	71
Figura 27: Sistema de purificación de ADN.....	72
Figura 28. Visualización del MSP.....	77
Figura 29. Vía Ras.....	78
Figura 30. Función de la Ciclina-D2 en la regulación del ciclo celular .....	80
Figura 31: Construcción del phylograma por el sistema Phylip.....	86
Figura 32: Árbol I .....	91
Figura 33: Árbol II .....	94
Figura 34: Árbol III .....	97
Figura 35: Imagen del array .....	100
Figura 36: Análisis y procesamiento del array .....	101
Figura 37: Perfiles de metilación de los genes seleccionados .....	103
Figura 38: Perfil de p16 .....	104
Figura 39: Perfil de RASSF1A.....	104
Figura 40: Perfil de MGMT .....	104
Figura 41: Perfil de E-Caderina.....	104
Figura 42: Perfil de Ciclina D-2.....	105
Figura 43: Perfil de HIN-1 .....	105
Figura 44: Perfil de RASAL-1 .....	105
Figura 45: Cluster de genes no metilados.....	106
Figura 46: Cluster epigenético de p16.....	106
Figura 47: Cluster epigenético de MGMT.....	107
Figura 48: Cluster epigenético de E-Cadherina .....	107
Figura 49: Cluster epigenético de Ciclina-D2 .....	108
Figura 50: Cluster epigenético de HIN-1 .....	108
Figura 51: Cluster epigenético de RASAL-1.....	109

Figura 52: Cluster epigenético de p16 y HIN-1 ..... 133  
Figura 53: Cluster epigenético de E-Cadherina, HIN-1 y RASAL-1 ..... 134



# ÍNDICE DE TABLAS





Tabla 1: Patología obstructiva urológica neonatal.....	11
Tabla 2: Relación de genes que intervienen en el desarrollo renal e implicaciones derivadas de una alteración homocigótica en su expresión .....	20
Tabla 3: Alteraciones genéticas en las anomalías congénitas renales y del tracto urinario (CAKUT) .....	29
Tabla 4: Clasificación de la hidronefrosis según la SFU .....	30
Tabla 5. Parámetros clínico-patológicos .....	63
Tabla 6. Parámetros de imagen .....	64
Tabla 7: Secuencia de primers de MSP .....	75
Tabla 8: Codificación de las variables clínico patológicas y de imagen .....	85
Tabla 9: Parámetros clínico-patológicos de la serie.....	90
Tabla 10: Agrupación árbol I .....	93
Tabla 11: Agrupación árbol II .....	96
Tabla 12: Agrupación árbol III .....	99
Tabla 13: Genes con valor de hibridación para la sonda metilada con respecto a la sonda control superior a 20. ....	102
Tabla 14: Correlación parámetros clínico-patológicos-epigenéticos .....	110



# ABREVIATURAS





<sup>123</sup>IOIH: 123-ortoiodohipurato  
5'Aza: 5' Azacitidina  
<sup>99m</sup>TcDTPA: dietilentriaminopentaacético marcado con Tecnecio <sup>99</sup>  
<sup>99m</sup>TcMAG3: mercaptoacetiltriglicerina marcado con Tecnecio <sup>99</sup>  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ALP: Fosfatasa alcalina  
AP-1: Activador de plasminógeno 1  
ARN: Ácido ribonucleico  
AT1 y AT2: Receptores de angiotensina tipo 1 y tipo 2  
ATR-X: Alfa talasemia y retraso mental ligados al cromosoma X  
BCL-2: Oncoproteína bcl-2  
bFGF: Factor de crecimiento básico de los fibroblastos  
Bmp: Proteínas morfogenéticas del hueso  
C: Citosina  
CpG: Regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina.  
CTCF: Factor de unión a CCCTC  
DMR: Regiones de metilación diferencial  
DNMTs: ADN-metiltransferasas  
ECA : Enzima convertidora de angiotensina  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
EGF: Factor de crecimiento epidérmico  
EMT: Transición epitelio-mesénquima  
ET-1: Endotelina-1  
FGF-2: Factor de crecimiento derivado de fibroblastos  
FGR: Filtrado glomerular renal  
FN-kB: Factor nuclear- kB  
FNT: Factor de necrosis tumoral  
FRD: Función renal diferencial  
G: Guanina  
Gd-DTPA: Gadolinio-DTPA  
Gd-RMU: Resonancia magnética urográfica con Gadolinio  
GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales  
GDP: Guanosin difosfato  
GGT: Glutamil transferasa  
GSTP1: *Glutathione-S-transferase*  
GTP: Guanosintrifosfato  
H-E: Hematoxilina-Eosina  
HGF: Factor de crecimiento de los hepatocitos  
HIN-1: High –in normal-1  
ICF: Inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales  
ICR: Centros de control de impronta  
IGF-I: Factor de crecimiento insulínico tipo 1  
IL-1: interleucina 1  
ITU: Infección del tracto urinario  
LOI: Pérdida de la impronta  
M: metilado  
MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein 1*  
MEC: Matriz extracelular  
MGMT: O6-metilguanina ADN metiltransferasa  
mMCP4: *mouse mast cell protease*

MSP: PCR específica de metilación  
NAG: N-acetyl-B-D-glucosaminidasa  
NF-kB: Factor nuclear-kB  
Nfat : Factor nuclear activador de células T  
NORA: Actividad residual normalizada  
p16: Cycline–depeded kinase inhibitor 2A  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandinas E<sub>2</sub>  
PGF: Factor de crecimiento plaquetario  
RASAL1: Ras protein activator like 1  
RASSF1A: Ras association domain family isoform A  
RCE: Receptor del crecimiento epidérmico  
RCP: Receptor de crecimiento plaquetario  
RD: Renograma diurético  
RMU: Resonancia magnética urográfica  
RTT: Tiempo de tránsito  
SFU: Sociedad de Urología Fetal  
SRA: Sistema renina angiotensina  
TBE: Tampón formado por Tris, Borato y EDTA  
Tbx 18: Factor de transcripción Tbox-18  
TGF-β: Factor de crecimiento de tumores  
TIMP: Inhibidores tisulares de metaloproteasas.  
TNF: Factor de necrosis tumoral  
U: No metilado  
Wnt: Glucoproteína con papel en el desarrollo embrionario  
WT-1: Gen supresor de tumores de Wilms

# INTRODUCCIÓN

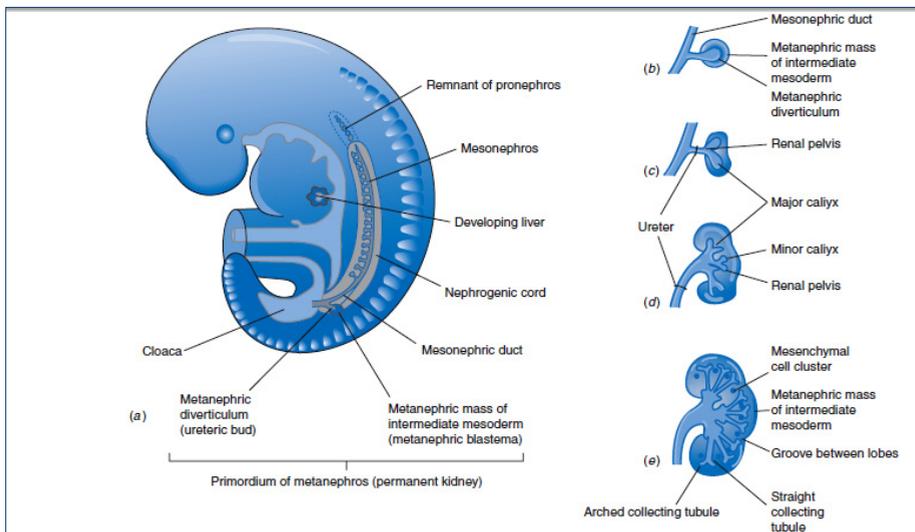




## 1. Características clínico-patológicas de la estenosis pieloureteral.

### 1.1 Desarrollo embriológico del sistema renal:

Durante la vida intrauterina el desarrollo embriológico del riñón atraviesa tres fases: pronefros, mesonefros y metanefros. De ellos, tan sólo el metanefros dará lugar al riñón adulto (1, 2) (Figura 1).

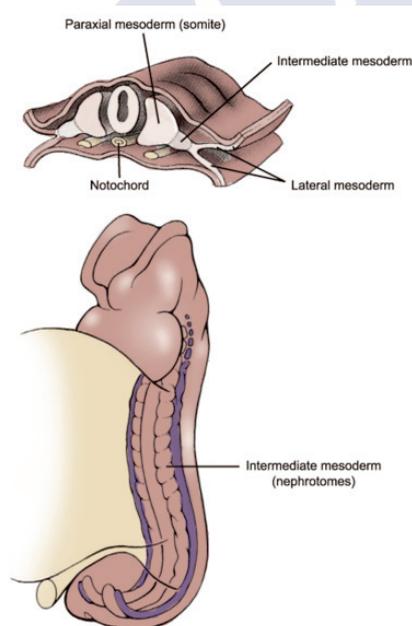


**Figura 1: Desarrollo embriológico del sistema renal.** Diferentes fases en la formación del sistema renal. El pronefros es el riñón rudimentario, nunca tendrá función. En la cuarta semana en el mesonefros se formará la cápsula de Bowman y el glomérulo. En la quinta semana de gestación a partir del metanefros se formará el sistema excretor (túbulos proximal, asa de Henle y túbulo distal) y la yema ureteral desarrollará el sistema colector (cálices, pelvis y uréter). Adaptada de kelalis, 2007 (3).

- **Pronefros (Figura 2):**

El pronefros es un riñón funcional en peces y anfibios pero en mamíferos es un vestigio evolutivo sin función renal. La primera evidencia del pronefros es a finales de la tercera semana comenzando a desarrollarse en la cuarta semana de gestación y persistiendo hasta la sexta. Inicialmente consiste en una masa de células mesoblásticas que se extienden longitudinalmente formando un cordón desde la región inmediatamente por debajo del corazón hasta la parte caudal del cuerpo. Este cordón se tubulariza y separa del resto de células adyacentes pasando a denominarse conducto de Wolf o pronéfrico el cual conecta, en su porción inferior, con el tubo digestivo y en su parte superior con invaginaciones del epitelio del peritoneo.

El tejido mesoblástico, entre estas invaginaciones, forma una estructura glomerular vascular, que es el pronefros, el cual rápidamente degenera y desaparece.



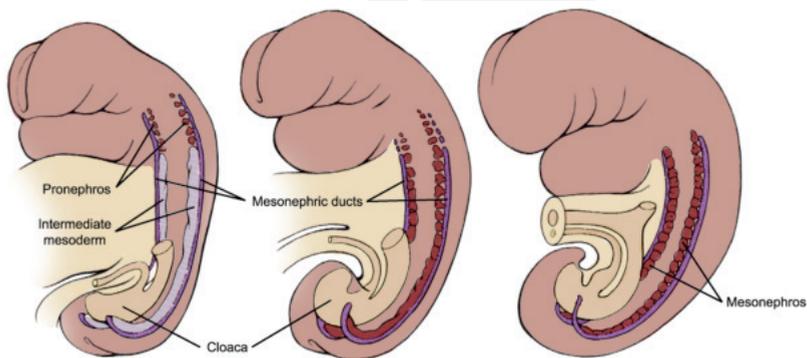
**Figura 2: Desarrollo embriológico del pronefros.** Las células mesoblásticas se disponen de forma tubular dando lugar al conducto de Wolf que se conectará en su porción inferior con el aparato digestivo y en su porción superior con el peritoneo. No desempeña función renal y degenera desapareciendo rápidamente al final de la sexta semana. Adaptado de Campbell-Walsh, 2007 (4).

- **Mesonefros (Figura 3):**

Por detrás del pronefros y en la cara interna del conducto de Wolf, proyectándose en la cresta urogenital, se forman en la cuarta semana una serie de tubos ciegos que se abren hacia el conducto de Wolf. Esta conformación se denomina mesonefros.

El extremo ciego de los túbulos se dilata y engloba una red glomerular de capilares sanguíneos formando así los glomérulos en su extremo medial. Alrededor de los glomérulos, los túbulos forman la cápsula de Bowman constituyendo el corpúsculo renal.

El mesonefros desempeña la función de riñón tan sólo en las etapas iniciales del desarrollo ya que cuando el metanefros se diferencia, el mesonefros cesa su función y degenera en parte.

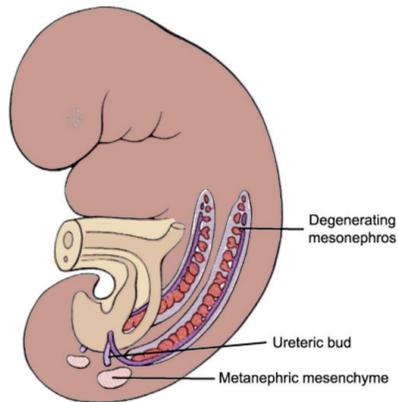


**Figura 3: Desarrollo embriológico del pronefros y mesonefros.** Los túbulos ciegos se abren hacia el conducto de Wolf. Se dilatan y engloban a una red de capilares formando el corpúsculo renal. El mesonefros desempeña la función de riñón sólo durante las etapas embrionarias del embarazo. Degenera en parte, ya que en el hombre dará lugar a los vasos eferentes y la rete testis del testículo. Adaptado de Campbell-Walsh, 2007 (4).

- **Metanefros (Figura 4):**

El riñón definitivo comienza a desarrollarse en la quinta semana de gestación y es a finales de la octava donde es completamente funcional. El origen del metanefros es doble, por un lado la masa metanefrogénica o mesénquima metanéfrica se diferencia para dar lugar principalmente a la parte glomerular del riñón y túbulos contorneados y por otra parte, las estructuras tubulares

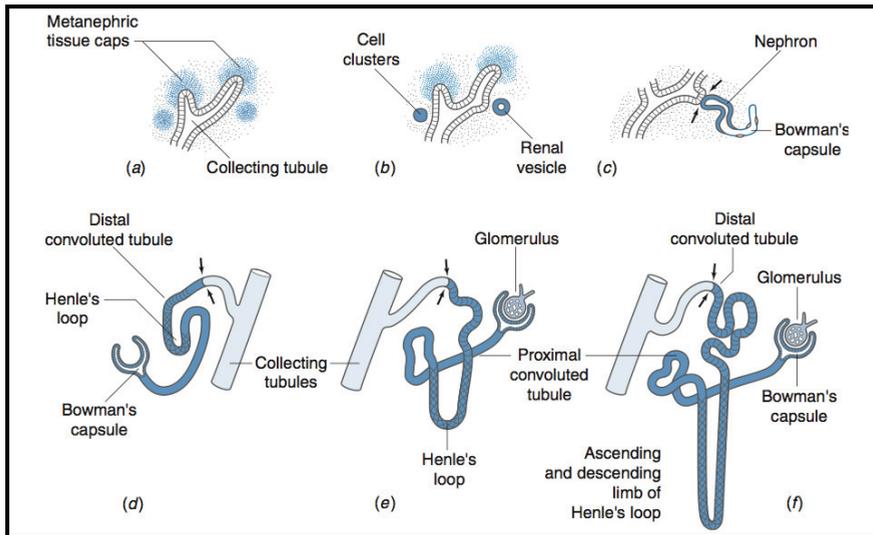
colectoras del riñón derivan de un divertículo que emerge de la parte final del conducto de Wolf cerca de la cloaca: la yema ureteral (Figura 4). Este divertículo se expande dentro de la masa metanefrogénica y se ramifica para dar lugar a estructuras colectoras de la orina: pelvis renal, cálices y túbulos colectores. La parte final de la yema ureteral, próxima a la cloaca, dará lugar al uréter.



**Figura 4: Desarrollo embriológico del metanefros.** El mesonefros desarrolla el mesénquima metanefrico que dará lugar al metanefros o riñón definitivo. Adaptado de Campbell-Walsh, 2007 (4).

Por lo tanto, en el desarrollo renal, el sistema excretor, constituido por el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal derivan del mesénquima metanefrico y el sistema colector formado por túbulos colectores, cálices, pelvis y uréter se forma a partir de la yema ureteral.

Una vez formado el metanefros, comienza la migración de este desde la pelvis, donde se había desarrollado, hasta la parte póstero-superior del abdomen.



**Figura 5: Desarrollo embriológico del sistema excretor.** Formación a partir del mesénquima metanefrítico del sistema excretor compuesto por el túbulo proximal, Asa de Henle y túbulo distal. Adaptada de Kelalis, 2007 (3).

## 1.2 Función renal:

### 1.2.1 Desarrollo de la función renal en periodo postnatal:

En el momento del nacimiento se producen una serie de cambios en la dinámica funcional del riñón. Estos cambios están íntimamente relacionados con la edad gestacional en el momento del parto y con factores desarrollados durante el embarazo. Así, el crecimiento intrauterino retardado, puede provocar una reducción permanente en el número de nefronas funcionantes (5). La influencia de la edad gestacional en el momento del parto sobre la función renal queda reflejada en la diferencia que existe en el filtrado glomerular entre los recién nacidos a término, que se duplica durante la primera semana de vida, y en los niños nacidos antes de las 34 semanas de edad gestacional, en los que este aumento se produce más lentamente (6).

La elevación progresiva del filtrado glomerular se produce como consecuencia de una disminución de la resistencia vascular renal, del aumento de la presión de perfusión, de la permeabilidad glomerular y de la superficie de filtración. A los dos años de vida se alcanzan niveles que se corresponden con los del adulto en niños nacidos a término.

La función tubular en el neonato se modifica junto con el aumento del filtrado glomerular.

### **1.2.2 Estimación de la función renal en el lactante y el niño:**

La estimación de la función renal en el niño basada en la determinación de creatinina no resulta sencilla ni útil por diferentes razones:

- La creatinina cambia rápidamente con el crecimiento aumentando varias veces su valor inicial durante los dos primeros meses de vida.
- En los dos primeros días, la creatinina sérica refleja los niveles maternos y no el índice de filtración del neonato.
- Existen discrepancias entre los niveles de creatinina según sea un recién nacido a término, en el que suele ser inferior a 1 mg/dl, o en un recién nacido pretérmino, en el que los niveles suelen ser de hasta 1.5 mg/dl en el primer mes de vida (7).

Por todos estos factores que influyen y modifican los niveles de creatinina la determinación de su valor de forma aislada no se considera un buen parámetro para estimar la función renal.

El filtrado glomerular renal (FGR) es el indicador más útil en la evaluación y seguimiento de la función renal. Su cálculo se lleva a cabo a través de una fórmula empírica desarrollada por Schwartz en el año 1976 basada en una constante, en la talla del paciente y en el nivel de creatinina sérica (8):

$$\text{FGR: } K \times T / \text{PCr}$$

Donde K es una constante que varía con la edad (en menores de 2 años su valor es 0,45, de 2 a 16 años es de 0,55 y de los 16 a los 21 años es de 0,70 en hombres y de 0,55 en las mujeres), T es la talla en centímetros y PCr es el nivel de creatinina en sangre determinado en mg/ml.

### **1.2.3 Sistema renina-angiotensina:**

La función renal fetal y neonatal está regulada en gran medida por hormonas circulantes. El Sistema Renina Angiotensina (SRA) es el más estudiado. Está presente en el mesonefro transitorio y se identifica en la 8ª semana de gestación en el metanefros.

La actividad de la renina plasmática permanece baja durante la vida fetal y en el periodo perinatal existe un marcado aumento. Es una enzima proteolítica que

se forma y almacena en las granulaciones de las células yuxtaglomerulares que rodean las arteriolas aferentes de los glomérulos renales. Actúa sobre su principal sustrato, el angiotensinógeno, para formar la angiotensina I. La angiotensina I mediante la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) se convierte en angiotensina II que ejerce como potente vasoconstrictor sobre la musculatura lisa arteriolar. Las dos clases principales de receptores de angiotensina se denominan AT-I y AT-II. La mayor parte de los efectos de la angiotensina II están mediados por el receptor AT-I (9, 10).

La liberación de renina por el riñón es el resultado de una respuesta a diferentes factores (11):

1. Las células yuxtaglomerulares, alrededor de las arteriolas aferentes, actúan como sensores o transductores de presión, detectan la presión de perfusión renal y los correspondientes cambios que experimentan las presiones de perfusión en las arteriolas aferentes.

2. Un segundo mecanismo de control para la liberación de renina está centrado en las células de la mácula densa, que constituyen un grupo de células epiteliales del túbulo contorneado distal situadas directamente frente a las células yuxtaglomerulares. Pueden funcionar como quimiorreceptores, que vigilan la carga de sodio (o cloruro) presentada al túbulo distal. Cuando aumenta la cantidad de sodio filtrado que llega a la mácula densa, se envía una señal para que las células yuxtaglomerulares disminuyan la liberación de renina, regulando así la filtración glomerular y la carga de sodio filtrado.

3. El sistema nervioso simpático regula la liberación de renina en respuesta a la bipedestación. El mecanismo consiste bien en un efecto directo sobre las células yuxtaglomerulares para que aumenten la actividad de la adenilciclase, o bien en un efecto indirecto sobre estas células o las de la mácula densa a través de la vasoconstricción de la arteriola aferente.

4. Existen también factores circulantes que influyen en la liberación de renina.

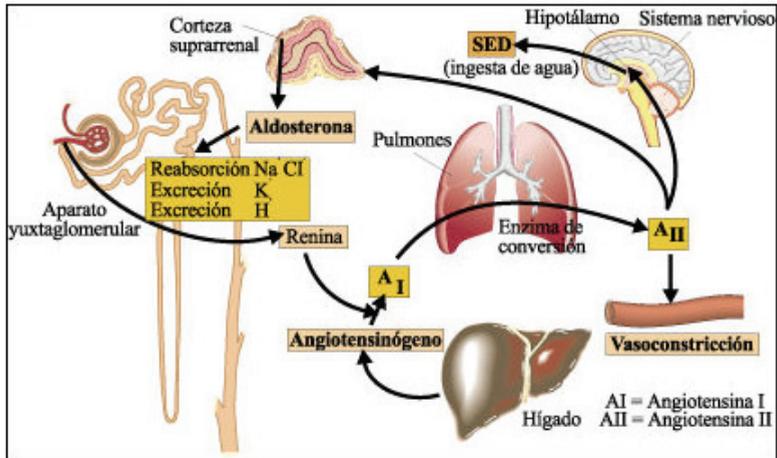


Figura 6. Sistema renina angiotensina: Diferentes señales que actúan en la regulación del sistema renina angiotensina.

#### 1.2.4 Función renal en la obstrucción congénita del tracto urinario:

El momento gestacional en el que se produce la lesión obstructiva del tracto urinario es fundamental para el desarrollo renal. La respuesta que genera el riñón frente a una obstrucción ureteral es diferente según se produzca en un riñón en desarrollo o en un riñón completamente desarrollado.

La atresia ureteral que se produce en las primeras etapas de la gestación causa una displasia renal irreversible. Cuanto más avanzado sea el momento gestacional en el que ocurre la obstrucción pieloureteral menos severas serán las alteraciones funcionales que se produzcan y es posible que puedan minimizarse por la corrección quirúrgica postnatal (12).

El periodo postnatal es también un momento de gran susceptibilidad en la maduración renal. Cualquier alteración obstructiva que se produzca en este periodo afecta al riñón de una manera más significativa que al riñón adulto.

En estudios animales se ha observado que el crecimiento renal y el filtrado glomerular se encuentran más alterados en animales jóvenes que en adultos.

En una cobaya recién nacida, la obstrucción ureteral provoca una disminución del volumen de filtrado glomerular, esclerosis y atrofia renal. La detención del crecimiento no puede evitarse y no es posible recuperar la función renal una vez hayan transcurrido diez días de la obstrucción aún a pesar de normalizarse la presión ureteral. En contraposición, en la cobaya adulta la resolución de la obstrucción, después de un tiempo similar a la de la cobaya recién nacida, no

causa atrofia renal y permite restablecer un patrón de filtrado glomerular normal (13).

En periodo neonatal, en el cual el riñón es inmaduro, la obstrucción renal produce un aumento de la resistencia vascular intrarenal, que conlleva a una activación del sistema renina angiotensina y sus diferentes efectos deletéreos en el sistema renal (14).

### 1.3 Nefropatía obstructiva congénita:

La uropatía obstructiva se define como una alteración del tracto urinario causada por una obstrucción. Una amplia lista de enfermedades congénitas forma parte de esta categoría de uropatías obstructivas y son la causa de enfermedad renal crónica en muchos casos (Tabla 1).

CAUSAS CONGÉNITAS DE UROPATÍA OBSTRUCTIVA
<b>ALTERACIONES EN LA URETRA</b>
Válvulas de uretra posterior
Válvulas de uretra anterior
Divertículo uretral
Estenosis de meato severa
Megalouretra
Atresia uretral
<b>ALTERACIONES VESICALES</b>
Quiste trigonal
Ureterocele vesical
Hipoplasia
Agenesia
<b>ALTERACIONES EN EL URÉTER</b>
Obstrucción de la unión pieloureteral
Obstrucción de la unión ureterovesical
Uréter ectópico
Ureterocele ectópico
Megauréter

Tabla 1: *Patología obstructiva urológica neonatal. Adaptada de Roth et al., 2002 (15).*

En algunos tipos de enfermedad urológica obstructiva congénita, como por ejemplo la estenosis pieloureteral, un diagnóstico y tratamiento precoz pueden evitar la evolución de la enfermedad hacia el daño renal crónico (15).

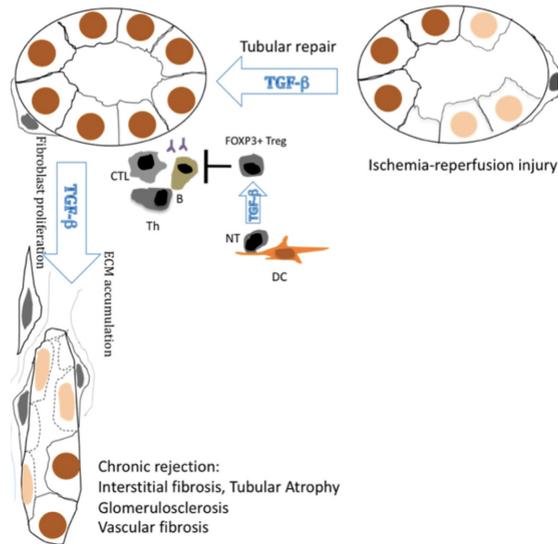
### **1.3.1 Fisiopatología de la obstrucción renal congénita:**

Ante una obstrucción en el sistema renal se producen una serie de respuestas mediadas por el sistema neuroendocrino como son la elevación de la presión hidrostática y la variación en el flujo renal.

La transmisión retrógrada de la presión provocada por la obstrucción causa el desarrollo de hidronefrosis con dilatación de la pelvis y aumento del tamaño renal. La consecuencia de este fenómeno de una manera mantenida en el tiempo sería la fibrosis intersticial (15).

En primera instancia, en una obstrucción del sistema excretor renal, el flujo vascular aumenta, pero tan sólo de manera transitoria. Esto desencadena la producción de prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y de angiotensina II con la consecuente activación del sistema renina angiotensina (SRA) y del factor de crecimiento de tumores ( $TGF-\beta$ ). El  $TGF-\beta$  induce en los fibroblastos la generación de matriz extracelular (MEC) (16). Todas estas reacciones desencadenan el aumento de la resistencia vascular y la disminución del filtrado glomerular renal así como el desarrollo de una fibrosis intersticial.

En los riñones, con signos incipientes de fibrosis intersticial, se ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti- $TGF-\beta$ , consigue que presenten un menor depósito de matriz extracelular (17, 18).



**Figura 7. Papel del TGF- $\beta$  en la fibrosis renal.** Ante la obstrucción al flujo vascular renal se desencadenan una serie de procesos que conllevan la activación del TGF- $\beta$ . La activación del TGF- $\beta$  provoca la activación de fibroblastos y el aumento de depósito de matriz extracelular lo cual se traduce en fibrosis intersticial renal. Adaptada de Du, 2011 (19).

## 1.4 Estenosis pieloureteral:

### 1.4.1 Definición de estenosis pieloureteral:

La estenosis pieloureteral se define como una restricción al flujo urinario desde la pelvis renal hacia el uréter. Como consecuencia de esta restricción se genera un mecanismo compensatorio consistente en una hipertrofia de la pelvis renal para intentar mantener un flujo de orina adecuado. En caso de no corregirse la obstrucción se produce un daño renal progresivo e irreversible (20, 21).

### 1.4.2 Epidemiología de la estenosis pieloureteral:

La estenosis pieloureteral se observa en todos los grupos de edad pero tiene una mayor frecuencia en el periodo neonatal. Esto es debido al diagnóstico prenatal de la hidronefrosis a través de las ecografías realizadas durante el control del embarazo (22). El 48% de las hidronefrosis detectadas en etapa fetal corresponden a estenosis pieloureterales siendo esta la causa más frecuente de dilatación significativa del sistema colector en el riñón fetal.

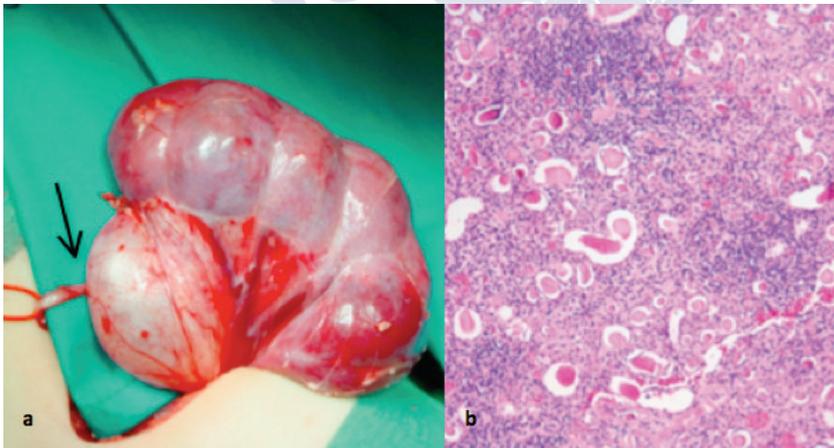
La estenosis pieloureteral es más frecuente en niños que en niñas, en especial en el periodo perinatal donde la proporción es mayor de 2:1 (23).

El lado izquierdo es el afectado en la mayoría de los casos. Entre el 10 y el 40% presentan una obstrucción de la unión pieloureteral bilateral (24).

#### 1.4.3 Características histopatológicas de la estenosis pieloureteral:

El hallazgo macroscópico al realizar la corrección quirúrgica es un segmento estenosado del uréter a nivel de la unión pieloureteral (Figura 8a).

El análisis histopatológico de dicho segmento suele describir una interrupción en el desarrollo de la musculatura circular de la unión pieloureteral o una alteración de las fibras de colágeno y de la composición de los tejidos que rodean las células musculares (Figura 8b). Las fibras musculares se encuentran separadas y adelgazadas, provocando una alteración en las contracciones que tendrá como consecuencia un vaciado ineficaz del flujo urinario (25).



**Figura 8: Aspectos macro y microscópicos de la estenosis pieloureteral.** (a) Imagen intraoperatoria donde se aprecia la diferencia de calibre entre la pelvis y el uréter (flecha). (b) Imagen histopatológica de estenosis pieloureteral donde se aprecia el depósito de colágeno.

#### **1.4.4 Clínica:**

En la actualidad, debido al empleo de la ecografía prenatal, la gran mayoría de los pacientes son diagnosticados mientras se encuentran asintomáticos.

Dentro del grupo cuyo diagnóstico se realiza a partir de la sintomatología, el 30% de ellos se deben a una infección del tracto urinario. Otros pueden presentar retraso en el crecimiento, trastornos de alimentación, dolor o hematuria (26).

#### **1.4.5 Orientación terapéutica de la estenosis pieloureteral:**

El manejo de la estenosis pieloureteral puede ser médico conservador o quirúrgico según la evaluación global e individualizada de cada paciente.

##### **1.4.5.1 Actitud médica conservadora:**

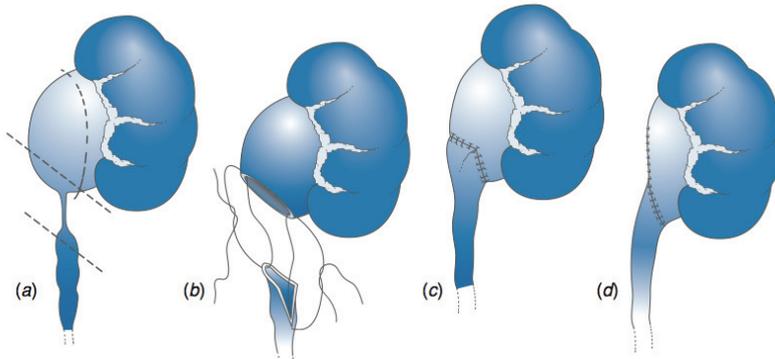
La estenosis pieloureteral que se mantiene asintomática y con una correcta función renal, puede manejarse de manera conservadora con un seguimiento clínico y radiológico. El control evolutivo se basa en ecografías seriadas para valorar el grado de dilatación renal y el estado del parénquima y en renogramas diuréticos para el seguimiento de la función renal y del drenaje urinario (27-29).

##### **1.4.6.2 Tratamiento quirúrgico:**

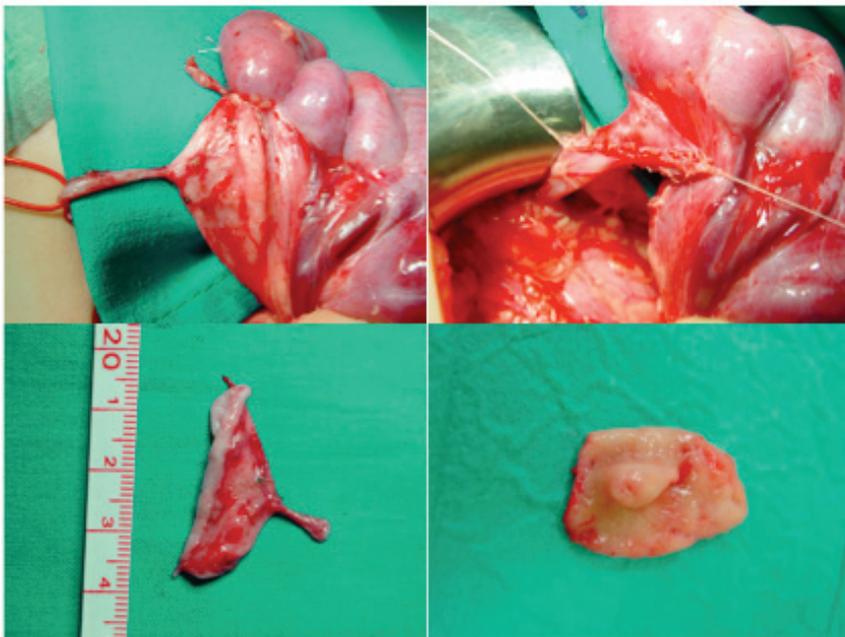
Cuando el paciente presenta clínica urinaria, un aumento progresivo de la dilatación renal, una alteración del parénquima en los controles ecográficos o la función renal empeora, el tratamiento debe ser quirúrgico.

La corrección quirúrgica de la obstrucción pieloureteral busca la preservación o mejoría de la función renal para su correcto desarrollo. Para ello se realiza la exéresis de la porción ureteral adinámica y se reanastomosa el uréter y la pelvis renal en el abordaje abierto o en el laparoscópico (Figuras 9 y 10), o se dilata la zona estenótica venciendo la limitación al paso del flujo urinario en el abordaje endoscópico (30, 31).

Las técnicas quirúrgicas convencionales progresivamente se ven desplazadas por abordajes endoscópicos y laparoscópicos pero en todas ellas el objetivo final es el mismo, restablecer un correcto paso del flujo urinario.



**Figura 9: Pieloplastia de Anderson-Hynes.** (a) Sección de unión pielouretral estenosada (b) Plastia y anastomosis tras exéresis de segmento estenótico (c y d) Resultado final, unión pielouretral amplia sin obstrucción al flujo urinario. Adaptada de kelalis, 2007 (3).



**Figura 10: Imagen intraoperatoria de una pieloplastia.** (a) Identificación de estenosis a nivel de la unión pielouretral (b) Anastomosis pielouretral tras exéresis de segmento estenótico (c y d) Visión macroscópica de la estenosis en la unión de la pelvis y uréter proximal.

## 2. Bases moleculares de la nefropatía obstructiva.

### 2.1 Desarrollo molecular del riñón:

La formación del sistema renal en el desarrollo embrionario se produce como resultado de la interacción de señales entre la yema ureteral y el mesénquima metanéfrico (32). Estos orígenes embriológicos diferentes hacen que existan diferentes enfermedades renales relacionadas con alguna alteración en la fase de desarrollo.

Desde 1993, al menos 400 genes han sido implicados en el desarrollo renal (33). El uso de ratones transgénicos en estudios experimentales lo ha facilitado, demostrando con la manipulación genética, diferentes fenotipos de enfermedad renal en el ser humano.

