



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

BUSQUEDA Y CARACTERIZACION DE MUTACIONES  
EN EL GEN NPHS2 EN NIÑOS MEXICANOS CON  
SÍNDROME NEFRÓTICO IDIOPÁTICO

TESIS  
PARA OBTENCIÓN DEL DIPLOMA DE  
SUBESPECIALIDAD EN  
NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA  
PRESENTA:  
DR. HORACIO MARTINEZ PUON



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

65 AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA  
*Salud para las Nuevas Generaciones*

ASESORES DE TESIS:  
DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO  
DR. LUIS VELASQUEZ JONES

Co asesor M en C  
BENJAMÍN ANTONIO RODRÍGUEZ ESPINO

MEXICO D.F.

MARZO

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS**

**BUSQUEDA Y CARACTERIZACION DE MUTACIONES EN EL GEN NPHS2 EN  
NIÑOS MEXICANOS CON SÍNDROME NEFRÓTICO IDIOPÁTICO**

---

**Dra. Mara Medeiros Domingo**  
**Asesora de Tesis**

---

**Dr. Luis Velásquez Jones**  
**Asesor de Tesis**

---

**M en C Benjamín Antonio Rodríguez Espino**  
**Co asesor**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Gracias a Dios, por estar conmigo en todo momento y por darme esta vocación de ser medico.

A mis padres, por el apoyo incondicional, por sus oraciones y el amor que me tienen.

Dra. Medeiros, gracias por sus enseñanzas y por transmitirme su pasión por la investigación, es un honor ser su residente.

Dr. Velásquez, gracias por sus enseñanzas y esa pasión a la nefrología pediátrica, es un placer que haya sido mi maestro.

A todo el equipo del laboratorio de investigación de nefrología y genética por ser posible el presente trabajo, mil gracias.

Horacio...

## ÍNDICE:

1. Portada	1
2. Firmas	2
3. Agradecimientos	3
4. Índice	4
5. Objetivos	6
6. Antecedentes	7
7. Marco Teórico	9
8. Planteamiento del problema	19
9. Justificación	20
10. Hipótesis	21
11. Características del lugar donde se realizó el estudio	22
12. Tipo de estudio	23
13. Cronograma	24
14. Población	25
15. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	26
16. Plan de análisis estadístico	27
17. Descripción de variables	28
18. Material y métodos	29
19. Financiamiento	37
20. Aspectos Éticos	37
21. Resultados	38
22. Discusión	45
23. Conclusiones	46
24. Referencias	47
25. Anexos	52

## **OBJETIVOS:**

### 1. General:

- a. Conocer la frecuencia de las mutaciones en el gen NPHS2 en los niños con síndrome nefrótico idiopático.

### 2. Específicos:

- b. Correlacionar la respuesta al tratamiento, las lesiones histológicas y la presencia o ausencia de mutaciones.
- c. Correlacionar la presencia de mutaciones con la evolución a insuficiencia renal crónica.
- d. Correlacionar la presencia de mutaciones con la evolución a insuficiencia renal crónica.

## **ANTECEDENTES:**

El síndrome nefrótico idiopático se define como la pérdida de proteínas por la barrera de filtración glomerular secundariamente se presenta edema, trastornos en los lípidos así como otros trastornos metabólicos. La etiología se desconoce pero se han realizado investigación los cuales han resultados como causa los trastornos genéticos asociados a la formación de los diferentes componentes del filtro glomerular, es así que se tienen como causa las diversas mutaciones presente en los genes que codifican las diferentes proteínas de dicho filtro, como son podocina (NPHS2), nefrina (NPHS1), NEPH1 (gen NEPH1), CD2AP (gen CD2AP), Fyn, densina y cadherina-5.<sup>1</sup>

La importancia de las mutaciones en los genes que codifican las proteínas de los podocitos puede evidenciarse claramente de la investigación realizada por Hinkes y colaboradores, quienes estudiaron 89 niños pertenecientes a 80 familias con síndrome nefrótico manifestado en el primer año de la vida. En este estudio se detectaron mutaciones de los genes NPHS1 (22.5%), NPHS2 (37.5%), WT1 (3.8%) y LAMB2 (2.5%) en 53 de las 80 familias (66.3%). Asimismo, las mutaciones descritas se encontraron en 85% de las familias con síndrome nefrótico congénito (inicio entre cero y tres meses de edad) y en 44% con síndrome nefrótico infantil (inicio entre cuatro a 12 meses de edad). Las mutaciones en el gen NPHS2 fueron la causa más frecuente del síndrome nefrótico tanto en la forma congénita (39%) como en la infantil; sin embargo, las mutaciones del gen NPHS1 solamente se encontraron en los niños con síndrome nefrótico congénito, y a su vez, con características del síndrome nefrótico congénito tipo finlandés.<sup>2</sup>

Hee Yoon Cho y colaboradores estudiaron 70 niños coreanos con síndrome nefrótico corticorresistente, no encontraron mutaciones en NPHS2.<sup>3</sup>

Rasheed Gbadegesin y colaboradores publicaron en el 2007, un análisis de mutaciones del gen NPHS2 (podocina) en EUA y la frecuencia de WT1 en pacientes con síndrome nefrotico idiopático corticodependientes así como de recaídas frecuentes, en el que estudiaron 20 niños, no encontraron mutaciones en estos genes. <sup>4</sup>

No existe información en México sobre mutaciones de NPHS2 en niños con síndrome nefrótico idiopático (SIN).

## **MARCO TEÓRICO:**

El síndrome nefrótico es una condición en la cual ocurre pérdida de proteínas a través del filtro glomerular; la proteinuria resultante se acompaña habitualmente de edema, hipoproteinemia, hiperlipidemia y otros trastornos metabólicos. El síndrome nefrótico se clasifica como idiopático cuando se debe a glomerulopatías primarias o bien puede ser secundario a diversas afecciones.<sup>1</sup>

El síndrome nefrótico idiopático es la causa más común del síndrome nefrótico en niños. En los menores de 10 años de edad con síndrome nefrótico idiopático, la mayoría de los pacientes presentan lesiones glomerulares mínimas, por lo que se ha denominado “enfermedad de cambios mínimos”, “glomerulopatía de cambios mínimos” y más recientemente “nefropatía de cambios mínimos”.<sup>2</sup> Se ha observado que 90 a 95% de estos pacientes responde habitualmente al tratamiento con corticosteroides,<sup>3</sup> por lo que también han sido clasificados como “síndrome nefrótico idiopático sensible a corticosteroides”. La proporción restante de pacientes presenta lesiones histológicas renales diversas que incluyen: hiper celularidad mesangial, glomerulosclerosis segmentaria y focal, glomerulonefritis membranoproliferativa, glomerulopatía membranosa y obsolescencia glomerular focal y global.<sup>6</sup> Los niños con los dos primeros tipos de lesiones histológicas mencionadas presentan con frecuencia falta de respuesta al tratamiento con corticosteroides, por lo cual también han sido clasificados como “síndrome nefrótico idiopático resistente a corticosteroides”.