La determinación del territorio nefrogénico se desarrolla en las crestas urogenitales derivándose del mesodermo intermedio que se diferencia a partir del mesodermo mediante señales inductoras. La proteína morfogenética del hueso BMP-4 podría ser una de estas señales. Los genes Hox ( Hoxb-7, Hoxa-11 y Hoxd-11) , el gen Lim-1, que codifica un factor de transcripción de tipo homeoproteína, y el Pax-2 son genes implicados en la formación del riñón en etapas iniciales ya que los embriones mutantes para estos genes carecen de riñones (34).

El desarrollo renal, una vez determinado el territorio nefrogénico, continúa mediante fenómenos de inducción recíproca entre la yema ureteral y el mesénquima metanéfrico. Señales procedentes del mesénquima metanéfrico inducen la formación de la yema ureteral. Esta inducción está mediada en gran parte por el Factor Neurotrófico Derivado de células Gliales (Gdnf) secretado por el mesénquima metanéfrico. El GDNF interacciona con receptores de membrana presentes en las células epiteliales de la yema ureteral. Este complejo-receptor GDNF induce una señal intracelular en las células de la yema ureteral provocando su crecimiento y hundimiento en el mesénquima metanéfrico. La expresión de GDNF en el mesénquima metanéfrico depende del factor de transcripción Eya-1. Los ratones mutantes para este gen carecen de ojos y riñones; en ellos, el uréter no es capaz de invadir el mesénquima metanéfrico debido a la falta de expresión de GDNF (35).

Los genes de la familia *forkhead*, Foxc-1 y Foxc-2, podrían regular negativamente la expresión de Eya-1 y de Gdnf ya que en ratones mutantes

para estos genes la expresión de Gdnf y Eya-1 se extiende más anteriormente y podría explicar la formación de un segundo uréter y el desarrollo de riñones duplicados (36).

El uréter en desarrollo produce señales que originan la diferenciación del mesénquima y el inicio de la tubulogénesis. Uno de los genes importantes para la tubulogénesis del mesénquima metanéfrico es el gen supresor de tumores de Wilms (Wt-1). La expresión de Wt-1, en respuesta al efecto inductor del uréter, parece estar mediada por el factor de transcripción Pax-2. Los ratones mutantes nulos para el gen Wt-1 carecen de riñones, posiblemente porque el uréter no se desarrolla y no envía señales al mesénquima metanéfrico. Esto implica que la ausencia de expresión de Wt-1 impide la generación de señales desde el mesénquima metanéfrico que regularían la inducción y crecimiento del uréter (37, 38).

Uno de los factores mesenquimáticos inducidos por el uréter es el Wnt-4. Este factor se expresa en el mesénquima metanéfrico como respuesta al efecto inductor del uréter y es esencial para la tubulogénesis. La expresión inicial de Wnt-4 en las células del mesénquima metanéfrico es inducida por el uréter en crecimiento aunque posteriormente actuará directamente sobre el parénquima manteniendo su expresión debido a su capacidad autoreguladora (39, 40).

En la tubulogénesis, la molécula BMP-7, perteneciente a la familia de proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), coopera con Wnt-4. BMP-7 colabora también con el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF-2) en el control del desarrollo del riñón previniendo la apoptosis del mesénquima renal (41).

La señal inductiva producida por el uréter depende del factor de transcripción de tipo homeoproteína Emx-2 que se expresa en la yema ureteral. Los ratones mutantes con déficit del gen Emx-2 expresan Wt-1, Gdnf y c-Ret pero no expresan Wnt-4 y carecen de túbulos. Por lo tanto Emx-2 parece estar regulando la señal o señales iniciales que disparan la expresión de Wnt-4 en el mesénquima metanéfrico e inicia la tubulogénesis (42).

Los genes Bmp-7 y Fgf-2, secretados por el mesénquima renal, están implicados en la proliferación de las células del estroma (43).

El gen Pax-2 tiene un doble papel; (I) inicialmente activa la expresión de Wt-1 en el mesénquima renal, (II) en las fases de desarrollo de la nefrona inhibiría la expresión de Wt-1 dependiendo de un tercer factor que interacciona con ella

cambiando su función reguladora. Por lo tanto, la expresión de Pax-2 queda restringida a la parte distal de la nefrona mientras que Wt-1 se expresará en la parte proximal que dará lugar al glomérulo (44).

El factor de crecimiento plaquetario (PGF) es importante para la formación del glomérulo y la diferenciación de células mesangiales (45).

Esta amplia relación de genes implicados en el desarrollo molecular renal y resumidos en la tabla 2, muestra que se trata de un proceso complejo, resultante de la interacción entre dos estructuras principales del sistema renal, el uréter y mesénquima renal, que desencadenan una cascada de eventos que darán lugar a la formación del riñón.



GEN	FUNCIÓN	EN RATÓN HOMOCIGÓTICO (-/-)
<b>Wt-1</b>	Formación de la yema ureteral	Agenesia renal
<b>Pax-2</b>	Conversión mesénquima-epitelio	Agenesia renal, hipoplasia renal, riñones displásicos
<b>Wnt-4</b>	Morfogénesis de estructuras tubulares y pretubulares. Conversión mesénquima-epitelio	Riñones pequeños y displásicos.
<b>Gdnf</b>	Formación de la yema ureteral	Agenesia renal
<b>Ret</b>	Receptor del complejo GDNF- GDNFR Formación de la yema ureteral	Agenesia renal Riñones displásicos
<b>At-1</b>	Maduración de vasos glomerulares. Formación de pelvis renal	Ausencia de pelvis renal Glomérulos inmaduros
<b>At-2</b>	Apoptosis células mesénquima Desarrollo de la yema ureteral	Anomalías congénitas renales y del tracto urinario.
<b>Bcl-2</b>	Prevención de la apoptosis de células epiteliales	Agenesia renal
<b>Bf-2</b>	Elongación ureteral	Uréter corto. Riñones hipoplásicos. Rotación incompleta. Fusión renal.
<b>Bmp-4</b>	Inhibe Wnt-1. Previene formación de yema ureteral ectópica	BMP-4 <sup>+/-</sup> anomalías congénitas renales y del tracto urinario.
<b>Bmp-7</b>	Prevención de apoptosis pre-epitelial	Displasia renal
<b>Emx-2</b>	Inductor en la expresión de Wnt-4 metanéfrico. Prevención de apoptosis pre-epitelial	Agenesia renal. Degeneración del bulbo ureteral.
<b>Eya-1</b>	Inductor para la expresión de Gdnf y regulador de Bcl-2	Agenesia renal. Ausencia de formación del bulbo ureteral.
<b>Gdnfr</b>	Formación de la yema ureteral	Agenesia renal
<b>Kal-1</b>	Función específica no conocida	Agenesia unilateral o bilateral
<b>Id</b>	Formación de la yema ureteral	Agenesia renal o displasia.
<b>Pdgf-β</b>	Formación de células mesangiales	Ausencia de células mesangiales
<b>Pkd-1</b>	Morfogénesis tubular. Adhesión celular	Poliquistosis renal autosómica dominante
<b>Rar</b>	Actividad Hox	Agenesia o displasia renal
<b>Shh</b>	Inducción de la yema ureteral Desarrollo metanéfrico.	Riñones hipoplásicos.

**Tabla 2: Relación de genes que intervienen en el desarrollo renal e implicaciones derivadas de una alteración homocigótica en su expresión. Adaptada de Kelalis, 2007 (3).**

## **2.2 Biomarcadores de nefropatía obstructiva congénita:**

Un biomarcador se define como una característica objetiva y medible para evaluar tanto un proceso biológico normal, un proceso patológico o la respuesta a un tratamiento farmacológico (46).

A continuación pasamos a describir los diferentes tipos de biomarcadores en la nefropatía obstructiva congénita.

### **2.2.1 Anatómicos o estructurales:**

Las características ecográficas del parénquima y de la pelvis renal tanto en el periodo prenatal como en el postnatal aportan mucha información acerca de la uropatía obstructiva.

Una dilatación pélvica importante se correlaciona con la severidad de la obstrucción. La suma de dilatación calicial e hiperecogenicidad del parénquima renal se asocian con un peor pronóstico (47, 48).

El diámetro renal pélvico anteroposterior establece una estrecha relación como factor predictivo de la severidad de la obstrucción. Este parámetro se hace más fiable a partir de los quince días de vida del recién nacido cuando ya se encuentra fuera del periodo de oliguria y deshidratación fisiológica (49).

### **2.2.2 Funcionales:**

Durante el tercer trimestre de gestación y el periodo neonatal el flujo vascular renal y el filtrado glomerular renal (FGR) aumentan significativamente.

La obstrucción ureteral causa un aumento de la resistencia vascular intrarenal que en los estudios con ecografía doppler se traduce en un aumento del índice de resistencia. Sin embargo, este índice de resistencia no se demuestra como marcador de obstrucción renal en todas las series publicadas (50).

La vasoconstricción renal resultante de la obstrucción ureteral es dependiente de la angiotensina. El angiotensinógeno medido en orina se correlaciona con la concentración de angiotensina intrarenal, por lo que este parámetro podría ser un biomarcador a tener en cuenta en el estudio de un riñón obstruido (51, 52).

Otras mediciones que podrían aportar información acerca de la función renal serían la  $\beta$ 2-microglobulina fetal, la acetilglucosaminidasa y la concentración de sodio urinario.

La  $\beta$ 2-microglobulina se emplea como índice de FGR fetal y podría ser efectivo como factor predictivo de la función renal postnatal (53). En periodo postnatal la medición en orina de la acetilglucosaminidasa se ve incrementada en pacientes con uropatía obstructiva del tracto superior (50).

La concentración de sodio urinario es un indicador de la función tubular renal fetal. Valores inferiores a 90 mmol/l son normales a las 20-30 semanas de gestación, valores superiores podrían sugerir alteración de la función tubular como causa de un mal desarrollo renal (54).

### **2.2.3 Celulares o Moleculares:**

Los marcadores celulares o moleculares en la estenosis pieloureteral son múltiples, algunos de ellos se describen a continuación.

#### **2.2.3.1 Factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ):**

El TGF- $\beta$  es una citoquina producida por el riñón; los túbulos displásicos expresan TGF- $\beta$ . Es responsable de la apoptosis y aumento de depósito de matriz extracelular (MEC) (55).

En la nefropatía obstructiva, tanto por el daño renal instaurado por la apoptosis y el aumento de depósito de MEC como por la presencia de túbulos displásicos, la expresión de TGF- $\beta$  se encuentra elevada.

Esto explica que la excreción en orina del TGF- $\beta$  se encuentre aumentada en niños con estenosis pieloureteral (56). Otra citoquina cuya excreción en orina también está elevada en estos pacientes es la *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) (57).

#### **2.2.3.2 B-cell lymphoma-2 (BCL-2):**

En ratas sometidas a obstrucción ureteral los túbulos mínimamente dilatados expresan la oncoproteína BCL-2, mientras que en los que la dilatación es severa no (58). Esta característica lo hace un biomarcador histológico junto con el TGF- $\beta$  de progresión de nefropatía obstructiva.

### **2.2.3.3 Receptor angiotensina II (AT II):**

La pérdida del receptor AT II en ratones va ligado a alteraciones renales siendo la obstrucción de la unión pieloureteral una de ellas. La obstrucción ureteral desencadena la activación del sistema renina angiotensina (SRA) el cual es responsable de la fibrosis y deterioro de la función renal. En la uropatía obstructiva congénita un genotipo DD dentro del polimorfismo genético de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) presenta un daño renal significativamente superior a los otros genotipos II o DI (59). Todo esto hace pensar que el genotipo podría ser un factor pronóstico en la evaluación de los pacientes con obstrucción del tracto urinario.

### **2.2.3.4 Factor de crecimiento epidérmico (EGF):**

El EGF desempeña un papel fundamental en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (60). Se sintetiza en las células tubulares y distales y su expresión se encuentra aumentada durante el proceso de maduración renal (61).

En estudios experimentales, se observó que en la obstrucción ureteral unilateral crónica en ratas, la expresión de EGF disminuía (62, 63). Grandaliano et al, pusieron en relación la disminución en orina del EGF en pacientes con estenosis de la unión pieloureteral frente al grupo control (57). Sin embargo, está hipótesis no se ha visto corroborada en estudios posteriores y el EGF no se considera como un marcador clínico de importancia (64).

### **2.2.3.5 Endotelina-1 (ET-1):**

La ET-1 es un péptido vasoconstrictor cuya potencia vasoconstrictora es 10 veces superior a la de la angiotensina II (65, 66). Su relación con el daño y disfunción renal derivado de una obstrucción ureteral, ha quedado demostrada en diferentes trabajos tanto experimentales como clínicos.

Hegarty et al, analizaron la expresión de ET-1 en ratas sometidas a obstrucción ureteral. La expresión de ET-1 se encontraba elevada en los riñones sometidos a la obstrucción y disminuida en las determinaciones realizadas en el riñón contralateral. Administrando un antagonista del receptor de ET-1, el grupo de ratas con obstrucción ureteral experimentaba una reducción de la apoptosis y la restauración del flujo vascular renal (67).

Por otro lado, Miller et al, compararon la expresión del gen ET-1 en ratas con estenosis de la unión pieloureteral y ratas sin estenosis. La expresión del gen en la pelvis renal y unión pieloureteral era superior en aquellas ratas que tenían estenosis. Ante estos resultados concluyeron que el aumento en la expresión del gen ET-1 en la obstrucción de la unión pieloureteral desempeña un papel importante en la fisiopatología de la obstrucción ureteral (68).

Al analizar la expresión de ET-1 en el tejido de las estenosis pieloureterales congénitas en niños, Kner et al, hallaron niveles aumentados con respecto al grupo control (69).

Otro grupo de estudio, Taha et al, analizaron los niveles de ET-1 en orina en pacientes con estenosis de la unión pieloureteral. Los niveles de ET-1 en orina eran significativamente superiores a los del grupo control. Esto supone que el ET-1 en vejiga es un buen marcador en el diagnóstico de la estenosis de la unión pieloureteral (70).

#### **2.2.3.6 Enzimas urinarios:**

En la nefropatía obstructiva se producen cambios y alteraciones a nivel de los túbulos proximales dañando las células de membrana. Esto se traduce en la liberación de enzimas lisosomales como la *N-Acetyl-B-D-Glucosaminidase* (NAG), *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) y *Alkaline de Phosphatase* (ALP). Diferentes estudios han demostrado que la expresión estas enzimas tubulares (NAG, GGT y ALP) se encuentran elevadas en la orina recogida a nivel pélvico con respecto a la orina recogida a nivel vesical en pacientes con estenosis pieloureteral (50, 71). Recientemente se ha demostrado que, en orina de pacientes con uropatía obstructiva, se encuentra elevada incluso hasta diez veces en comparación con pacientes sin obstrucción (72). Este dato podría ser empleado como una herramienta más a la hora de indicar un manejo conservador o quirúrgico de la patología.

Taha et al y Tataranni et al, estudiaron que los niveles en orina de NAG, tras la resolución de la estenosis, permanecían todavía elevados a los 45 días postcirugía y que sus niveles descendían con respecto a los preoperatorios entre los tres y seis meses (71, 73). Esto indica que la recuperación funcional y ultraestructural renal no es inmediata tras su reparación. Se ha demostrado,

además, una correlación negativa entre la función renal y la expresión de estos biomarcadores en la estenosis pieloureteral (71).

### **2.2.3.7 Microproteínas:**

Una de las principales funciones del glomérulo es la filtración selectiva de proteínas plasmáticas. Las proteínas de bajo peso molecular son filtradas en el glomérulo y se reabsorben en su totalidad en los túbulos renales. La presencia en orina de estas proteínas, como por ejemplo la  $\beta$ 2-microglobulina, es un signo de disfunción tubular.

Las proteínas de alto peso molecular no son filtradas por el glomérulo en condiciones normales. Si se produce inflamación o daño en la membrana basal aumenta la permeabilidad glomerular y estas proteínas, como la microalbúmina y microproteínas totales, se filtran. Por lo tanto la presencia de microalbúmina y microproteínas totales en orina es un signo de daño glomerular (74).

En estudios experimentales tanto el índice  $\beta$ 2-microglobulina/creatinina como el de microalbúmina/creatinina en orina se encuentran elevados tras una semana de obstrucción ureteral completa (75).

En pacientes con estenosis pieloureteral, los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina en orina extraída de la pelvis renal dilatada durante su reparación quirúrgica son superiores a los niveles de la orina a nivel vesical (50).

Los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina, microalbúmina y microproteínas totales, en el grupo de pacientes con estenosis pieloureteral son superiores con respecto al grupo control y no descienden hasta los cuatro meses posteriores a la cirugía en el caso de la  $\beta$ 2-microglobulina y dieciocho meses en el de la microalbúmina (73, 76).

## **2.3 Rutas implicadas en la génesis de la nefropatía obstructiva:**

En este apartado se trata de definir las principales rutas implicadas en la génesis de la nefropatía obstructiva (Figura 11).

### **2.3.1 Factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ):**

El TGF- $\beta$  es una citoquina que se activa ante una lesión del tejido y puede actuar sinérgicamente con otros factores de crecimiento estimulando o

inhibiendo el depósito de matriz extracelular (MEC) mediante el reclutamiento de fibroblastos.

El exceso en el acúmulo de proteínas de MEC, como la fibronectina, el colágeno y los proteoglicanos, produce una inhibición de las proteasas y un bloqueo en la degradación de la matriz que se traduce en fibrosis (77-79).

En modelos humanos y animales con obstrucción del tracto urinario se ha demostrado tanto en tejidos como en orina el aumento de TGF- $\beta$  (56, 80).

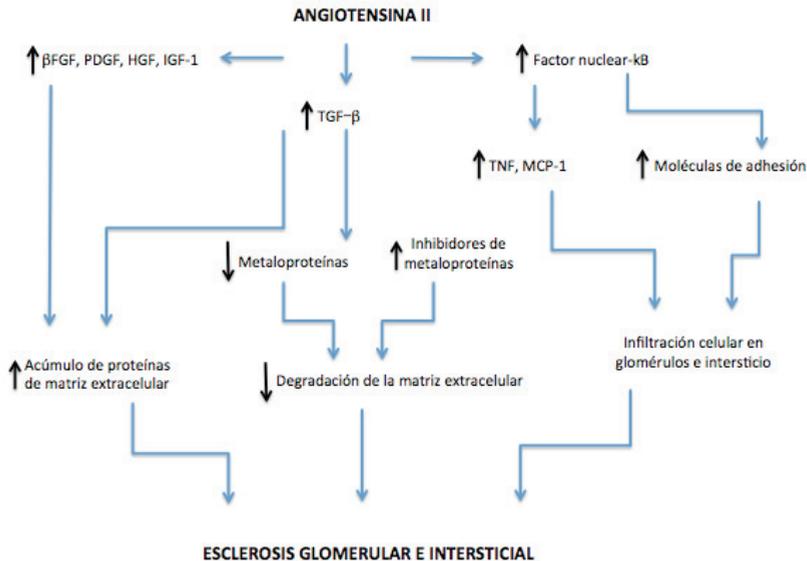
El TGF- $\beta$  desencadena múltiples vías bioquímicas que conducen a una fibrosis renal en el deterioro renal mediante la infiltración de macrófagos y fibroblastos. Todo esto lo sitúa como un potencial biomarcador del daño renal subclínico.

### **2.3.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA):**

El SRA está implicado en la fisiopatología de la fibrosis renal como consecuencia de la obstrucción del tracto urinario disminuyendo la proliferación celular y aumentando la apoptosis celular (81, 82).

Como consecuencia de la obstrucción ureteral, el SRA desencadena una serie de cambios a nivel renal tales como el aumento de actina en el musculo liso y aumento del TGF- $\beta$  que activa de una manera dependiente o independiente la fibrosis renal mediante el Activador de Plasminógeno 1 (AP-1) que impide el paso de plasminógeno en plasmina (61, 83-86).

El SRA está presente en el desarrollo renal normal, pero en los casos de uropatía obstructiva puede ser un promotor de la fibrosis y acentuar el daño renal a través de diversos mecanismos.



**Figura 11: Rutas implicadas en la génesis de la nefropatía obstructiva.** La angiotensina II estimula la síntesis de varios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de tumores (TGF-β), el derivado de las plaquetas (PGF), el similar a la insulina (IGF-I), el básico de los fibroblastos (bFGF) y el de los hepatocitos (HGF). De ellos, el más importante en la patología renal es el TGF-β, pero todos comparten la capacidad para estimular el crecimiento celular y la fibrosis glomerular e intersticial a través de un incremento en la síntesis de proteínas de matriz extracelular. El TGF-β, además inhibe la degradación de esta matriz, aumentando la actividad de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) e inhibiendo estas últimas. Aumento de la actividad oxidativa y en la síntesis de diversas citocinas proinflamatorias (TNF, MCP-1, RANTES, moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1) que contribuyen decisivamente en la infiltración intersticial de macrófagos y otras células. La síntesis de muchas de estas citocinas es regulada por el factor de transcripción NF-κB, el cual es activado directamente por la angiotensina II. Adaptada de L. Hernando, 2003 (87)

### 2.3.3 Apoptosis:

En la obstrucción ureteral crónica las células tubulares e intersticiales se programan para su apoptosis mediante la activación de enzimas citolíticas denominadas caspasas. Este proceso conlleva a una pérdida de tejido renal (88, 89).

Numerosas y distintas vías como factores de crecimiento, citoquinas o la angiotensina II son capaces de iniciar la apoptosis.

El factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) induce la transcripción de varios genes como la familia *bcl-2*, el angiotensinógeno y mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF). A su vez la angiotensina II y el TNF estimulan la activación del NF- $\kappa$ B reforzando así un ciclo de retroalimentación positiva entre ellos en el proceso de apoptosis y la consecuente pérdida de tejido renal.

#### **2.4 Bases genéticas en el desarrollo de la obstrucción del tracto urinario:**

El paso de orina desde la pelvis renal hacia la vejiga precisa una correcta y coordinada peristalsis pieloureteral llevada a cabo por las células de músculo liso ureteral. Además de esto, otros factores, como los neuronales, están implicados.

El origen, embriológicamente diferente, del sistema excretor y del colector hace que el complejo proceso de ensamblaje de estos dos sistemas pueda derivar en diferentes fallos (90) (Tabla 3).

El gen *Bmp4* se expresa en el mesénquima y es un gen esencial en la formación de las células de músculo liso uretral. El factor de transcripción T-box 18 (*Tbx-18*) se expresa específicamente en el mesénquima ureteral. La inactivación de *Tbx-18* conlleva la pérdida de expresión del gen *Bmp4* en el mesénquima ureteral desencadenando un defecto en la diferenciación de las células de músculo liso ureterales (91).

Alteraciones del sistema renina angiotensina (SRA) están implicadas en la nefropatía obstructiva ya que se relacionan con la diferenciación de las células musculares ureterales (92).

La calcineurina, que es una fosfatasa serina/treonina calcio dependiente, defosforila el *Nuclear Factor of Activated T cells* (*Nfat*), encargado de activar la cadena de transcripción de numerosos genes.

La inactivación de la calcineurina en el metanefros y mesénquima ureteral conlleva una alteración en el desarrollo de las células de músculo liso del sistema urinario lo que provoca una disfunción en la peristalsis pieloureteral (93).

Estudios recientes han demostrado como la activación transgénica de *Nfat* también desencadena severas anomalías como la hidronefrosis o hidrouréter.

Por lo tanto la vía calcineurina-*Nfat* es determinante para un correcto desarrollo del sistema renal (94).

Gen	Función	Síndrome	Fenotipo
<b>Pax-2</b>	Factor de transcripción	Síndrome renal-coloboma	Hipoplasia renal, riñón único, reflujo vesicoureteral, coloboma del nervio óptico, sordera.
<b>Kal</b>	Migración neuronal	Síndrome Kallmann	Hipogonadotropismo hipogonadismo, anosmia, malformaciones de manos, paladar ojival, ataxia cerebral, agenesia renal. Secuencia Potter, doble sistema, reflujo vesicoureteral, ausencia de vasos deferentes
<b>Eya-1</b>	Organogénesis	Síndrome branquioto-renal	Quistes o fístulas branquiales, malformaciones de pabellón auricular, cataratas, anomalías segmento anterior ocular, agenesia renal con contralateral hipodisplasia, hipodisplasia bilateral, agenesia renal bilateral, obstrucción unión pieloureteral, reflujo vesicoureteral, riñones bífidos.
<b>Agtr-2</b>	Receptor de angiotensina II		CAKUT
<b>Hnf-1</b>	Organogénesis. Factor 1B hepatocito	Diabetes juvenil	Diabetes juvenil no insulino-dependiente, quistes renales, enfermedad glomeruloquística renal, monorroño, anomalías Müllerianas.

**Tabla 3 . Alteraciones genéticas en las anomalías congénitas reales y del tracto urinario (CAKUT). Adaptada de Kelalis, 2007 (3).**

### 3. Diagnóstico por imagen de la estenosis pieloureteral.

#### 3.1 Ecografía:

El empleo de la ecografía en el control del embarazo y en los niños tras infecciones del tracto urinario ha aumentado la frecuencia del diagnóstico de hidronefrosis.

La obstrucción de la unión pieloureteral corresponde a la mitad de las hidronefrosis detectadas en periodo perinatal siendo esta la anomalía más frecuentemente detectada durante el control del embarazo (95).

La ecografía es un método diagnóstico no invasivo, portátil, que no emite radiaciones ionizantes, que no precisa medios de contraste y que su empleo no está limitado por la función renal (Figura 12). Por todos estos motivos se considera el método *gold standar* en el *screening* y seguimiento evolutivo de

los pacientes en la valoración del tamaño renal, grosor de la cortical y grado de dilatación.

La Sociedad de Urología Fetal (SFU) propuso una graduación según el nivel de hidronefrosis (96). Esta clasificación se basa en la afectación o no de los cálices y del parénquima renal para clasificar los grados de hidronefrosis desde el grado I al IV. Los grados I y II corresponden a un grado leve de pelviectasia. Los grados III y IV representan una verdadera hidronefrosis; además el grado IV presenta una cortical adelgazada (Tabla 4).

GRADO DE HIDRONEFROSIS	HALLAZGOS ECOGRÁFICOS
0	Sin dilatación de la pelvis renal
I	Dilatación pélvica intrarrenal
II	Dilatación pélvica extrarrenal sin dilatación calicial
III	Dilatación de la pelvis y de los cálices sin adelgazamiento cortical
IV	Adelgazamiento del parénquima renal

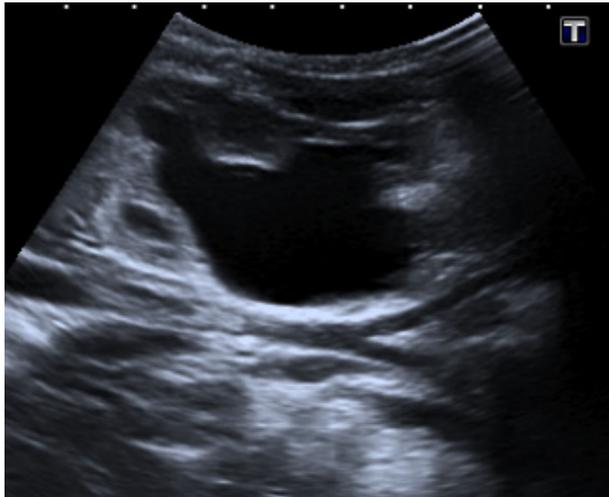
**Tabla 4: Clasificación de la hidronefrosis según la Sociedad de Urología Fetal.**

Existe una relación bien establecida entre el diámetro anteroposterior de la pelvis renal en las ecografías prenatales y la posibilidad de desarrollar una patología postnatal significativa. La mayoría de los autores emplean como límite un diámetro superior a 5 mm antes de las 30 semanas de edad gestacional y de 10 mm en las posteriores (97).

Bouzada et al determinan una sensibilidad del 100% en la detección de sistemas renales que precisaron corrección quirúrgica en pacientes con un diámetro antero posterior en la ecografía postnatal superior a 15 mm (98). Con este y otros estudios se puede establecer la relación que existe entre la

dilatación pélvica renal con la necesidad de cirugía en el manejo de la estenosis pieloureteral (48, 99).

Con todo lo expuesto anteriormente, las ventajas del empleo de la ecografía en el diagnóstico y seguimiento de la estenosis pieloureteral quedan patentes, sin embargo, presenta un gran inconveniente, no aporta información acerca de la función renal.



**Figura 12: Ecografía renal.** *Grave dilatación pielocalicial acompañada de adelgazamiento cortical.*

### 3.1.1 Ecografía doppler:

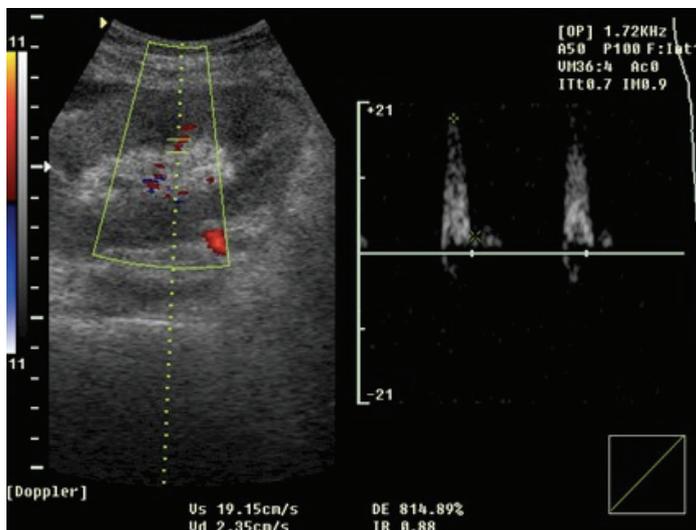
Debido a las limitaciones de la ecografía para la distinción entre patología obstructiva y no obstructiva, el empleo de la ecografía doppler puede aportar información adicional en el diagnóstico de este tipo de uropatías.

La obstrucción fisiopatológicamente causa un aumento en la resistencia de la arteria renal lo que conlleva a una disminución del flujo diastólico con respecto al flujo sistólico. Con estos datos se puede calcular la resistencia arterial renal mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Pico velocidad máxima sistólica} - \text{Pico velocidad mínima diastólica}}{\text{Pico velocidad sistólica}}$$

El resultado de esta fórmula es el índice de resistencia. Numerosos estudios han documentado que un índice de resistencia superior a 0.70 y una diferencia entre ambos riñones superior a 0.08 es un criterio sugestivo de una patología renal obstructiva (100-102) (Figura 13).

A pesar de que la ecografía doppler aporta información acerca de la presencia o no de obstrucción, las técnicas ecográficas se emplean como métodos de *screening* y seguimiento. Para la determinación de la función renal existen otras pruebas diagnósticas específicas en las que además del estudio de la funcionalidad renal también aportan datos anatómicos.



**Figura 13: Ecografía doppler renal.** Presenta un índice de resistencia de 0.88 sugestivo de patología obstructiva por ser superior a 0,70.

### 3.2 Estudios Isotópicos:

En la era de la imagen multimodal el renograma diurético es uno de los procedimientos establecidos para la evaluación diagnóstica de la dilatación del tracto urinario y para el seguimiento de la hidronefrosis. En la práctica clínica el renograma diurético es el método de elección para diferenciar un sistema urinario dilatado pero no obstruido de una verdadera estenosis, y contribuye al manejo de los pacientes con hidronefrosis al monitorizar tanto el drenaje urinario como la función renal.

### 3.2.1 Renograma diurético:

El renograma evalúa el tránsito, a través del riñón, de la actividad procedente de un radiofármaco administrado por vía intravenosa que se elimina por vía urinaria a lo largo del tiempo. El renograma diurético es un procedimiento fácil, que con una baja dosis de radiación, proporciona datos clínicos funcionales de cada unidad renal, así como de la dinámica del drenaje o excreción urinaria. Actualmente se encuentra plenamente establecido en el proceso diagnóstico de las dilataciones del tracto urinario superior, ya que en la mayoría de ocasiones permite diferenciar situaciones de dilatación sin obstrucción de las estenosis verdaderas.

### 3.2.2 Radiofármaco:

La elección del radiofármaco actualmente varía entre tres opciones que son: 123-ortoiodohipurato ( $^{123}\text{IOIH}$ ), dietilentriaminopentaacético marcado con Tecnecio  $^{99}$  ( $^{99\text{m}}\text{TcDTPA}$ ) y mercaptoacetiltriglicerina marcado con Tecnecio  $^{99}$  ( $^{99\text{m}}\text{TcMAG3}$ ). Los trazadores tubulares,  $^{123}\text{IOIH}$  y  $^{99\text{m}}\text{TcMAG3}$ , debido a su alta tasa de extracción renal y a su rápido aclaramiento plasmático, se prefieren al agente glomerular,  $^{99\text{m}}\text{TcDTPA}$ , especialmente en niños y en pacientes con deterioro de la función renal (103, 104).

En la actualidad,  $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG3}$  es el agente de elección. Tras su inyección se une casi un 90% a proteínas plasmáticas, lo que disminuye la fracción que es filtrada por el glomérulo. La eliminación es rápida y ocurre por secreción tubular, en la porción distal del túbulo proximal. Proporciona una imagen excelente, incluso en situaciones de insuficiencia renal.

### 3.2.3 Diurético:

La furosemida es un potente diurético de asa que produce un incremento agudo del flujo de orina. Su efecto diurético comienza entre 1 y 2 minutos después de su administración. Las dosis recomendadas son 1 mg/kg en menores de 1 año, 0.5 mg/kg en niños mayores de un año, con un límite de 20 mg (103, 105-107). En casos de insuficiencia renal severa, la respuesta a la furosemida es mucho menor. Una función renal conservada (>15 ml/min) y una hidratación adecuada son los mayores determinantes de una respuesta eficaz a la furosemida (105, 108).

En relación a la inyección del diurético (Furosemida) existen actualmente tres opciones aceptadas: F+20, F0 y F-15, según el intervalo de tiempo transcurrido entre la administración del trazador y el diurético. El momento de la inyección está designado en minutos junto a la letra "F". Hasta la fecha no hay datos que apoyen que un determinado momento de la administración del diurético presente ventajas frente a los otros (103, 105-107). En la mayoría de centros, el protocolo estándar empleado es el F+20, reservando el F-15 para casos con importante dilatación conocida o en pacientes con F+20 dudoso.

### **3.2.4 Evaluación curvas actividad/tiempo:**

Las curvas actividad tiempo, corregidas con el fondo, se emplean para valorar la función renal diferencial y estudiar el drenaje urinario.

#### **3.2.4.1 Función renal diferencial:**

En el caso de utilización de  $^{99m}\text{TcMAG3}$  se recomienda la utilización del análisis, con sustracción de fondo, de la curva entre el minuto 1-2 para evaluar la función renal diferencial.

La función renal diferencial representa la contribución de cada unidad a la función global. El rango normal se sitúa entre 45-55% y se obtiene por el cálculo del área bajo la curva del renograma en el tiempo del intervalo seleccionado (106, 107).

Este parámetro puede emplearse para detectar deterioro de la función renal (unidad con menos del 40% o disminución de más de un 5% respecto al control previo) y servir, en algunos casos, de valor para la decisión quirúrgica.

#### **3.2.4.2 Curvas del renograma:**

En la curva del renograma podemos distinguir tres fases. La primera muestra un ascenso rápido tras la inyección intravenosa del trazador y refleja tanto la velocidad de la inyección (bolo adecuado) como el aporte arterial al riñón. La segunda fase muestra una pendiente más moderada, que se corresponde con el manejo renal del trazador, pasando desde las células tubulares hasta los sistemas tubulares de las nefronas. Hacia los 2-5 minutos se alcanza el máximo y con ello el inicio de la tercera fase. Este pico puede estar retrasado tanto en patología obstructiva como en problemas vasculares o parenquimatosos. La

tercera fase es fundamentalmente de eliminación, reflejando el balance entre la actividad que llegó al riñón y la que se elimina.

En un intento por complementar el análisis de las curvas se han introducido diferentes parámetros cuantitativos. De ellos, el más extendido ha sido el T1/2 postfurosemida, entendido como el tiempo en que la curva actividad-tiempo disminuye a la mitad del máximo. Se ha establecido el tiempo de 20 minutos como el que identifica obstrucción, siendo normal inferior a 10 minutos.

### **3.2.5 Evaluación de la respuesta al diurético:**

Los dos factores que principalmente condicionan la respuesta a la furosemida son la función renal y el volumen del sistema colector. Una función renal deteriorada (Filtrado Glomerular Renal de una unidad renal inferior a 15 ml/min/m<sup>2</sup>) y sistemas colectores con gran capacidad son las causas más frecuentes de falsos positivos (105, 109).