En nuestro hospital los pacientes con síndrome nefrótico idiopático reciben tratamiento con esteroides (60mg/m<sup>2</sup>SC/día por 6 semanas y posteriormente 40mg/m<sup>2</sup>SC/días alternos por 6 semanas), se consideran corticosensibles aquellos en quienes la proteinuria desaparece en las primeras cuatro semanas de tratamiento con prednisona y si no responden son invitados a participar en el protocolo HIM/2006/032 “Eficacia de la combinación tacrolimus – prednisona comparada con ciclosporina – prednisona en el tratamiento del síndrome nefrótico

idiopático corticorresistente“. Se considera la realización de biopsia renal en los casos de: corticorresistencia, corticodependencia, recaídas frecuentes, deterioro en la función renal. De acuerdo a la experiencia clínica mundial, la mayoría de los pacientes sin biopsia renal (que responden al tratamiento de inmunosupresión inicial), serán de lesiones glomerulares mínimas, mientras que los que requieren la biopsia son generalmente de lesiones glomerulares complejas

La filtración del plasma a través del glomérulo requiere el paso de agua y solutos a través de la barrera de filtración glomerular. Esta barrera tiene tres componentes: el endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular y las células epiteliales viscerales denominadas podocitos. Los podocitos se unen a la membrana basal glomerular a través de prolongaciones epiteliales denominadas pedicelos; estos pedicelos dejan un espacio entre cada uno de ellos, en el cual se ubica el denominado diafragma de hendidura.

Los podocitos son células epiteliales diferenciadas, altamente especializadas, que embriológicamente derivan de las células mesenquimatosas. Los pedicelos se unen a la membrana basal glomerular por la acción de la  $\alpha 3\beta 1$ -integrina y los  $\alpha$  y  $\beta$ -dístroglicanos.<sup>7</sup>

La membrana de los podocitos se encuentra cargada negativamente, debido a la presencia de diversas proteínas aniónicas en su superficie, que incluyen la podocalixina, podoplanina y podoendina. Esta membrana tiene dos funciones; en primer lugar limita el paso de la albúmina, la cual también está cargada negativamente; en segundo lugar, las cargas aniónicas mantienen la separación de los pedicelos.<sup>9</sup>

Se ha considerado que los podocitos tienen las siguientes funciones: a) regulación de la permeabilidad selectiva glomerular; b) soporte estructural del capilar glomerular, en cooperación con las células mesangiales para resistir la fuerza distensora de la presión hidráulica intracapilar; c) remodelación de la

membrana basal glomerular, en cooperación con las células endoteliales y mesangiales, y d) endocitosis de las proteínas filtradas.<sup>8-10</sup>

El diafragma de hendidura es una estructura de unión altamente especializada, que forma la mayor barrera para evitar la pérdida de proteínas a través del filtro glomerular.<sup>7</sup>

Uno de los primeros componentes moleculares del diafragma de hendidura identificados fue la nefrina (gen NPHS1), la cual es un miembro de la familia de las inmunoglobulinas; la importancia de la nefrina se deduce del hecho que en ausencia de nefrina no se forma el diafragma de hendidura.<sup>9</sup> Después de la nefrina, se identificaron otras proteínas localizadas en el diafragma de hendidura o en su cercanía. Estas proteínas y sus genes incluyen, entre otras, las siguientes: podocina (gen NPHS2), NEPH1 (gen NEPH1), CD2AP (gen CD2AP), Fyn, densina y cadherina-5 (Fig. 2).<sup>11</sup>

Se ha descrito que la nefrina, la podocina y el NEPH1 forman un complejo proteico que funciona como un receptor transmembrana. Cuando se pierde algunos de estos componentes, los pacientes o ratones experimentales, desarrollan proteinuria y fusión de los pedicelos.<sup>9</sup> Una de las funciones básicas del complejo receptor de la nefrina es formar una unión polarizada entre las células contiguas. En el podocito maduro, las vías de señalización a través del diafragma de hendidura vía el complejo de nefrina, sirven para regular la estructura del podocito por medio de la modulación del citoesqueleto para mantener la arquitectura tridimensional y los movimientos de la célula.<sup>11</sup>

Por otro lado, se ha demostrado que la permeabilidad de la membrana basal glomerular se encuentra determinada no solamente por el tamaño sino también por la carga de las proteínas. De esta manera, la carga negativa o aniónica de la membrana basal glomerular impide el paso de las moléculas de albúmina, las cuales también tienen carga negativa. Lo anterior indica que en el síndrome nefrótico idiopático, la proteinuria también ocurre a consecuencia de la

alteración electroquímica de la membrana basal glomerular, con pérdida de sus cargas aniónicas.

Finalmente, en los pacientes con síndrome nefrótico idiopático la producción aumentada de diversas linfocinas por los linfocitos T activados, puede alterar la permeabilidad glomerular a la albúmina. A este respecto, se ha demostrado aumento de la producción in vitro por los linfocitos de las interleucinas (IL) 2, IL-4 e IL-13 e interferón gamma. El aumento de la concentración de las interleucinas mencionadas puede explicar la alteración en la permeabilidad glomerular observada en los pacientes con síndrome nefrótico idiopático. Sin embargo, también se ha determinado que el denominado “factor de permeabilidad vascular”, es diferente en sus características a la IL-2 y se ha concluido que al momento actual la citocina patogenética aún no ha sido identificada.<sup>12</sup>

De la discusión anterior respecto a la fisiopatología del síndrome nefrótico se pueden sustentar dos mecanismos principales que inducen la alteración de la permeabilidad del filtro glomerular a las proteínas del suero, principalmente la albúmina. Por un lado, se tiene a los pacientes que evolucionan a insuficiencia renal crónica terminal y reciben un trasplante renal; una proporción variable de estos pacientes presentan recurrencia del síndrome nefrótico después del trasplante, por lo que se puede especular que en estos casos la enfermedad es probablemente mediada por una citocina producida por los linfocitos T que incrementa la permeabilidad de la membrana basal glomerular y que persiste en circulación, incluso en pacientes que han sido sometidos a nefrectomía bilateral antes del trasplante.<sup>13</sup> Aun debe definirse si esta citocina actúa modificando directamente la permeabilidad de la membrana basal glomerular o través de la lesión de los podocitos y el diafragma de hendidura. Por otro lado, deben considerarse los pacientes con síndrome nefrótico en quienes se ha demostrado mutaciones en los genes que codifican las proteínas básicas de los podocitos y el diafragma de hendidura que mantienen la integridad anatómica y fisicoquímica de la barrera de filtración glomerular.

Las enfermedades que causan el síndrome nefrótico pueden agruparse en forma general en tres categorías: a) Enfermedades que actúan a través de mecanismos mediados por anticuerpos; ejemplos de estas enfermedades son el lupus eritematoso sistémico, la glomerulonefritis membranoproliferativa y la glomerulopatía membranosa. b) Enfermedades asociadas con alteraciones metabólicas; ejemplo de éstas es la diabetes mellitus. c) Enfermedades causadas por función anormal de las células glomerulares; la mayoría de estas enfermedades ocurren por lesión o disfunción de los podocitos, por lo cual éstas han sido designadas como podocitopatías<sup>4</sup>

Se ha propuesto que la disfunción de los podocitos puede tener tres posibles etiologías: idiopática, genética o reactiva. A su vez, las lesiones histológicas glomerulares, de acuerdo a la clasificación propuesta, incluyen principalmente: a) lesiones glomerulares mínimas, b) glomerulosclerosis segmentaria y focal, c) esclerosis mesangial difusa y d) glomerulopatía colapsante<sup>2</sup>

Por otro lado, estas categorías histopatológicas no son completamente excluyentes una de otras. Así, puede ocurrir transición entre las lesiones histológicas en los pacientes con síndrome nefrótico. De esta manera, algunos pacientes que en la biopsia inicial presentan lesiones glomerulares mínimas, en un estudio histológico posterior (realizado habitualmente por falta de respuesta al tratamiento con corticosteroides) se observan lesiones de glomeruloesclerosis segmentaria y focal. Lo mismo puede ocurrir en niños que en el estudio histológico inicial muestran proliferación mesangial difusa. Por otro lado, se ha observado que un mismo factor etiológico puede manifestarse por distintos tipos de lesiones histológicas; así, los pacientes que presentan mutaciones en el gen NPHS2, que codifica la producción de podocina, pueden presentar al estudio histológico renal lesiones glomerulares mínimas, glomeruloesclerosis segmentaria y focal y, raramente, esclerosis mesangial difusa.

La importancia de las mutaciones en los genes que codifican las proteínas de los podocitos puede evidenciarse claramente de la investigación realizada por Hinkes y colaboradores,<sup>12</sup> quienes estudiaron 89 niños pertenecientes a 80 familias con síndrome nefrótico manifestado en el primer año de la vida. En este estudio se detectaron mutaciones de los genes NPHS1 (22.5%), NPHS2 (37.5%), WT1 (3.8%) y LAMB2 (2.5%) en 53 de las 80 familias (66.3%). Asimismo, las mutaciones descritas se encontraron en 85% de las familias con síndrome nefrótico congénito (inicio entre cero y tres meses de edad) y en 44% con síndrome nefrótico infantil (inicio entre cuatro a 12 meses de edad). Las mutaciones en el gen NPHS2 fueron la causa más frecuente del síndrome nefrótico tanto en la forma congénita (39%) como en la infantil; sin embargo, las mutaciones del gen NPHS1 solamente se encontraron en los niños con síndrome nefrótico congénito, y a su vez, con características del síndrome nefrótico congénito tipo finlandés.

#### Síndrome nefrótico de lesiones glomerulares mínimas

El síndrome nefrótico de lesiones glomerulares mínimas se caracteriza por el hallazgo de histología glomerular normal al estudio de microscopía óptica y fusión extensa de los pedicelos al examen con microscopio electrónico.

En la variante genética se han identificado tres formas: a) Síndrome nefrótico de lesiones glomerulares mínimas corticorresistente autosómico recesivo (clasificación OMIM #600995), que se presenta en la infancia o en la niñez, y probablemente es causado por mutaciones en el gen NPHS2 que codifica la podocina. b) Síndrome nefrótico autosómico dominante el cual se presenta con mayor frecuencia como glomerulosclerosis segmentaria y focal y más raramente como lesiones glomerulares mínimas; este síndrome se ha ligado a un locus ubicado en el cromosoma 19q; el gen responsable es probablemente el ACTN4 (OMIM #603278), que codifica la alfa-actinina 4. c) Distrofia muscular tipo 2B, la cual es causada por mutaciones en la disferlina (OMIM #603009) y se acompaña de síndrome nefrótico de lesiones glomerulares mínimas.<sup>15</sup>

## Síndrome nefrótico con glomerulosclerosis segmentaria y focal

En los pacientes con síndrome nefrótico la glomerulosclerosis segmentaria y focal se define como una solidificación segmentaria del ovillo capilar glomerular con acúmulo de matriz extracelular; en ocasiones ocurre adhesión o sinequias entre el ovillo glomerular y la cápsula de Bowman.

Los pacientes con la variante genética pueden presentar la lesión de glomerulosclerosis segmentaria y focal como parte de un síndrome o la lesión encontrarse limitada al riñón (no sindrómica). Las mutaciones genéticas que se incluyen en las formas no sindrómicas incluyen genes que codifican proteínas en el citoesqueleto basado en actina o en el diafragma de hendidura. En cambio, en las formas sindrómicas se incluyen mutaciones genéticas en las proteínas de la membrana basal glomerular (como en el síndrome de Alport) y en los factores de transcripción que son críticos para la diferenciación de los podocitos (como la proteína del factor de Wilms-1, WT1); asimismo, enfermedades metabólicas (Fabry) y mitocondriopatías (MELAS).<sup>4</sup>

Las mutaciones en el gen NPHS2, que codifica la producción de podocina, son las más frecuentemente encontradas en el síndrome nefrótico con glomerulosclerosis segmentaria y focal de tipo genético; la herencia es de tipo autosómico recesivo;<sup>16</sup> el gen se ubica en el cromosoma 1q25-31.<sup>13</sup> Se ha estimado que estas mutaciones se encuentran en aproximadamente 10 a 30% de los pacientes con glomerulosclerosis segmentaria y focal con síndrome nefrótico corticorresistente,<sup>17</sup> y no todos ellos presentan el síndrome nefrótico en la etapa de la niñez.<sup>13</sup> Sin embargo, los pacientes afectados también pueden presentar hallazgos histológicos iniciales de lesiones glomerulares mínimas o hiperplasia mesangial difusa. Una característica distintiva es que estos pacientes habitualmente no responden al tratamiento con corticosteroides ni otros medicamentos inmunosupresores.<sup>18</sup>

Las mutaciones del gen ACTN4, ubicado en el cromosoma 19q13, que codifica la alfa-actinina-4 se han observado en pacientes con síndrome nefrótico

con glomerulosclerosis segmentaria y focal de tipo familiar, con modo de herencia autosómico dominante.<sup>15</sup> Por otro lado, en otras formas de glomerulosclerosis segmentaria y focal, también transmitidas con carácter autosómico dominante, se han observado mutaciones en el gen CD2AP, ubicado en el cromosoma 6p12, el cual codifica las proteínas asociadas a CD2.<sup>13</sup>

Por otro lado, en las variantes sindrómicas se han descrito mutaciones en el WT1 en pacientes con síndrome de Frasier, pero también en pacientes con glomerulosclerosis segmentaria y focal aislada.<sup>19-21</sup>

Se ha mencionado previamente que una proporción aún no definida de pacientes con síndrome nefrótico y glomerulosclerosis segmentaria y focal presentan mutaciones en genes específicos que codifican proteínas de los podocitos como la nefrina, podocina y la alfa-actinina-4<sup>22-33</sup>. A este respecto, aun existe controversia de la efectividad de diversos medicamentos inmunosupresores en los pacientes que presentan estas mutaciones, pero al parecer es baja la posibilidad de una respuesta favorable.<sup>22</sup>

Los estudios iniciales del ISKDC mostraron que aproximadamente 30% de los niños con síndrome nefrótico idiopático y glomerulosclerosis segmentaria y focal presentan respuesta al tratamiento inicial con corticosteroides.<sup>6</sup> Sin embargo, en una proporción importante de los pacientes se observan recaídas en los siguientes meses después del tratamiento inicial. En otros casos, después de una respuesta inicial favorable y de otras remisiones en recaídas subsecuentes, algunos pacientes presentan falta de respuesta a un nuevo tratamiento, por lo cual se ha denominado corticorresistencia tardía. Se ha descrito una menor respuesta al tratamiento con corticosteroides en los pacientes con mutaciones en el gen NPHS2 que codifica la podocina de los podocitos.<sup>34</sup>

Los hallazgos mencionados ya tienen actualmente implicaciones en el manejo de los pacientes con síndrome nefrótico idiopático<sup>35-44</sup>. Se ha mencionado que en algunos centros nefrológicos se buscan mutaciones de la podocina en los

niños con síndrome nefrótico idiopático, con el fin de evitar el uso de corticosteroides, los cuales no serán efectivos en el tratamiento de estos pacientes.<sup>13</sup>

#### Síndrome nefrótico congénito tipo finlandés

El síndrome nefrótico congénito tipo finlandés se hereda en forma autosómica recesiva y se debe a la mutación del gene de la nefrina (NPHS1) localizado en el cromosoma 19q13.1. La enfermedad no es exclusiva de la población finlandesa<sup>45-48</sup>.