En la actualidad la valoración de la respuesta a la furosemida ha cambiado respecto al criterio inicial. La pendiente de la curva de respuesta se utiliza para valorar el drenaje urinario, pero la valoración exclusiva de esta pendiente no es el modo más adecuado en todos los casos. Existe una minoría de riñones hidronefróticos que muestran una curva de drenaje deficiente, incluso con un T1/2 postfurosemida patológico y que sin embargo, no están obstruidos. Este hecho está en relación con el efecto "reservorio" de la pelvis dilatada, que acumula lentamente el radiofármaco no detectándose eliminación significativa durante el tiempo que dura el renograma. Las pelvis grandes necesitan más tiempo para rellenarse pero también más tiempo para vaciarse. Además, dentro de la pelvis se produce una dilución del radiofármaco por lo que hay que extremar la cautela en concluir que existe obstrucción. Es un error frecuente inferir que la obstrucción está establecida solo porque apreciamos un mal drenaje urinario (110).

La valoración de las imágenes postmicionales ha ganado importancia, de modo que aún en circunstancias en las que se constata pobre respuesta tras la administración de furosemida, si se observa un drenaje completo en las imágenes postmicionales se puede excluir una obstrucción (106). Es importante conocer que si se constata drenaje en cualquier punto del

renograma diurético, la obstrucción se excluye y el riesgo de deterioro para el riñón es pequeño.

#### **3.2.5.1 Estudio normal:**

El análisis visual de las imágenes obtenidas nos muestra unos riñones relativamente simétricos, con captación parenquimatosa homogénea y aparición precoz de la actividad en sistemas colectores y vejiga. El aclaramiento de dicha actividad ocurre casi por completo antes de la administración del diurético (cuando se planifica un estudio F+20) (Figura 14a).

#### **3.2.5.2 Ausencia de respuesta al diurético:**

El patrón típico de una respuesta obstructiva muestra el incremento creciente de la actividad a lo largo del tiempo de estudio en la unidad renal afectada, con actividad acumulada en el sistema pielocalicial sin que presente disminución tras la administración de la dosis diuréticas ni en las imágenes postmiccionales o tras cambio postural (Figura 14b).

#### **3.2.5.3 Patrón de dilatación no obstructiva:**

Característicamente presenta un marcado incremento de la actividad en sistemas colectores dilatados, que responden, aunque a veces tardíamente, a la administración del diurético.

#### **3.2.6 Parámetros cuantitativos:**

En un intento por cuantificar el tránsito del trazador en el riñón se han utilizado diferentes parámetros cuantitativos, desde el T<sub>max</sub> (tiempo en alcanzar el máximo de la curva, o tiempo al pico) hasta los análisis de deconvolución. OE (output efficiency) es la cantidad de trazador, en porcentaje, que ha sido eliminada por el riñón en el tiempo "t", respecto a la que el riñón ha extraído del torrente vascular. NORA (Normalized Residual Activity) es la actividad que permanece en el riñón en el tiempo "t" expresada en relación a la actividad entre el minuto 1-2. La ventaja de estos parámetros es que proporcionan una estimación del lavado renal, independientemente de la función diferencial de los riñones (106).

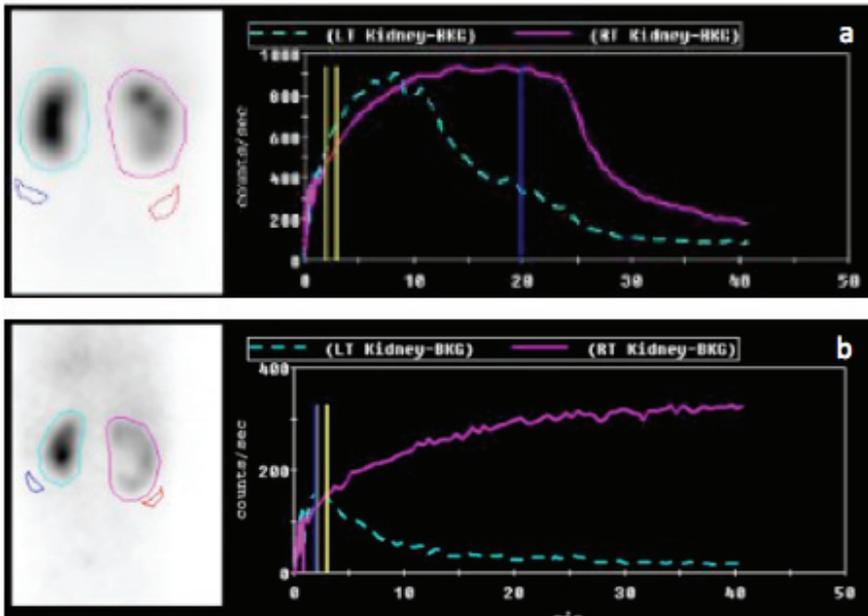


Figura 14: *Renograma diurético.* (a) *Renograma diurético no obstructivo* (b) *Renograma diurético obstructivo.*

### 3.3 Resonancia magnética:

La resonancia magnética urográfica (RMU) se introdujo en el estudio de la patología renal obstructiva a finales de los años 80. Desde entonces su empleo está cada vez más extendido.

Las ventajas en el empleo de la RMU es la excelente visión anatómica que aporta al estudio de la patología obstructiva evitando la radiación (Figura 15).

A finales de los años 90, el avance fue mayor con la combinación de la RMU y gadolinio-DTPA (Gd-DTPA), resonancia magnética urográfica con gadolinio (Gd-RMU). Con esta conjugación se puede realizar una excelente evaluación anatómica, de la función renal y del grado de obstrucción.

El cálculo de la función renal diferencial (FRD) en la Gd-RMU se realiza a través de la fórmula:

$$\frac{\text{Volumen renal individual}}{\text{Volumen renal derecho-Volumen renal izquierdo}} \times 100$$

Los datos publicados acerca de la FRD obtenida por el renograma diurético (RD) y Gd-RMU muestran una gran correlación entre ambos (111-113).

El tiempo de tránsito del radiofármaco transcurrido desde la pelvis hasta el uréter se contabiliza como RTT. Un paso sin alteraciones obstructivas se correspondería con un RTT inferior o igual a 4 minutos, un paso obstruido este parámetro sería igual o superior a 8 minutos y un estado indeterminado sería un RTT comprendido entre 4 y 8 minutos.

La información aportada por la Gd-RMU acerca de la anatomía, función renal y estado de obstrucción hace que sea un método idóneo para la evaluación de la estenosis pieloureteral.

La Gd-RMU comparada con el RD tiene una mayor sensibilidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficiencia (111). Sin embargo todavía su uso no está extendido en la práctica diaria pues presenta ciertos inconvenientes tales como la necesidad de sedación de los niños para el estudio y su elevado coste.



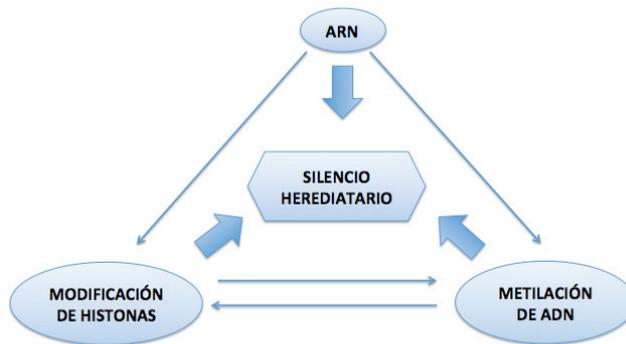
**Figura 15: Uroresonancia magnética.** Se aprecia un sistema renal izquierdo con una pelvis tremendamente dilatada y una zona clara de estenosis a nivel de la unión pieloureteral (flecha) que dificulta el paso desde la pelvis renal hacia el uréter.

## 4. Epigenética

### 4.1 Definición:

La epigenética se puede definir como aquellos cambios hereditarios en las pautas de expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN (114).

Los tres mecanismos básicos referidos como fenómenos epigenéticos son: la metilación del ADN, la modificación de las histonas y la intervención de secuencias de pequeños ARN no codificantes (115-117) (Figura 16).



**Figura 16: Fenómenos epigenéticos.** Mecanismos epigenéticos: metilación, modificación de las histonas y la intervención de pequeños ARN no codificantes. Todos estos fenómenos interfieren en el patrón hereditario sin que ocurra alteración alguna en la secuencia de nucleótidos de ADN.

### 4.2 Visión histórica de la epigenética:

El nacimiento de la epigenética procede de un cruce de caminos entre la biología del desarrollo y la genética en los años 40 del siglo XX. Uno de los patriarcas de este camino fue Sir Conrad Waddington, profesor de Genética de la Universidad de Edimburgo, que introdujo la teoría de plasticidad fenotípica y epigenética (118). Se refería a la epigenética, como amalgama entre genética Mendeliana clásica y epigénesis, que es la teoría en la que los órganos embrionarios surgen de la nada mediante la inducción por parte del ambiente, haciendo hincapié en su importancia en el desarrollo embrionario (Harlsberg, 2010). Waddington definía la epigenética como “una interacción casual entre genes y sus productos que conforman el fenotipo”, lo que en el lenguaje

contemporáneo corresponde a “una actividad heredada del ADN, que no depende de la secuencia nativa del mismo” (119).

Desde las primeras publicaciones de Waddington en 1940 hasta los años 70 del siglo XX, los mecanismos epigenéticos eran todavía desconocidos, así como algunos fenómenos asociados epigenéticos como la diferenciación de célula troncal de médula ósea o la desactivación del cromosoma X en los mamíferos.

Las primeras evidencias de metilación o demetilación como un proceso biológico importante aparecieron basados en los cambios enzimáticos de la citosina en el ADN que propusieron Griffith y Mahler en 1969 en el trabajo sobre memoria a largo plazo (120). Más tarde Riggs, en el año 1975, fue el primero que describió el fenómeno de desactivación del cromosoma X (121). Independiente y simultáneamente, Holliday y Pugh publicaron trabajos similares (122).

El “renacimiento” del interés por la epigenética, se debe a una revisión de estudios de Waddington, (123) que supuso “un papel crítico que encendió la mecha para la explosión de utilización de la epigenética en 1990” (124).

¿Cuáles son las novedades aportadas por el control epigenético de la expresión?

- (i) Son cambios funcionales y no estructurales del ADN que forman parte de la maquinaria de regulación génica.
- (ii) Se observan cambios epigenéticos continuos y cuantitativos que no se acumulan.
- (iii) Los cambios epigenéticos son reversibles.
- (iv) Los cambios epigenéticos son heredables.
- (v) Los cambios epigenéticos son el nexo de unión entre genes y factores medioambientales, que puede explicar algunas relaciones “misteriosas” entre mutaciones espontáneas y selección, en el contexto de la teoría neo-Darwiniana.

En la actualidad el estudio epigenético ha centrado la investigación de la herencia no sólo en la línea germinal, sino también en las células somáticas durante el desarrollo embrionario. El desarrollo embrionario, desde esta perspectiva, puede considerarse como una serie de decisiones que determinan

o condicionan el destino de las células en función a una respuesta generada por una posición determinada.

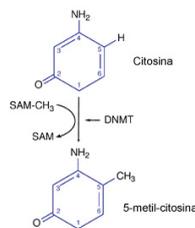
### 4.3 Metilación.

#### 4.3.1 Bases bioquímicas de la metilación del ADN. Islas CpG:

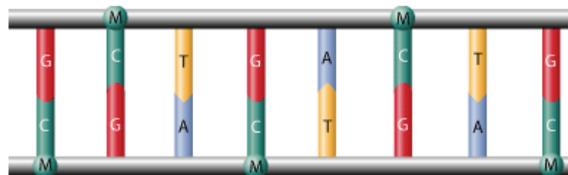
Desde el punto de vista bioquímico, la metilación consiste en la adición enzimática de un grupo metilo de la *S-adenosil-L-metionina* al carbono 5 de la citosina (C) del ADN, situada previa y contiguamente a una guanina (G) (125) (Figura 17). El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado, que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica (126).

La reacción de metilación se realiza y se mantiene mediante interacción de una familia de enzimas; las ADN-metiltransferasas (DNMTs), que incluyen DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (127).

A.



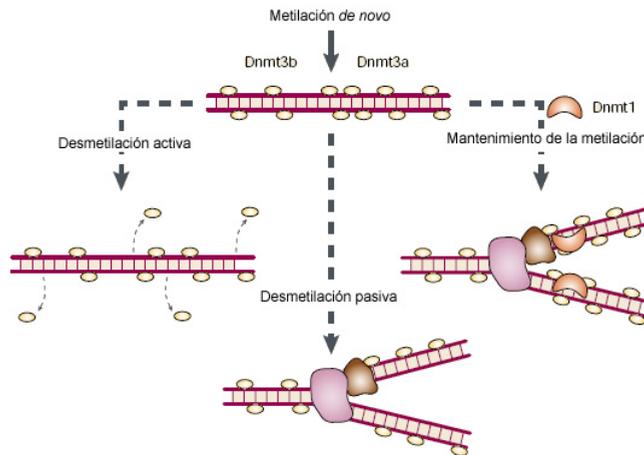
B.



**Figura 17: Metilación del ADN.** a. Adhesión enzimática del grupo metilo (CH<sub>3</sub>) al carbono 5 de la citosina situada previa y contiguamente a la guanina. b. Estructura terciaria de un fragmento de ADN metilado.

El papel biológico de la ADN metiltransferasa-1 de mantenimiento (DNMT1), consiste en la metilación en una hebra del ADN al inicio de la replicación. Los patrones de metilación de las células somáticas son generalmente estables y heredables.

Sin embargo, las células germinales durante el desarrollo embrionario temprano, son reprogramadas ampliamente, siendo la metilación de novo, por parte de las ADN metiltransferasa DNMT3a y DNMT3b, particularmente activas en estos estadios (128) (Figura 18).



**Figura 18: Metilación de novo.** Los grupos metilo pueden ser introducidos al ADN no metilado por las enzimas de metilación de novo DNMT 3a y DNMT 3b. Cuando el ADN se replica, el grupo metilo de la hebra guía es reconocido y se introduce uno nuevo en la hebra hija por medio de la actividad de DNMT1. En presencia de DNMT1 los patrones de metilación se mantienen. La desmetilación puede ocurrir en ausencia de DNMT1 en replicación continua de ADN (desmetilación pasiva) y de forma pasiva sin replicación de ADN. Adaptado de Dean, 2001 (129).

En general, el genoma de las células germinales femeninas se encuentran menos metilado que el de las masculinas. El patrón de metilación es borrado por una demetilación generalizada cerca del estadio germinal de 8 células. A partir de entonces, la metilación del ADN adquiere patrones específicos durante el desarrollo embrionario y se establece el patrón de metilación de las células somáticas (126, 130, 131).

Las metiltransferasas tienen afinidad estricta por la secuencia CpG. Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano.

En el 98% del genoma, los CpG se encuentran en promedio de uno por cada 80 dinucleótidos. Existen regiones desde 200 pb a varias kilobases que tiene una frecuencia cinco veces superior de dinucleótidos CpG (> 60% de CG) denominadas "islas CpG". Aproximadamente entre el 60 y el 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están. En general, la islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas (126, 132, 133).

#### **4.3.2 Papel de la metilación del ADN en procesos de desarrollo y enfermedad:**

Los factores epigenéticos son factores etiológicos de enfermedades ya que (134):

- 1.El estado epigenético de los genes es más dinámico en comparación con la secuencia de ADN, además de que puede ser alterado por aspectos del desarrollo y condiciones ambientales a los que esté expuesto el organismo (135)
- 2.Algunas señales epigenéticas pueden ser transmitidas, en conjunto con la secuencia de ADN, a través de varias generaciones celulares. Esto significa que las marcas epigenéticas presentan cierta estabilidad meiótica (136).
- 3.La modulación epigenética es crítica para la función genómica normal en procesos como la segregación de cromosomas en la mitosis, la inactivación de elementos parásitos de ADN y la regulación de la actividad genética (116). La estabilidad epigenética parcial, la metaestabilidad, puede explicar ciertas irregularidades no-mendelianas de las enfermedades complejas.

En mamíferos, las células madre embrionarias, poseen genes reguladores que no se encuentran plenamente ni activos ni inactivos, sino que contienen características de ambos. Esta denominada marca epigenética bivalente proporciona plasticidad en la célula madre para que estos genes estén

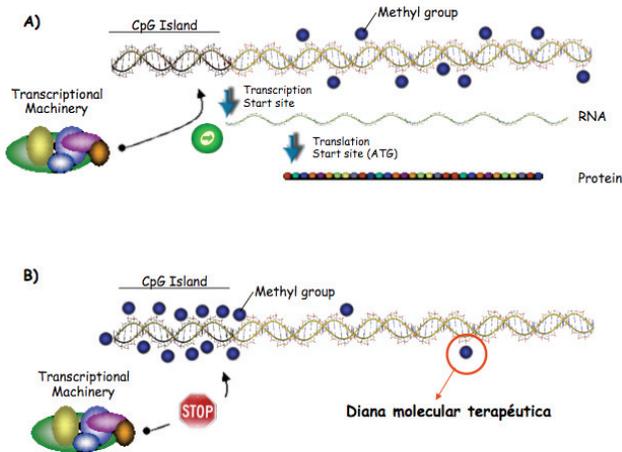
preparados para asumir cualquiera de los dos estados de la cromatina, el activo o inactivo, para cada tipo de línea celular.

Los patrones de metilación del ADN son importantes para regular de manera adecuada la expresión de ciertos genes y asegurar un desarrollo normal del ser humano. Es crucial en el periodo de desarrollo embrionario de los mamíferos y su alteración se relaciona con enfermedad (122).

Durante los estadios iniciales de la embriogénesis, tras la implantación embrionaria, la metilación genera cambios dramáticos en el genoma a través de las metiltransferasas de novo DNMT3a y DNMT3b. En modelos de animales se ha demostrado que ratones homocigotos knockout en DNMT1 o en DNMT3b no son viables, además, ratones knockout en DNMT3a mueren a las 4 semanas del nacimiento (130).

Los cambios en la expresión génica pueden deberse a problemas en la maquinaria encargada de producir y mantener la metilación, tales como mutaciones en los genes que codifican las ADN metiltransferasas, en aquellos que codifican proteínas de unión de ADN metilado, por cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN o en los complejos remodeladores de la cromatina que conduce a cambios en su patrón de metilación. Entre este tipo de padecimientos se encuentran los síndromes: ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales) en el que existe una mutación bialélica en DNMT3b (137), el Síndrome Rett asociado con el cromosoma X, el cual se manifiesta con trastornos del desarrollo neural y retraso mental en mujeres, es otro ejemplo de enfermedad conocida que se basa en una mutación del gen *MeCP2*, que codifica una proteína ligada a regiones metiladas (138), el Síndrome de X frágil y el ATR-X (alfa talasemia y retraso mental ligados al cromosoma X). Otras enfermedades humanas como los Síndromes de Beckwith Wiedemann y Prader Willi / Angelman, están asociadas con cambios en la dosis funcional de genes sujetos a impronta genómica, y pueden originarse por diferentes mecanismos que incluyen microdelecciones o duplicaciones de la región improntada, disomía uniparental y alteraciones en los mecanismos de regulación epigenética (131, 139-141).

Por otra parte, la metilación aberrante es un fenómeno relativamente frecuente en los procesos neoplásicos caracterizados por la inestabilidad genómica y alteraciones en la expresión génica (139, 142) (Figura 19).

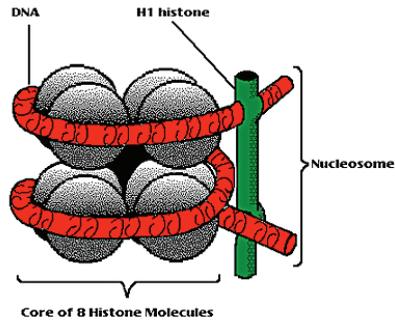


**Figura 19: Metilación del promotor.** A. El grupo metilo no se encuentra en el promotor, por lo tanto se transcribe el gen. B. El promotor se encuentra metilado y la transcripción del gen se detiene y por lo tanto no se expresa.

#### 4.4 Acetilación:

El nucleosoma es una estructura nuclear en la que dos vueltas de ADN se enrollan alrededor de un cilindro formado por 8 histonas. Dos dímeros de histona H2A-H2B se asocian a un tetrámero de histonas H3-H4 (Figura 20). Cada nucleosoma se une al siguiente a través de una doble cadena de ADN; esto en microscopía electrónica, ofrece una imagen de rosario en el que las cuentas corresponden a nucleosomas individuales que se unen por la línea que es el ADN.

El nucleosoma es la estructura fundamental por la que el ADN se enrolla y así queda en el núcleo. Además, son claves en los procesos de expresión génica ya que el despliegue y el repliegue de la cromatina es un proceso dinámico y regulado necesario para la replicación del ADN y por lo tanto puede tener un impacto directo sobre la accesibilidad de los genes a la maquinaria de transcripción.



**Figura 20: Nucleosoma.** Estructura del nucleosoma formado por dos vueltas de ADN alrededor de un cilindro formado por 8 histonas.

Las histonas son proteínas que se unen al ADN. Son básicas y pequeñas lo cual facilita su unión con el ADN para ejercer su función, la de empaquetamiento del ADN para formar parte de la cromatina.

Las histonas son de dos tipos: H1 (ó H5) y las histonas nucleosómicas.

Las histonas nucleosómicas son mas pequeñas (102 a 135 aminoácidos) y forman los nucleosomas al plegar el ADN sobre un grupo de ellas. A este grupo corresponden la H2A, H2B, H3 y H4, son muy estables, conservando su configuración a lo largo de diferentes especies eucariotas y se encuentran en gran número (alrededor de 60 millones de cada tipo) en el núcleo de la célula.

Las histonas pueden ser modificadas tras la traducción lo que genera un cambio en sus propiedades de unión al ADN y a las proteínas nucleares. Las histonas H3 y H4 tienen largas colas N-terminales hacia el exterior del nucleosoma que son susceptibles de ser modificadas. Las modificaciones que pueden sufrir las histonas son: acetilación, metilación, fosforilación y mono-ubiquitinación y sumoilación. Estas variaciones pueden ser heredadas, influir en la expresión génica, cambiar la arquitectura local de la cromatina y reclutar otras proteínas que reconozcan modificaciones específicas de las histonas.

Existe una correlación entre la acetilación de histonas y el aumento de transcripción, que parece ser debida a que tras acetilarse la histona se une menos al ADN. Por otra parte parece haber activadores de la transcripción que se unen específicamente a acetil-lisina. La metilación de histonas, por tanto, puede activar o reprimir la transcripción dependiendo de qué residuos de lisina y en qué histonas son metilados.

Los fenómenos epigenéticos más importantes son la metilación del ADN y la acetilación de histonas (Figura 21).

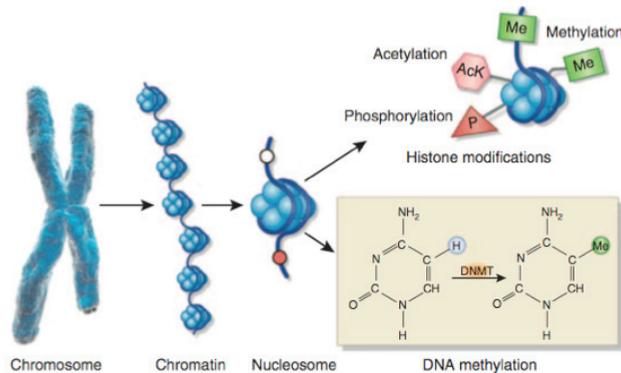


Figura 21. *Fenómenos epigenéticos. Metilación de ADN y acetilación de histonas.*

## 4.5 Epigenética y sistema renal.

### 4.5.1 Papel de la epigenética en el sistema renal:

En los últimos años el estudio genético del desarrollo embriológico renal ha cobrado una relevancia importante (143).

Alteraciones epigenéticas, que no afectan a la secuencia de nucleótidos, provocarían alteraciones en la expresión de los genes implicados en el desarrollo renal pudiendo ser los responsables de diferentes maneras de expresión del fenotipo de la enfermedad renal.

En el décimo día de desarrollo embriológico renal del ratón, el mesodermo intermedio se compone de un agregado de células llamadas mesénquima metanéfrico. Este mesénquima responde a las señales inductivas provenientes de la yema ureteral por parte del gen Wnt, que promueve la agregación y la conversión del mesénquima a epitelio. Estas señales inductivas, aunque normalmente son proporcionadas por la yema ureteral pueden provenir de muchos otros tejidos, están epigenéticamente programadas para responder de una forma limitada, de tal manera que sólo un cierto tipo de epitelio y de estroma pueden surgir como respuesta a la señal de Wnt (144).

Las mutaciones genéticas en el ratón y la manipulación de los tejidos en el embrión de pollo han ayudado a definir algunos componentes críticos en mesodermo intermedio y mesénquima metanéfrico.

Las proteínas PAX-2, LIM-1, y OSR-1 son necesarias y en algunos casos suficiente para desarrollar el mesodermo intermedio desde el mesodermo paraxial (145).

Las interacciones epigenéticas entre estos tres genes aún no están claros. En el ratón, Pax-2 se expresa a pesar de ser Lim-1 u Osr-1 mutantes, sin embargo, Lim1 no se expresa en Pax-2/8 mutantes. En el momento de la especialización mesodérmica, la expresión ectópica de Pax-2 puede formar mesodermo intermedio en el embrión del pollo. En el embrión de la rana, Pax-2 junto con Lim-1 también pueden generar tejido renal aunque Osr-1 tiene una actividad similar actuando en solitario.

La activación de los genes Pax-2/8, Lim-1, y Osr-1 es dependiente de su localización y requieren señales ambientales locales. James y Schultheis en 2005, sugieren que bajo la influencia de Bmp en la placa mesodérmica lateral se expresan Osr-1 y Pax-2 y se genera la formación del mesodermo intermedio, mientras que las señales axiales pueden inhibir las Bmp para suprimir este mesodermo intermedio. Por lo tanto, la expresión Pax-2/8 podría ser iniciado entre la placa mesodermo axial y lateral por la acción de dos gradientes opuestos (146).

En desarrollo renal la familia *Hox* tiene relevancia. La pérdida de expresión de Hox-11 resulta en una agenesia renal como consecuencia de la supresión de Gdnf y Six-2. La interacción entre estos genes para el desarrollo del riñón metanéfrico está sustentada por los datos sobre la regulación de Six-2 por parte de un complejo de proteínas que incluye Hox-11, Pax-2 y Eya-1 en el mesénquima metanéfrico (147).

Los cambios epigenéticos en loci específicos que actúan para delimitar el potencial de desarrollo de estas células madre renales siguen siendo determinantes. La proteína PAX-2 esta ligada a un complejo histona metiltransferasa ALR/MII2 y MII3 a través de la proteína adaptadora PTIP.

PAX-2 puede serina / treonina fosforilada en respuesta a las señales de Wnt; la interacción de PAX-2 con PTIP promueve la metilación de H3K4 en loci específicos renales bajo estas señales inductoras. Aunque PTIP no es riñón específica, puede servir como enlace entre PAX-2 y otras proteínas específicas de la maquinaria epigenética con importantes decisiones con respecto al destino celular que tienen que desarrollar. En consonancia con esta idea,

mutaciones en PTIP son letales y muestran una reducción global de la metilación de H3K4 (148). Estos datos sugieren que la función de Pax-2/8 es proporcionar locus y especificidad tisular para las señales epigenéticas y restringir el desarrollo del mesodermo intermedio al linaje celular renal.

La enfermedad renal crónica es en parte una consecuencia de la edad. En el glomérulo, el envejecimiento de los podocitos hace que exhiban una morfología alterada y patrones de expresión de los genes alterados. En los mamíferos, la reducción de los niveles de ADN metilado se correlaciona con la edad, lo que sugiere que la represión de la expresión génica pueden perderse con el tiempo.

#### **4.5.2 Alteraciones epigenéticas en la fibrosis renal:**

La fibrosis renal se puede definir como un proceso de cicatrización patológica llevada a cabo por fibroblastos activados que presentan un aumento de actividad proliferativa, matriz extracelular y expresión de actina muscular (149, 150).

A diferencia de la reparación fisiológica, la fibrosis es un proceso patológico que no cesa, incluso cuando la lesión inicial ha desaparecido. Esta característica de "perpetuación" se refleja en los fibroblastos, los mediadores principales de fibrogénesis. A diferencia de la reparación fisiológica, los fibroblastos no vuelven a su situación de quiescencia una vez que se han activado. Dicha activación es tan robusta que se mantiene incluso cuando son cultivados en plástico. Esto ha conducido a la hipótesis de que determinadas marcas celulares están implicadas en la activación de los fibroblastos en la fibrogénesis.

Se han encontrado evidencias de que la hipermetilación de ADN de genes específicos desempeña un papel importante en la activación de los fibroblastos, que en última instancia contribuye a la fibrogénesis en el riñón.

En los últimos años, estudios experimentales como los de Betchel et al en 2010 y Tampe et al. en 2012 demuestran que el agente demetilante 5'Azacitidina (5'Aza) normaliza el fenotipo de los fibroblastos activados in vitro y se produce una mejoría de la fibrosis renal tras su administración a ratones (151, 152). Esto hace sugerir que la hipermetilación aberrante estaría implicada en la patogénesis de la activación de los fibroblastos y por lo tanto en la consecuente fibrosis renal.

Dichos estudios trabajaron con una batería de 12 genes que se encontraban hipermetilados en los fibroblastos de riñones con fibrosis y no en el grupo control. El gen Rasal-1 se encuentra dentro de los genes seleccionados. Es un gen que inactiva la vía Ras-GTP, esto quiere decir que la disminución de los niveles de Rasal-1 causan un aumento intrínseco de señalización Ras-GTP, similar a la oncoproteína Ras en el cáncer.

La fibrosis renal en los modelos experimentales se asocia con la hipermetilación de Rasal-1 llevada a cabo por la metiltransferasa DNMT-1. La hipermetilación de Rasal-1 conlleva a su represión transcripcional causando la activación de los fibroblastos y por lo tanto fibrosis renal.

Tanto la lesión renal aguda reversible y fibrosis progresiva crónica se asocia con la represión transcripcional de Rasal-1; sin embargo, la regeneración espontánea del riñón después de la lesión aguda se asocia con la normalización de la expresión Rasal-1 (Rasal1 no está metilado en el daño renal agudo), mientras que la fibrosis crónica progresiva se asocia con la metilación y por tanto supresión transcripcional de Rasal-1. Esto se explica con el cultivo celular en el cual la exposición de los fibroblastos durante un corto espacio de tiempo a TGF- $\beta$  causa una activación transitoria de los fibroblastos e induce a una supresión del gen Rasal-1 sin que éste se encuentre en estado de hipermetilación. Por el contrario, la exposición a largo plazo a TGF- $\beta$  causa la activación persistente de los fibroblastos ya que induce la hipermetilación del gen Rasal-1 provocando la represión transcripcional del mismo.

Estos estudios sugieren que la represión transcripcional de Rasal-1 forma parte del programa de activación de fibroblastos y que su hipermetilación provoca la activación de forma permanente lo que conduce a la fibrosis renal.

La metilación aberrante del ADN en la fibrosis renal no está limitada a Rasal-1 ni a los fibroblastos sino que también hay otros genes y tipos celulares implicados en ella.

#### **4.5.3 Metilación aberrante y la vía Ras en el sistema renal:**

La hipermetilación de determinados genes podría estar en relación con la perpetuación de la activación de fibroblastos y en consecuencia con la fibrosis renal (ver punto 4.5.2). La familia Ras regula diferentes tipos de respuesta celular como la proliferación, apoptosis, migración y la adhesión.

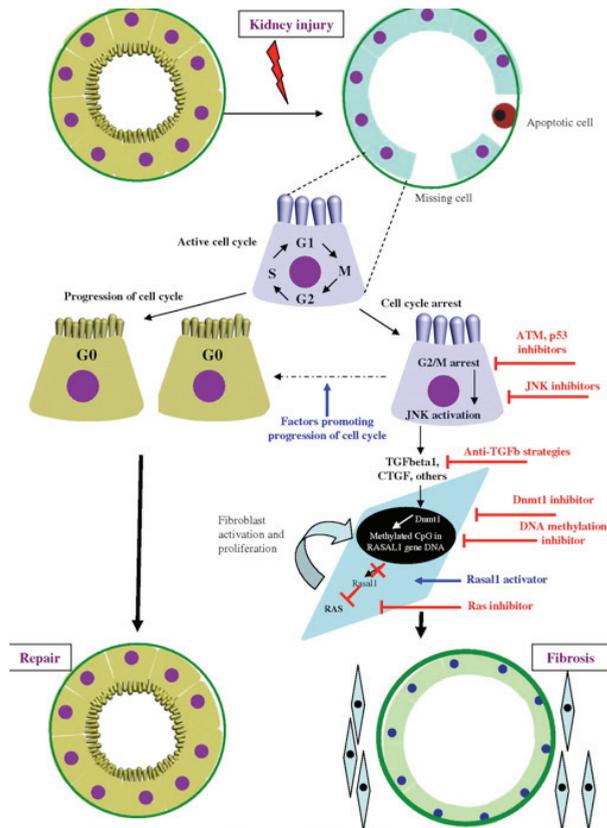
El ciclo de las Ras-GTPasas alterna entre la forma GTP que expresa su estado “on” y GDP que representa la forma “off”. A través de receptores tirosin quinasa regulan el factor de crecimiento plaquetario (PGF), el factor del crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos. También tienen efecto sobre los receptores de la angiotensina II y el endotelial así como en la formación de TGF- $\beta$ .

El gen Rasal-1 pertenece a la familia RAS-Gap. Su función, en condiciones normales, es la inactivación de la respuesta celular mediante la unión a GTP-Ras provocando la hidrólisis hacia GDP-Ras.

La hipermetilación del gen Rasal-1 provocaría su silenciamiento epigenético lo que conllevaría a la activación de los fibroblastos y la fibrosis renal de una manera irreversible.

Esta disregulación de las citoquinas controladas por la cascada Ras explica la fisiopatología de la enfermedad renal mediante la fibrogénesis y el fallo renal que desencadenan.

Betchel et al pusieron de manifiesto no sólo la relación existente entre la hipermetilación del gen Rasal-1 con la fibrogénesis renal sino que ésta se trataba de una respuesta a la exposición de manera prolongada a TGF- $\beta$  y es llevada a cabo por la ADN metiltransferasa DNMT1 (151, 153, 154).



**Figura 22: Vía Ras en el sistema renal.** La inactivación del gen RASAL-1, perteneciente a la familia RAS, se relaciona con el proceso de fibrosis renal mediante la activación y proliferación de fibroblastos. Adaptado de Ortiz, 2010 (155).

#### 4.6 Nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en alteraciones epigenéticas en la patología renal:

Los avances en el estudio epigenético han despertado un gran interés para diseñar e implementar alternativas terapéuticas eficaces.

Inicialmente el estudio de las enfermedades se basó en buscar genes que estuvieran relacionados con su etiología. Sin embargo, en algunos casos no se encuentran lesiones genéticas que expliquen el comportamiento patológico ni ningún patrón de herencia mendeliana.

La epigenética estudia cambios hereditarios, pero potencialmente reversibles, de la expresión genética mediada por patrones de metilación de ADN y la alteración de la estructura de cromatina.

Los futuros caminos que se abren en el estudio de la epigenética se basan en (Figura 23):

- **Definir los epigenomas estándar** ya que la organización epigenética anormal solo podrá ser definida cuando se conozcan los patrones normales de cada tipo celular.

En la actualidad, los conceptos como islas CpG o elementos transponibles se utilizan para definir secuencias no-metiladas o metiladas, respectivamente. Idealmente, en el futuro se podrán definir patrones epigenéticos para cada una de las líneas celulares en diferentes etapas de desarrollo del cuerpo en varios organismos como una base importante de los estudios de enfermedades (156).

- **Identificar la variabilidad epigenética**

Una vez que se hayan definido los epigenomas normales, se tratará la heterogeneidad entre los diferentes patrones individuales. Al recopilar información sobre varias poblaciones, probablemente se podrán asociar cambios individuales con características generales de algún grupo demográfico que tiene factores en común.

Considerando que varios cambios epigenéticos ocurren durante las etapas tempranas de la enfermedad humana, se espera que ese rango de variabilidad pueda ser un instrumento de diagnóstico para los individuos que sean aún asintomáticos (156).

- **Estudios especializados sobre fuentes de variabilidad epigenética**

Paralelamente a los estudios previamente mencionados, se podrá comparar información contenida en cohortes para determinar si hay factores específicos que influyen el comportamiento epigenético (156).

- **Estudios de asociación epigenómicos**

Poder realizar estudios de asociación epigenómica sobre enfermedades específicas. La localización y el grado de variabilidad en el genoma serán útiles porque permitirán comprender la función de la desregulación epigenética en los mecanismos patológicos. Con esto se podrán diseñar biomarcadores para la detección temprana y pronóstico (156).

- **Mayor desarrollo bioinformático**

El estudio epigenómico requiere de herramientas para organizar, manejar y analizar una gran cantidad de datos generados en los estudios, por lo tanto, será necesario promover la epigenómica computacional para poder cumplir con

esas necesidades (156).

A la vista queda por tanto que la epigenética empleada como un biomarcador es una herramienta importante en el diagnóstico precoz de una serie de patologías.

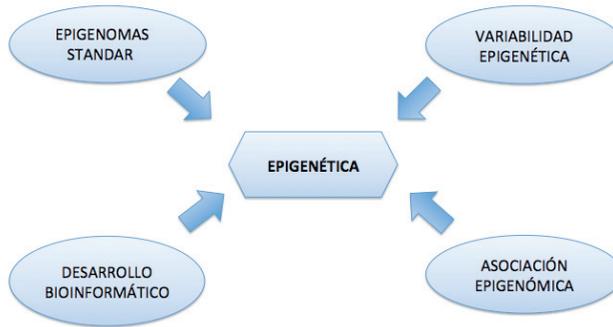


Figura 23. *Futuros caminos de desarrollo de la epigenética.*

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### **Objetivo principal:**

- Conocer si la metilación tiene alguna relación con la fibrosis fisiopatológica producida en la estenosis pieloureteral intrínseca congénita.

### **Objetivos secundarios:**

- Si existe esta relación, ¿la metilación podría convertirse en un biomarcador de la estenosis pieloureteral?.
- Qué papel juega la metilación en la estenosis pieloureteral si se demuestra dicha asociación.
- Esta relación tendría aplicación en el algoritmo diagnóstico-terapéutico de la estenosis pieloureteral.
- Encontrar una "huella epigenética" que nos permita identificar a pacientes con estenosis pieloureteral, que pueda tener una correlación con la evolución clínica, pudiendo usarse en un futuro como factor diagnóstico y pronóstico.



# MATERIAL Y MÉTODOS





## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 1. Selección del material.

#### 1.1 Pacientes:

Se han seleccionado 20 pacientes intervenidos de estenosis pieloureteral en el Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela entre los años 1995 y 2011.

Para la obtención de la muestra de los pacientes seleccionados se eliminaron aquellos que tuviesen cualquier otro tipo de patología urológica asociada, afectación bilateral o alguna característica obstructiva no intrínseca (vaso polar). El protocolo de diagnóstico de los pacientes se basa en estudio radiológico mediante ecografía y renograma diurético MAG-3 prequirúrgico. El seguimiento de los pacientes se realizó en las Consultas Externas del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela mediante ecografías y renogramas diuréticos MAG-3 postquirúrgico de manera seriada en los controles periódicos.

De la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica "Pat-Win" se obtuvieron las piezas quirúrgicas de los pacientes intervenidos para su posterior procesamiento y análisis.

Los datos de cada paciente se encontraban recogidos en sus Historias Clínicas, desde el año 2008, estos datos se recogieron a través del sistema informático de Historias Clínicas informatizada "IANUS".

A partir del Archivo de Historias Clínicas de Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y del Archivo del Servicio de Anatomía Patológica del CHUS se consultaron los siguientes datos: edad, sexo, lado afecto, forma de diagnóstico, clínica, tipo de cirugía, ecografía y renograma diurético MAG-3 pre y postquirúrgico y situación clínica actual.

## **1.2 Selección de muestras:**

Se han seleccionado las 20 piezas quirúrgicas de unión pieloureteral reseca durante las cirugías de estenosis pieloureteral. Realizadas en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela entre los años 1995 y 2011.

De cada muestra, que se etiqueta con un número de referencia, se extrae ADN comprobando su cantidad y calidad mediante espectroscopia (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific).

## **2. Estudio histopatológico:**

Las piezas quirúrgicas de estenosis de la unión pieloureteral remitidas de quirófano fueron fijadas en formol tamponado (10%) durante 24 horas, e incluidas en parafina de acuerdo con los procedimientos estandarizados del Servicio de Anatomía Patológica.

De cada bloque de parafina se realizaron secciones seriadas de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, teñidas con hematoxilina-eosina (H-E).

De las 20 piezas se disponía de bloques de parafina representativos. En todos los casos se revisaron las preparaciones histológicas teñidas con H-E que permitieron seleccionar los bloques más característicos.

En cada muestra se seleccionó la zona correspondiente a la estenosis pieloureteral que se incluyeron en parafina y congelaron. Se realizaron cortes de las zonas acotadas (en una media de 5-10 cortes de 5  $\mu\text{m}$ ) que se recogieron en tubos de eppendorf rotulados con el número de referencia correspondiente para extracción de ADN.

## **3. Parámetros a estudio.**

### **3.1 Parámetros clínico-patológicos empleados en el estudio:**

Hemos elegido los parámetros clínico-patológicos de: edad, sexo, lado afecto, edad al diagnóstico, sintomatología, filtrado glomerular renal (FGR) pre y postquirúrgico e incidencias durante el seguimiento evolutivo que se recogen en la tabla 5.

Ref.	Sexo V/M	Riñón	Edad Diagnóstico (Meses)	Edad Cirugía (Meses)	Indicación	FGR preQ	FGR postQ	Situación
1	H	Izquierdo	Prenatal	12	ITU	86	90	ITU
2	H	Izquierdo	Prenatal	11	Asintomático	67,05	70	Asintomático
3	M	Izquierdo	Prenatal	4	ITU	65	67	ITU
4	H	Izquierdo	Prenatal	60	Asintomático	192	127	Asintomático
5	H	Izquierdo	Prenatal	8	Asintomático	63	70	Asintomático
6	H	Izquierdo	Prenatal	4	Asintomático	107	110	Asintomático
7	H	Derecho	Prenatal	17	Asintomático	107	108	Asintomático
8	M	Izquierdo	156	156	Cólico	128	129	Asintomático
9	H	Izquierdo	10	18	Asintomático	79,8	102	Asintomático
10	M	Derecho	Prenatal	5	Asintomático	55,8	130	Asintomático
11	H	Izquierdo	Prenatal	4	Asintomático	103	101,35	Asintomático
12	M	Izquierdo	Prenatal	24	Asintomático	100	97	Asintomático
13	H	Izquierdo	Prenatal	11	Asintomático	82	89	ITU
14	H	Derecho	Prenatal	12	Asintomático	109	113	Asintomático
15	M	Izquierdo	Prenatal	7	Asintomático	106	121	Asintomático
16	M	Derecho	13	36	Asintomático	110	120	Asintomático
17	H	Izquierdo	3	5	Asintomático	56	169	Asintomático
18	M	Derecho	Prenatal	4	ITU	60	110	Asintomático
19	M	Derecho	Prenatal	12	ITU	95	120	Asintomático
20	V	Derecho	228	228	Cólico	82,9	98	Asintomático

Tabla 5. *Parámetros clínico-patológicos.*

### 3.2 Parámetros del estudio de imagen:

Hemos elegido los parámetros radiológicos pre y postoperatorios de: grado de hidronefrosis y grosor de la cortical, función renal y el tiempo de eliminación en el renograma diurético MAG-3 pre y postoperatorios (tabla 6).

Ref.	Grado HN preQ	Cortical preQ	Grado HN PostQ	Cortical PostQ	Función renal precirugía	Función renal postcirugía	T 1/2 precirugía	T 1/2 postcirugía
1	3	No	2	No	43%	50%	>20 MIN	6,7 MIN
2	3	Si	1	No	32.5%	31%	>20 MIN	7.5 MIN
3	3	Si	2	Si	No PRE	21,5%	>20 MIN	7,7 MIN
4	2	No	1	No	49.5%	52%	>20 MIN	5,7 MIN
5	4	Si	1	No	31.2%	No valido	>20 MIN	No valido
6	3	No	2	No	No Válido	48,5%	>20 MIN	6 MIN
7	3	No	2	No	47,7%	46,8%	>20 MIN	17 MIN
8	3	No	1	No	45%	44,3%	>20 MIN	14 MIN
9	4	Si	2	No	56,5%	50%	>20 MIN	16 MIN
10	4	Si	4	Si	36%	35%	>20 MIN	8 MIN
11	4	Si	3	No	19%	16,7%	>20 MIN	11 MIN
12	4	No	3	No	46%	51%	>20 MIN	5,2 MIN
13	4	Si	2	No	40%	50%	>20 MIN	9 MIN
14	3	Si	2	No	44%	49%	>20 MIN	9 MIN
15	3	Si	3	Si	47%	49%	>20 MIN	22 MIN
16	4	Si	2	No	46%	45%	>20 MIN	7.2 MIN
17	3	No	2	No	50%	45%	>20 MIN	12 MIN
18	3	Si	3	Si	33%	30%	>20 MIN	14 MIN
19	4	Si	3	No	41%	46,8%	>20 MIN	12 MIN
20	4	Si	1	Si	41%	35%	>20 MIN	5.7 MIN

Tabla 6. *Parámetros de imagen.*

#### 4. Extracción del ADN:

Se realizó según el protocolo aconsejado para el *kit* de aislamiento de ADN genómico Puregene (GENTRA, USA).

Los cortes de parafina se tratan con Xilol y Etanol para su desparafinación.

Los fragmentos de tejido se incubaron a 65°C en una solución de lisis celular y proteinasa K (1 mg/ml) hasta observar lisis tisular total.

Las proteínas fueron eliminadas por precipitación en acetato de amonio 7,5 M pH 7,5. El ADN fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol 70%, resuspendido en solución de hidratación (buffer TE pH 8,0) y almacenado a -20°C.

#### 4.1 Protocolo de extracción de ADN:

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5 M), TE 1X pH.8 (autoclavado), Etanol o isopropanol absolutos a -20°C y opcionalmente RNasa A (10 mg/ml).

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) o proveniente de parafina tras su desparafinización en un Eppendorf de 1.5 o 2ml.
2. Agregar 500 µl de buffer de lisis y 10 µl de proteinasa K.
3. Incubar a 55°C, con agitación, toda la noche.
4. Centrifugar al máximo (15.000 rpm) 15 min.
5. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio. Evitar llevarse la fracción sólida del fondo
6. Agregar 300 µl de cloruro de sodio, que lleva a precipitar proteínas, agitar brevemente y centrifugar al máximo 15 min.
7. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol a -20°C o doble volumen de etanol a -20°C. Agitar lentamente, luego mezclar completamente.
8. Centrifugar 15 min. Descartar el sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
9. Lavar con 750 µl de etanol 70°, evitando perder o disgregar el pellet.
10. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C.
11. Resuspender en 50 µl 1xTE. Agitar e incubar a 55°C 2 horas.
12. Guardar a -20°C.

#### 5. Microarray.

##### 5.1 Conceptos generales de microarray:

A finales de los años 80, Stephen Fodor, Michael Pirrung, Leighton Read y Lubert Stryer desarrollaron los *arrays*, una revolucionaria tecnología para la determinación y cuantificación de ADN en una muestra.

La principal ventaja de esta novedosa tecnología frente a los métodos tradicionales (Northern, Southern, etc.), residía en la posibilidad de analizar simultáneamente miles de genes (157).

Un array de ADN consiste en un gran número de moléculas de ADN ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que forman una matriz de secuencias en dos dimensiones. Estos fragmentos de material genético pueden ser secuencias cortas llamadas oligonucleótidos, o de mayor tamaño, cDNA (ADN complementario, sintetizado a partir de mRNA), o bien productos de PCR (replicación in vitro de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la Polimerasa) (158).

Los fragmentos de ADN de una sola hebra inmovilizados en el soporte, se les denomina “sondas” y se depositan en la superficie del array en forma de fragmentos o genes completos generalmente procedentes de librerías génicas. Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes, etc.), los métodos más utilizados para marcaje de sondas o dianas en microarrays son los químicos o enzimáticos, utilizándose comúnmente los fluoróforos Cy3 y Cy5 (cianinas) (158).

Tras el marcaje se incuban sobre el panel de sondas, permitiendo la hibridación (reconocimiento y unión entre moléculas complementarias) de secuencias homólogas. Durante la hibridación, las muestras de material genético marcadas, se unirán a sus complementarias inmovilizadas en el soporte del chip, permitiendo la identificación y cuantificación del ADN presente en la muestra a estudio (159) (Figura 24).

El escáner y las herramientas informáticas de software interpretan y analizan los datos obtenidos.

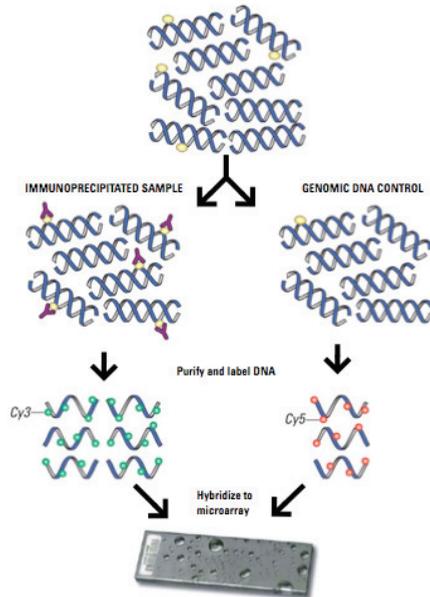


Figura 24. *Microarray*. Adaptado de <http://www.Agilent.com>

## 5.2 Protocolo microarray Agilent para el análisis de ADN metilado:

Se siguió el protocolo de Agilent para el análisis de ADN metilado. Para conocer el detalle de los elementos, reactivos, condiciones y parámetros se puede consultar la página:

[http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G417090012\\_Methylation\\_Protocol\\_v.2.0.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G417090012_Methylation_Protocol_v.2.0.pdf).

En resumen, los pasos del protocolo son:

- Preparación de las muestras:
  - Preparado del granuloma magnético
  - Preparación del ADN para la inmunoprecipitación
  - Inmunoprecipitación del ADN metilado
  - Lavado y elución del ADN metilado del granulado
  - Extracción del inmunoprecipitado y referenciación del ADN con fenol-cloroformo
- Etiquetar las muestras:

- Etiquetar el ADN con tinción fluorescente
- Limpieza y etiquetado del ADN genómico
- Hibridación y lavado:
  - Hibridación del microarray
    - Preparación del Buffer de lavado
    - Preparación del equipo
    - Lavado de los cristales de los microarrays
  - Solución para estabilización y secado:
    - Pre calentamiento de la solución de estabilización y secado
    - Lavado del microarray con la solución de estabilización y secado
- Escaneo de las características:
  - Escaneo del microarray empleando el GenePix Scanner
  - Extracción de los datos mediante software

### 5.3 Análisis de los datos:

Para el análisis de los datos se empleó el *software GenePix Pro 4.0*.

Las imágenes obtenidas son procesadas y la información resultante dispuesta en forma matricial, formando lo que se denomina matriz de expresión genética. La matriz de expresión genética contiene el nivel de expresión de los genes (dispuestos en las filas de la matriz, un gen por cada fila) para cada una de las muestras de estudio (dispuestas en las columnas de la matriz, una muestra por columna). Esta matriz resulta una plantilla específica para cada gen.

Antes de analizar las matrices se realiza el preprocesamiento y normalización de los datos para eliminar la variabilidad ligada al proceso de hibridación de los arrays. Se realiza manualmente la validación de los datos reduciendo, quitando y/o moviendo los datos inconsistentes (Figura 25). Se realiza la transformación logarítmica de escala, el nivel de expresión de un gen se expresa como el cociente del valor de expresión en la muestra objeto de estudio respecto al valor de expresión en la muestra tomada como referencia (160).

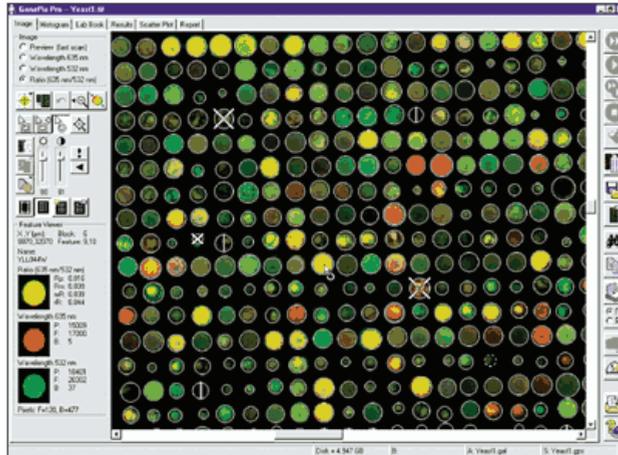


Figura 25. Normalización de datos del array. (Captura del programa GenePix Pro 4.0)

Se realiza por último el scaneo de los datos en función a la intensidad de los mismos tras la corrección con controles y el fondo. Los datos se trasladan a una hoja Excel de resultados.

El perfil de expresión génica fue determinado mediante la comparación de los grupos experimentales (2 pacientes con estenosis pieloureteral) con los grupos control (2 uniones pieloureterales) con test no-paramétricos utilizando un criterio para definir los genes metilados entre los diferentes conjuntos de muestras: una tasa de cambio absoluta de 2,0 o mayor.

## 6. Prueba de metilación específica mediante PCR (MSP).

### 6.1 Conceptos generales de la MSP y modificación del ADN con bisulfito:

La optimización de los métodos basados en el tratamiento del ADN con bisulfito sódico, permite el análisis de un número limitado de CpGs basándose en su estado de metilación (PCR específica de metilación, MSP) (Mills, 2002).

El bisulfito sódico convierte las citosinas no metiladas en uracilos, mientras las metiladas permanecen como tales. Esta reacción permite diferenciar ADN metilado del no metilado.

La PCR específica de metilación (MSP) es la técnica más utilizada para estudiar la metilación de islas CpG, comunes en los promotores de muchos genes.

Las citosinas de las islas CpG se encuentran normalmente demetiladas en

tejidos normales, pero se metilan en promotores de genes implicados en procesos celulares anormales como el cáncer (Figura metilación de novo).

La MSP es una de las técnicas más eficaces para estudiar los perfiles de metilación de estas regiones. Las diferencias obtenidas entre alelos metilados y demetilados al tratar con bisulfito sódico son la base de la PCR específica de metilación, y son especialmente útiles para el estudio de islas CpG por la abundancia de sitios CpG que contienen.

El primer paso consiste en el tratamiento del ADN con bisulfito. Para ello se desnaturalizan las hebras del ADN nativo calentando a 95°C. Una vez abiertas las hebras se hace accesibles las regiones que contienen islas CpG para una reacción química con bisulfito sódico, que incluye sulfanización, deaminación y desulfonación de citosina no metilado, con el producto final de uracilo.

Tras la purificación y precipitación se obtienen fragmentos de ADN con secuencias transformadas o intactas según el estado inicial, siendo la modificación en ausencia de grupos de metilo unidos a secuencia CG y la conservación de secuencias CG unidos por grupo de metilo que impide la reacción con bisulfito.

El siguiente paso del proceso consiste en una PCR convencional con amplificación de regiones seleccionadas con una pareja de primers: uno de ellos está diseñado para secuencia no transformada con bisulfito (metilada), otro primer reconoce la secuencia que lleva el cambio tras el tratamiento con bisulfito sódico.

En resumen, para cada muestra de ADN modificado se realizan dos PCR, valorando el resultado en conjunto en el gel de agarosa.

## **6.2 Protocolo de MSP.**

### **6.2.1 Tratamiento con bisulfito sódico.**

#### **6.2.1.1 Modificación del ADN:**

- 1.1.- 1µg de ADN en 50 ml agua
- 1.2.- Añadimos 5,7 ml de NaOH 3M (1,2 gr en 10ml).
- 1.3.- Incubación durante 15 minutos a 37°C
- 1.4.- Añadimos 33 ml de Hidroquinona\* (Merck) .

La hidroquinona se prepara 20mM (0,11 gr en 50 ml agua). Se debe proteger de la luz y mantener con agitación continua.

1.5.- Añadimos 530 ml de Bisulfito Sódico\* (Sigma Aldrich) .  
El Bisulfito Sódico se prepara 4,2M (4,45 gr en 10ml agua. pH 5.0)

1.6.- Incubamos las muestras 15 horas a 50°C EN OSCURIDAD

### 6.2.1.2 Purificación: DNA-Clean-UP:

2.1.- Montar el sistema múltiple de vacío, conectando a la bomba de vacío. Se montan y rotulan las columnas y jeringuillas (Figura 26). Se cierran los canales.



Figura 26. Sistema múltiple de vacío.

2.2.- Se sacan los tubos de la incubación y se les añade 1 ml de resina (bien agitada, agitándola cada 3-5 muestras).  
Se añade resina + ADN a las columnas. Se repite este paso con todas las muestras.



**Figura 27: Sistema de purificación de ADN. (Promega)**

2.3.- Se abre el vacío y el flujo en las llaves de la columna.

2.4.- Una vez haya bajado todo el volumen, se añade 1 ml de isopropanol 80% a la columna para lavarla.

2.5.- Una vez haya bajado todo el volumen, se añade de nuevo otro 1 ml de isopropanol 80% a la columna

2.6.- Cuando haya bajado todo el volumen, se pone la columna en el eppendorf original.

2.7.- Se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad (14.000 rpm) para limpiar restos de isopropanol.

2.8.- Se pasa la columna a un tubo nuevo etiquetado al que se añade las letras BS para indicar que es ADN tratado con bisulfito.

2.9.-Se añaden 50  $\mu$ l de Agua Destilada y se incuban 2 minutos a Temperatura Ambiente. En este paso estamos consiguiendo que la resina se suelte del ADN porque es lipofílica.

2.10.- Se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad (14.000 rpm).

Además del sistema tradicional, hemos utilizado un kit de metilación estandarizado (EZ DNA Methylation™ Kit, ZYMO RESEARCH, USA), que ha demostrado una alta eficiencia en el proceso de conversión de más del 99% de los residuos de Citosina no metilados a Uracilo, siendo más de 99% de protección de Citosina metilada y una cobertura de más de 80% del ADN.

El EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO RESEARCH, USA) consta de los siguientes componentes:

- CT Conversion Reagent\*
- M- Dilution Buffer
- M-Binding Buffer
- M-Wash Buffer\*\*
- M- Desulphonation Buffer
- M-Elution Buffer
- Zymo-Spin™ IC columnas
- Collection Tube
- CT Conversion Reagent se remite en forma sólida en un tubo oscuro y se prepara para reacción al instante para uso inmediato, dada su fotosensibilidad. Para ello se añade 750 µg del agua destilada y 210 µg de *M- Dilution Buffer* al tubo de *CT Conversion Reagent*, agitando la mezcla durante 10 minutos en la temperatura ambiente.

\*\* Una vez iniciando la utilización del kit se diluye el *M-Wash Buffer* concentrado añadiendo 96% del etanol absoluto a 24 ml del Buffer.

El protocolo que se ha seguido fue el siguiente:

1. Añadir 5 µl de *M-Dilution Buffer* a 1 µl del ADN ajustando el volumen total hasta 50 µl con agua destilada en tubo de eppendorf rotulado.
2. Incubar la mezcla 30 minutos a temperatura 42°C.
3. Añadir 100 µl de *CT Conversion Reagent* recién preparado en cada tubo de mezcla.
4. Incubar los tubos 12-16 horas en 50°C en Termomixer en oscuridad
5. Incubar los tubos durante 10 minutos en la nevera (0, +4°C).

### 6.2.2 Precipitación y purificación del ADN tratado:

6. Añadir 400 µl de *M-Binding Buffer* a *Zymo-Spin™ IC* columnas colocadas en los *Collection Tube* correctamente rotulados
7. Añadir a las mismas columnas el contenido del ADN modificado con bisulfito, cerrar las tapas de las columnas e invertir la mezcla varias veces
8. Centrifugar a máxima velocidad (14.000 x g) 30 segundos. Desechar el líquido de los *Collection Tube*.
9. Añadir 100 µl de *M-Wash Buffer* diluido a cada columna. Centrifugar a máxima velocidad 30 segundos.
10. Añadir 200 µl de *M- Desulphonation Buffer* a cada columna almacenando en la temperatura ambiente (20-30°C) durante 20-30 minutos. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
11. Añadir 200 µl de *M-Wash Buffer* a cada columna y centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos. Repetir el lavado 2 veces.
12. Colocar las columnas en tubos rotulados eppendorf de 1,5 ml. Añadir 12 µl de *M-Elution Buffer* directamente al fondo de la columnas y centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos, obteniendo ADN diluido en tubos eppendorf.
13. Guardar el ADN purificado en el arcón de -20°

### 6.3 PCR específica de metilación (MSP):

La técnica de MSP se basa en el protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar.

Configuración de la reacción:

El sustrato que hemos utilizado para cada reacción consiste en 1 µl del ADN modificado con bisulfito sódico. Los primers de PCR prediseñados se especifican en la tabla 7 para una secuencia metilada (M) y una no metilada (U) de cada gen.

Genes	Forward primer 5'>3	Reverse primer 5'>3
p16 M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGGACCGTAA
P16 U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA
RASSF1A M	GTTGGTATTCGTTGGGCGC	GCACCACGTATACGTAACG
RASSF1A U	GGTTGTATTTGGTTGGAGTG	CTACAAACCTTTACACACAACA
MGMT M	GGTCGTTTGTACGTTCCG	GACCGATACAAACCGAAGC
MGMT U	GTAGGTTGTTGTATGTTTGT	AACCAATACAAACCAACA
E-Caderina M	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAACATAAAATTCACCTACCGAC
E-Caderina U	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	CACAACCAATCAACAACACA
Ciclina-D2 M	GGCGGATTTTATCGTAGTCG	CTCCACGCTCGATCCTTCG
Ciclina-D2 U	AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	ACATCCTCACCAACCTCCA
HIN-1 M	GGTACGGGTTTTTACGGTTCGTC	A ACTTCTTATACCGA TCCTCG
HIN-1 U	GGTA TGGGTTTTTTA TGGTTTGT	CAAAACTCTTATACCCAATCCTCA
RASAL-1 M	GTGTATTTTGTGTTTCGTCGTT	CAAAGAACTCTTACCGAAACG
RASAL-1 U	ATTTTATTAGGAGTTAGTGTTAT	CACAACAAACTCTTACCAAAACA

Tabla 7: *Secuencia de primers de MSP. (M- secuencia metilada, U- secuencia no metilada)*

Los componentes de reacción para una MSP de volumen final de 25 µl son los siguientes:

- Tampón de reacción 10x (*Buffer*) - 2,5 µl
- MgCl<sub>2</sub> - 2 µl
- dNTPs - 2 µl
- *Forward* Primer - 1 µl
- *Revers* Primer - 1 µl
- Enzima polimerasa (*Taq*-polimerasa) - 0,2 µl
- ADN - 1 µl
- Agua destilada - 15,3 µl

#### 6.4 Elección de las condiciones de reacción:

Las condiciones de reacción de una amplificación por PCR se componen del número total de ciclos a ejecutar, la temperatura y la duración de cada paso en los ciclos. La decisión en cuanto a número de ciclos para ejecutar, se basa en la cantidad de material de ADN.

El primer paso es la desnaturalización del ADN que hace que todo el ADN pase a cadena sencilla. Se realiza con temperatura de 94°C en 30 segundos.

En el segundo paso, los oligonucleótidos cebadores (primers) encuentran sus secuencias complementarias y se adhieren a ellas. Este punto es variable en

cuanto a la temperatura (temperatura de *annealing*) que ajustamos según las características de los primers, siendo 57°C para *HIN-1*, *RASSF1A*, *Ciclina D2*, con duración de 45 segundos, y 60°C para *p16* con duración de 30 segundos, *RASAL1* 59°C con duración de 45 segundos, *MGMT* 58°C con duración de 45 segundos y *E-Caderina* 55°C con duración de 30 segundos.

Finalmente, el último paso en un ciclo de PCR es aquel en el que la ADN polimerasa está produciendo una copia complementaria del ADN diana a partir de la secuencia de cebador de PCR, se realiza con la temperatura habitual de 72°C, considerado como la temperatura óptima para buena estabilidad térmica de polimerasas.

Tras repetición de los ciclos descritos se añade un paso final de extensión de 7 minutos a 72°C y conservación del producto final en temperatura ambiente.

#### **6.5 Electroforesis del producto de PCR y visualización del resultado:**

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en *buffer* TBE (*Tris*, *Borato* y *EDTA*), teñidos con bromuro de etidio (Figura 28).

En el gel de agarosa aparecen bandas entre 150-200 pares de bases en todas muestras amplificadas con primer no metilado por presencia de residuos de “contaminación” del tejido normal. Sin embargo la banda en muestra con ADN modificado y amplificado con MSP con primer metilado aparece específicamente en los casos con regiones del promotor amplificados e islas CpG unidos a grupo de metilo.

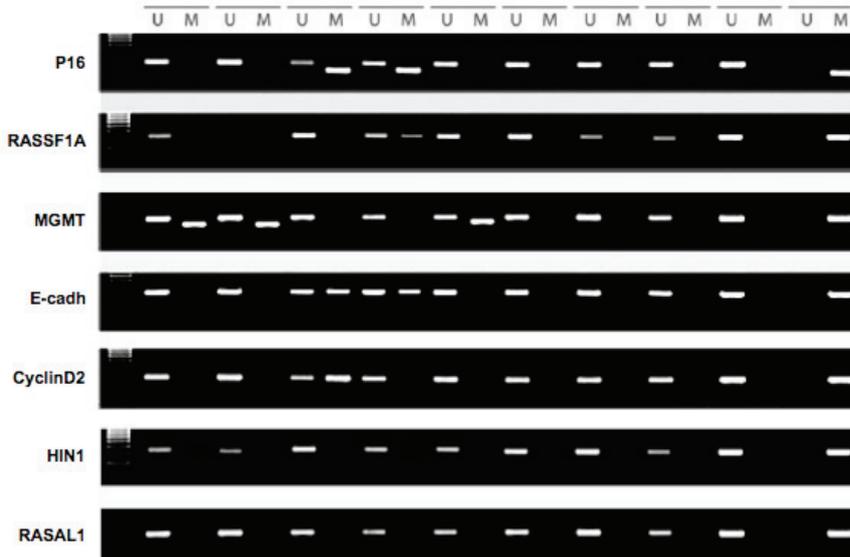


Figura 28. Visualización del MSP. Visualización de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa tras tinción con bromuro de etidio.

## 7. Selección y descripción de los genes seleccionados:

Se han seleccionado 7 genes para el estudio mediante PCR: p16, RASSF1A, MGMT, E-Cadherina, Ciclina-D2, HIN-1, RASAL1. Para cada gen, se diseñaron dos parejas de primer para PCR dentro de la región del promotor, correspondientes a secuencia de promotor metilado (M) y no metilado (U) (Tabla 7).

Genes	Fordward primer 5'>3	Reverse primer 5'>3
p16 M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA
P16 U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA
RASSF1A M	GTTGGTATTCGTTGGGGCGC	GCACCACGTATACGTAACG
RASSF1A U	GGTTGTATTTGGTTGGAGTG	CTACAAACCTTTACACACAACA
MGMT M	GGTCGTTTGTACGTTCCG	GACCGATACAAACCGAACG
MGMT U	GTAGGTTGTTGTATGTTTGT	AACCAATACAAACCAACA
E-Caderina M	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAATAAAAATTACCTACCGAC
E-Caderina U	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	CACAACCAATCAACAACACA
Ciclina-D2 M	GGCGGATTTTATCGTAGTCG	CTCCACGCTCGATCCTTCG
Ciclina-D2 U	AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	ACATCCTCACCAACCCTCCA
HIN-1 M	GGTACGGGTTTTTACGGTTTCGTC	A ACTTCTTATACCGA TCCTCG
HIN-1 U	GGTA TGGGTTTTTTA TGGTTTGT	CAAACCTCTTATACCCAATCCTCA
RASAL-1 M	GTGATTTTTGTTTTTCGTCGTTT	CAAAGAACTCTTACCGAAACG
RASAL-1 U	ATTTTATTAGGAGTTAGTGGTTAT	CACAACAAACTCTTACCAAAAACA

Tabla 7: Secuencia de primers de MSP. (M- secuencia metilada, U- secuencia no metilada).

### 7.1 p16 (Cycline–depedent kinase inhibitor 2A):

Es una proteína supresora de tumores codificada por el gen CDKN2A. Tiene un papel fundamental en el control del ciclo celular. Regula la actuación de las ciclinas deteniendo el ciclo celular en la fase G1 y G2.

Funciona como un estabilizador de la proteína supresora de tumores p53 cuando interactúa y secuestra a Mdm2, una proteína responsable de la degradación de p53. También induce parada en G2 y apoptosis por una vía independiente de p53, evitando la activación del complejo Ciclina B1/CDC2.

Las mutaciones de p16 van asociadas a un incremento en el riesgo de padecer numerosos tipos de cáncer (melanoma, esófago, gástrico, ADP) (161).

### 7.2 RASSF1A (Ras association domain family isoform A):

A nivel renal la proteína codificada por este gen controla el ciclo celular, la estabilización microtubular, la adhesión celular, la motilidad y la apoptosis. Por lo tanto la depleción de RASSF1A se asocia con una aceleración en la progresión de la mitosis y un aumento en el riesgo de padecer defectos cromosómicos (162, 163).

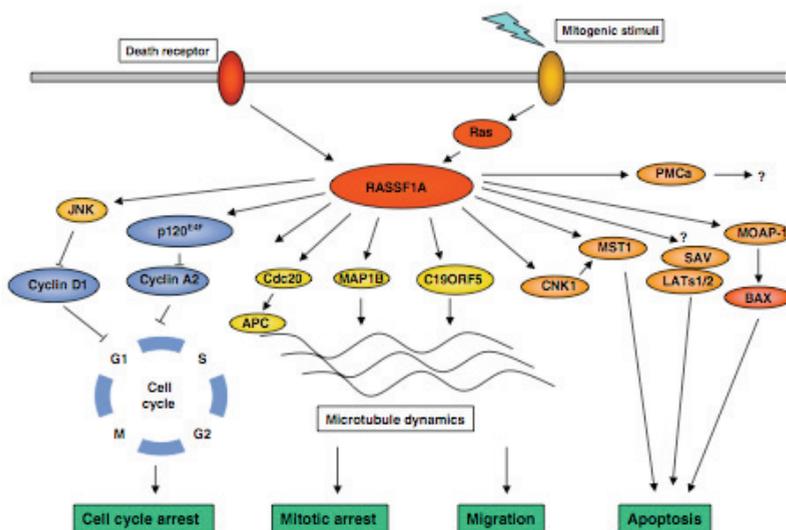


Figura 29. Vía Ras. Funciones del gen RASSF1A.

### 7.3 MGMT (O6-metilguanina ADN metiltransferasa):

El gen MGMT (O6-metilguanina ADN metiltransferasa) codifica una enzima clave en el sistema de reparación del ADN.

La hipermetilación de la isla CpG ubicada en la región promotora del gen MGMT es el principal responsable de muchos tipos de tumores como el glioblastoma. Se ha observado sin embargo, que en los glioblastomas esta hipermetilación se asocia con una mayor supervivencia debido a la mejor respuesta al tratamiento quimioterápico convirtiéndose así, la hipermetilación del gen MGMT, en un importante biomarcador pronóstico en este tipo de tumores (164).

### 7.4 E-Cadherina:

Las cadherinas son moléculas monoméricas, que constituyen receptores homofílicos que se unen a caderinas idénticas expresadas en células homo o heterotípicas para establecer contacto célula-célula. Su acción es calcio y temperatura dependiente. En una célula puede expresarse más de una cadherina. Se conocen al menos doce de ellas pero las más estudiadas son tres:

- E-Cadherina, presente en epitelios de diferentes tejidos como hígado y riñón.
- N-Cadherina, propia del tejido neural, se expresa en el cerebro pero también en el músculo cardíaco.
- P-Cadherina encontrada en la placenta.

La acción de las Cadherinas permite la adhesión celular y la mantención de los tejidos, la persistencia de los espacios intercelulares, el desarrollo embrionario, el crecimiento embrionario, la implantación de los blastómeros y la morfogénesis (165).

### 7.5 Ciclina-D2:

Es una proteína codificada por el gen CCND2. Pertenece a la familia de las ciclinas, cuya función es regular el ciclo celular a través de las ciclinas dependientes de la quinasa.

La Ciclina D2 forma un complejo con cdk4/cdk6, cuya actividad es esencial para transición G1-S del ciclo celular (Figura 20). Además también esta

demostrada su implicación en la fosforilación del gen supresor del tumor Rb (166).

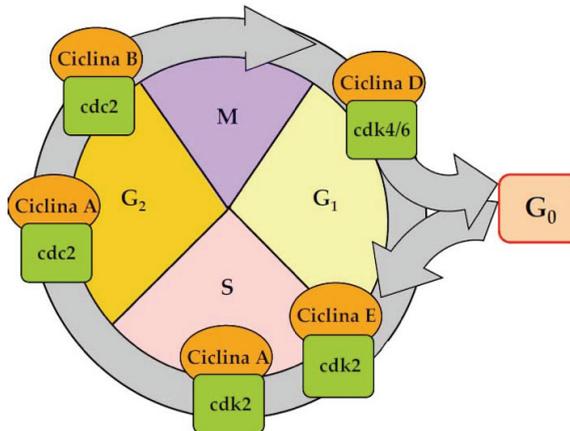


Figura 30. Función de la Ciclina-D2 en la regulación del ciclo celular.