El gen de la nefrina está mutado en el síndrome nefrótico tipo finlandés. La nefrina constituye un componente importante del diafragma de hendidura de los pedicelos de los podocitos. Los estudios en ratones con la deficiencia muestran que la nefrina intacta es necesaria para mantener la permeabilidad selectiva normal del capilar glomerular. Las mutaciones de una proteína estrechamente ligada a la nefrina, la proteína asociada a CD2 (gen CD2AP) en los ratones, ha permitido demostrar que otros componentes del diafragma de hendidura, o sus proteínas de anclaje, también pueden ocasionar un síndrome nefrótico con características clínicas parecidas a las observadas en el síndrome nefrótico tipo finlandés.

#### Síndrome de Denys-Drash

El síndrome de Denys-Drash se caracteriza por la asociación de síndrome nefrótico de inicio temprano, que progresa rápidamente a insuficiencia renal crónica, pseudohermafroditismo masculino y tumor de Wilms.<sup>49,50</sup>

La mayoría de los pacientes con síndrome de Denys-Drash presentan mutaciones heterocigotas, principalmente de novo. Estas mutaciones del gen supresor del tumor de Wilms (WT1) son en sentido equivocado y localizadas en los exones 8 y 9. Estas mutaciones también se han observado en pacientes con síndrome nefrótico corticorresistente aislado.<sup>20</sup>

En base a las consideraciones anteriores se planea el siguiente estudio prospectivo dirigido a determinar la presencia de mutaciones de los genes NPHS1 (que codifica la nefrina) y NPHS2 (que codifica la podocina) en los niños con síndrome nefrótico idiopático que se encuentran en control en el Departamento de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez y correlacionar estos resultados con la respuesta a los tratamientos instituidos y la evolución posterior. En aquellos pacientes que cuenten con estudio histológico renal, indicado habitualmente debido a la presencia de recaídas frecuentes del síndrome nefrótico, corticodependencia o corticorresistencia, se realizará además la correlación entre la presencia de algunas de las mutaciones investigadas, los hallazgos histológicos renales, su respuesta al tratamiento y evolución posterior.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

- El síndrome nefrótico idiopático es la causa mas frecuente de síndrome nefrótico en niños. Recientemente se han identificado diferentes mutaciones en los genes que codifican la producción de diversas moléculas del filtro glomerular (podocitos y membrana de hendidura, uno de los genes estudiados ha sido la podocina (gen NPHS2) que es una proteina localizada en el diafragma de hendidura, estructura de unión altamente especializada, que forma la mayor barrera para evitar la pérdida de proteínas a través del filtro glomerular.

En otros países se ha reportado que entre 0% a 37.5% de los pacientes con síndrome nefrótico idiopático presentan mutaciones en el gen NPHS2. Se desconoce la frecuencia en población mexicana.

## **JUSTIFICACIÓN:**

- Al momento actual no se cuenta en nuestro País con estudios que indiquen la frecuencia de las mutaciones en el gen NPHS2 en los niños con síndrome nefrótico idiopático.
- Asimismo, el estudio permitirá correlacionar la presencia de mutaciones y las lesiones histológicas renales y la respuesta a los tratamientos instituidos en estos pacientes.
- Finalmente, permitirá definir si la presencia de mutaciones se correlaciona con mayor deterioro de la función renal y desarrollo de insuficiencia renal crónica en estos niños.

## **HIPÓTESIS:**

1. Alrededor de 20 a 30% de los pacientes con síndrome nefrótico idiopático presentan mutaciones en los genes NPHS1 y NPHS2.
2. Los pacientes con mutaciones presentan con mayor frecuencia lesiones histológicas de glomeruloesclerosis segmentaria y focal.
3. La presencia de mutaciones se correlaciona con mala respuesta a los tratamientos instituidos.
4. La presencia de mutaciones se acompaña de mayor deterioro de la función renal en estos niños.

## **CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL ESTUDIO:**

El Hospital Infantil de México Federico Gómez, es un Instituto Nacional de salud, ubicado en la calle Dr. Márquez # 162, colonia Doctores en la delegación Cuauhtémoc. Es un hospital de tercer nivel que atiende a población abierta referida de todas las instituciones de salud del distrito federal, área metropolitana y resto de la república mexicana, el cual labora los 365 días del año las 24 horas del día.

El Hospital Infantil de México Federico Gómez, cuenta con 300 camas censables. Este estudio se llevó a cabo tanto en el laboratorio de investigación, como en el laboratorio y el servicio de nefrología, los cuales se encuentran ubicados en el tercer piso del edificio Mundet y cuarto piso del edificio Federico Gómez respectivamente.

**TIPO DE ESTUDIO:**

- Se trata de un estudio descriptivo y transversal.

## CRONOGRAMA:

1. Enero 2008:
  - a. Realización de marco teórico y antecedentes
2. Febrero – Abril 2008:
  - a. Captura de pacientes, toma de muestras, examen físico y recolección de datos del expediente clínico
3. Marzo – Abril 2008
  - a. Captura de pacientes, toma de muestras, examen físico
4. Febrero – Junio 2008
  - a. Recolección de datos y secuenciación de DNA
5. Mayo – Junio 2008
  - a. Análisis de datos obtenidos
6. Junio – Julio 2008
  - a. Redacción de conclusiones y término de la tesis

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL
Marco teórico y antecedente	X						
Captura de pacientes, muestreo		X	X	X			
Recolección de datos y secuenciación del ADN		X	X	X	X	X	
Análisis de datos obtenidos					X	X	
Redacción de conclusiones y termino de tesis						X	X

## **POBLACIÓN:**

- Pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de cualquier género, con diagnóstico síndrome nefrótico idiopático, que acudieron a la consulta externa de Nefrología.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN:**

### 1. Criterios de inclusión:

- a. Edad al inicio del síndrome nefrótico entre 1 mes a 15 años.
- b. Laboratorio al inicio del síndrome nefrótico: función renal (urea y creatinina) normal, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, albúmina menor de 2.5 g/dL, complemento normal; examen general de orina: +++/ proteinuria mayor de 40 mg/m<sup>2</sup>/hora.
- c. Ausencia de enfermedades que causan síndrome nefrótico en niños.
- d. Aceptación mediante consentimiento informado y asentimiento de los menores que puedan otorgarlo.