### 7.6 HIN-1 (High –in normal-1):

Fue identificado como un gen altamente expresado en las células luminales normales de mama, y con una expresión disminuida en carcinomas de mama in situ e invasivos y metastáticos.

HIN-1 es una citoquina sin homología con otros tipos de proteínas (167, 168).

Se sugiere un posible papel de HIN-1 en la formación de lobulillos de mama y/o diferenciación terminal durante del embarazo. También puede estar relacionado con la regulación de la proliferación celular epitelial, diferenciación y morfogénesis.

### 7.7 RASAL1 (Ras protein activator like 1):

La proteína codificada por este actúa como supresores de la función de RAS mediante la catalización hacia su forma de inactiva GDP permitiendo así el control de la proliferación y diferenciación celular.

A nivel renal esta inactivación de la familia RAS trae como consecuencia la activación y proliferación de los fibroblastos. La exposición durante un periodo breve de tiempo al TGF- $\beta$  provoca el silencio del gen RASAL1 de forma transitoria; sin embargo cuando esta exposición al TGF- $\beta$  es prolongada se produce la metilación en las islas CpG del gen RASAL1 lo que conlleva su inactivación de forma permanente (151).

## 8. Estadística.

### 8.1 Programa PHYLIP:

La correlación y agrupación de los datos se ha llevado a cabo utilizando el paquete de software filogenético/estadístico denominado PHYLIP. <http://www.phylogeny.fr/> es una web de acceso libre gratuito en la que se puede construir y analizar la relación filogenética entre secuencias moleculares. Emplea diferentes programas bioinformáticos para construir árboles filogenéticos a partir de las secuencias introducidas (169, 170).

Los análisis filogenéticos son fundamentales para muchas áreas de investigación en biología y típicamente involucran la identificación de secuencias homólogas, su alineación múltiple, la reconstrucción filogenética y la representación gráfica del árbol inferido.

Phylogeny.fr ofrece tres modos principales según las necesidades de cada usuario:

El modo de "One Click"; es la opción más básica. Tiene una alta precisión y velocidad para el reconocimiento de secuencias homólogas. Utiliza diferentes programas en los que tan sólo hay que introducir una secuencia de entrada para obtener el árbol. Estos programas son: el *MUSCLE* para el alineamiento múltiple, *PhyML* para la construcción de árboles y *TreeDyn* para la representación de árbol.

El 'Advanced' permite personalizar los parámetros de cada programa explicados en el párrafo anterior.

El modo 'a la carta' ofrece más flexibilidad y sofisticación, ya que en el se pueden crear una selección y establecer los pasos necesarios, dentro de una amplia gama de herramientas, para satisfacer las diferentes necesidades específicas. (169, 170).

En nuestra muestra asociamos a cada variable un valor entre cuatro posibilidades como máximo para establecer la secuencia que posteriormente introdujimos en el programa PHYLIP empleando la opción "Advanced" para la construcción del árbol filogenético.

La asignación de cada valor a nuestras variables fue el siguiente:

#### Sexo:

- Varón: A

- Mujer: T

**Riñón afectado:**

- Izquierdo: A
- Derecho: T

**Edad al diagnóstico:**

- Prenatal: A
- Menores de 1 año: T
- Entre 1 y 5 años: C
- Mayores de 5 años: G

La asignación de los diferentes valores a los rangos de edad se realizó en base a que la mayoría de los pacientes en la actualidad se diagnostican intraútero debido al control del embarazo que se realiza en la actualidad, seguidos de menores de 1 año que debutan como ITU (infección del tracto urinario) o retraso de crecimiento y entre 1 y 5 años que corresponde a la etapa de adquisición de habilidades para el control de esfínteres y los pacientes mayores de 5 años en los que se manifiestan más tardíamente como dolor tipo cólico.

**Edad en la cirugía:**

- Menores de 6 meses: A
- Entre 6 meses y un año: T
- Entre 1 y 3 años: C
- Mayores de 3 años: G

Los pacientes intervenidos antes de los 6 meses son pacientes cuyo diagnóstico es muy precoz y en los que en la evolución clínica y radiológica presentan ITU (forma de expresión clínica más frecuente) o empeoramiento significativo en el seguimiento ecográfico o en el renograma MAG-3 realizados al mes y a los 3 meses de vida según nuestro protocolo.

Los pacientes intervenidos entre 6 meses y un año son aquellos en los que los estudios de la función y eliminación renal empeoran o se mantienen pero con empeoramiento ecográfico o clínico.

La distinción entre el grupo de 1 y 3 años con los mayores a 3 años pueden recaer en que los pacientes mayores de 3 años con estenosis pieloureteral en la etapa de crecimiento y desarrollo pueden presentar un empeoramiento en

los patrones obstructivos de eliminación renal.

**Indicación:**

- Infección de orina: A
- Asintomáticos: T
- Cólicos: C
- Dolor lumbar: G

La mayoría de los pacientes en la actualidad debido el diagnóstico prenatal se diagnostican mientras se encuentran asintomáticos. En orden de frecuencia los siguientes síntomas de presentación son: ITU, cólicos y dolor lumbar.

**Filtrado glomerular:**

- $<29 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : A
- $30\text{-}59 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : T
- $60\text{-}89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : C
- $>90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : G

\*Asignación realizada según los distintos niveles de insuficiencia renal según el FGR.

**Grado de hidronefrosis:**

- 1: A
- 2: T
- 3: C
- 4: G

\*Asignación realizada según la clasificación de hidronefrosis de la Sociedad de Urología Fetal.

**Adelgazamiento en estudio ecográfico de la cortical renal:**

- Adelgazada: A
- Normal: T

**Función renal:**

- $<30\%$ : A
- $31\text{-}44\%$ : T
- $>44\%$ : C
- No válido: G

La función renal oscila entre: función renal deteriorada de forma grave cuando es inferior al 30%, deterioro leve cuando se encuentra entre el 31 y 41% y

función renal conservada cuando es superior al 44%.

**Tiempo medio de eliminación en renograma MAG-3 prequirúrgico:**

- >20 minutos: A
- <20 minutos: T

El tiempo medio de eliminación en el renograma MAG-3 prequirúrgico se clasifica como obstructiva si este tiempo es superior a 20 minutos o normal si es inferior a 20 minutos.

**Tiempo medio de eliminación en renograma MAG-3 postquirúrgico:**

- <10 minutos: A
- 10-20 minutos: T
- >20 minutos: C
- No válido: G

El tiempo medio de eliminación en el renograma MAG-3 postquirúrgico se clasifica en normal si es inferior a 10 minutos, indeterminado si oscila entre 10 y 20 minutos y obstructivo si es superior 20 minutos.

>1 AAATACGCTTTCCAAA	>11 AAAATGGGACTAAATT
>2 AAATTCCAATTTAAT	>12 TAACTGGGTCTCCAAT
>3 TAATACCCATAGAAAA	>13 AAATTCGATTTCAAA
>4 AAAGTGGTTATCCATT	>14 ATATTGGGATTTCAAT
>5 AAAATCCGAATTGAGT	>15 TAATTGGCACACCAAT
>6 AAAATGGCTTTGCAAT	>16 TTCCTGGGATTTCCAAT
>7 ATACTGGCTTTCCATT	>17 AATATTGCTTTCCATT
>8 TAGGCGGCTATCCATT	>18 TTAAACGCACATAAATT
>9 AATCTCGGATTCCATT	>19 TTATAGGGACTTCATT
>10 TTAATTGGAGATTAAT	>20 ATGGCCGAAATTAAT

**Tabla 8: Codificación de las variables clínico patológicas y de imagen.** Estas variables asignadas a las características de cada paciente a estudio serán analizadas como una secuencia por el programa PHYLIP.

Dichas variables se analizan con el software PHYLIP para generar un árbol de distancias y semejanzas en forma de “phylograma” (Figura 31).

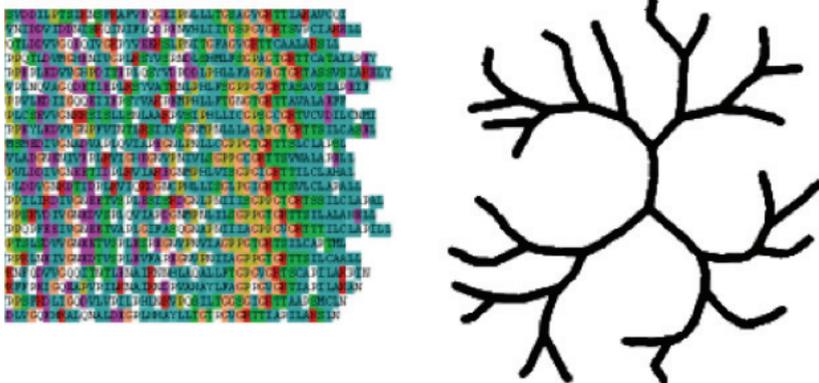
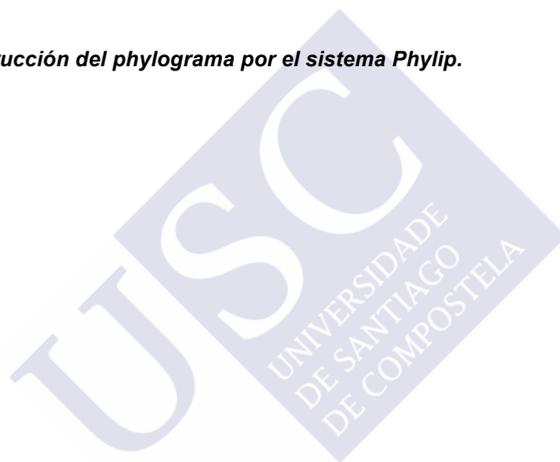


Figura 31: Construcción del phylograma por el sistema Phylip.



# RESULTADOS





## 1. Datos clínico-patológicos.

### 1.1 Análisis descriptivo:

El 60% de nuestros pacientes eran hombres y el 40% mujeres.

El lado izquierdo se encontraba afectado en un 65% de los casos.

El diagnóstico se realizó en periodo prenatal en el 75% de los casos mientras que el 25% restante se diagnosticó con una edad media de 82 meses.

La edad media con la que se intervinieron nuestros pacientes fue a los 31.9 meses.

Con respecto a la clínica, el 70% se encontraban asintomáticos en el momento de la cirugía; el 30% restante presentaban algún tipo de clínica en el momento de la indicación quirúrgica siendo en el 66% dolor tipo cólico y en el resto ITU.

El filtrado glomerular renal (FGR) medio prequirúrgico fue de 92.7 ml/min/1,73m<sup>2</sup> y el postquirúrgico 107.06 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

Con respecto a la hidronefrosis prequirúrgica en la ecografía el 5% tenían una hidronefrosis moderada, el 45% severa y el 50% muy severa. Con respecto a la hidronefrosis postquirúrgica el 25% tenían una hidronefrosis leve, el 45% moderada, el 25% severa y un 5% muy severa.

El parénquima renal se encontraba alterado previo a la cirugía en un 65% mientras que posterior a la cirugía sólo el 25% lo presentaba adelgazado.

La función renal media previa a la intervención quirúrgica era del 39.3% mientras que la postquirúrgica alcanzó el 42%.

El T1/2 prequirúrgico en todos ellos fue superior a 20 minutos, característica imprescindible en un renograma obstructivo. El T1/2 postquirúrgico medio fue de 10.3 minutos.

En el seguimiento postquirúrgico sólo el 15% presentaron sintomatología.

Todos estos parámetros quedan recogidos en la tabla 9.

PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS		n	%
<b>Sexo</b>	Hombre	12	60%
	Mujer	8	40%
<b>Lado afecto</b>	Izquierdo	13	65%
	Derecho	7	35%
<b>Edad diagnóstico</b>	Prenatal	15	75%
	Postnatal	5	25%
<b>Edad Cirugía</b>	31.9 meses		
<b>Clínica</b>	Asintomáticos	14	70%
	ITU	2	10%
	Cólico	4	20%
<b>FGR Precirugia</b>	92.7 ml/min/1,73m <sup>2</sup>		
<b>FGR Postcirugia</b>	107.06 ml/min/1,73m <sup>2</sup>		
<b>Grado de hidronefrosis prequirúrgica</b>	Grado 2	1	5%
	Grado 3	9	45%
	Grado 4	10	50%
<b>Grado de hidronefrosis postquirúrgica</b>	Grado 1	5	25%
	Grado 2	9	45%
	Grado 3	5	25%
	Grado 4	1	5%
<b>Adelgazamiento cortical prequirúrgico</b>	Si	13	65%
	No	7	35%
<b>Adelgazamiento cortical postquirúrgico</b>	Si	5	25%
	No	15	75%
<b>Función renal prequirúrgica</b>	39.3%		
<b>Función renal postquirúrgica</b>	41.9%		
<b>T1/2 prequirúrgico</b>	>20 min		
<b>T1/2 postquirúrgico</b>	10.3 min		
<b>Evolución</b>	Asintomático	17	85%
	Clínica	3	15%

Tabla 9: *Parámetros clínico-patológicos de la serie.*

## 1.2 Análisis aplicando el programa Phylip:

Los datos se agruparon y analizaron según el programa PHYLIP (<http://www.phylogeny.fr/>) (169, 170).

En un primer momento codificamos el filtrado glomerular renal (FGR) con las siguientes variables:  $<60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : A,  $61-120 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : T,  $121-180 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : C,  $>180 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : G.

Con estos datos obtuvimos la siguiente correlación.

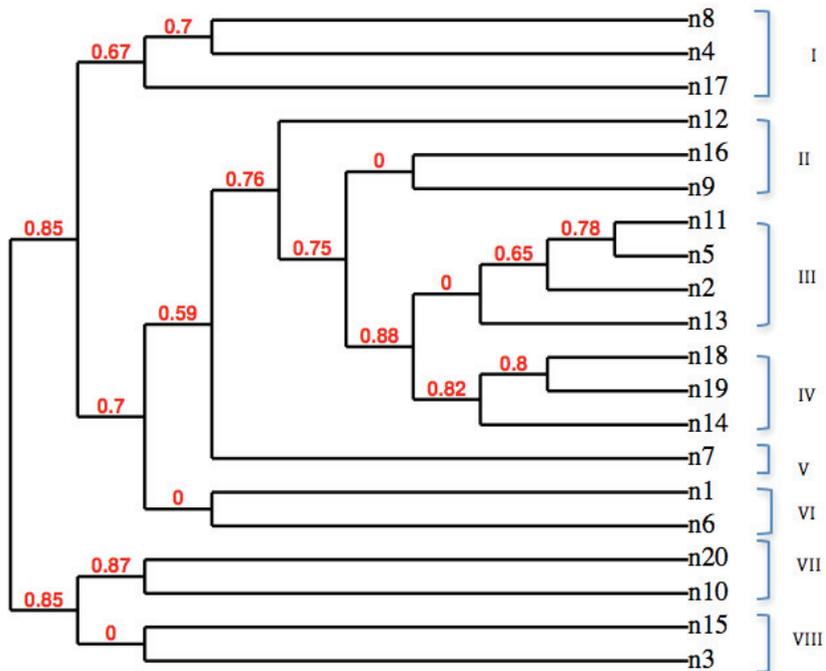


Figura 32: Árbol I

En este árbol se presentaba la siguiente asociación en 7 grupos de pacientes:

**Grupo I:** Tres pacientes con las siguientes características en común; el riñón afectado era el izquierdo en todos ellos, presentaban una filtrado glomerular renal postquirúrgico entre  $121-180 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , la corteza renal no se encontraba adelgazada ni en la ecografía pre ni en la postquirúrgica, la función renal en el renograma MAG-3 estaba conservada en el estudio pre y postquirúrgico y todos presentan un T1/2 postquirúrgico indeterminado.

**Grupo II:** En este grupo se reúnen 3 pacientes en los que la edad de intervención quirúrgica en todos ellos se encuentra entre los 13 y 36 meses, son pacientes asintomáticos en el momento de indicar el tratamiento quirúrgico,

su filtrado glomerular renal pre y postquirúrgico se recoge entre 61-120 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, el grado de hidronefrosis prequirúrgica corresponde en todos ellos a un grado 4, la corteza renal no se encuentra adelgazada una vez corregida la estenosis pieloureteral, la función renal tanto pre como postquirúrgica está conservada.

**Grupo III:** Corresponde a 4 pacientes varones, todos ellos afectados del lado izquierdo, con diagnóstico prenatal, asintomáticos en el momento de la indicación de la cirugía. El filtrado glomerular tanto pre como postquirúrgico se encuentra entre 61 y 120 ml/min/1,73m<sup>2</sup> y la corteza renal en todos ellos se encuentra adelgazada en el momento prequirúrgico y se normaliza tras la corrección de la estenosis pieloureteral.

**Grupo IV:** Corresponde a 3 pacientes afectados del lado derecho, cuya sospecha diagnóstica es prenatal con un filtrado glomerular renal postquirúrgico entre 61 y 120 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, corteza renal en la ecografía previa a la intervención adelgazada y una función renal ligeramente deteriorada e el momento de la indicación de la cirugía.

**Grupo V:** Este paciente no comparte características comunes con ninguno de los otros grupos.

**Grupo VI:** Se recogen 2 pacientes varones afectados del lado izquierdo cuya sospecha diagnóstica es prenatal, con un filtrado glomerular renal entre 61-120 ml/min/1,73m<sup>2</sup> tanto pre como postquirúrgico, con un grado de hidronefrosis grado 3 en la ecografía prequirúrgica y grado 2 en la postquirúrgica y una corteza renal normal en ambos casos. La función renal postquirúrgica en ambos se encuentra conservada y el T1/2 postquirúrgico es no obstructivo.

**Grupo VII:** Dos pacientes con afectación del lado derecho, hidronefrosis prequirúrgica grado 4, con corteza adelgazada en la ecografía tanto previa como posterior a la corrección quirúrgica, función renal deteriorada levemente pre y postquirúrgica y un T1/2 postquirúrgico no obstructivo.

**Grupo VIII:** Dos mujeres con afectación del lado izquierdo cuya sospecha diagnóstica es prenatal y se intervienen entre los 13 y 36 meses. El filtrado glomerular se encuentra entre 61 y 120 ml/min/1,73m<sup>2</sup> en el momento previo a la cirugía, presentan una hidronefrosis grado3 en la ecografía prequirúrgica y un parénquima adelgazado tanto antes como después de la intervención.

Su T1/2 postquirúrgico es no obstructivo.

REFERENCIA	SEXO	LADO	EDAD DX	CLINICA	FOR PRE	FORPOST	HN PRE	CORT PRE	HN POST	CORT POST	MAG3 PRE	MAG3 POST	T1/2 PRE	T1/2 POST
8	MUJER	IZQUIERDO	> 5 AÑOS	COLICO	121-180	121-180	GRADO 3	NORMAL	GRADO 1	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN
4	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	> 36 MESES ASINTOMÁTICO	> 180	121-180	GRADO 2	NORMAL	GRADO 1	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN
17	VARON	IZQUIERDO	0-12 MESES	< 6 MESES ASINTOMÁTICO	< 60	121-180	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN
12	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	13-36 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 4	NORMAL	GRADO 3	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN
16	MUJER	DERECHO	1-5 AÑOS	13-36 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN
9	VARON	IZQUIERDO	0-12 MESES	13-36 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN
11	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NORMAL	< 30%	< 30%	> 20 MIN	10-20 MIN
5	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NORMAL	31-44%	NO VÁLIDO	> 20 MIN	NO VÁLIDO
2	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 1	NORMAL	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN
13	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	31-44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN
18	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES ITU	< 60	61-120	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	31-44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN
19	MUJER	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES ITU	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NORMAL	31-44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN
14	VARON	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	31-44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN
7	VARON	DERECHO	PRENATAL	13-36 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN
1	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES ITU	61-120	61-120	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN
6	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NORMAL	NO VÁLIDO	NO VÁLIDO	> 20 MIN	< 10 MIN
20	VARON	DERECHO	> 5 AÑOS	> 36 MESES COLICO	61-120	61-120	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 1	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN
10	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES ASINTOMÁTICO	< 60	121-180	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 4	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN
15	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	13-36 MESES ASINTOMÁTICO	61-120	61-120	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN
3	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	13-36 MESES ITU	61-120	61-120	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 2	ADELGAZADA	NO VÁLIDO	NO VÁLIDO	> 20 MIN	< 10 MIN

Tabla 10: Agrupación árbol I

- GRUPO I
- GRUPO II
- GRUPO III
- GRUPO IV
- GRUPO V
- GRUPO VI
- GRUPO VII
- GRUPO VIII

Revisando la bibliografía, cambiamos los parámetros de codificación del FGR, siendo la nueva codificación:  $<29 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : A,  $30-59 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : T,  $60-89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : C,  $>90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ : G obteniendo así la siguiente correlación.

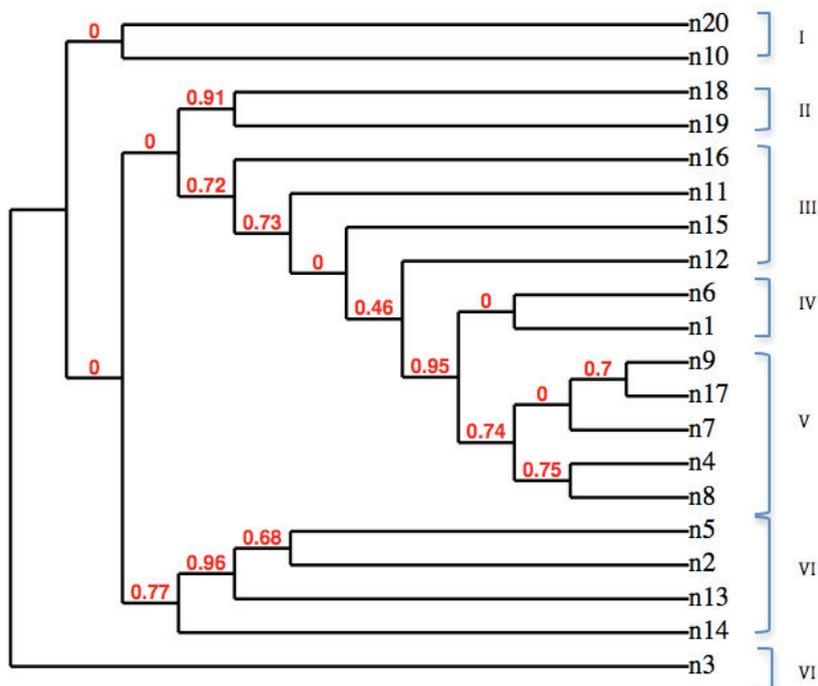


Figura 33: *Árbol II*

En este árbol se presentaba la siguiente asociación en 6 grupos de pacientes:

**Grupo I:** Reúne dos pacientes afectados del lado derecho. Su filtrado glomerular (FGR) postquirúrgico es en ambos superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . Presenta una hidronefrosis grave en la ecografía prequirúrgica y el parénquima renal se encuentra adelgazado tanto en la ecografía prequirúrgica como en la post. La función renal se encuentra deteriorada discretamente situándose entre 21 y 44% en ambos controles. El T1/2 postquirúrgico es no obstructivo.

**Grupo II:** Pertenecen dos mujeres con el riñón derecho afectado en las que el diagnóstico se realizó en el periodo prenatal. Ambas presentaron sintomatología previa a la cirugía en forma de ITU. Su FGR postquirúrgico fue superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . La ecografía prequirúrgica mostraba en ambas una corteza renal adelgazada y una hidronefrosis en los controles tras la

corrección de grado 3. La función renal prequirúrgica en ambas se encontraba levemente disminuida siendo ésta entre el 31 y 44% y su T1/2 postquirúrgico era indeterminado en los controles.

**Grupo III:** Recoge a 4 pacientes los cuales todos son asintomáticos en el momento de la cirugía y presentan un FGR tanto pre como postquirúrgico es superior a 90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

**Grupo IV:** Se trata de dos pacientes varones con el riñón izquierdo afectado. El diagnóstico en ambos casos fue por sospecha prenatal. Presentan un FGR postquirúrgico superior a 90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. En la ecografía tanto en la pre como en la postquirúrgica se apreciaba una corteza renal adelgazada con un grado 3 de hidronefrosis prequirúrgica. La función renal postquirúrgica se mantuvo en ambos superior al 44% y el T1/2 postquirúrgico fue no obstructivo.

**Grupo V:** Reúne a 5 pacientes con características comunes con respecto a un FGR postquirúrgico superior a 90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, la corteza renal en la ecografía postquirúrgica no está adelgazada, la función renal se encuentra tanto antes como después de la intervención conservada y el T1/2 postquirúrgico en todos ellos es indeterminado.

Dos varones con riñón afectado del lado izquierdo cuyo diagnóstico fue prenatal. La cirugía se realizó encontrándose asintomáticos y con un FGR entre 60-89 ml/min/1,73m<sup>2</sup> que se mantuvo en esas cifras en el postoperatorio. La corteza renal en la ecografía preoperatoria se encontraba adelgazada, en la ecografía posterior a la reparación presentaba un grado de hidronefrosis leve con recuperación del grosor del parénquima renal. La función renal en previa a la cirugía se encontraba levemente deteriorada.

**Grupo VII:** Corresponde a dos varones con diagnóstico prenatal intervenidos entre los 6 y 12 meses encontrándose asintomáticos en el momento de la cirugía. En la ecografía prequirúrgica presentaban una hidronefrosis muy severa con adelgazamiento del parénquima renal mientras que en la ecografía posterior a la corrección quirúrgica la hidronefrosis era de grado moderado con una corteza de características normales. La función renal prequirúrgica estaba levemente deteriorada mientras que la de control se recuperó a niveles normales. El T1/2 postquirúrgico fue no obstructivo.

**Grupo VIII:** Este paciente no guardaba características comunes suficientes con otros pacientes que permitiese una agrupación.

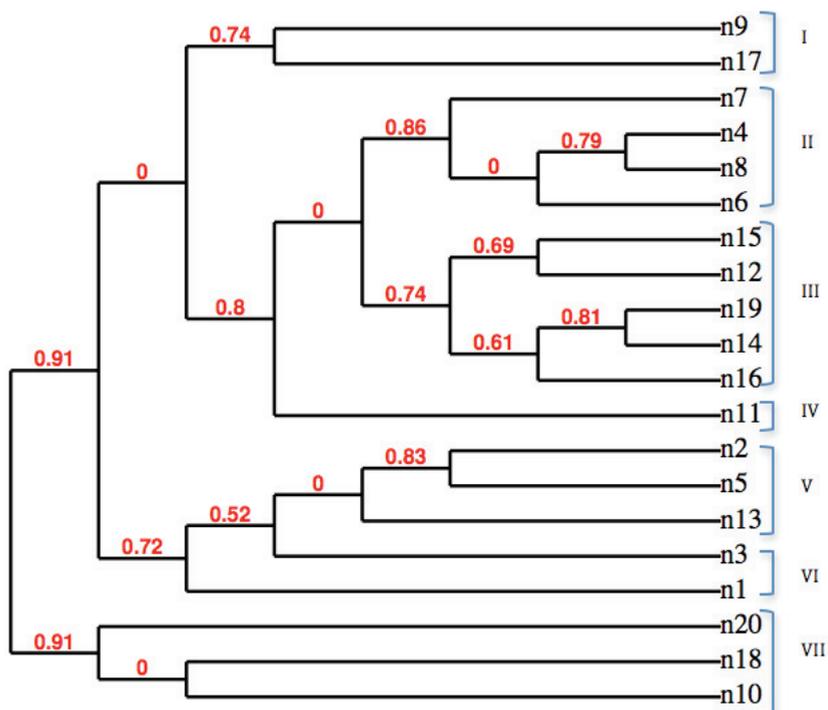
REFERENCIA	SEXO	LADO	EDAD DX	EDAD OX	CLINICA	FGR PRE	FGR POST	HN PRE	CORT PRE	HN POST	CORT POST	MAG3 PREQ	MAG3 POSTQ	T1/2 PRE	T1/2 POST
20	VARON	DERECHO	> 5 AÑOS	> 36 MESES	CÓLICO	60-89	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 1	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20	< 10 MIN
10	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	30-59	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 4	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20	< 10 MIN
18	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES	ITU	30-59	> 90	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20	10-20 MIN
19	MUJER	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	10-20 MIN
16	MUJER	DERECHO	1-5 AÑOS	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	< 10 MIN
11	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NORMAL	< 30%	< 30%	> 20	10-20 MIN
15	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	> 44%	> 44%	> 20	< 10 MIN
12	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	NORMAL	GRADO 3	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	< 10 MIN
6	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NORMAL	NO VÁLIDO	NO VÁLIDO	> 20	< 10 MIN
1	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	60-89	> 90	GRADO 3	NORMAL	GRADO 3	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	< 10 MIN
9	VARON	IZQUIERDO	0-12 MESES	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	10-20 MIN
17	VARON	IZQUIERDO	0-12 MESES	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	30-59	> 90	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	10-20 MIN
7	VARON	DERECHO	PRENATAL	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	10-20 MIN
4	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	> 36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 2	NORMAL	GRADO 1	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	10-20 MIN
8	MUJER	IZQUIERDO	> 5 AÑOS	> 36 MESES	CÓLICO	> 90	> 90	GRADO 3	NORMAL	GRADO 1	NORMAL	> 44%	> 44%	> 20	10-20 MIN
5	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 1	NORMAL	31-44%	No válido	> 20	NO VÁLIDO
2	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 1	NORMAL	31-44%	31-44%	> 20	< 10 MIN
13	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	31-44%	> 44%	> 20	< 10 MIN
14	VARON	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NORMAL	31-44%	> 44%	> 20	< 10 MIN
3	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	60-89	60-89	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 2	ADELGAZADA	No válido	No válido	< 30%	< 10 MIN

Tabla 11: Agrupación árbol II

- GRUPO I
- GRUPO II
- GRUPO III
- GRUPO IV
- GRUPO V
- GRUPO VI
- GRUPO VII
- GRUPO VIII

Introduciendo una nueva variable, que es la evolución clínica de estos pacientes una vez intervenidos, la cual codificamos como A: la presencia de alguna incidencia en el seguimiento evolutivo y T: su ausencia, la correlación que obtuvimos fue el siguiente.

Este es el árbol que consideramos por todas las características que reúne como el más adecuado para centrar la discusión de nuestro estudio.



**Figura 34: Árbol III**

En este árbol se presentaba la siguiente asociación en 7 grupos de pacientes:

**Grupo I:** Reúne a dos varones con afectación del lado izquierdo que fueron diagnosticados entre los 0 y 12 meses y en los que se indicó la cirugía encontrándose asintomáticos. El Filtrado glomerular renal (FGR) postquirúrgico en ambos era superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . En la ecografía de control tras la cirugía la hidronefrosis que presentaban era moderada de grado 2 y la corteza renal no se encontraba adelgazada. Tanto la función renal pre como la postquirúrgica estaba conservada, el T1/2 de control era indeterminado. En ninguno de ellos se registra alguna incidencia en el seguimiento evolutivo.

**Grupo II:** Este grupo está formado por 4 pacientes con características comunes con respecto a su FGR tanto pre como postquirúrgico que es en ambos casos superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . El parénquima renal se mantiene conservado tanto en la ecografía pre como en la posterior a la pieloplastia. La función renal en el renograma de control está conservada y en ninguno de ellos se registró ninguna incidencia durante el tiempo de seguimiento evolutivo.

**Grupo III:** Corresponde a 5 pacientes con características comunes con respecto a su FGR tanto pre como postquirúrgico que es en ambos casos superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . La función renal en el renograma de control está conservada y en ninguno de ellos se registró ninguna incidencia durante el tiempo de seguimiento evolutivo.

**Grupo IV:** Este paciente no guardaba características comunes suficientes con otros pacientes que permitiese una agrupación.

**Grupo V:** Reúne a 3 pacientes varones con el riñón izquierdo afectado de diagnóstico prenatal e intervenidos entre los 6 y 12 meses. Todos ellos se encontraban asintomáticos en el momento de la cirugía. Su FGR tanto pre como postquirúrgico se encuentra entre 60 y  $89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . En la ecografía prenatal la corteza se encuentra adelgazada mientras que en la de control tras la cirugía el parénquima está conservado. La función renal previa a la pieloplastia está levemente deteriorada.

**Grupo VI:** Corresponde a 2 pacientes con el riñón izquierdo afectado de diagnóstico prenatal e intervenidos entre los 6 y 12 meses. Ambos presentaron clínica previa a la intervención en forma de ITU. Su FGR prequirúrgico se situaba entre 60 y  $89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . La hidronefrosis en la ecografía prequirúrgica en ambos era severa disminuyendo a una hidronefrosis moderada en el control postoperatorio. El T1/2 de control en todos los casos fue no obstructivo y ninguno de ellos presentó incidencias en el seguimiento evolutivo.

**Grupo VII:** Reúne a 3 pacientes con el riñón derecho afectado con un FGR superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . El parénquima se encuentra adelgazado tanto en la ecografía prequirúrgica como en la postquirúrgica. La función renal previa a la pieloplastia se encuentra levemente deteriorada. Ninguno de ellos presentó ninguna incidencia en el seguimiento evolutivo.

REFERENCIA	SEXO	LADO	EDAD DX	EDAD QX	CLINICA	FGR PRE	FGR POST	HN PRE	CORT PRE	HN POST	CORT POST	MAG3 PRE	MAG3 POST	T1/2 PRE	T1/2 POST	INCIDENCIAS
9	VARON	IZQUIERDO	0-12 MESES	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
17	VARON	IZQUIERDO	0-12 MESES	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	30-59	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
7	VARON	DERECHO	PRENATAL	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
4	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	> 36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 2	NO	GRADO 1	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
8	MUJER	IZQUIERDO	> 5 AÑOS	> 36 MESES	CÓLICO	> 90	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 1	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
6	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 2	NO	NO VÁLIDO	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO
15	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO
12	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	NO	GRADO 3	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO
19	MUJER	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
14	VARON	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	31-44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO
16	MUJER	DERECHO	1-5 AÑOS	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO
11	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NO	< 30%	< 30%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
2	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 1	NO	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO
5	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 1	NO	31-44%	NO VÁLIDO	> 20 MIN	NO VÁLIDO	NO
13	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	31-44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	ITU
3	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	60-89	60-89	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 2	ADELGAZADA	NO VÁLIDO	< 30%	> 20 MIN	< 10 MIN	ITU
1	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	60-89	> 90	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	ITU
20	VARON	DERECHO	> 5 AÑOS	> 36 MESES	CÓLICO	60-89	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 1	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO
18	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES	ITU	60-89	> 90	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	31-44%	< 30%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO
10	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	30-59	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 4	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO

Tabla 12: Agrupación árbol III

- GRUPO I
- GRUPO II
- GRUPO III
- GRUPO IV
- GRUPO V
- GRUPO VI
- GRUPO VII

## 2. Datos epigenéticos.

### 2.1 Microarray:

Ante la hipótesis planteada con respecto a si la metilación es importante en la estenosis pieloureteral, realizamos una prospección con un *array* manual analizando dos piezas de estenosis pieloureteral sobre un total de 12288 sondas (Figura 35).

Tras realizar un cribado de limpieza, se seleccionan 11470 útiles. De estas 11470 sondas útiles el porcentaje de genes metilados corresponde entre el 16-23% del total de las sondas.

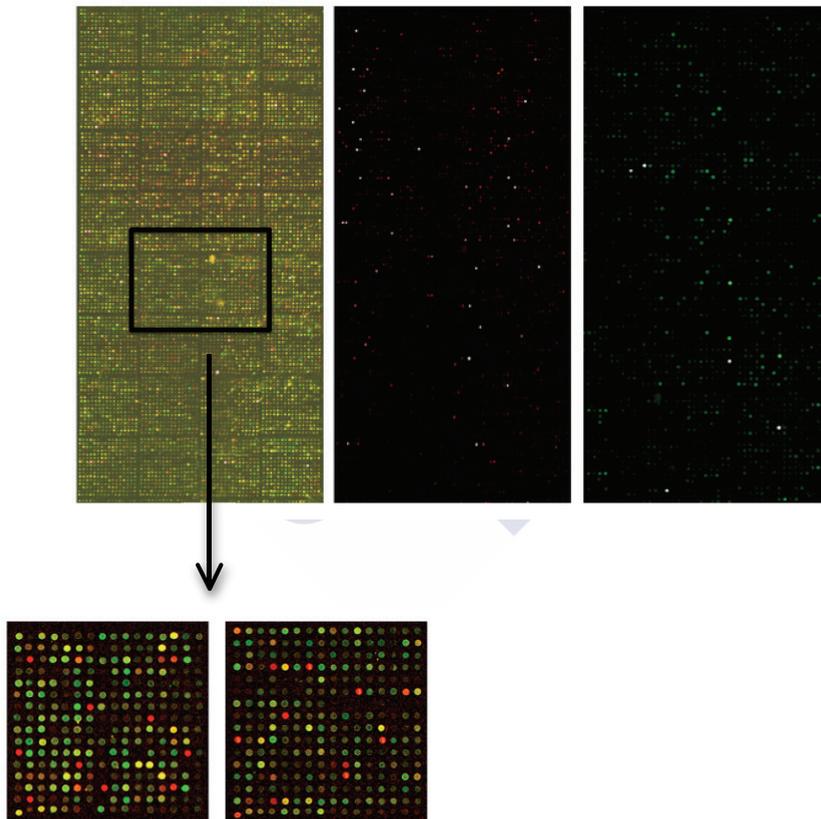


Figura 35: *Imagen del array*

Los datos del *array* se analizan con el programa de escaneo para procesar las muestras metiladas y no metiladas (Figura 36).

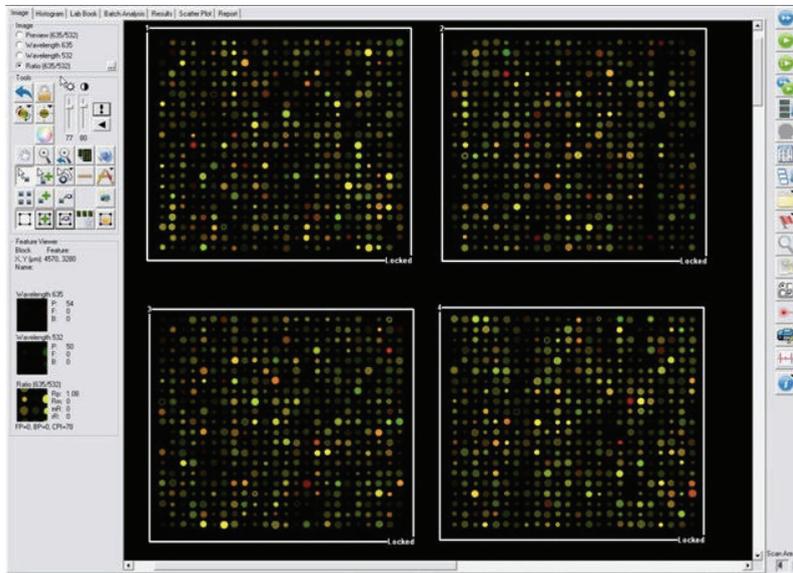


Figura 36: Análisis y procesamiento del array

En la siguiente tabla se representan los 146 genes cuyo valor de hibridación para la sonda metilada con respecto a la sonda control es superior a 20 (Tabla 13).

ABCB6   AI335447	HOXB13   AA456069	PVALB   AA010609
ABCC5   N80617	HOXB5   H02340	RAB2   T82415
AD24   AI017605	HOXB7   AA857101	RAC3   N54221
AGRN   AA458878	HOXC4   AI200419	RALB   W15297
AHCY   AA485626	HRB   AA489568	RALB   W15297
ALDH5A1   AA884035	HSD17B3   AA437291	RBX1   R97788
ANXA3   g1025815	HSF1   g712705	RIPK1   AA426324
APG5L   N95381	HSPC150   AA460432	RUNX1   AA146826
ARPC1B   AA188155	IFITM2   AA985421	SMARCC2   H24688
ATF1   AI241388	IL1B   W47101	SMARCC3   AA035796
ATP7B   N26536	IL1RAP   AA404284	SMOH   AA070437
B2M   AA670408	IL1RAP   R35903	SPF30   H05577
BAAT   R98624	IL6ST   AI360116	SRRM1   AA976063
BACE2   AA457119	KCNQ2   H51461	SYNE-1   AA046724
BCL2L2   AA456480	LAPTM5   AA410265	TACTILE   AI652836
BID   AA190401	LEAP-2   R93723	TBCC   AA954188
BMP7   W73473	LHCGR   g3214350	TCEA2   AA412500
BNIP3   AA063521	LIG1   AA917688	TCF7   AA480071
BST2   AA485371	LOC51067   AA056381	TCFL4   AA134555
C5   N73030	LOC51102   W47099	TGFA   AA933077
CASP7   T50828	LOC51596   AA457543	TGFB2   N45138
CCT4   T98684	LOC54543   AA069704	TGFB2   W47556
CDC42   AA630164	LTBP1   AA504656	TIMM17B   AA219179
CDH5   T53626	LYN   R83837	TIMP4   g3416414
CDKL2   g6228445	LYPLA2   AA521038	TM4SF7   AA100696
CENTB1   AA918804	MAD	TMPO   AA676998
CFLAR   N94588	MADH4   AA456439	TNFRSF8   AI203419
CNK   AA489234	MADH6   AA410440	TOB1   AA490213
COL5A1   R75635	MAGEB2   AI479347	TRAP240   AA434084
COX15   H62905	MAPRE1   AA001749	TRF4-2   H05635
CRLF3   N46830	MECP2   AA670387	TUBB2   AA888148
CSF2RB   R66326	MGMT   AI248501	TUBB4   g944344
CSK   AA078778	MIG   AA131406	UBE1C   AI309770
CSPG2   AA101875	MRPL16   R06372	WNT2B   g2167242
CTSB   AA970402	N33   H13424	YARS   AA486761
CYP2D6   AI016456	NASP   AA644128	ZHX1   N50828
DHFR   AA682438	NTT5   AA005387	
DLX4   AA256304	NUDE1   AA459394	
EDN1   H11003	OSBPL10   R31395	
EDN2   AI140863	PA26   AA447661	
EGR2   AA446027	PANK   H14604	
ELAVL4   AI458073	PAWR   AA972337	
EMS1   AI659564	PCDHA9   AA437139	
F8   AA437191	PGM1   AA488504	
FCN3   AA666363	PIK3C3   AA455605	
FDXR   AI671604	PIR121   H12043	
FN1   AA497002	PKD2L1   AI217982	
FOLR3   W47362	PMM1   AA156863	
GADD45B   AI184305	PPP1R7   AA459572	
GHR   AA775738	PPP3CA   AA460707	
GSTM3   R63106	PPP3CA   AA68263	
GTF2A2   T55801	PRKCA   AA236171	
HBXAP   N91426	PRKCBP1   AI378555	
HDAC3   AA973283	PSMA5   AA598815	
HMG2L1   W42451	PTHLH   AA845432	

**Tabla 13: Genes con valor de hibridación para la sonda metilada con respecto a la sonda control superior a 20.**

## 2.2 Perfiles de metilación:

Por sus implicaciones en los procesos biológicos tales como fijación, crecimiento y control del ciclo celular, elegimos los siguientes genes: p16, RASSF1A, MGMT, E-Cadherina, Ciclina-D2, HIN-1 y RASAL-1.

El perfil de metilación de las islas CpG en la región del promotor de los genes se expresan en la siguiente figura (Figura 37).

REF	p16	RASSF1	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
control							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
control							
	25%M/75%U	0%M/100%U	5%M/85%U	25%M/75%U	5%M/95%U	25%M/75%U	35%U/65%M

Figura 37: Perfiles de metilación de los genes seleccionados.

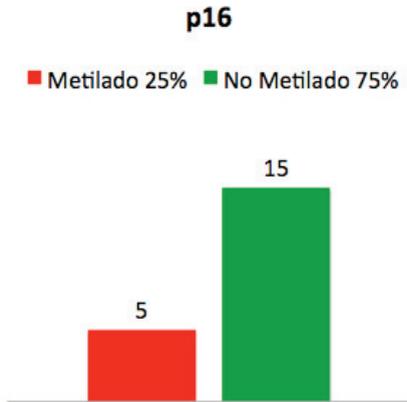


Figura 38: Perfil de p16

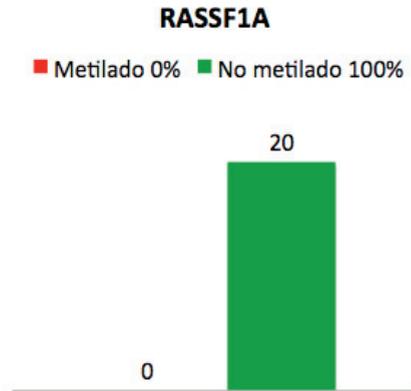


Figura 39: Perfil de RASSF1A

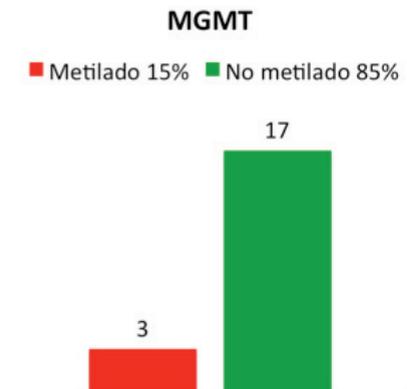


Figura 40: Perfil de MGMT

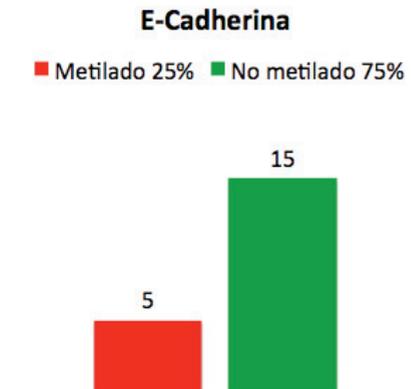
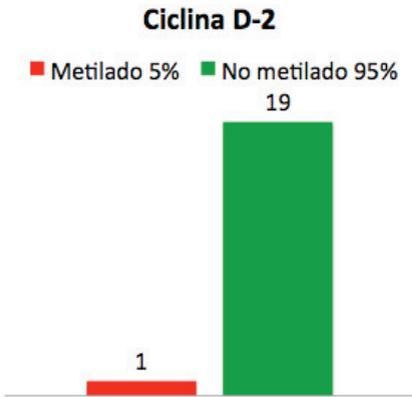
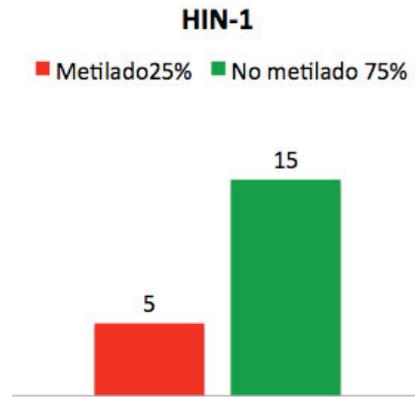
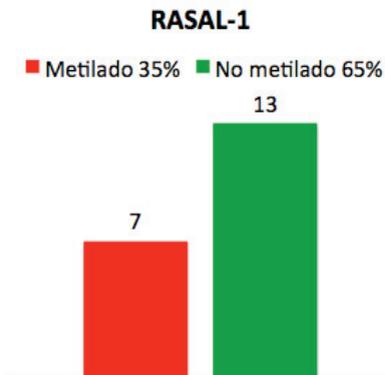


Figura 41: Perfil de E-Cadherina

Figura 42: Perfil de *Ciclina D-2*Figura 43: Perfil de *HIN-1*Figura 44: Perfil de *RASAL-1*

Los resultados con respecto a la metilación muestran una proporción considerable de metilación aberrante en la región del promotor de los genes p16 (25%), MGMT (15%), E-Cadherina (25%), HIN-1 (25%) y RASAL-1 (35%).

### 2.3 Clusters epigenéticos:

Eliminamos de los datos de epigenética la fila del gen RASSF1A ya que ninguno de los pacientes resultó metilado para dicho gen.

Analizando los datos, existe un solo cluster de pacientes que no presentan ningún gen metilado, se corresponden con los pacientes 10,13,16 y 18 (Figura 45).

PACIENTE	p16	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
10	Green	Green	Green	Green	Green	Green
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green
16	Green	Green	Green	Green	Green	Green
18	Green	Green	Green	Green	Green	Green

**Figura 45: Cluster de genes no metilados**

Agrupando de forma independiente cada gen entre metilado y no metilado la distribución que encontramos en cada uno fue la siguiente:

#### - p16 (Cycline–dependent kinase inhibitor 2A):

PACIENTE	p16	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Green	Green	Green	Green	Green
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5	Green	Green	Green	Green	Green	Green
9	Green	Green	Green	Green	Green	Green
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green
15	Green	Green	Green	Green	Green	Green
19	Green	Green	Green	Green	Green	Green
20	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4	Red	Green	Green	Green	Green	Green
6	Red	Green	Green	Green	Green	Green
7	Red	Green	Green	Green	Green	Green
8	Red	Green	Green	Green	Green	Green
17	Red	Green	Green	Green	Green	Green

**Figura 46: Cluster epigenético de p16**

Los 5 pacientes con el gen p16 metilados lo comparten en su gran mayoría (excepto un caso) con los pacientes que también tiene el gen HIN-1 metilado.

Con respecto a los pacientes en los que p16 no se encuentra metilado, estos sin embargo sí presentan el gen RASAL-1 metilado.

**- MGMT (O6-metilguanina ADN metiltransferasa):**

PACIENTE	p16	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
2	Green	Green	Red	Green	Green	Red
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5	Green	Green	Red	Green	Green	Green
9	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green	Red
14	Green	Green	Green	Green	Green	Red
15	Green	Green	Green	Green	Green	Red
19	Green	Green	Green	Green	Green	Green
20	Green	Green	Green	Red	Green	Green
4	Red	Green	Green	Green	Red	Green
6	Red	Green	Green	Green	Red	Red
7	Red	Green	Green	Green	Green	Green
17	Red	Green	Red	Green	Green	Green
1	Green	Red	Green	Green	Green	Red
11	Green	Green	Green	Green	Red	Green
8	Red	Red	Red	Green	Red	Green

**Figura 47: Cluster epigenético de MGMT**

En el análisis individualizado del gen MGMT entre metilado y no metilado no se observa ningún patrón definido de asociación entre los distintos genes.

**- E- Cadherina:**

PACIENTE	p16	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
3	Green	Green	Green	Green	Green	Red
12	Green	Green	Green	Green	Green	Red
14	Green	Green	Green	Green	Green	Red
15	Green	Green	Green	Green	Green	Red
19	Green	Green	Green	Green	Green	Green
20	Green	Green	Green	Red	Green	Green
4	Red	Green	Green	Green	Red	Green
6	Red	Green	Green	Green	Red	Red
7	Red	Green	Green	Green	Green	Green
1	Green	Red	Green	Green	Green	Red
11	Green	Green	Green	Green	Red	Green
2	Green	Green	Red	Green	Green	Green
5	Green	Green	Green	Green	Green	Green
9	Green	Green	Green	Green	Green	Green
17	Red	Green	Red	Green	Green	Green
8	Red	Red	Red	Green	Red	Green

**Figura 48: Cluster epigenético de E-Cadherina**

Los 5 pacientes en los que E-Cadherina está metilado no comparten un patrón de metilación en ningún caso con RASAL-1 y tan sólo en uno de HIN-1; mientras que las muestras no metiladas para E-Cadherina sí expresan RASAL-1 y HIN-1 metilados.

**- Ciclina-D2:**

PACIENTE	p16	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
3	Green	Green	Green	Green	Green	Red
12	Green	Green	Green	Green	Green	Red
14	Green	Green	Green	Green	Green	Red
15	Green	Green	Green	Green	Green	Red
19	Green	Green	Green	Green	Green	Red
4	Red	Green	Green	Green	Red	Green
6	Red	Green	Green	Green	Red	Green
7	Green	Green	Green	Green	Green	Red
1	Green	Red	Green	Green	Green	Red
11	Green	Green	Green	Green	Red	Green
2	Green	Green	Red	Green	Green	Green
5	Green	Green	Red	Green	Green	Green
9	Green	Green	Green	Green	Green	Green
17	Red	Green	Green	Green	Green	Green
8	Red	Red	Red	Green	Red	Green
20	Green	Green	Green	Red	Green	Green

**Figura 49: Cluster epigenético de Ciclina-D2**

Solamente un paciente presenta metilación para la Ciclina-D2, por lo que no se ha podido establecer ningún perfil de metilación para este gen.

**- HIN-1 (High –in normal-1):**

PACIENTE	p16	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
3	Green	Green	Green	Green	Green	Red
12	Green	Green	Green	Green	Green	Red
14	Green	Green	Green	Green	Green	Red
15	Green	Green	Green	Green	Green	Red
19	Green	Green	Green	Green	Green	Red
1	Green	Red	Green	Green	Green	Red
2	Green	Green	Red	Green	Green	Green
5	Green	Green	Red	Green	Green	Green
9	Green	Green	Green	Green	Green	Green
17	Red	Green	Green	Green	Green	Green
20	Green	Green	Green	Red	Green	Green
4	Red	Green	Green	Green	Red	Green
6	Red	Green	Green	Green	Red	Red
7	Green	Green	Green	Green	Red	Green
11	Green	Red	Green	Green	Red	Green
8	Red	Red	Red	Green	Red	Green

**Figura 50: Cluster epigenético de HIN-1**

Los 5 pacientes con HIN-1 metilado comparten estado de metilación con p16. Los pacientes con HIN-1 no metilado excepto uno, todos presentan tanto E-Cadherina como RASAL-1 metilados.

**- RASAL-1 (Ras protein activator like 1):**

PACIENTE	p16	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HIN-1	RASAL1
2	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5	Green	Green	Green	Green	Green	Green
9	Green	Green	Green	Green	Green	Green
17	Green	Green	Green	Green	Green	Green
20	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4	Green	Green	Green	Green	Green	Green
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Green	Green	Green	Green	Green	Green
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green
15	Green	Green	Green	Green	Green	Green
19	Green	Green	Green	Green	Green	Green
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6	Green	Green	Green	Green	Green	Green

**Figura 51: Cluster epigenético de RASAL-1**

Es el grupo mayoritario en metilación con 7 pacientes metilados para dicho gen. Se establece un patrón de metilación que nos divide a nuestra serie en dos grandes grupos. Por un lado los pacientes con RASAL-1 metilado, los cuales no comparten esta característica con otros genes (solo con un paciente que presenta metilación para HIN-1 y p16 y otro caso para MGMT). El otro grupo, lo formarían los casos con RASAL-1 no metilados, en los que el resto de los genes de nuestra serie sí se encuentran metilados.

**3. Correlación entre parámetros clínico-patológicos y metilación:**

La finalidad principal del estudio es encontrar correlación entre los parámetros clínico-patológicos de los pacientes con estenosis pieloureteral y sus patrones de metilación específicos para los genes seleccionados. Para ello se han agrupado los cluster, de ambas características unidas, para intentar apreciar alguna relación entre ambos quedando representada en la siguiente tabla.

Tabla 14: Correlación parámetros clínico-patológicos-epigenéticos

REFERENCIA	SEXO	LADO	EDAD DX	EDAD OX	CLÍNICA	FER PRE	FER POST	HN PRE	CORT PRE	HN POST	CORT POST	MAG3 PRE	MAG3 POST	ITZ PRE	ITZ POST	INCIDENCIAS	p16	RASSF1	MGMT	e-cadherin	Cyclin-D2	HN-L1	RASAL1
9	VARON	IZQUIERDO	6-12 MESES	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
17	VARON	IZQUIERDO	0-12 MESES	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	30-59	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
7	VARON	DERECHO	PRENATAL	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
4	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	> 36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 2	NO	GRADO 1	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
5	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	CÓLICO	60-89	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
6	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	NO	GRADO 2	NO	NO VALIDO	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
15	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
12	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	NO	GRADO 3	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
19	MUJER	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NO	31-44%	> 44%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
14	VARON	DERECHO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	31-44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
16	MUJER	DERECHO	15 AÑOS	13-36 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
11	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	> 90	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 3	NO	< 30%	< 30%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
2	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 1	NO	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
5	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	31-44%	NO VALIDO	> 20 MIN	NO VALIDO	NO							
13	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ASINTOMÁTICO	60-89	60-89	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 2	NO	31-44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
3	MUJER	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	60-89	60-89	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 2	ADELGAZADA	NO VALIDO	> 30%	> 20 MIN	< 10 MIN	ITU							
1	VARON	IZQUIERDO	PRENATAL	6-12 MESES	ITU	60-89	> 90	GRADO 3	NORMAL	GRADO 2	NO	> 44%	> 44%	> 20 MIN	< 10 MIN	ITU							
20	VARON	DERECHO	> 5 AÑOS	> 36 MESES	CÓLICO	60-89	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 1	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							
18	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES	ITU	60-89	> 90	GRADO 3	ADELGAZADA	GRADO 3	ADELGAZADA	31-44%	< 30%	> 20 MIN	10-20 MIN	NO							
10	MUJER	DERECHO	PRENATAL	< 6 MESES	ASINTOMÁTICO	30-59	> 90	GRADO 4	ADELGAZADA	GRADO 4	ADELGAZADA	31-44%	31-44%	> 20 MIN	< 10 MIN	NO							



# DISCUSIÓN





### **1. Aspectos clínico-patológicos de la estenosis pieloureteral.**

La estenosis pieloureteral constituye la segunda causa más frecuente de dilatación del tracto urinario superior. Su incidencia en los últimos años ha aumentado debido al control que se lleva a cabo en la mujer embarazada permitiendo diagnosticar la hidronefrosis en la gran mayoría de los casos mientras los pacientes se encuentran asintomáticos.

La estenosis pieloureteral consiste en la dificultad de paso de la orina desde la pelvis renal hacia el uréter. Esta situación provoca un aumento de presión retrógrada que genera una dilatación de la pelvis renal que en una situación mantenida en el tiempo genera displasia y fallo renal.

En la evaluación diagnóstica de la estenosis pieloureteral no está nada establecido como norma patognomónica para determinar el tratamiento adecuado, se necesita realizar una evaluación conjunta de aspectos clínicos y radiológicos sin existir en todos los casos una posición conjunta de acuerdo.

En la valoración de la dilatación del tracto urinario superior determinada por la ecografía, la existencia de obstrucción se basa en el renograma diurético; valores superiores a 20 minutos de tiempo medio de eliminación del trazador tras la administración del diurético se considera obstructivo mientras que los que se encuentran entre 10 y 20 indeterminado y por debajo de 10 minutos normal. Es en este punto del análisis donde radiólogos y cirujanos pueden encontrar sus mayores discrepancias.

Seguimientos conservadores en pacientes con una función renal conservada y asintomáticos han evidenciado una evolución favorable con mejoría en su patrón de eliminación lo que sugiere que únicamente el perfil obstructivo como indicador de cirugía no es válido en estos pacientes siendo imperativa una evaluación conjunta y multidisciplinar.

Este vacío sin un pilar base para establecer el tratamiento hace que la epigenética se pueda convertir en una herramienta más, útil y atractiva en el proceso de evaluación de los pacientes con estenosis pieloureteral.

### 1.1 Características de nuestro grupo de estudio:

La estenosis pieloureteral es más frecuente en los niños y en el lado izquierdo, estos datos se corresponden con nuestra serie en la cual un 60% de los pacientes son varones y el 65% de los casos el lado afectado es el izquierdo.

Como se corresponde con la tendencia actual el diagnóstico se hizo prenatal en el los dos terceras partes de los casos justificándose por los controles ecográficos llevados durante el embarazo. Esta previsión en el diagnóstico precoz tiene un valor añadido en el pronóstico ya que estos pacientes desde recién nacidos reciben profilaxis antibiótica para prevenir infecciones urinarias que pueden dañar o deteriorar más la función renal en el caso de que ya estuviese dañada. En nuestro grupo esta correlación se mantiene ya que el 70% de ellos se encontraba asintomático a la hora de la cirugía.

El filtrado glomerular renal (FGR) es el indicador más útil en la evaluación y seguimiento de la función renal. Su cálculo se lleva a cabo a través de una fórmula empírica desarrollada por Schwartz en el año 1976 basada en una constante que varía con la edad (en menores de 2 años su valor es 0,45, de 2 a 16 años es de 0,55 y de los 16 a los 21 años es de 0,70 en hombres y de 0,55 en las mujeres), en la talla del paciente (en centímetros) y en el nivel de creatinina sérica (mg/ml) (8).

Se considera un FGR normal aquel que es superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , ligeramente disminuido si su valor oscila entre 60 y  $89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , moderadamente disminuido entre 30 y 59 y gravemente disminuido a valores de FGR inferiores a  $29 \text{ ml/min/1,73m}^2$ .

Es nuestra serie el Filtrado Glomerular Renal medio prequirúrgico fue de  $92.7 \text{ ml/min/1,73m}^2$  encontrándose en valores normales. La media postquirúrgica sin embargo ascendió a  $107.06 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . Este ascenso en el parámetro del control analítico de la función renal sugiere que nuestros pacientes en alguna medida se beneficiaron de la intervención quirúrgica.

Tanto en el diagnóstico de estenosis pieloureteral como en su seguimiento evolutivo la ecografía tiene un papel muy importante ya que es un método diagnóstico no invasivo, portátil, que no emite radiaciones ionizantes, que no precisa medios de contraste y que su empleo no está limitado por la función renal.

La obstrucción de la unión pieloureteral corresponde a la mitad de las hidronefrosis detectadas en periodo perinatal siendo esta la anomalía más frecuentemente detectada durante el control del embarazo (95). Existe una relación bien establecida

entre el diámetro anteroposterior de la pelvis renal en las ecografías prenatales y la posibilidad de desarrollar una patología postnatal significativa (97, 98). Se ha podido establecer la relación que existe entre la dilatación pélvica renal con la necesidad de cirugía en el manejo de la estenosis pieloureteral (48, 99). En nuestra serie esto se corrobora ya que el 75% de los pacientes intervenidos han sido diagnosticados en periodo prenatal.

En la ecografía se valora el grado de dilatación de la pelvis con asociación o no de dilatación de cálices y la ecogenicidad y grosor del parénquima renal. La Sociedad de Urología Fetal estableció unas pautas para la clasificación de las hidronefrosis siendo el Grado 0 en el que no existe hidronefrosis, Grado I en donde la dilatación pélvica es intrarenal y el grosor del parénquima está conservado, Grado II con dilatación pélvica extrarenal sin asociar dilatación calicial, Grado III en donde existe tanto dilatación de la pelvis como de los cálices pero el grosor de la cortical se encuentra conservado y Grado IV en el que se le suma a los hallazgos del grado III el adelgazamiento de la corteza renal.

En nuestra serie el grado de hidronefrosis prequirúrgico corresponde en un 50% a una hidronefrosis muy severa que se correlacionaría con un grado IV de hidronefrosis, el 45% severa que correspondería a un grado III de hidronefrosis y el 5% una hidronefrosis moderada que se correlacionaría con un grado II según la clasificación de la Sociedad de Urología Fetal. Sin embargo tras la cirugía los parámetros de hidronefrosis ecográfica varían drásticamente presentando ahora la mayoría una hidronefrosis moderada que se correspondería con un grado II, un 25% una hidronefrosis leve correspondiéndose con un grado I, un 25% severa que correspondería a un grado III y tan sólo un 5% una hidronefrosis muy severa que correspondería al grado IV. Estos cambios en la distribución de los grados de hidronefrosis tanto prequirúrgico como postquirúrgicos explican que la corteza renal se encontrase adelgazada en el 65% de los casos antes de la pieloplastia y tan sólo el 25% en el seguimiento postquirúrgico.

El renograma diurético es una pieza clave y fundamental en el diagnóstico y análisis de las estenosis pieloureterales. Mediante esta prueba se puede valorar la función renal y las características de la curva de eliminación del diurético. Es el método de elección para diferenciar un sistema urinario dilatado pero no obstruido de una verdadera estenosis, y contribuye al manejo de los pacientes con hidronefrosis al monitorizar tanto el drenaje urinario como la función renal.

El renograma evalúa el tránsito, a través del riñón, de la actividad procedente de un radiofármaco administrado por vía intravenosa que se elimina por vía urinaria a lo largo del tiempo proporcionando datos clínicos funcionales de cada unidad renal, así como de la dinámica del drenaje o excreción urinaria.

El rango normal en el que se sitúa la función renal se encuentra entre el 45-55% y se obtiene por el cálculo del área bajo la curva del renograma en el tiempo del intervalo seleccionado (106, 107). Se considera un deterioro de la función renal cuando una unidad tiene una función inferior al 40% o se refleja una disminución de más de un 5% respecto al control previo.

Para la evaluación de la dinámica de drenaje el parámetro más extendido ha sido el T1/2 postfurosemida. Se ha establecido el tiempo de 20 minutos como el que identifica obstrucción, siendo normal inferior a 10 minutos y el situado entre 10 y 20 minutos como indeterminado.

Existe una minoría de riñones hidronefróticos que muestran una curva de drenaje deficiente, incluso con un T1/2 postfurosemida patológico y que sin embargo, no están obstruidos. Este hecho está en relación con el efecto "reservorio" de la pelvis dilatada, que acumula lentamente el radiofármaco no detectándose eliminación significativa durante el tiempo que dura el renograma. Las pelvis grandes necesitan más tiempo para rellenarse pero también más tiempo para vaciarse. Además, dentro de la pelvis se produce una dilución del radiofármaco por lo que hay que extremar la cautela en concluir que existe obstrucción. Es un error frecuente inferir que la obstrucción está establecida solo porque apreciamos un mal drenaje urinario (110).

La valoración de las imágenes postmicciones ha ganado importancia, de modo que aún en circunstancias en las que se constata pobre respuesta tras la administración de furosemida, si se observa un drenaje completo en las imágenes postmicciones se puede excluir una obstrucción y el riesgo de deterioro para el riñón es pequeño (106).

En nuestro grupo, la función renal media prequirúrgica de nuestro grupo de pacientes corresponde a un 39.3% lo cual se corresponde con un deterioro moderado de la función renal, sin embargo a pesar de que la función renal postquirúrgica también se encuentra en rango de deterioro moderado con una funcionalidad del 42% este porcentaje se encuentra más próximo al considerado como función renal conservada que sería por encima del 44%.

Con respecto al T1/2 postfurosemedida en todos ellos el prequirúrgico era superior a 20 minutos sin constatar vaciado postmiccional ni tras cambios posturales. Con respecto al T1/2 postquirúrgico el valor promedio se sitúa en valores normales siendo de 10.3 minutos. Esto nos sugiere que la cirugía restableció el paso de orina desde la pelvis hacia el uréter.

## **1.2 Análisis de las características de nuestro estudio según los “clusters” clínicos de asociación:**

Al estudiar nuestros pacientes por agrupaciones de tipo “cluster” observamos 7 grupos diferentes que se asociaban en función a características comunes tal y como quedaron reflejados en la tabla 12 de agrupación árbol III.

1. En el primer grupo se asocian dos varones afectados en el lado izquierdo y asintomáticos en el momento de la cirugía. Estas características son comunes a la mayoría de los pacientes con estenosis pieloureteral en donde la prevalencia es mayor en niños y en el lado izquierdo y la mayoría de los pacientes son asintomáticos debido a un diagnóstico precoz. La función renal postoperatoria normal (superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) basada en el filtrado glomerular renal (FGR) se corresponde con una función renal en el renograma diurético conservada (superior al 44%). El T1/2 postquirúrgico se encuentra en parámetros indeterminados (10-20 minutos) pero se constata en ambos casos el vaciado tras la micción o cambios posturales. Esto se podría justificar debido a la hidronefrosis moderada (Grado II) residual que persiste en ambos pacientes que provoca un efecto reservorio de las pelvis renales que retrasan la eliminación del diurético. Esta hidronefrosis moderada postquirúrgica se puede explicar teniendo en cuenta los grados de dilatación preoperatorios que eran severo (Grado III) y muy severo (Grado IV), lo que podría justificar también el comienzo del deterioro en la función renal determinado por el filtrado glomerular renal que mostraba una disminución leve ( $60-89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) y moderada ( $30-59 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) en los parámetros analíticos de la función renal prequirúrgica.
2. En el segundo grupo las características comunes que se extraen son una correcta función renal analítica determinada por un FGR normal (superior a  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) tanto en las determinaciones preoperatorias como postquirúrgicas que se corresponden con funciones renales conservadas (superiores al 44%) en el renograma previo y posterior a la pieloplastia. Esta

concordancia también se encuentra en la valoración del parénquima renal en los estudios ecográficos en los cuales el grosor del parénquima no está adelgazado. Analizando en profundidad este grupo, a pesar de que la homogeneidad no es total, se extraen otras características comunes tales como que es un grupo mayoritario de varones, con diagnóstico prenatal y asintomáticos en el momento de la cirugía sin afectación del parénquima ni de la función renal con un grado de hidronefrosis severa (Grado IV) lo cual podría explicar los T1/2 indeterminados pero no obstructivos en el renograma diurético de control tras la cirugía.

3. En el tercer grupo las características comunes son una correcta función renal con respecto a su FGR tanto pre como postquirúrgico que se encuentra en rangos de normalidad ( $> 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ). Esta correcta función renal también se corresponde con la función renal determinada por el renograma diurético postquirúrgico ( $>44\%$ ).

Profundizando en el análisis, se trata de un grupo donde el predominio en relación al sexo es femenino con diagnóstico prenatal y asintomáticos en el momento de la cirugía. La función renal analítica, tanto pre como postquirúrgica, según los parámetros analíticos del FGR está conservada ( $>90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), sin embargo la función renal determinada en el renograma diurético en dos de los casos se encontraba moderadamente deteriorada (31-44%). Analizando estos datos esta disminución en la función renal se explicaría al correlacionarlo con un grado de dilatación prequirúrgico muy severo (Grado IV) asociada con un adelgazamiento de la corteza renal la cual se recupera, al igual que la función renal, en los controles postquirúrgicos.

4. El IV grupo se trata sólo de un paciente que no reúne las suficientes características en común como para poder agruparlo con otros pacientes. Se trata de un varón, con estenosis pieloureteral izquierda de diagnóstico prenatal intervenido antes de los seis meses asintomático. Su función renal analítica según el FGR se encontraba en rango de normalidad ( $> 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) sin ser así la determinada por el renograma diurético que estaba severamente afectada ( $<30\%$ ). La afectación de la función renal en el renograma diurético se corresponde con la disminución en el grosor del parénquima en la ecografía prequirúrgica pero no así en la de control posterior a la pieloplastia donde el parénquima renal se recupera correspondiéndose con un adecuado FGR y no así con la función renal del renograma. La mejoría del parénquima renal se

explica por la recuperación en el grado de hidronefrosis pasando de una dilatación muy severa (Grado IV) a una dilatación severa (Grado III). Esta dilatación postoperatoria persistente podría ser la que justificaría un patrón indeterminado al analizar el T1/2 postquirúrgico (10-20 minutos) en este paciente tal vez ocasionado por el efecto reservorio de la pelvis dilatada.

5. El grupo V reúne diferentes características en común lo que lo convierte en un grupo bastante homogéneo. Se trata de tres pacientes varones con afectación del lado izquierdo y diagnóstico prenatal intervenidos entre los 6 y 12 meses de vida, todos ellos asintomáticos con una función renal analítica según el FGR levemente disminuida ( $60-98 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ). Esta correlación se mantiene con un deterioro moderado de la función renal en el renograma diurético preoperatorio (31-44%). La hidronefrosis prequirúrgica en la mayoría de este grupo se corresponde con una dilatación muy severa (Grado IV) asociando en todos los casos una disminución en el grosor del parénquima renal. En contraposición en el control postoperatorio el grado de dilatación disminuye a un grado leve y se recupera el grosor del parénquima renal.
6. El grupo VI recoge dos pacientes con estenosis pieloureteral del lado izquierdo con diagnóstico prenatal, intervenidos entre los 6 y 12 meses con sintomatología urinaria. La función renal preoperatoria se encontraba afectada en ambos casos deteriorada levemente ( $60-89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) lo que podría estar justificado por la sintomatología de los pacientes. En ambos pacientes el grado de dilatación prequirúrgico era severo (Grado III) disminuyendo a moderado (Grado II) en el control postoperatorio. En el seguimiento evolutivo estos dos pacientes presentaron sintomatología urinaria.
7. El grupo VII recoge tres pacientes afectados de estenosis pieloureteral derecha. Todos ellos tenían una alteración prequirúrgica de la función renal tanto analítica según el FGR que mostraba un deterioro leve ( $60-89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) y moderado ( $30-59 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) como en la determinada por el renograma diurético (31-44%). Esta alteración de la función renal se corresponde con un parénquima renal disminuido en grosor tanto en las ecografías previas como posteriores a la cirugía. En contraposición no hay coincidencia en la evolución de la función renal analítica según el FGR postquirúrgico que se encuentra en intervalos de normalidad ( $>90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) y la función renal del renograma diurético de control en el cual la función persiste deteriorada ( $< 44\%$ ). Este dato

sí se corresponde con el hallazgo ecográfico de parénquima renal adelgazado persistente en la ecografía postoperatoria.

Comparando los grados de hidronefrosis pre y postquirúrgicos en este grupo no se observan diferencias significativas, siguen persistiendo los mismos grados severos ( Grado III) y muy severos ( Grado IV) en dos de los tres casos y sólo en uno de ellos se aprecia una mejoría notable ( de Grado IV a Grado I). Esta ausencia de mejoría en el grado de hidronefrosis sin embargo no guarda correlación con las curvas de eliminación del renograma diurético donde todos presentan un patrón no obstructivo.