### 2. Criterios de exclusión:

- a. Síndrome nefrótico secundario a enfermedades sistémicas.
- b. Deseo voluntario de no participar en el estudio.
- c. Criterios de eliminación:

### 3. Criterios de eliminación:

- a. Información clínica y exámenes de laboratorio incompletos
- b. Falta de seguimiento del paciente

## **PLAN DE ANALISIS ESTADÍSTICO:**

1. Análisis de secuencias mediante el programa Fincht TV y el programa DNAMAN versión 6.0. Análisis estadístico mediante el programa SPSS versión 16.0

## **DESCRIPCIÓN DE VARIABLES:**

1. Variable independiente:
  - a. Presencia de mutaciones en el gen NPHS2. variantes genéticas con descendientes patológicas (síndrome nefrótico).
2. Variables dependientes:
  - b. Remisión. Desaparición de las manifestaciones clínicas del síndrome nefrótico (edema, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) y de la proteinuria (menos de 4 mg/h/m<sup>2</sup>, en colección nocturna de 12 horas).
  - c. Remisión parcial. Desaparición de las manifestaciones clínicas pero no bioquímico (persiste hipoproteinemia, hipercolesterolemia, y proteinuria).
3. Recaída. Se considera recaída la reaparición de la proteinuria: mayor de 40 mg/hora/m<sup>2</sup> en orina de colección nocturna de 12 horas.
4. Corticorresistencia. No respuesta al tratamiento con corticosteroides a dosis de 60 mg/m<sup>2</sup>/día, por 4 semanas.
5. Corticosensible: respuesta al primer tratamiento con corticoesteroides a 60mg/m<sup>2</sup>/d.
6. Corticosensible con recaídas frecuentes: respuesta al primer tratamiento con corticoesteroides presentando recaídas en número de 2 en 6 meses o 4 en un año.
7. No respuesta a otros tratamientos instituidos.
8. Función renal durante su evolución. Función renal al inicio del diagnóstico mediante fórmula de Schwartz así como al final del estudio.

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se realizó un estudio descriptivo de 15 pacientes infantiles diagnosticados con síndrome nefrótico idiopático, que acudieron a control en la Consulta Externa del Departamento de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), durante el periodo de enero a julio del 2008.

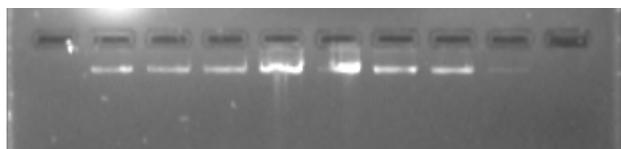
A cada paciente se le realizó una historia clínica y un examen físico, además de los siguientes exámenes clínicos de laboratorio:

- 4 En sangre: biometría hemática, creatinina, triglicéridos, colesterol, proteínas totales y fracciones, complemento hemolítico sérico: fracciones C3 y C4, inmunoglobulinas, calcio, fósforo y fosfatasa alcalina.
- 5 En orina: examen general de orina, proteinuria cuantitativa en colección nocturna de orina de 12 horas.
- 6 Además se les tomó una muestra de sangre para las pruebas moleculares.

### **Aislamiento del DNA de sangre venosa**

Se obtuvieron 6 ml de sangre venosa de los pacientes en tubo BD Vacutainer® con EDTA como anticoagulante (Becton, Dickinson and Company©). El DNA se extrajo siguiendo un protocolo de lisis celular del kit comercial QIAamp® DNA Blood mini kit (QIAGEN®).

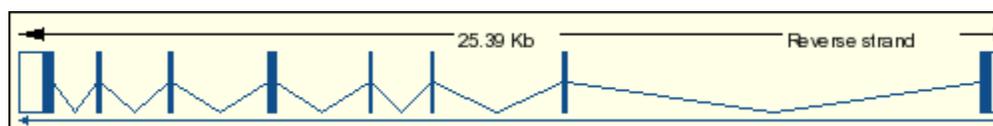
El DNA obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría para verificar su pureza y concentración. Además se verificó la integridad de la molécula mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE (Tris-Acido bórico-EDTA).



**Figura 1.** Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del DNA aislado de las muestras de sangre de los pacientes. En general se obtuvo una adecuada integridad de la molécula para pruebas moleculares. Se agregó 1 ul de muestra en cada pozo y se sometió a 100 KV por 30 minutos.

## **Análisis molecular del gen NPHS2**

Para la realización del análisis molecular del gen NPHS2 se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los ocho exones que conforman al gen (Figura 2). Para lo cual se obtuvo la secuencia consenso del gen (Vega Gene ID:OTTHUNG00000035252) en la base de datos de genes ENSEMBLE.ORG<sup>52</sup>.



**Figura 2.** Estructura del gen NPHS2 (podocina), de acuerdo a la información reportada en ENSEMBLE.ORG. Como se observa el gen tiene un tamaño aproximado de 25.39 kb y esta constituido por 8 exones.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa PRIMER3<sup>53</sup> disponible en línea (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), de manera general se consideraron los siguientes parámetros para el diseño:

- 4 Se diseñaron flanqueando al menos 50 pares de bases antes y después del exón blanco.
- 5 Se verificó que los oligonucleótidos no cayeran en posiciones donde se localizaba algún tipo de polimorfismo.

- 6 Se diseñaron con una Tm igual a 60°C para poder realizar la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de todos los exones en el menor número de experimentos posibles.
- 7 Se calculó de manera informática que los juegos de oligonucleótidos para cada exón no se alinearan a cualquier otra posición dentro del genoma y que no formaran dímeros entre los mismos pares.

**Tabla 1.** Diseño de los oligonucleótidos empleados para amplificar cada uno de los exones del gen NPHS2.

Exón	Posición*	Secuencia de oligonucleótido	Tamaño del fragmento (pares de bases)
1	S:	5' AGT CCA CAG CTC CAC CAA GAC 3'	587
	AS:	5' CTC TGG CTT CAG TGG GTC TC 3'	
2	S:	5' CCA AGA ATT GGA CCA ACA GAT G 3'	297
	AS:	5' GCA TTC CAC ATG GAG CAA TAA C 3'	
3	S:	5' GAA AGT TGG CCA ATT TTA G 3'	427
	AS:	5' CTG AGG TCC ATA TTA CAA ATC TGC 3'	
4	S:	5' GAT GGG CCA ATG GTC TGT AAT 3	393
	AS:	5' ATT CCC TAG ATT GCC TTT GCA C 3'	
5	S:	5' GGT AGG CCA ACT CCA TTT TTC T 3'	480
	AS:	5' GTC AAT TTG GCA ACC TCC TAA C 3'	
6	S:	5' TAG TAC AGA ACA ATG GCC ACC A 3'	412
	AS:	5' CCT GGC CTA AAA TGG GAA AT 3'	
7	S:	5' AGA CAG CAG TAG AGA GGC TTG C 3'	258
	AS:	5' ATG GAC AGT AAG GAA AAG G 3'	
8	S:	5' CTC AGT GCT TGT CTG CTG AGT C 3'	477
	AS:	5' CAT ATG GCA ACC AAA GGA AGG 3'	

\* S= oligonucleótido sentido AS= oligonucleótido antisentido.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

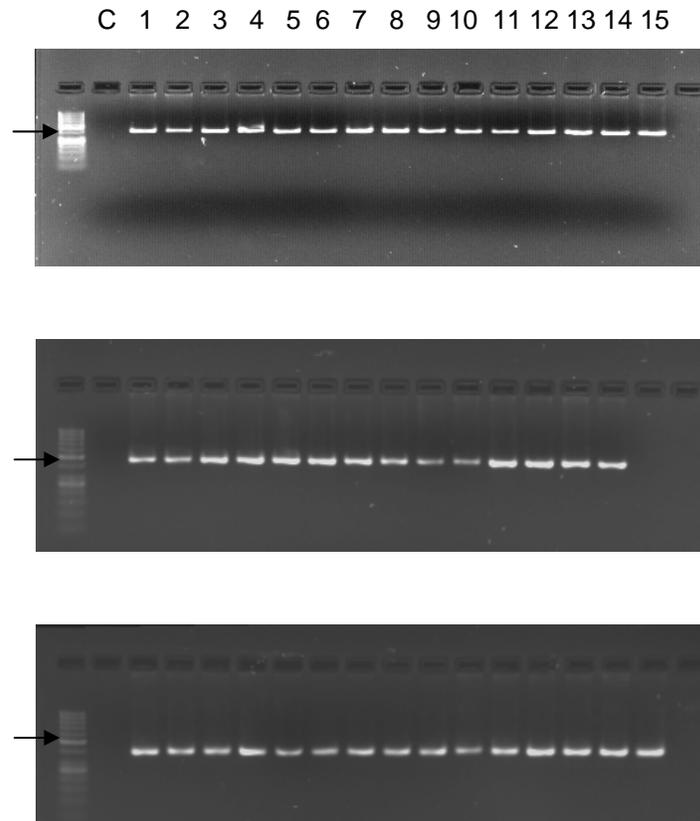
Las concentraciones de la mezcla de reacción para la PCR se ajustaron para un volumen de 20 ul:

- Buffer de reacción 1x
- 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Platinum® , Invitrogen™)
- 3 pmol de cada uno de los oligonucleótidos,
- 2 mM de cada uno de los dNTPs ( Adenina, Timina, Guanina y Citocina),
- 100 ng de DNA,
- 5% de dimetil sulfoxido (DMSO),
- Agua ultrapura (MilliQ) suficiente para completar 20 ul.

La mezcla se sometió a las siguientes condiciones de reacción para la PCR en un termociclador para la amplificación de los exones:

- Activación de la enzima 96°C por 2 minutos.
- Seguido de 35 ciclos de:
- 96°C por 30 segundos (desnaturalización),
- 60°C por 30 segundos (alineamiento),
- 72°C por un minuto (extensión),
- Y una extensión final a 72°C por un minuto.

Se verificaron los productos de la amplificación de los exones de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE (Tris-Acido bórico-EDTA).



**Figura 3.** Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa a 2 % de los productos de PCR obtenidos para los exones 2 (297 pb), 4 (393 pb) y 5 (480 pb) de los 15 pacientes. Se empleó un marcador de peso molecular de 50 pb, la flecha indica la banda correspondiente a 400 pb. C= control negativo.

### Reacción de secuenciación

Los productos de la amplificación de la PCR fueron purificados mediante la exonucleasa 1 recombinante ExoSAP-IT® (Usb®), con las siguientes condiciones: Se tomaron 5 ul de reacción de PCR ( $\approx$  1 ug de DNA) y se agregaron 2 ul (1 unidad) de la enzima, se incubó la mezcla a 37°C por 15 minutos y se inactivó la enzima incubando a 96°C durante 15 minutos. Se tomó 1 ul de la reacción purificada ( $\approx$  200 ng de DNA) para elaborar la mezcla de reacción para secuenciación:

- 1 ul de BigDye Terminator (BigDye® Terminator v3.1, Applied Biosystems®)
- 1 ul de PCR.

- 0.25 ul de oligonucleótidos (2.5 pmol),
  - ul de agua ultrapura (MilliQ).

La mezcla se sometió a los siguientes parámetros de reacción en el termociclador:

- 25 ciclos de:
  - 96°C por 30 segundos (desnaturalización)
  - 60°C por 4 minutos (extensión).

Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados mediante columnas de separación Centri-sep (Princeton Separations, Inc.) Siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. La reacción purificada fue deshidratada mediante un sistema de vacío y centrifuga durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente la muestra obtenida fue resuspendida en 20 ul de formamida grado molecular. La mezcla final se incubó a 96°C durante 2.5 minutos y se congeló en hielo de manera inmediata durante 5 minutos y posteriormente se sometió a electroforesis en un secuenciador automatizado de capilar ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

Los electroferogramas obtenidos de cada una de las secuencias de los exones (Figura 4), de los pacientes, se analizaron mediante el programa FinchTV© (Geospiza, Inc.) y el programa de análisis de secuencias DNAMAN v6.0 (Lynnon BioSoft©) (Figura 5) para la búsqueda de las posibles variables estructurales en el gen (SNPs y/o mutaciones), las secuencias resultantes fueron alineadas con la secuencia consenso de NPHS2 obtenida previamente como control comparativo así como cada una de los SNPs (Tabla 2) reportados en las bases de datos citadas.

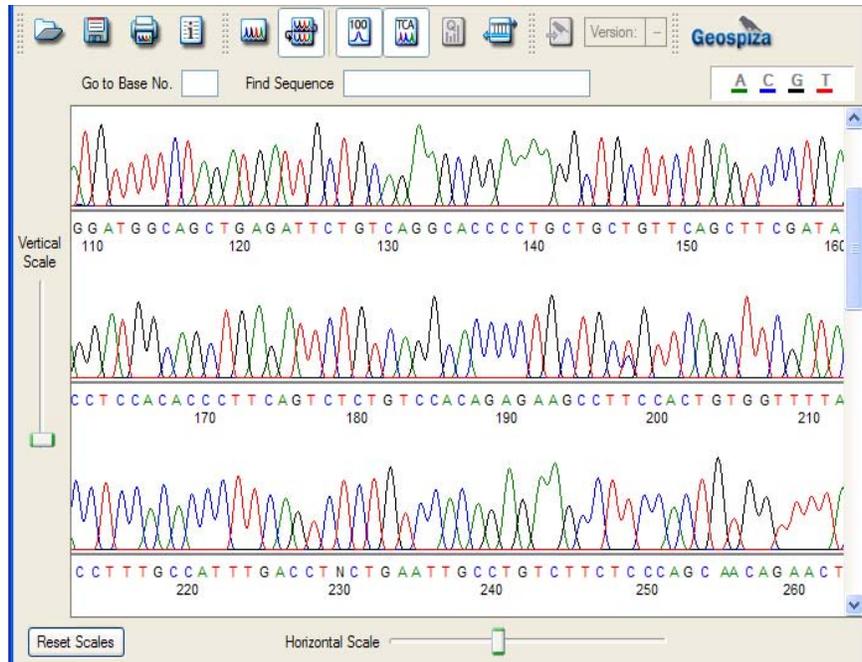


Figura 4. Ejemplo de electroferograma

```

Fast alignment of DNA sequences NPHS2-X1.seq and DNAMAN1
Ktuple=2 Gap_penalty=7
Upper line: NPHS2-X1.seq, from 1 to 314
Lower line: DNAMAN1, from 117 to 430
NPHS2-X1.seq:DNAMAN1 identity= 99.36% (312/314) gap=0.00% (0/314)
1  CACAGGGACTGCGCTCCCGTGCCCTAGCGCTCCCGGCTGCTGCTCCAGCCGCCCGGCA
   |||
117 CACAGGGACTGCGCTCCCGTGCCCTAGCGCTCCCGGCTGCTGCTCCAGCCGCCCGGCA

61  GCTCTGAGGATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTOCTCCAGGGAGTCCCGCGGCGAGGCGGC
   |||
177 GCTCTGAGGATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTOCTCCAGGGAGTCCCGCGGCGAGGCGGC

121 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAGAGGGCAAGGCCGAGAGGAGCGCGGAGCCCGCGG
   |||
237 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAGAGGGCAAGGCCGAGAGGAGCGCGGAGCCCGCGG

181 CGCCAGGAGGCTGGGCCCGAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGGCC
   |||
297 CGCCAGGAGGCTGGGCCCGAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGGCC

241 CGAGCCCGCCGCCACGGTGGTGGACGTGGATGAGGTCGAGGCTCCGGCGAGGAGGGC
   |||
357 CGAGCCCGCCGCCACGGTGGTGGACGTGGATGAGGTCGAGGCTCCGGCGAGGAGGGC

301 ACCGAGGTGGTGGCGCTGTTGGAGAGCGAGCGGCCGAGGAAG
   |||
417 ACCGAGGTGGTGGC

```

Figura 5. Ejemplo de la alineación de secuencias con el programa DNAMAN

**Tabla 2.** SNPs reportados para el gen NPHS2 humano (Podocina)<sup>52</sup>.

SNP	Alelos reportados en mRNA	Función	Residuo	Codón	AA
1	rs12406197	T/G	19	5' UTR	
2	rs12123397	T, C/G	156	Sinónimo	Ala [A] 3 29
3	rs1079292	T/C	171	Sinónimo	Gly [G] 3 34
4	rs3738423	T/C	357	Sinónimo	Ser [S] 3 96
5	rs12240233	T/C	494	missense	T=Pro [P] 2 142 C=Leu [L]
6	rs12568913	T/C			
7	rs5005771	G/A	960	Sinónimo	Ala [A] 3 297
8	rs1410592	T/C	1023	Sinónimo	Ala [A] 3 318
9	rs3818587	G/A	1107	Sinónimo	Leu [L] 3 346
10	rs4399118	T/C	1193	missense	T=Leu [L] 2 375 Pro [P]
		Reverse			
11	rs1410591	T/C	1275	3' UTR	
12	rs1410590	C/T	1378	3' UTR	
13	rs2274623	C/T	1421	3' UTR	
14	rs2274622	C/T	1479	3' UTR	
15	rs1060775	A/G	1649	3' UTR	

## **FINANCIAMIENTO:**

- Estudio financiado por fondos federales: HIM/2008/010

## **ASPECTOS ÉTICOS:**

Este estudio se efectuó de acuerdo a la Declaración de Helsinki del año 2000 y al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.

Los investigadores participantes son especialistas en Nefrología Pediátrica, Genética Médica y Biología Molecular y por consiguiente están debidamente capacitados para desarrollar la investigación.

Las pruebas de laboratorio que se efectuaron, con excepción de la toma de muestra para realizar el estudio genético, se realizaron habitualmente tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los niños con SNI.

La prueba para la investigación de las mutaciones se realizó en muestra de sangre obtenida por punción venosa

La información proporcionada por el paciente y sus familiares fue de manejo exclusivo de los investigadores y se mantendrá en reserva en el expediente clínico y formatos de recolección de datos del estudio.

En el estudio sólo participarán los pacientes que hayan otorgado su consentimiento informado por escrito; los pacientes o sus familiares conservarán copia del mismo y se mantendrá la disponibilidad para atender sus dudas o preguntas en el momento que lo requieran.

Dado que se indicó punción venosa para obtención de la muestra de sangre el estudio se considera de riesgo mayor del mínimo.

El estudio aportó información valiosa, actualmente no disponible en nuestro País, referente a la presencia de mutaciones del gen NPHS2 en los niños con síndrome nefrótico idiopático.

## **RESULTADOS:**

Fueron incluidos 15 niños con diagnóstico de síndrome nefrótico, doce de los cuales fueron de género masculino (80%) y tres fueron del género femenino (20%).

La edad inicio al diagnóstico se presentaron de la siguiente forma: 0-2 años 7 pacientes (43.8%), de 3-5 años 7 pacientes (43.8%), de 6-9 años y 10-13 años cero pacientes, 14-17 años solo 2 pacientes (12.5%).

El diagnóstico principal fue síndrome nefrótico idiopático y de acuerdo a la respuesta al tratamiento inicial con esteroide (prednisona 60mgm2scd 4 semanas y posteriormente 40mgm2scd días alternos 8 semanas) se reportó uno clasificado como coticosensible (6.6%), dos coticosensible con recaídas frecuentes (13.3%), doce como corticorresistente (80%).

Dos pacientes evolucionaron a insuficiencia renal y recibieron trasplante renal (13.3%), cinco con insuficiencia renal crónica estadio I y II según guías KDOQUI (33.3%), y ocho conservaron la función renal (53.3%).

Hallazgos histopatológicos: glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GSFS) en 10 pacientes (53%), dos con proliferación mesangial difusa (PMS) 13.3%, dos con lesiones glomerulares mínimas (AGM) 13.3%, y uno con glomerulonefritis endo y extracapilar con formación de semilunas fibrosas y celulares (GMN) 6.6%.

**Tabla 4.** Demografía de los 15 pacientes incluidos en el estudio.

<b>Edad al diagnóstico del SNI</b>	<b>Pacientes ( n / %)</b>
<b>Genero:</b>	
- Masculino	12 (80%)
-Femenino	3 (20%)
<b>Clasificación según respuesta al esteroide:</b>	
Corticosenible	
Recaídas frecuentes	1 (6.6%)
Corticorresistente.	2 (13.3%)
	12 (80%)
<b>Tiempo de seguimiento (meses ± DS)</b>	12 ± 0.74
<b>Función Renal (n/%)</b>	
conservada	8 (53%)
IRC	5 (33.3%)
IRCT y Trasplante renal.	1 (6.6%)
<b>Lesión histopatológica:</b>	
Glomeruloesclerosis focal y segmentaria	10/ 53%
Proliferación mesangial difusa	
Alteraciones glomerulares mínimas.	2/ 13.3%
Proliferación endo y extracapilar con semilunas.	2/ 13.3%
	1/ 6.6%

A los 15 pacientes se exploró el gen NPHS2 (podocina) cada uno de los polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y los sitios de corte y plegamiento (Splicing) reportados, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 5.** Análisis de las secuencias del gen NHPS2 del exón 1 de cada uno de los 15 pacientes.

Paciente	Exon	SNP	Alelos de los pacientes	Alelos reportados en Forward
1	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/G (5'UTR) G/G	5'UTR T/C
2	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/G (5'UTR) G/G	5'UTR T/C
3	1	rs1079292 (3)	G/G	T/C
4	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/T (5'UTR) G/G	5'UTR T/C
5	1	rs1079292 (3)	G/G	T/C
6	1	rs1079292 (3)	G/G	T/C
7	1	rs1079292 (3)	G/G	T/C
8	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/T (5'UTR) G/G	5'UTR T/C
9	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/T (5'UTR) G/G	5'UTR T/C
10	1	rs1079292 (3)	G/G	T/C
11	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/G (5'UTR) G/G	5'UTR T/C
12	1	rs1079292 (3)	G/G	T/C
13	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/G G/G	5'UTR T/C
14	1	rs12406197 (1) rs1079292 (3)	T/A G/G	5'UTR T/C
15	1	rs1079292 (3)	G/G	T/C

**Tabla 6.** Análisis de las secuencias del gen NHPS2 del exón 2 de cada uno de los 15 pacientes.

Paciente	Exón	SNP	Alelo del paciente	Alelos reportados en Forward
01	2	rs3738423	C/C	T/C
02	2	rs3738423	C/C	T/C
03	2	rs3738423	C/C	T/C
04	2	rs3738423	C/C	T/C
05	2	rs3738423	C/C	T/C
06	2	rs3738423	C/C	T/C
07	2	rs3738423	C/C	T/C
08	2	rs3738423	C/C	T/C
09	2	rs3738423	C/C	T/C
10	2	rs3738423	C/C	T/C
11	2	Se repitió	C/C	T/C
12	2	rs3738423	C/C	T/C
13	2	rs3738423	C/C	T/C
14	2	rs3738423	C/C	T/C
16	2	rs3738423	C/C	A/G