En el análisis de los datos clínicos de nuestro grupo de estudio apreciamos que no existe en todos los casos correlación entre la función renal analítica según el FGR, la determinada en el renograma diurético, el del grosor del parénquima renal, grado de hidronefrosis y patrón de eliminación. Esta falta de correlación nos lleva a deliberar que no se puede establecer una pauta diagnóstica ni terapéutica basada tan sólo en un parámetro. Es por esto, por lo que nos planteamos si la epigenética podría ser una pieza más en el logaritmo del manejo de la estenosis pieloureteral.

## 2. Epigenética.

### 2.1 Características epigenéticas:

El nacimiento de la epigenética procede de un cruce de caminos entre la biología del desarrollo y la genética en los años 40 del siglo XX de manos de Sir Conrad Waddington, profesor de Genética de la Universidad de Edimburgo, que introdujo la teoría de plasticidad fenotípica y epigenética (118).

La epigenética se puede definir como aquellos cambios hereditarios en las pautas de expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN, siendo cambios funcionales y no estructurales (114).

Los tres mecanismos básicos referidos como fenómenos epigenéticos son: la metilación del ADN, la modificación de las histonas y la intervención de secuencias de pequeños ARN no codificantes (115-117).

Estos cambios son continuos, cuantitativos, sin ser acumulados, así como reversibles y heredables siendo el nexo de unión entre genes y factores medioambientales que puedan explicar algunas relaciones “misteriosas” entre mutaciones espontáneas y selección (171).

#### 2.1.1 Utilidad de la epigenética en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento:

Las modificaciones epigenéticas podrían ser útiles en el diagnóstico temprano de enfermedades, como factores pronósticos, predictores de respuesta al tratamiento farmacológico, de la evolución de la enfermedad y de puntos diana terapéuticos (172).

Todas estas características citadas junto con las consecuencias derivadas de ellas, convierten a la epigenética en un pilar fundamental en muchos de los estudios de investigación en la actualidad.

Las alteraciones epigenéticas pueden servir como biomarcadores para detectar patologías y predecir la eficacia terapéutica. Por ejemplo, la hipermetilación de GSTP1 (*glutathione-S-transferase*) se encuentra aproximadamente en el 85% de los cánceres de próstata. Esto no es así en la hiperplasia benigna de próstata, por lo que su detección en sangre o biopsia puede ser empleado para la detección de células cancerígenas (173). Otro ejemplo similar es el MGMT (O6-metilguanina ADN metiltransferasa) en los gliomas; en aquellos fenotipos en los que el gen MGMT se encuentra metilado se ha observado que responden mejor al tratamiento con determinados agentes alquilantes (174).

La reversibilidad en las alteraciones epigenéticas la convierten en el centro de números estudios de investigación para el desarrollo de nuevos tratamientos. Más de 100 agentes epigenéticos se encuentran actualmente bajo estudio, lo que es una clara muestra del impacto que la epigenética tiene en la actualidad enfocada en el desarrollo de marcadores estratégicos de alteraciones epigenéticas que ayuden al diagnóstico y manejo de las enfermedades (171).

### **2.1.2 Epigenética en patología humana:**

El estudio epigenético se centra mayoritariamente en el cáncer. Las alteraciones epigenéticas que predisponen al cáncer no se limitan a alteraciones en la función de los genes, pero sí predisponen a mutaciones o disfunciones genéticas. La hipermetilación de los promotores de los genes es una alteración común en el proceso tumoral, así por ejemplo, en el carcinoma renal (VHL-1) o en el cáncer de mama (BRCA1), genes de supresores de tumores se encuentran hipermetilados y por lo tanto inactivos (171).

Los tumores hematológicos son sobre los que los factores epigenéticos han cambiado de una forma más notable su enfoque terapéutico, identificando terapias que, combinadas, actúan de forma sinérgica obteniendo un mejor pronóstico de la enfermedad. En los tumores sólidos, la terapia epigenética no ha obtenido los mismos resultados, hasta ahora, que en los tumores hematológicos como ocurre en los linfomas y las leucemias (175).

El gran peso de los estudios epigenéticos se centran en el diagnóstico y pronóstico de los tumores (164), sin embargo, trabajos en otros campos diferentes al cáncer son mucho menos frecuentes. Algunos de ellos son por ejemplo; la endocrinología con trabajos sobre la diabetes mellitus, ginecología con la endometriosis o neurología con trabajos acerca del Alzheimer. En la actualidad, el estudio epigenético se ha centrado en la investigación de la herencia no sólo en la línea germinal, sino también en las células somáticas durante el desarrollo embrionario.

### **2.1.3 Epigenética en la estenosis pieloureteral:**

La inmensa mayoría de estudios sobre la epigenética se centran en el cáncer siendo muy escasos los estudios epigenéticos sobre la fibrosis y el sistema renal y en otras patologías como se reflejó en el punto 2.1.1.

Con estos precedentes iniciamos nuestro estudio, totalmente “a ciegas”, partiendo de la hipótesis de que la epigenética fuese importante en el sistema renal y existiese alguna relación con la fibrosis en la estenosis pieloureteral.

A finales de los años 80, Stephen Fodor, Michael Pirrung, Leighton Read y Lubert Stryer desarrollaron los *arrays*, una revolucionaria tecnología para la determinación y cuantificación de ADN en una muestra. La importancia de esta técnica radica en la posibilidad de analizar simultáneamente miles de genes (158). Un *array* consiste en un gran número de moléculas de ADN ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que forman una matriz de secuencias en dos dimensiones. Estas moléculas de ADN se denominan sondas. Las muestras a analizar se marcan por diversos métodos. El método más empleado de marcaje son los fluoruros, las cianinas. Tras el marcaje se incuban sobre el panel de las sondas y se hibridan uniéndose a sus complementarios permitiendo así la identificación y cuantificación del ADN de la muestra estudio (158, 159).

Usando esta tecnología, y como primera aproximación, tratamos de averiguar si la epigenética tenía algún papel en la estenosis pieloureteral. Para ello estudiamos dos pacientes intervenidos de estenosis de la unión pieloureteral frente a dos controles sanos (uréteres) sobre un total de 12288 sondas.

Tras realizar un cribado de limpieza, se seleccionan 11470 sondas útiles. De estas 11470 sondas, el porcentaje de genes metilados encontrado varía entre el 16 y el 23% del total de las sondas.

Estos resultados abrieron camino a nuestro estudio ya que demostraron que Sí existe una relación entre la metilación y la estenosis pieloureteral.

## **2.2 Genes de estudio:**

Entre los genes metilados en el análisis seleccionamos un serie de ellos al azar, pero no de forma aleatoria, centrándonos en aquellos cuyo papel es fundamental en diferentes procesos biológicos, como es el control del ciclo celular, la apoptosis, adhesión celular o el crecimiento. Siguiendo estos criterios de selección los genes escogidos fueron los siguientes: p16 (control del ciclo celular), RASSF1A (vía Ras), MGMT (reparación ADN), E-Cadherina (adhesión celular), Ciclina-D2 (control del ciclo celular), HIN-1 (control del ciclo celular) y RASAL-1 (vía Ras y fibrosis).

Las muestras de ADN, correspondientes a las piezas quirúrgicas de los 20 pacientes intervenidos por estenosis pieloureteral seleccionados según los criterios

de inclusión establecidos para nuestro estudio, se trataron con bisulfito sódico que convierte las citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las metiladas permanecen como tales. Las citosinas de las islas CpG se encuentran normalmente demetiladas en tejidos normales, pero se metilan en promotores de genes implicados en procesos celulares anormales. Esta reacción permite diferenciar ADN metilado del no metilado. (Mills, 2002).

Los resultados obtenidos de los genes seleccionados en nuestro estudio fueron los siguientes:

### **2.2.1 p16 (Cycline–depeded kinase inhibitor 2A):**

El porcentaje de metilación obtenido en nuestros pacientes para este gen fue del 25% (Figura 38).

Esta relación entre p16 y la estenosis pieloureteral se puede justificar basándose en el papel que tiene este gen en el control del ciclo celular, regulando la actuación de las ciclinas deteniendo el ciclo celular en la fase G1 y G2.

Estudios sobre el p16 y el sistema renal relacionan el envejecimiento de las células tubulares y la sobreexpresión de p16 con cambios tubulointersticiales en la fibrosis intersticial y la atrofia tubular, siendo estos los principales problemas en el rechazo de un trasplante renal (176).

Brovente et al en 2008, proponen que la reparación del daño renal agudo depende de la proliferación de células que sustituyen a las dañadas; sugieren que la incapacidad de las células tubulares para proliferar, por su parada en la fase G2 del ciclo celular, es un punto clave en la fibrosis renal.

El ciclo celular es un ciclo secuencial de eventos moleculares y celulares compuesto por las fases G1, S, G2 y M. Los genes que controlan el ciclo celular, supervisan la integridad estructural de los cromosomas antes de la progresión en las diferentes fases. Los puntos de control se realizan en la entrada a la fase S de replicación del ADN (fase G1/S), en la entrada en la mitosis (fase G2/M) y en la replicación (fase S).

En modelos obstructivos renales se ha identificado una reacción causal entre la parada del ciclo celular en la fase G2/M y la fibrosis intersticial. Ante la parada del ciclo celular en esta fase en las células tubulares se activa una cascada de señalización por parte de la quinasas que ponen en marcha la activación de

citoquinas profibróticas como el TGF- $\beta$ , participando así en la transición epitelio-mesenquima (EMT) (155, 177).

La función de p16 es la de regular el ciclo celular, basándonos en los estudios descritos anteriormente, podemos establecer la relación entre p16 y la fibrosis renal; ya que una alteración en la fase G2/M induce a la fibrosis por dos vías. I) una la de la imposibilidad de regeneración celular y II) la puesta en marcha de una cascada de reacciones proinflamatorias.

### **2.2.2 RASSF1A (Ras association domain family isoform A):**

En nuestro estudio ningún paciente resultó metilado para dicho gen (Figura 39), sin embargo, si se ha establecido la relación entre RASSF1A y riñón, en referencia al cáncer renal, por lo que podemos suponer que aunque tiene actividad en el riñón, su papel en la estenosis pieloureteral controlado por metilación quizás no sea relevante.

A nivel renal la proteína codificada por este gen controla el ciclo celular, la estabilización microtubular, la adhesión celular, la motilidad y la apoptosis. Por lo tanto la depleción de RASSF1A se asocia con una aceleración en la progresión de la mitosis y un aumento en el riesgo de padecer defectos cromosómicos siendo un biomarcador en el cáncer de células claras renales (162, 163).

### **2.2.3 MGMT (O6-metilguanina ADN metiltransferasa):**

En nuestro grupo de estudio el 15% de los pacientes presentaban este gen metilado (Figura 40). Con respecto a la distribución en los grupos clínicos se aprecia que este gen no se ha expresado metilado en relación a ningún grupo en concreto sino de forma dispersa sin poder intuir una relación entre la metilación de MGMT y estenosis pieoureteral. Esta ausencia de relación se corresponde con otros autores, que establecen de una manera fuerte y robusta la relación entre MGMT y los tumores cerebrales sin encontrar referencias que lo relacionen con la fibrosis renal.

El gen MGMT (O6-metilguanina ADN metiltransferasa) codifica una enzima clave en la red de reparación del ADN. MGMT elimina los aductos mutagénicos y citotóxicos de la O6-guanina en el ADN, lo cual es el punto diana de ataque de los agentes alquilantes de quimioterapia. La hipermetilación de la isla CpG ubicada en la región

promotora del gen MGMT es el principal responsable de muchos tipos de tumores cerebrales (178).

La hipermetilación de MGMT es un marcador pronóstico en los glioblastomas ya que en dichos tumores, esta característica muestra una mejor respuesta al tratamiento con temozolomida (164).

#### **2.2.4 E-Cadherina:**

El 25% de nuestros pacientes presentaban la E-Cadherina metilada (Figura 41). Las cadherinas son moléculas monoméricas, que constituyen receptores homofílicos que se unen a cadherinas idénticas expresadas en células homo o heterotípicas para establecer contacto célula-célula. Su acción es calcio y temperatura dependiente. En una célula puede expresarse más de una cadherina. Se conocen al menos doce de ellas pero en nuestro estudio nos centramos en la E-Cadherina por estar presente en el riñón.

La acción de las cadherinas permite la adhesión celular, la persistencia de los espacios intercelulares, el desarrollo y crecimiento embrionario, la implantación de los blastómeros y la morfogénesis.

La relación de la metilación de la E-Cadherina en el 25% de nuestros pacientes la podemos explicar basándonos en recientes estudios donde se prueba que el déficit de expresión de la E-Cadherina se puede relacionar con la fibrosis renal. Beghdadi et al, en su trabajo del 2013, estudian como los mastocitos actúan sobre la remodelación celular y participan en la inflamación que conlleva a la fibrosis y fallo renal. Para ello estudiaron ratones con déficit de mMCP4 (*mouse mast cell protease 4*) en los que existía una mayor fibrosis intersticial, daño tubular, depósito de colágeno y actina y un descenso en la expresión de la E-Cadherina (179).

La transición epitelio-mesénquima (EMT) juega un papel importante en la fibrosis; las principales células que contribuyen a la fibrosis renal se originan de las células epiteliales tubulares renales mediante la vía EMT. La EMT es inducida por diversas citoquinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de tumores (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF) e interleucina 1 (IL-1). Zheng et al en 2009, demostraron como la inactivación de E-Cadherina induce a TGF- $\beta$  en la transición epitelio-mesénquimal (EMT) en las células epiteliales tubulares;

concluyendo por lo tanto que la falta de expresión de E-Cadherina es una causa de la EMT y consecuentemente de fibrosis renal (180).

Aplicando estos hallazgos a nuestro grupo, podríamos pensar que una disminución de la expresión de la E-Cadherina, por encontrarse metilada, podría tener relación con el proceso de la fibrosis renal.

### **2.2.5 Ciclina-D2:**

Es una proteína codificada por el gen CCND2 que pertenece a la familia de las ciclinas, cuya función es regular el ciclo celular a través de las ciclinas dependientes de la quinasa.

La Ciclina D2 forma un complejo con cdk4/cdk6, cuya actividad es esencial para transición G1-S del ciclo celular. Además también esta demostrada su implicación en la fosforilación del gen supresor de tumor Rb (Al-Aynati, 2004).

En nuestro grupo resultó sólo metilada en un paciente (5% de los casos) (Figura 42). Otros autores no han encontrado fuertes hallazgos que puedan relacionar a la Ciclina-D2 con la fibrosis renal. A pesar de tener un papel en el control del ciclo celular, como p16 en el que sí existe relación con la fibrosis renal, este control se produce sobre diferente fases del control del ciclo.

### **2.2.6 HIN-1 (High –in normal-1):**

Fue identificado como un gen altamente expresado en las células luminales normales de mama, y con una expresión disminuida en carcinomas de mama in situ invasivos y metastáticos. (Krop, 2001 y 2004). Se sugiere un posible papel de HIN 1 en la formación de lobulillos de mama y/o diferenciación terminal durante del embarazo, la regulación de la proliferación celular epitelial, diferenciación y morfogénesis.

No se ha establecido ninguna relación entre Hin-1 y el riñón, tanto a nivel de su desarrollo embriológico como en su implicación en procesos patológicos del mismo. Sin embargo en nuestro estudio aparece en un porcentaje alto de metilación (25%) (Figura 43). A pesar de que Hin-1 actúa como supresor de tumores mayoritariamente, los datos obtenidos en nuestro grupo los podríamos explicar basándonos en la función de regulación que Hin-1 sobre la fase G0 del ciclo celular controlando la reentrada al mismo (181). Quizás sea este control sobre el ciclo celular el que lo relaciona con el proceso de la fibrosis a nivel renal que se produce

en la estenosis pieloureteral. Comparando las fases del ciclo celular que en nuestro grupo parecen asociar una relación con la fibrosis en la estenosis pieloureteral, tanto p16 como HIN-1 tiene en común que regulan las fases más tardías del ciclo, el paso de G1/M y G0.

### **2.2.7 RASAL1 (Ras protein activator like 1):**

El gen RASAL1 se encontró metilado en el 35% de nuestros pacientes (Figura 44). Este porcentaje lo sitúa en el gen metilado más representativo en nuestro grupo de estudio.

El gen RASAL1 pertenece a la familia RAS-Gap. La familia Ras-Gap en condiciones normales, controlan la respuesta celular a través de las Ras-GTPasas alternando entre la forma GTP para su estado activo y GDP para su forma inactiva. A través de receptores tirosin quinasa regulan el factor de crecimiento plaquetario (PGF), el factor del crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos. También tiene efecto sobre los receptores de la angiotensina II y el endotelial así como en la formación de TGF- $\beta$ .

La explicación de la metilación de este gen en la estenosis pieloureteral la encontramos en la relación establecida entre RASAL-1 y la fibrosis. La fibrosis renal se puede definir como un proceso de cicatrización patológica llevada a cabo por fibroblastos activados que presentan un aumento de actividad proliferativa, matriz extracelular y expresión de actina muscular (149, 150). A diferencia de la reparación fisiológica, la fibrosis es un proceso patológico que no cesa, incluso cuando la lesión inicial ha desaparecido. Esta característica de "perpetuación" se refleja en los fibroblastos, los mediadores principales de fibrogénesis. A diferencia de la reparación fisiológica, los fibroblastos no vuelven a su situación de quiescencia una vez que se han activado. Dicha activación es tan robusta que se mantiene incluso cuando son cultivados en plástico. Esto ha conducido a la hipótesis de que determinadas marcas celulares están implicadas en la activación de los fibroblastos en la fibrogénesis.

Aunque con un mecanismo diferente, esta explicación sobre la implicación de RASAL-1 en la fibrosis, se puede extrapolar a la fibrosis generada por alteraciones en el ciclo celular en las fases que controlan p16 y HIN-1, en las que dicha alteración provoca una "perpetuación" en los procesos de fibrosis. Lo mismo ocurre

con E-Caderina cuya falta de expresión provoca una ruptura en la unión celular lo que permite a TGF- $\beta$  actuar como factor profibrótico.

La hipermetilación del gen RASAL1 provocaría su silenciamiento epigenético lo que conllevaría a la activación de los fibroblastos y la fibrosis renal de una manera irreversible. Esta desregulación de las citoquinas controladas por la cascada Ras explica la fisiopatología de la enfermedad renal mediante la fibrogénesis y fallo renal que desencadenan.

Betchel et al, pusieron de manifiesto no sólo la relación existente entre la hipermetilación del gen RASAL1 con la fibrogénesis renal sino que ésta se trataba de una respuesta a la exposición de manera prolongada a TGF- $\beta$  y es llevada a cabo por la ADN metiltransferasa DNMT1 (151, 153, 154).

La exposición durante un periodo breve de tiempo al TGF- $\beta$  provoca el silencio del gen RASAL1 de forma transitoria; sin embargo cuando esta exposición es prolongada se produce la metilación en las islas CpG del gen RASAL1 lo que conlleva a su inactivación de forma permanente. Esto explica como tanto en la lesión renal aguda reversible como en la fibrosis progresiva crónica se asocian con la represión transcripcional de RASAL1; sin embargo, la regeneración espontánea del riñón después de la lesión aguda se asocia con la normalización de la expresión RASAL1 (RASAL1 no está metilado en el daño renal agudo), mientras que la fibrosis crónica progresiva se asocia con la metilación y por tanto supresión transcripcional de RASAL1.

### **2.3. Agrupaciones epigenéticas y perfiles epigenéticos en nuestro estudio:**

En el análisis de nuestro grupo de estudio, según los clusters de asociación epigenética, hemos observado las siguientes características.

Existe un primer grupo de pacientes que no presentan metilado ninguno de los genes seleccionados para nuestro estudio (Figura 45).

De entre los genes que sí se encuentran metilados, el análisis individual sobre cada uno de ellos comparando metilado y no metilado nos muestra.

#### **2.3.1 p16 (Cycline–depended kinase inhibitor 2A):**

Al analizar el gen p16 individualmente entre metilado y no metilado (Figura 46), llama la atención que los 5 pacientes con el gen p16 metilados lo comparten en su

gran mayoría, excepto un caso, con los pacientes que también tiene el gen HIN-1 metilado.

Con respecto a los pacientes en los que p16 no se encuentra metilado, estos sin embargo sí presentan el gen RASAL-1 metilado.

Teniendo en cuenta que en nuestro estudio los genes con mayor porcentaje de metilación han sido p16: 25%, E-Cadherina: 25%, HIN-1: 25% y RASAL 1: 35%, podemos establecer que tres de estos cuatro genes destacados por su porcentaje de metilación parecen relacionarse entre sí. p16 y HIN-1 se complementan en su estado de metilación, mientras que si estos no se encuentran metilados lo hace RASAL-1. Estos hallazgos los podríamos explicar basándonos en que p16 y HIN-1 además de compartir cluster de metilación también comparten un papel similar: regular el ciclo celular (en el cual alteraciones del mismo se han relacionado con fibrosis). Por otro lado, la relación de RASAL-1 con la fibrosis renal puede seguir otra vía diferente a la regulación del ciclo celular, en la que existe una perpetuación en la activación de los fibroblastos, que son los mediadores principales de la fibrogénesis.

### **2.3.2 MGMT(O6-metilguanina ADN metiltransferasa):**

En el análisis individualizado del gen MGMT entre metilado y no metilado (Figura 47) no se observa ningún patrón definido de asociación entre los distintos genes.

Con respecto a la relación que pueden establecer los tres pacientes con MGMT metilado observamos que dos pacientes de HIN-1 coinciden.

Sin embargo, los casos no metilados para el gen MGMT no tiene un patrón definido con respecto a los otros genes.

### **2.3.3 E-Cadherina:**

Al analizar E-Cadherina de manera individualizada entre los casos metilados y no metilados (Figura 48) observamos un patrón con respecto a los pacientes que presentan E-Cadherina metilado. Estos pacientes, en los que E-Cadherina está metilado, no comparten la característica de metilación en ningún caso con RASAL-1 y tan sólo en uno de HIN-1. Analizando ahora los pacientes que presentan E-Cadherina no metilada, RASAL-1 y HIN-1, sí se encuentran metilados.

Esto nos lleva a deducir que la metilación para el gen E-Cadherina es totalmente independiente del RASAL-1 y HIN-1, siendo la relación entre ambos grupos

antagónica; si E-Cadherina está metilada RASAL-1 y HIN-1 estarán no metilados y viceversa en el caso contrario para E-Cadherina no metilado.

#### **2.3.4 Ciclina-D2:**

El gen Ciclina-D2 tan sólo se ha encontrado metilado en un paciente. El análisis individualizado de este gen no ha aportado, como era esperable, ningún patrón en la distribución de las características metilación/no metilación en nuestro trabajo.

#### **2.3.5 HIN-1 (High –in normal-1):**

En el análisis individualizado de HIN-1 con respecto a su estado de metilación/no metilación con respecto a los otros genes (Figura 50), nos muestra un patrón de distribución muy similar al analizado en p16 como ya habíamos dicho.

Ambos genes, HIN-1 y p16, comparten el estado de metilación, como si se complementasen.

Al analizar los pacientes con HIN-1 no metilado excepto uno, todos presentan tanto E-Cadherina como RASAL-1 metilados.

En el análisis de HIN-1 al igual que en el p16, podríamos realizar una división entre pacientes con HIN-1 metilado que comparten patrón con p16 y los pacientes con HIN-1 no metilado en los que RASAL-1 sí está metilado.

Este análisis de HIN-1 refuerza nuestra suposición acerca de la asociación entre HIN-1 y p16, basándonos en que comparten el mismo papel: regular el ciclo celular, en el cual alteraciones del mismo se han relacionado con fibrosis (155).

#### **2.3.6 RASAL-1(Ras protein activator like 1):**

El análisis de RASAL-1 individualizado con respecto a su estado de metilado/no metilado (Figura 51) resulta el más llamativo de nuestra serie.

En el podemos establecer una línea ficticia que nos divide nuestra serie en dos grandes grupos. Por un lado los pacientes con RASAL-1 metilado, los cuales no comparten esta característica con otros genes (solo con un paciente que presenta metilación para HIN-1 y p16 y otro caso para MGMT). En los casos con RASAL-1 no metilados, el resto de los genes de nuestra serie sí están metilados.

El análisis de esta figura nos puede llevar a la conclusión de que el estado de metilación de RASAL-1 es autónomo e independiente sin la necesidad de estar complementado por otros genes. Es decir; si el gen RASAL-1 está metilado en un

paciente con estenosis pieloureteral es poco probable que otros genes sí lo estén; mientras que si RASAL-1 está no metilado en estos pacientes será necesario estudiar otros genes.

Esta relación puede explicarse con la hipótesis de Knudson, que estableció en 1971 sobre el cáncer como resultado de mutaciones acumuladas del ADN de las células. Esta hipótesis se basa en el estudio de los retinoblastomas. Existen dos formas de retinoblastomas: los familiares (aparecen tumores independientes en los dos ojos) y esporádicos (aparece un sólo tumor en uno de los dos ojos). En los afectados con el primer tipo tienen una probabilidad mayor de desarrollar otros tipos de cáncer debido a que en todos los tejidos somáticos presentan un alelo mutado del gen RB1 (gen supresor de tumores), por lo que sólo necesitan una segunda mutación para perder la función de gen supresor de tumores. Con respecto a los retinoblastomas esporádicos haría falta el evento en cada tejido, lo cual ocurre con menor frecuencia (182).

Así, utilizando esta hipótesis para explicar este perfil de metilación, tan sólo con RASAL-1 metilado ya se produce una fibrosis renal en la estenosis pieloureteral; mientras que con respecto a HIN-1 y p16 será necesaria la metilación de manera conjunta para que esto se produzca.

#### **2.4 Visión global de los perfiles epigenéticos.**

Al analizar de forma global los perfiles epigenéticos realizados sobre cada gen de manera independiente analizando su estado de metilado/ no metilado, nos llama la atención dos asociaciones diferentes.

Por un lado queda reflejado de forma clara que p16 y HIN se complementan en sus estados de metilación/no metilación (Figura 52). Todos los pacientes con p16 metilados presentan este mismo estado en HIN-1. Esta relación que establecen, en su estado de metilación, la podemos asimilar con la función que ambos genes desempeñan, la regulación del ciclo celular, en el cual alteraciones del mismo se han relacionado con fibrosis. La parada en el ciclo celular, provoca que, ante un daño renal agudo, las células tubulares no proliferen y sustituyan a las células dañadas, conllevando a un daño renal progresivo; además de inducir una cascada de elementos proinflamatorios y profibróticos (155).

PACIENTE	p16	HIN-1
1	Green	Green
2	Green	Green
3	Green	Green
5	Green	Green
9	Green	Green
12	Green	Green
14	Green	Green
15	Green	Green
19	Green	Green
20	Green	Green
17	Red	Green
11	Green	Red
4	Red	Red
6	Red	Red
7	Red	Red
8	Red	Red

Figura 52: Cluster epigenéticos de p16 y HIN-1

Otro claro grupo, que en el análisis de los perfiles epigenéticos resalta, es la relación entre E-Cadherina, HIN-1 y RASAL-1.

En este perfil epigenético llama la atención que la presencia de metilación para RASAL-1 conlleva la no metilación de los genes E-Cadherina y HIN-1 y viceversa.

En este perfil, RASAL-1 y E-Cadherina comparten, en relación con la estenosis pieloureteral, su papel sobre la fibrosis. Los mecanismos de ambos en relación con la fibrosis renal no son comunes. La hipermetilación del gen RASAL1, provoca su silenciamiento epigenético lo que conlleva a la activación de los fibroblastos y la fibrosis renal de una manera irreversible (151). La pérdida de expresión de E-Cadherina se relaciona la transición epitelio-mesenquimal (EMT) que juega un importante papel en la fibrosis, incluida la renal. El silenciamiento de E-Cadherina induce a TGF- $\beta$  en la EMT y por tanto fibrosis renal (180).

El otro gen, dentro de este patrón, es HIN-1 cuya función no tiene ninguna relación con los dos genes anteriores. HIN-1 regula el ciclo celular; y se sabe que defectos del ciclo celular se han visto relacionados con la fibrosis (155).

Estos genes, mediante diferentes vías, tienen un papel importante en la fibrosis renal siendo éste el nexo de unión que podemos establecer entre ellos.

Con estos tres genes, el resultado que obtenemos es el de todos los pacientes con muestras metiladas de nuestro estudio (Figura 53).

PACIENTE	e-cadherin	HIN-1	RASAL1
20	Green	Green	Green
2	Red	Green	Green
5	Red	Green	Green
9	Red	Green	Green
17	Red	Green	Green
4	Green	Red	Green
7	Green	Red	Green
11	Green	Red	Green
8	Red	Red	Green
1	Green	Green	Red
3	Green	Green	Red
12	Green	Green	Red
14	Green	Green	Red
15	Green	Green	Red
19	Green	Green	Red
6	Green	Red	Red

Figura 53: Cluster epigenéticos de E-Cadherina, HIN-1 y RASAL-1

### 3. Correlación entre parámetros clínicos y epigenéticos.

El objetivo de esta tesis es evaluar si la epigenética tiene relación en el inicio, evolución y/o progresión de la estenosis pieloureteral. El gran peso de los trabajos epigenéticos se centran en el estudio del cáncer; aunque se están comenzando a publicar datos sobre la epigenética y el riñón, trasplante o enfermedad cardiovascular; ningún trabajo hasta ahora, había abordado la epigenética en la estenosis pieloureteral (183, 184).

Para estratificar los parámetros clínicos en perfiles de agrupación clínica empleamos el programa PHYLIP (Tabla 12), mientras para los epigenéticos analizamos individualmente cada gen entre su estado metilado y no metilado (Figuras 45-51). La asociación de ambos se refleja en la tabla 14.

Examinando de manera conjunta los parámetros clínicos con los epigenéticos, encontramos 6 grupos ya que el grupo IV estaría formado por un sólo paciente (Tabla 14).

Las características conjuntas analizadas para cada grupo fueron las siguientes:

- Grupo I:

Analizando a las características clínicas, se corresponden con un grupo de varones afectados de estenosis pieloureteral del lado izquierdo. Estas dos características son las más comunes en este tipo de patología donde el sexo más afectado es el masculino y el lado es el izquierdo. En este grupo el diagnóstico no se realizó prenatalmente sino que fue antes del año de vida. No tuvieron clínica, por lo que el hallazgo fue de manera incidental. A pesar de no haber presentado ninguna sintomatología, la función renal determinada por el filtrado glomerular renal (FGR) estaba deteriorada en ambos casos ( $< 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) aunque la función renal del renograma diurético estaba conservada ( $> 44\%$ ). En ambos casos la hidronefrosis era severa (Grado III) y muy severa (Grado IV) acompañada en uno de los casos por adelgazamiento del parénquima renal lo que si nos traduce y justifica el deterioro de la función renal. Tras la cirugía, la función renal determinada por el FGR se recupera ( $> 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) y es coincidente con la función renal conservada postoperatoria ( $> 44\%$ ) del renograma diurético, al igual que con la recuperación del grosor del parénquima renal y el grado de hidronefrosis (Grado II) en las ecografías de control. Ambos pacientes permanecieron asintomáticos, sin ninguna incidencia en el seguimiento a largo plazo.

Las características epigenéticas de las piezas de estenosis de la unión pieloureteral analizadas de este grupo, se caracterizan por estar metiladas para p16 y E-Cadherina. Son dos genes cuya implicación en la fibrosis renal sigue vías diferentes. p16 lleva a la fibrosis renal por una disregulación en el ciclo celular, mientras que la metilación de E-Cadherina y por lo tanto su falta de expresión y función, cohesión entre células, permite que TGF- $\beta$  induzca a la transición epitelio-mesenquimal (EMT) responsable de la fibrosis renal.

Este perfil epigenético nos puede llevar a sugerir como en este grupo, de pacientes asintomáticos con una correcta función en el renograma diurético, el proceso de fibrosis y obstrucción de la unión pieloureteral que tienen puesto en marcha de manera silente se ve reflejado en el FGR y el adelgazamiento del grosor del parénquima renal.

- Grupo II:

Este grupo no es homogéneo en cuanto a sexo y lado afectado, sin embargo, sí que, al igual que en otras series, los varones y el lado izquierdo son predominantes. El diagnóstico se realizó en la mayoría de los casos de forma prenatal como es habitual en la actualidad debido a los controles realizados durante el embarazo. En este grupo el FGR era normal ( $> 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), dato concordante con una correcta función renal en el renograma diurético ( $>44\%$ ) y una conservación del grosor del parénquima renal en la ecografías previas a la cirugía. El grado de hidronefrosis previo a la cirugía era severo en la mayoría del grupo y se normalizó prácticamente tras la misma. Ningún paciente presentó algún tipo de incidencias en el seguimiento realizado a largo plazo.

El perfil epigenético derivado del análisis de las piezas de estenosis de la unión pieloureteral reflejan en este grupo metilación para los genes p16 y HIN-1. Ambos genes se asociaron en el análisis de perfiles independientes de cada gen entre metilado/no metilado. p16 y HIN-1 comparten la función que desempeñan, el control del ciclo celular. Alteraciones en la regulación de las distintas fases del ciclo celular se han relacionado con la fibrosis renal.

Este perfil de metilación, nos explica el proceso de fibrosis que se estaría llevando a cabo en estos pacientes, que se encuentran asintomáticos y con una correcta función renal, en los que sin embargo el efecto deletéreo de la fibrosis se está llevando a cabo sin dar muestras todavía de su expresión.

-Grupo III:

El grupo III está constituido por mujeres con estenosis pieloureteral del lado derecho diagnosticadas, en la mayor parte, en período prenatal. Casi todo el grupo es asintomático a la hora de la cirugía y el FGR está conservado ( $>90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ); sin embargo, la función renal en el renograma diurético, en dos de las cinco personas que forman este grupo, está deteriorada (31-44%). Esta alteración en la función renal se corresponde con un grado muy severo de hidronefrosis acompañada de disminución en el grosor del parénquima renal. Tras la cirugía el FGR permanece conservado y la función renal se recupera en todo el grupo siendo en todos los casos  $> 44\%$ , el grado de hidronefrosis mejora al igual que se recupera, en casi la totalidad del conjunto, el grosor de la corteza renal. La evolución de estos pacientes fue favorable en todos los casos.

El perfil epigenético de este grupo es de metilación para el gen RASAL-1. Betchel et al, demostraron la asociación de metilación de RASAL-1 con la perpetuación de la activación de los fibroblastos y por lo tanto con la fibrosis renal.

Este perfil de metilación nos explica y alerta de la fibrosis desarrollada en un grupo en el que la función renal analítica y en la mitad de los pacientes en el renograma diurético, estaría conservada pero el grosor y afectación de la corteza renal comienza a resentirse por el predominio de hidronefrosis muy severa (Grado IV) que existe en estos pacientes.

- Grupo V:

Los datos clínicos de este grupo, recogen un perfil característico de la estenosis pieloureteral. Se trata de un grupo de varones, afectos del lado izquierdo, con un diagnóstico prenatal y asintomáticos. Sin embargo, este grupo, a pesar de estar asintomáticos, tienen una función renal, tanto analítica como en el renograma diurético, deteriorada al igual que una afectación del parénquima renal. Tras la cirugía, la función renal no se corrige en el FGR y en el renograma tan sólo en un paciente del grupo. Sí lo hace el parénquima renal y el grado de hidronefrosis.

En el perfil epigenético de este grupo, la metilación se produce en el gen E-Cadherina. La metilación de E-Cadherina justifica la fibrosis renal ya que cuando no se expresa, no cumple su función, que es la cohesión entre las células; esto induce a la actuación de TGF- $\beta$  en la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la consecuente fibrosis renal.

Este grupo, a pesar de tener un diagnóstico precoz debido a su sospecha antenatal y a ser asintomático, tiene un mal pronóstico en nuestra serie. La función renal se encuentra deteriorada desde el inicio y su recuperación, a pesar de intervenir quirúrgicamente a todos los pacientes antes de los 12 meses de vida, no ha logrado restablecerse.

- Grupo VI:

El grupo VI presenta unos parámetros clínicos de estenosis pieloureteral del lado izquierdo con diagnóstico prenatal. A pesar del diagnóstico precoz, ambos pacientes que conforman el grupo presentan sintomatología. Esto se acompaña y podría justificar el deterioro que presenta el grupo en el FGR ( $< 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ). Con respecto a la función renal, en el renograma diurético, uno de estos pacientes la tiene conservada ( $>44\%$ ) y en el otro caso no se ha podido valorar aunque intuimos

que estaba deteriorada ya que este paciente tenía adelgazada la corteza renal en la ecografía. Tras la cirugía, un paciente persiste con la función tanto analítica como la del renograma diurético deteriorada y persiste afectación del parénquima renal; mientras que el otro paciente del grupo ha restablecido una correcta función analítica y mantiene conservada tanto la función en el renograma como el parénquima renal. En este grupo, ambos pacientes han presentado incidencias en el seguimiento a largo plazo; por lo que podemos concluir que se trata de un grupo de riesgo para la conservación de la función renal.

Analizando los datos epigenéticos de este grupo presentan un perfil de metilación para RASAL-1; sobre el cual que ha quedado establecida la relación que existe entre su falta de expresión y fibrosis renal.

Si al unir a este grupo los dos pacientes del grupo III, que presentan un deterioro de la función renal en el renograma diurético y presentan el gen RASAL-1 metilado, podríamos especular con el mal pronóstico que la metilación del gen RASAL-1 confiere a los pacientes con estenosis pieloureteral. Debido a los pocos casos recogidos en nuestra serie, serán necesarios estudios a más largo plazo, para comprobar si la ya conocida relación de la metilación de RASAL-1 se puede correlacionar con una mayor afectación de la función renal.

- Grupo VII:

Analizando los parámetros clínicos, es un grupo heterogéneo que se caracteriza por tener afectado el lado derecho. El diagnóstico, en la mayoría de pacientes de este grupo, se ha realizado de manera prenatal. Con respecto al paciente con diagnóstico postnatal, este se realizó por un episodio de dolor tipo cólico. Todo el grupo presenta una función renal tanto analítica según el FGR como en el renograma diurético deteriorada con grados muy severos de hidronefrosis con afectación del parénquima renal. La evolución en esos pacientes tras la cirugía, ha sido, con respecto a la función renal analítica, su restablecimiento pero no así en la función renal del renograma diurético donde ha permanecido afectada, y en un caso incluso ha empeorado. La corteza renal en todos ellos sigue adelgazada a pesar de que el grado de hidronefrosis ha mejorado. Ninguno de estos pacientes ha presentado incidencias en el seguimiento a largo plazo.

Al analizar los patrones de metilación, resulta llamativo la práctica ausencia de metilación; tan sólo un paciente presenta metilación para la Ciclina-D2. En este grupo, a diferencia de los anteriores no podemos establecer una relación entre la

metilación y la fibrosis renal así como tampoco con su valor en el pronóstico de la enfermedad.

#### **4. Visión global del trabajo:**

En el trabajo realizado, ha quedado patente que la metilación "SI" tiene importancia en la estenosis pieloureteral, implicada en ella a través de la metilación. Esto abre una nueva línea de investigación, hasta ahora no desarrollada.

La utilidad derivada de este trabajo, sobre la epigenética en esta patología, radica en la posibilidad de convertirla en un biomarcador que apoye como herramienta al algoritmo diagnóstico-terapéutico de la estenosis pieloureteral, en el que todavía no existe una regla dogmática establecida como patrón de actuación. Quizás, permita al clínico, emplearla como un nuevo marcador que ayude a tomar decisiones en pacientes, todavía asintomáticos, en los que el proceso de fibrosis ya está puesto en marcha, antes de que su función renal comience a deteriorarse.

Esta tesis, limitada por el escaso tamaño muestral, abre una hipótesis; una nueva línea de investigación, de la que destacar diferentes perfiles clínico-epigenéticos para futuros estudios.

Pacientes con estenosis pieloureteral con adecuada función renal pero con grados severos de hidronefrosis, presentan RASAL-1 metilado, y por tanto el proceso de fibrosis ya está desencadenado. Quizás este hallazgo epigenético podría emplearse como un biomarcador a tener en cuenta para prevenir el deterioro de la función renal.

Otros genes destacados en nuestro estudio, junto con RASAL-1, serían p-16, HIN-1 y E-Cadherina. P16 y HIN-1 se han relacionado en nuestro estudio a través de su nexo de unión sobre el papel común que desempeñan, que es el control del ciclo celular, el cual asocia alteraciones del mismo con el proceso de fibrosis.

E-Cadherina, por su parte, cuando no se expresa, no desempeña su función, que es la cohesión celular, lo que conlleva a una activación de los fibroblastos y a la fibrosis.

De nuestro estudio, se podrían destacar, por un lado dos patrones clínicos de mal pronóstico, asociados a dos clusters epigenéticos de metilación; (I) E-Cadherina y RASAL-1; y (II) la asociación entre p16 y HIN-1 pareja en cuanto a su estado de metilación en la estenosis pieloureteral. Por lo tanto, estos cuatro genes RASAL-1,

E-Cadherina, HIN-1 y p16 serían los candidatos para desarrollar estudios futuros sobre sus implicaciones pronósticas en la estenosis pieloureteral.



# CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES

---

1. La estenosis pieloureteral en estadios avanzados es causa de insuficiencia renal y comorbilidad asociada.
2. Es importante tener más herramientas para el diagnóstico y toma de decisiones terapéuticas en la estenosis pieloureteral.
3. Demostramos, por primera vez, que la metilación tiene un papel importante en la estenosis pieloureteral debido al alto porcentaje de genes metilados que encontramos.
4. La metilación del gen RASAL-1 destaca dentro del estudio de genes metilados que están implicados en la estenosis pieloureteral.
5. La metilación del gen RASAL-1 tiene un valor importante en la valoración conjunta de las diferentes pruebas en el estudio de las hidronefrosis.
6. HIN-1 y p16, quizás por compartir el mismo papel funcional (la regulación del ciclo celular) aparecen asociados en los perfiles de metilación de nuestra serie.
7. HIN-1, E-Cadherina y RASAL-1 se encuentran metilados en todos los pacientes con estenosis pieloureteral de nuestra serie. A pesar de que RASAL-1 es el gen que se encuentra metilado en un mayor porcentaje, HIN-1 y E-Cadherina deberían ser tomados en cuenta. Estos tres genes por sí solos, sugieren un perfil epigenético en nuestro grupo.
8. La metilación puede convertirse en un biomarcador en pacientes con estenosis pieloureteral en fases iniciales de su enfermedad y ser empleado como una herramienta más en su algoritmo diagnóstico-terapéutico.



# BIBLIOGRAFÍA





## BIBLIOGRAFÍA

1. Salder TW. Longman's Medical Embryology. Philadelphia 1995 1995.
2. Moore KL PT. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. In: Saunders W, editor. 7th ed. Philadelphia 2003.
3. Kelalis, King, Belman. Clinical Pediatric Urology. 5th Edition. Informa Healthcare. United Kindong; 2007.
4. Campbell-Walsh. Urology. 9th edition. Elsevier. Philadelphia; 2007.
5. Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol.* 1994;8(2):175-80. Epub 1994/04/01.
6. Bueva A, Guignard JP. Renal function in preterm neonates. *Pediatric research.* 1994;36(5):572-7. Epub 1994/11/01.
7. Trompeter RS, Al-Dahhan J, Haycock GB, Chik G, Chantler C. Normal values for plasma creatinine concentration related to maturity in normal term and preterm infants. *The International journal of pediatric nephrology.* 1983;4(3):145-8. Epub 1983/09/01.
8. Schwartz GJ, Brion LP, Spitzer A. The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatric clinics of North America.* 1987;34(3):571-90. Epub 1987/06/01.
9. Urushihara M, Kinoshita Y, Kondo S, Kagami S. Involvement of the intrarenal renin-angiotensin system in experimental models of glomerulonephritis. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2012;2012:601786. Epub 2012/07/20.
10. de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & behavior.* 2010;100(5):525-34. Epub 2010/04/13.
11. Zamo FS, Lacchini S, Mostarda C, Chiavegatto S, Silva IC, Oliveira EM, et al. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns in hypertensive rats - Renin-Angiotensin system modulation. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(1):85-92. Epub 2010/02/04.
12. King LR, Coughlin PW, Bloch EC, Bowie JD, Ansong K, Hanna MK. The case for immediate pyeloplasty in the neonate with ureteropelvic junction obstruction. *The Journal of urology.* 1984;132(4):725-8. Epub 1984/10/01.
13. Taki M, Goldsmith DI, Spitzer A. Impact of age on effects of ureteral obstruction on renal function. *Kidney international.* 1983;24(5):602-9. Epub 1983/11/01.
14. Beharrie A, Franc-Guimond J, Rodriguez MM, Au J, Zilleruelo G, Abitbol CL. A functional immature model of chronic partial ureteral obstruction. *Kidney international.* 2004;65(4):1155-61. Epub 2004/04/17.
15. Roth KS, Koo HP, Spottswood SE, Chan JC. Obstructive uropathy: an important cause of chronic renal failure in children. *Clinical pediatrics.* 2002;41(5):309-14. Epub 2002/06/28.
16. Bottinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol.* 2007;27(3):309-20. Epub 2007/05/30.
17. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994;331(19):1286-92. Epub 1994/11/10.
18. Bruijn JA, Roos A, de Geus B, de Heer E. Transforming growth factor-beta and the glomerular extracellular matrix in renal pathology. *J Lab Clin Med.* 1994;123(1):34-47. Epub 1994/01/01.

19. Du C. Transforming Growth Factor-Beta in Kidney transplantation: A double-edged sword. In *Kidney Transplantation-New Perspective* 2011.
20. Whitaker RH. Some observations and theories on the wide ureter and hydronephrosis. *British journal of urology*. 1975;47(4):377-85. Epub 1975/08/01.
21. Koff SA, Hayden LJ, Cirulli C, Shore R. Pathophysiology of ureteropelvic junction obstruction: experimental and clinical observations. *The Journal of urology*. 1986;136(1 Pt 2):336-8. Epub 1986/07/01.
22. Brown T, Mandell J, Lebowitz RL. Neonatal hydronephrosis in the era of sonography. *AJR American journal of roentgenology*. 1987;148(5):959-63. Epub 1987/05/01.
23. Johnston JH, Evans JP, Glassberg KI, Shapiro SR. Pelvic hydronephrosis in children: a review of 219 personal cases. *The Journal of urology*. 1977;117(1):97-101. Epub 1977/01/01.
24. Lebowitz RL, Griscom NT. Neonatal hydronephrosis: 146 cases. *Radiologic clinics of North America*. 1977;15(1):49-59. Epub 1977/04/01.
25. Hanna MK. Antenatal hydronephrosis and ureteropelvic junction obstruction: the case for early intervention. *Urology*. 2000;55(5):612-5. Epub 2000/05/03.
26. Snyder HM, 3rd, Lebowitz RL, Colodny AH, Bauer SB, Retik AB. Ureteropelvic junction obstruction in children. *The Urologic clinics of North America*. 1980;7(2):273-90. Epub 1980/06/01.
27. Koff SA, Campbell KD. The nonoperative management of unilateral neonatal hydronephrosis: natural history of poorly functioning kidneys. *J Urol*. 1994;152(2 Pt 2):593-5. Epub 1994/08/01.
28. Wen JG, Frokiaer J, Jorgensen TM, Djurhuus JC. Obstructive nephropathy: an update of the experimental research. *Urol Res*. 1999;27(1):29-39. Epub 1999/03/26.
29. Houben CH, Wischermann A, Borner G, Slany E. Outcome analysis of pyeloplasty in infants. *Pediatr Surg Int*. 2000;16(3):189-93. Epub 2000/04/29.
30. Anderson JC, Hynes W. Retrocaval ureter; a case diagnosed pre-operatively and treated successfully by a plastic operation. *British journal of urology*. 1949;21(3):209-14. Epub 1949/09/01.
31. Lande P, Zerbib M, Peyret C, Martinache PR, Biset JF, Flam T, et al. [Retrograde endopyelotomy in the treatment of iterative stenoses of the pyeloureteral junction]. *Journal d'urologie*. 1993;99(3):132-5. Epub 1993/01/01. Endopyelotomie par voie retrograde dans le traitement des stenoses iteratives de la jonction pyelo-ureterale.
32. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mechanisms of development*. 2000;92(1):31-45. Epub 2000/03/08.
33. Glassberg KI. Normal and abnormal development of the kidney: a clinician's interpretation of current knowledge. *The Journal of urology*. 2002;167(6):2339-50; discussion 50-1. Epub 2002/05/07.
34. Di-Poi N, Zakany J, Duboule D. Distinct roles and regulations for HoxD genes in metanephric kidney development. *PLoS genetics*. 2007;3(12):e232. Epub 2007/12/28.
35. Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R. Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nature genetics*. 1999;23(1):113-7. Epub 1999/09/02.
36. Kume T, Deng K, Hogan BL. Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development*. 2000;127(7):1387-95. Epub 2000/03/08.

37. Donovan MJ, Natoli TA, Sainio K, Amstutz A, Jaenisch R, Sariola H, et al. Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Developmental genetics*. 1999;24(3-4):252-62. Epub 1999/05/14.
38. Fanni D, Fanos V, Monga G, Gerosa C, Locci A, Nemolato S, et al. Expression of WT1 during normal human kidney development. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2011;24 Suppl 2:44-7. Epub 2011/10/14.
39. Murugan S, Shan J, Kuhl SJ, Tata A, Pietila I, Kuhl M, et al. WT1 and Sox11 regulate synergistically the promoter of the Wnt4 gene that encodes a critical signal for nephrogenesis. *Experimental cell research*. 2012;318(10):1134-45. Epub 2012/04/03.
40. Vainio SJ. Nephrogenesis regulated by Wnt signaling. *Journal of nephrology*. 2003;16(2):279-85. Epub 2003/05/28.
41. Dudley AT, Godin RE, Robertson EJ. Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes & development*. 1999;13(12):1601-13. Epub 1999/07/01.
42. Davies JA, Fisher CE. Genes and proteins in renal development. *Experimental nephrology*. 2002;10(2):102-13. Epub 2002/04/09.
43. Kreidberg JA. WT1 and kidney progenitor cells. *Organogenesis*. 2010;6(2):61-70. Epub 2010/10/05.
44. Chugh SS. Transcriptional regulation of podocyte disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2007;149(5):237-42. Epub 2007/05/01.
45. Arar M, Xu YC, Elshihabi I, Barnes JL, Choudhury GG, Abboud HE. Platelet-derived growth factor receptor beta regulates migration and DNA synthesis in metanephric mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(13):9527-33. Epub 2000/03/29.
46. Group BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95. Epub 2001/03/10.
47. Corteville JE, Gray DL, Crane JP. Congenital hydronephrosis: correlation of fetal ultrasonographic findings with infant outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(2):384-8. Epub 1991/08/01.
48. Dhillon HK. Prenatally diagnosed hydronephrosis: the Great Ormond Street experience. *Br J Urol*. 1998;81 Suppl 2:39-44. Epub 1998/05/29.
49. Perez-Brayfield MR, Kirsch AJ, Jones RA, Grattan-Smith JD. A prospective study comparing ultrasound, nuclear scintigraphy and dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging in the evaluation of hydronephrosis. *J Urol*. 2003;170(4 Pt 1):1330-4. Epub 2003/09/23.
50. Carr MC, Peters CA, Retik AB, Mandell J. Urinary levels of the renal tubular enzyme N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in unilateral obstructive uropathy. *J Urol*. 1994;151(2):442-5. Epub 1994/02/01.
51. Chevalier RL, Peach MJ. Hemodynamic effects of enalapril on neonatal chronic partial ureteral obstruction. *Kidney Int*. 1985;28(6):891-8. Epub 1985/12/01.
52. Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. *Hypertension*. 2003;41(1):42-9. Epub 2003/01/04.
53. Dommergues M, Muller F, Ngo S, Hohlfeld P, Oury JF, Bidat L, et al. Fetal serum beta2-microglobulin predicts postnatal renal function in bilateral uropathies. *Kidney Int*. 2000;58(1):312-6. Epub 2000/07/08.

54. Johnson MP, Bukowski TP, Reitleman C, Isada NB, Pryde PG, Evans MI. In utero surgical treatment of fetal obstructive uropathy: a new comprehensive approach to identify appropriate candidates for vesicoamniotic shunt therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(6):1770-6; discussion 6-9. Epub 1994/06/01.
55. Yang SP, Woolf AS, Yuan HT, Scott RJ, Risdon RA, O'Hare MJ, et al. Potential biological role of transforming growth factor-beta1 in human congenital kidney malformations. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1633-47. Epub 2000/11/14.
56. El-Sherbiny MT, Mousa OM, Shokeir AA, Ghoneim MA. Role of urinary transforming growth factor-beta1 concentration in the diagnosis of upper urinary tract obstruction in children. *J Urol.* 2002;168(4 Pt 2):1798-800. Epub 2002/09/28.
57. Grandaliano G, Gesualdo L, Bartoli F, Ranieri E, Monno R, Leggio A, et al. MCP-1 and EGF renal expression and urine excretion in human congenital obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2000;58(1):182-92. Epub 2000/07/08.
58. Chevalier RL, Smith CD, Wolstenholme J, Krajewski S, Reed JC. Chronic ureteral obstruction in the rat suppresses renal tubular Bcl-2 and stimulates apoptosis. *Exp Nephrol.* 2000;8(2):115-22. Epub 2000/03/24.
59. Hohenfellner K, Hunley TE, Brezinska R, Brodhag P, Shyr Y, Brenner W, et al. ACE I/D gene polymorphism predicts renal damage in congenital uropathies. *Pediatr Nephrol.* 1999;13(6):514-8. Epub 1999/08/19.
60. Boonstra J. Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity. *FASEB J.* 1999;13 Suppl:S35-42. Epub 1999/06/03.
61. Chung KH, Chevalier RL. Arrested development of the neonatal kidney following chronic ureteral obstruction. *J Urol.* 1996;155(3):1139-44. Epub 1996/03/01.
62. Bartoli F, Gesualdo L, Paradies G, Caldarulo E, Infante B, Grandaliano G, et al. Renal expression of monocyte chemotactic protein-1 and epidermal growth factor in children with obstructive hydronephrosis. *J Pediatr Surg.* 2000;35(4):569-72. Epub 2000/04/19.
63. Yang Y, Zhou X, Gao H, Ji SJ, Wang C. The expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in the stenotic tissue of congenital pelvi-ureteric junction obstruction in children. *J Pediatr Surg.* 2003;38(11):1656-60. Epub 2003/11/14.
64. Taha MA, Shokeir AA, Osman HG, Abd El-Aziz Ael A, Farahat SE. Pelvi-ureteric junction obstruction in children: the role of urinary transforming growth factor-beta and epidermal growth factor. *BJU Int.* 2007;99(4):899-903. Epub 2007/03/24.
65. Josephson S, Hemsén A. Renal tissue endothelin in long-term complete ureteric obstruction in the young rat. *Urol Int.* 1994;53(2):57-61. Epub 1994/01/01.
66. Moridaira K, Morrissey J, Fitzgerald M, Guo G, McCracken R, Tolley T, et al. ACE inhibition increases expression of the ETB receptor in kidneys of mice with unilateral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(1):F209-17. Epub 2002/12/11.
67. Hegarty NJ, Young LS, O'Neill AJ, Watson RW, Fitzpatrick JM. Endothelin in unilateral ureteral obstruction: vascular and cellular effects. *J Urol.* 2003;169(2):740-4. Epub 2003/01/25.
68. Miller J, Hesse M, Diemer T, Haenze J, Knerr I, Rascher W, et al. Congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction of the rat: a useful animal model for human ureteropelvic junction obstruction? *Urology.* 2004;63(1):190-4. Epub 2004/01/31.
69. Knerr I, Nyul Z, Miller J, Rosch W, Dotsch J, Repp R, et al. Increased endothelin-1 and decreased adrenomedullin gene expression in the stenotic tissue of congenital

- pelvi-ureteric junction obstruction in children. *BJU Int.* 2001;87(7):667-71. Epub 2001/05/15.
70. Taha MA, Shokeir AA, Osman HG, Abd el-Aziz Ael A, Farahat SE. Diagnosis of ureteropelvic junction obstruction in children: role of endothelin-1 in voided urine. *Urology.* 2007;69(3):560-4; discussion 4-5. Epub 2007/03/27.
71. Taha MA, Shokeir AA, Osman HG, Abd El-Aziz Ael A, Farahat SE. Obstructed versus dilated nonobstructed kidneys in children with congenital ureteropelvic junction narrowing: role of urinary tubular enzymes. *J Urol.* 2007;178(2):640-6. Epub 2007/06/19.
72. Schaeffer A. Infection of the urinary tract. In: Walsh PC RA, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's urology.* 2002 ed. USA: Saunders Co. p. 515-602.
73. Tataranni G, Farinelli R, Zavagli G, Logallo G, Farinelli A. Tubule recovery after obstructive nephropathy relief: the value of enzymuria and microproteinuria. *J Urol.* 1987;138(1):24-7. Epub 1987/07/01.
74. Rennke HG, Olson JL, Venkatachalam MA. Glomerular filtration of macromolecules: normal mechanisms and the pathogenesis of proteinuria. *Contrib Nephrol.* 1981;24:30-41. Epub 1981/01/01.
75. Everaert K, Kerckhaert W, Delanghe J, Lameire N, Sturley W, Van de Wiele C, et al. Elevated tubular proteinuria, albuminuria and decreased urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity following unilateral total ureteral obstruction in rats. *Urol Res.* 1998;26(4):285-9. Epub 1998/10/06.
76. Lama G, Ferraraccio F, Iaccarino F, Luongo I, Marte A, Rambaldi PF, et al. Pelviureteral junction obstruction: correlation of renal cell apoptosis and differential renal function. *J Urol.* 2003;169(6):2335-8. Epub 2003/05/29.
77. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992;90(1):1-7. Epub 1992/07/01.
78. Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazzieri R, Noguera I, et al. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells.* 1997;15(3):190-7. Epub 1997/01/01.
79. Misseri R, Rink RC, Meldrum DR, Meldrum KK. Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury. *J Surg Res.* 2004;119(2):149-59. Epub 2004/05/18.
80. Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int.* 1993;44(2):313-21. Epub 1993/08/01.
81. Yoo KH, Norwood VF, el-Dahr SS, Yosipiv I, Chevalier RL. Regulation of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in neonatal ureteral obstruction. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 2):R503-9. Epub 1997/08/01.
82. Chevalier RL, Thornhill BA, Wolstenholme JT. Renal cellular response to ureteral obstruction: role of maturation and angiotensin II. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 2):F41-7. Epub 1999/07/17.
83. Chevalier RL, Chung KH, Smith CD, Ficenec M, Gomez RA. Renal apoptosis and clusterin following ureteral obstruction: the role of maturation. *J Urol.* 1996;156(4):1474-9. Epub 1996/10/01.
84. Yoo KH, Thornhill BA, Chevalier RL. Angiotensin stimulates TGF-beta1 and clusterin in the hydronephrotic neonatal rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(3):R640-5. Epub 2000/03/11.

85. Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(1-2):104-32. Epub 2001/02/24.
86. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension.* 1998;31(1 Pt 2):181-8. Epub 1998/02/07.
87. L. Hernando. *Nefrología Clínica.* 2ª Edición. Panamerica. Madrid; 2003.
88. Gobe GC, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. Role of apoptosis. *Lab Invest.* 1987;56(3):273-81. Epub 1987/03/01.
89. Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, et al. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int.* 2001;60(3):924-34. Epub 2001/09/05.
90. Brenner-Anantharam A, Cebrian C, Guillaume R, Hurtado R, Sun TT, Herzlinger D. Tailbud-derived mesenchyme promotes urinary tract segmentation via BMP4 signaling. *Development.* 2007;134(10):1967-75. Epub 2007/04/20.
91. Mendelsohn C. Going in circles: conserved mechanisms control radial patterning in the urinary and digestive tracts. *The Journal of clinical investigation.* 2006;116(3):635-7. Epub 2006/03/03.
92. Yosypiv IV, El-Dahr SS. Role of the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(9):1219-29. Epub 2005/06/09.
93. Chang CP, McDill BW, Neilson JR, Joist HE, Epstein JA, Crabtree GR, et al. Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery. *The Journal of clinical investigation.* 2004;113(7):1051-8. Epub 2004/04/02.
94. Chen F. Genetic and developmental basis for urinary tract obstruction. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(9):1621-32. Epub 2008/12/17.
95. Thomas DF. Fetal uropathy. *Br J Urol.* 1990;66(3):225-31. Epub 1990/09/01.
96. Fernbach SK, Maizels M, Conway JJ. Ultrasound grading of hydronephrosis: introduction to the system used by the Society for Fetal Urology. *Pediatr Radiol.* 1993;23(6):478-80. Epub 1993/01/01.
97. Siemens DR, Prouse KA, MacNeily AE, Sauerbrei EE. Antenatal hydronephrosis: thresholds of renal pelvic diameter to predict insignificant postnatal pelviectasis. *Tech Urol.* 1998;4(4):198-201. Epub 1999/01/19.
98. Bouzada MC, Oliveira EA, Pereira AK, Leite HV, Rodrigues AM, Fagundes LA, et al. Diagnostic accuracy of fetal renal pelvis anteroposterior diameter as a predictor of uropathy: a prospective study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;24(7):745-9. Epub 2004/12/09.
99. Johnson CE, Elder JS, Judge NE, Adeeb FN, Grisoni ER, Fattlar DC. The accuracy of antenatal ultrasonography in identifying renal abnormalities. *Am J Dis Child.* 1992;146(10):1181-4. Epub 1992/10/01.
100. Bude RO, DiPietro MA, Platt JF, Rubin JM, Miesowicz S, Lundquist C. Age dependency of the renal resistive index in healthy children. *Radiology.* 1992;184(2):469-73. Epub 1992/08/01.
101. Kessler RM, Quevedo H, Lankau CA, Ramirez-Seijas F, Cepero-Akselrad A, Altman DH, et al. Obstructive vs nonobstructive dilatation of the renal collecting system in children: distinction with duplex sonography. *AJR Am J Roentgenol.* 1993;160(2):353-7. Epub 1993/02/01.

102. Platt JF. Urinary obstruction. *Radiol Clin North Am.* 1996;34(6):1113-29. Epub 1996/11/01.
103. Shulkin BL, Mandell GA, Cooper JA, Leonard JC, Majd M, Parisi MT, et al. Procedure guideline for diuretic renography in children 3.0. *Journal of nuclear medicine technology.* 2008;36(3):162-8. Epub 2008/09/04.
104. Maisey M. Radionuclide renography: a review. *Current opinion in nephrology and hypertension.* 2003;12(6):649-52. Epub 2003/10/18.
105. O'Reilly P, Aurell M, Britton K, Kletter K, Rosenthal L, Testa T. Consensus on diuresis renography for investigating the dilated upper urinary tract. *Radionuclides in Nephrourology Group. Consensus Committee on Diuresis Renography. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 1996;37(11):1872-6. Epub 1996/11/01.
106. Gordon I, Piepsz A, Sixt R. Guidelines for standard and diuretic renogram in children. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 2011;38(6):1175-88. Epub 2011/04/20.
107. O'Reilly PH. Standardization of the renogram technique for investigating the dilated upper urinary tract and assessing the results of surgery. *BJU international.* 2003;91(3):239-43. Epub 2003/02/13.
108. Boubaker A, Prior JO, Meuwly JY, Bischof-Delaloye A. Radionuclide investigations of the urinary tract in the era of multimodality imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 2006;47(11):1819-36. Epub 2006/11/03.
109. Brown SC, Upsdell SM, O'Reilly PH. The importance of renal function in the interpretation of diuresis renography. *British journal of urology.* 1992;69(2):121-5. Epub 1992/02/01.
110. Eskild-Jensen A, Gordon I, Piepsz A, Frokiaer J. Interpretation of the renogram: problems and pitfalls in hydronephrosis in children. *BJU international.* 2004;94(6):887-92. Epub 2004/10/13.
111. Grattan-Smith JD, Perez-Bayfield MR, Jones RA, Little S, Broecker B, Smith EA, et al. MR imaging of kidneys: functional evaluation using F-15 perfusion imaging. *Pediatr Radiol.* 2003;33(5):293-304. Epub 2003/04/16.
112. Rodriguez LV, Spielman D, Herfkens RJ, Shortliffe LD. Magnetic resonance imaging for the evaluation of hydronephrosis, reflux and renal scarring in children. *J Urol.* 2001;166(3):1023-7. Epub 2001/08/08.
113. Rohrschneider WK, Haufe S, Wiesel M, Tonshoff B, Wunsch R, Darge K, et al. Functional and morphologic evaluation of congenital urinary tract dilatation by using combined static-dynamic MR urography: findings in kidneys with a single collecting system. *Radiology.* 2002;224(3):683-94. Epub 2002/08/31.
114. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999;286(5439):481-6. Epub 1999/10/16.
115. Devaskar SU, Raychaudhuri S. Epigenetics--a science of heritable biological adaptation. *Pediatr Res.* 2007;61(5 Pt 2):1R-4R. Epub 2007/04/25.
116. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics.* 2003;33 Suppl:245-54. Epub 2003/03/01.
117. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):253-62. Epub 2007/03/17.
118. Waddington CH. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *NATURE.* 1942;150:563-5.

119. Esteller M. Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;358(11):1148-59. Epub 2008/03/14.
120. Griffith JS, Mahler HR. DNA ticketing theory of memory. *Nature*. 1969;223(5206):580-2. Epub 1969/08/09.
121. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetics and cell genetics*. 1975;14(1):9-25. Epub 1975/01/01.
122. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975;187(4173):226-32. Epub 1975/01/24.
123. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987;238(4824):163-70. Epub 1987/10/09.
124. Haig D. The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2004;69:67-70. Epub 2005/08/25.
125. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:93-124. Epub 1983/01/01.
126. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16(1):6-21. Epub 2002/01/10.
127. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998;19(3):219-20. Epub 1998/07/14.
128. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*. 1992;6(5):705-14. Epub 1992/05/01.
129. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(24):13734-8. Epub 2001/11/22.
130. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57. Epub 1999/11/11.
131. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol*. 2001;195(1):97-110. Epub 2001/09/25.
132. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(24):11995-9. Epub 1993/12/15.
133. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*. 1999;23(1):58-61. Epub 1999/09/02.
134. Ptak C, Petronis A. Epigenetics and complex disease: from etiology to new therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008;48:257-76. Epub 2007/09/22.
135. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*. 2004;7(8):847-54. Epub 2004/06/29.
136. Riggs AD, Xiong Z, Wang L, LeBon JM. Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure. *Novartis Foundation symposium*. 1998;214:214-25; discussion 25-32. Epub 1998/05/27.
137. Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14412-7. Epub 1999/12/10.

138. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 1999;23(2):185-8. Epub 1999/10/03.
139. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 2001;38(5):285-303. Epub 2001/05/23.
140. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2000;1(1):11-9. Epub 2001/03/27.
141. Kramer JM, Kochinke K, Oortveld MA, Marks H, Kramer D, de Jong EK, et al. Epigenetic regulation of learning and memory by *Drosophila* EHMT/G9a. *PLoS Biol.* 2011;9(1):e1000569. Epub 2011/01/20.
142. Plass C. Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet.* 2002;11(20):2479-88. Epub 2002/09/28.
143. Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:509-29. Epub 2006/07/07.
144. Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental cell.* 2005;9(2):283-92. Epub 2005/08/02.
145. Dressler GR. Epigenetics, development, and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2008;19(11):2060-7. Epub 2008/08/22.
146. James RG, Schultheiss TM. Bmp signaling promotes intermediate mesoderm gene expression in a dose-dependent, cell-autonomous and translation-dependent manner. *Developmental biology.* 2005;288(1):113-25. Epub 2005/10/26.
147. Wellik DM, Hawkes PJ, Capecchi MR. Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes & development.* 2002;16(11):1423-32. Epub 2002/06/07.
148. Patel SR, Kim D, Levitan I, Dressler GR. The BRCT-domain containing protein PTIP links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase complex. *Developmental cell.* 2007;13(4):580-92. Epub 2007/10/11.
149. Strutz F, Zeisberg M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(11):2992-8. Epub 2006/10/13.
150. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(12):2495-508. Epub 1996/12/01.
151. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nature medicine.* 2010;16(5):544-50. Epub 2010/04/27.
152. Tampe D, Zeisberg M. A primer on the epigenetics of kidney fibrosis. *Minerva medica.* 2012;103(4):267-78. Epub 2012/07/19.
153. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827. Epub 1987/01/01.
154. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989;49(17):4682-9. Epub 1989/09/01.
155. Ortiz A, Ucero AC, Egido J. Unravelling fibrosis: two newcomers and an old foe. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2010;25(11):3492-5. Epub 2010/09/14.
156. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature reviews Genetics.* 2005;6(8):597-610. Epub 2005/09/02.

157. Weng YI, Huang TH, Yan PS. Methylated DNA immunoprecipitation and microarray-based analysis: detection of DNA methylation in breast cancer cell lines. *Methods Mol Biol.* 2009;590:165-76. Epub 2009/09/19.
158. Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques.* 2000;29(5):1042-6, 8-55. Epub 2000/11/21.
159. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *Nature genetics.* 1999;21(1 Suppl):15-9. Epub 1999/01/23.
160. Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic acids research.* 2001;29(12):2549-57. Epub 2001/06/19.
161. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, et al. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer research.* 1998;58(20):4740-4. Epub 1998/10/27.
162. de Martino M, Klatt T, Haitel A, Marberger M. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker. *Cancer.* 2012;118(1):82-90. Epub 2011/06/30.
163. Kawai Y, Sakano S, Suehiro Y, Okada T, Korenaga Y, Hara T, et al. Methylation level of the RASSF1A promoter is an independent prognostic factor for clear-cell renal cell carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2010;21(8):1612-7. Epub 2009/12/30.
164. Nehru GA, Pai R, Samuel P, Chacko AG, Chacko G. Status of O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase [MGMT] gene promoter methylation among patients with glioblastomas from India. *Neurology India.* 2012;60(5):481-6. Epub 2012/11/09.
165. Nelson WJ, Dickinson DJ, Weis WI. Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity. *Progress in molecular biology and translational science.* 2013;116:3-23. Epub 2013/03/14.
166. Al-Aynati MM, Radulovich N, Ho J, Tsao MS. Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2004;10(19):6598-605. Epub 2004/10/12.
167. Krop IE, Sgroi D, Porter DA, Lunetta KL, LeVangie R, Seth P, et al. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(17):9796-801. Epub 2001/08/02.
168. Krop I, Player A, Tablante A, Taylor-Parker M, Lahti-Domenici J, Fukuoka J, et al. Frequent HIN-1 promoter methylation and lack of expression in multiple human tumor types. *Molecular cancer research : MCR.* 2004;2(9):489-94. Epub 2004/09/24.
169. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research.* 2008;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008/04/22.
170. Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology.* 2010;10:8. Epub 2010/01/14.
171. Ho AS, Turcan S, Chan TA. Epigenetic therapy: use of agents targeting deacetylation and methylation in cancer management. *OncoTargets and therapy.* 2013;6:223-32. Epub 2013/04/10.
172. Rodriguez-Dorantes M, Tellez-Ascencio N, Cerbon MA, Lopez M, Cervantes A. [DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]. *Revista de*

investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion. 2004;56(1):56-71. Epub 2004/05/18. Metilacion del ADN: un fenomeno epigenetico de importancia medica.

173. Henrique R, Jeronimo C. Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. *European urology*. 2004;46(5):660-9; discussion 9. Epub 2004/10/12.

174. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England journal of medicine*. 2000;343(19):1350-4. Epub 2000/11/09.

175. Federico M, Bagella L. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies and solid tumors. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:475641. Epub 2010/12/29.

176. Braun H, Schmidt BM, Raiss M, Baisantray A, Mircea-Constantin D, Wang S, et al. Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(9):1467-73. Epub 2012/07/17.

177. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nature medicine*. 2010;16(5):535-43, 1p following 143. Epub 2010/05/04.

178. Hummel TR, Wagner L, Ahern C, Fouladi M, Reid JM, McGovern RM, et al. A Pediatric Phase 1 Trial of Vorinostat and Temozolomide in Relapsed or Refractory Primary Brain or Spinal Cord Tumors: A Children's Oncology Group Phase 1 Consortium Study. *Pediatric blood & cancer*. 2013. Epub 2013/04/05.

179. Beghdadi W, L CM, Claver J, Pejler G, Beaudoin L, Lehuen A, et al. Mast cell chymase protects against renal fibrosis in murine unilateral ureteral obstruction. *Kidney international*. 2013. Epub 2013/03/22.

180. Zheng G, Lyons JG, Tan TK, Wang Y, Hsu TT, Min D, et al. Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *The American journal of pathology*. 2009;175(2):580-91. Epub 2009/07/11.

181. Krop I, Parker MT, Bloushtain-Qimron N, Porter D, Gelman R, Sasaki H, et al. HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation. *Cancer research*. 2005;65(21):9659-69. Epub 2005/11/04.

182. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature*. 2011;476(7359):163-9. Epub 2011/08/13.

183. Zawada AM, Rogacev KS, Heine GH. Clinical relevance of epigenetic dysregulation in chronic kidney disease-associated cardiovascular disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013. Epub 2013/03/21.

184. Simmonds MJ, Benavente D, Brand OJ, Moore J, Ball S, Ferro CJ, et al. Skewing of Female X-Chromosome Inactivation: An Epigenetic Risk Factor for Kidney Transplantation Outcome. *Transplantation*. 2013;95(5):e25-e8. Epub 2013/03/19.