**Tabla 7.** Análisis de las secuencias del gen NHPS2 del exon 3 de cada uno de los 15 pacientes.

Paciente	Exón	SNP	Alelo	Alelos reportados en Forwar
01	3	rs1079292	T/T	T/C
02	3	rs1079292	T/T	T/C
03	3	rs1079292	T/T	T/C
04	3	rs1079292	T/T	T/C
05	3	rs1079292	T/T	T/C
06	3	rs1079292	T/T	T/C
07	3	rs1079292	T/T	T/C
08	3	rs1079292	T/T	T/C
09	3	rs1079292	T/T	T/C
10	3	rs1079292	T/T	T/C
11	3	rs1079292	T/T	T/C
12	3	rs1079292	T/T	T/C
13	3	rs1079292	T/T	T/C
14	3	rs1079292	T/T	T/C
16	3	rs1079292	T/T	T/C

**Tabla 8.** Análisis de las secuencias del gen NHPS2 del exon 1 de cada uno de los 15 pacientes.

Paciente	Exon	SNP	Alelo paciente	Alelo reportado
1	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
2	8	rs1410592	T/C	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
3	8	rs1410592	T/C	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
4	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
5	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
6	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
7	8	rs1410592	T/C	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
8	8	rs1410592	T/C	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C

9	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
10	8	rs1410592	T/C	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	G/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
11	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
12	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
13	8	rs1410592	T/T	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
14	8	rs1410592	T/C	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C
15	8	rs1410592	T/C	T/C
		rs5005771	G/G	G/A
		rs3818587	A/A	G/A
		rs4399118	C/C	T/C

De los resultados obtenidos, no se encontró mutación alguna en el gen NPHS2 en los 15 pacientes con síndrome nefrótico idiopático estudiados. Pero si se encontraron polimorfismos en los SNP comparados con lo reportado internacionalmente en la página Web del NCBI SNP, expresando otros alelos a los reportados:

Así tenemos que para el *exón 1* en el *SNP rs12406197* se reporta internacionalmente alelo en oligonucleótido sentido T/G, en el presente estudio se encontró los siguientes alelos: heterocigoto T/G (26.6%) y T/A (6.6%), y monocigoto G/G (46.6%) y T/T (20%), todo dentro de la región 5' UTR del gen.

Para el *SNP rs12123397* reporta alelo en oligonucleótido sentido T, C/G, en este estudio se encontró: heterocigoto C/T (100%). Ambos codifican para el mismo aminoácido: Alanina. En el *SNP rs1079292* se reporta con alelo A/G, nosotros

encontramos A/G (13.3%) y G/G (86.6%), ambos codifican para el aminoácido reportado: Glicina.

El *exón 2*, cuenta con un solo *SNP rs3738423* con alelo en oligonucleótido sentido T/C en la tercera posición del codon que codifica Leucina, encontramos en los 15 pacientes alelos homocigotos C/C (100%), ambos codifican al mismo aminoácido: Serina, este SNP se reporta internacionalmente alelos Europa A/A (1%), A/G (16%) y G/G (81%) en Asia AA (0%), A/G (15%) y G/G (84%), Africa A/A (3%), A/G (16%) y G/G (80%).

El *exón 3*, *SNP rs12240233* reportado en la base de datos de SNPs del NCBI con los alelos en oligonucleótido sentido T/C en la segunda posición del codon que codifica T= Leucina y C= Prolina ( este ultimo implica mutación), en nuestros pacientes se encontró alelo T/T en el 100%, codificando para el aminoácido Leucina. En cuanto a la diversidad en otras poblaciones (Europa, Asia y África) reportan 100% para el alelo homocigoto A/A.

El *exón 4* no se encontró diferencia alguna en ninguno de los pacientes con respecto a lo reportado internacionalmente.

El *exón 5* en su *SNP Rs12568913* con alelo en oligonucleótido sentido T/C, localizado en el tercer codon que codifica C= Arginina y T= terminación (mutación); encontramos alelos C/C (100%), que codifica para el aminoácido Arginina el mismo reportado. La diversidad en otras poblaciones (Europa, África y Asia) alelo homocigoto A/A en el 100%.

El *exón 6* y *exón 7* no se encontró diferencia alguna, carecen de SNP que impliquen variación alguna.

El *exón 8* cuenta con la mayor parte de los *SNP en el gen NPHS2*, el cual solo reportamos sin la fracción 3'UTR. El *SNP rs5005771* reportado en la base de datos de SNPs del NCBI con los alelos en oligonucleótido sentido G/A en la tercera posición del codon que codifica para Alanina. En la muestra que analizamos se encontró en el 100% de los pacientes el alelo G/G que codifica para el mismo aminoácido. En otras poblaciones se reportan Europa alelos C/C (100%), T (1%), Asia C/C (100%), T (1%), Afro americanos C/C (97%), C/T (2%), Asia C/C (100%), Sub Sahara C/C (98%), T/T (1%). Para el *SNP rs1410592* con alelo en Forward T/C (N=) localizado en el tercera posición del codón que codifica

para Alanina; encontramos alelos T/C (46.6%) y homocigoto T/T (46.6%) y C/C (6.6%), que codifican para Alanina. En otras poblaciones, Europa A/A (20%), A/G (40%), G/G (40%), Afro americanos A/A (22%), A/G (33%), G/G (43%), Asia A/A (20%), A/G (40%), G/G (40%) y Europeos A/A (32%), A/G (42%) G/G (21%). En el SNP *rs3818587* con alelo en oligonucleótido sentido G/A, en la tercera posición del codón que codifica para Leucina; se encontró en nuestro grupo de estudio con alelos A/A (93.3%) y A/G (6.6%), los cuales codifican para el aminoácido Leucina. En otras poblaciones (Europa C/C (16%), T/T (83%), Afro americanos C/C (4%), C/T (17%), T/T (78%), Asia C/T (20%), T/T (79%). Y para el SNP *rs4399118* con alelo en oligonucleótido sentido T/C, en la segunda posición del codón que codifica T=Leucina y C= prolina (mutación) encontramos alelo homocigoto C/C, que codifica para el aminoácido Leucina, igual al reportado. La diversidad poblacional en Europa, Asia y África han reportado G/G en el 100%.

## **DISCUSION**

En el presente estudio no encontramos mutaciones en el gen NPHS2 en niños mexicanos con Síndrome nefrótico idiopático, aun falta incluir a mas pacientes en el estudio, pero estos datos preliminares concuerdan con lo reportado en EUA<sup>4</sup> y corea<sup>3</sup>. A diferencia de lo reportado por Hinkes y cols, que encontró 37.5% de mutaciones.

Un hallazgo interesante fue la variabilidad en los alelos los cuales son totalmente diferentes al reportado en el NCBI, estos alelos que no se han reportado en otras poblaciones. El nuevo polimorfismo encontrado en el exón 1 son sinónimos y no repercuten en la conformación de la proteína final.

Está pendiente realizar completar tamaño de la muestra de estudio (80 pacientes) y buscar los polimorfismos nuevos en sujetos controles (100 alelos).

## CONCLUSIONES

No encontramos mutaciones en el gen NPHS2 en 15 niños mexicanos con síndrome nefrótico idiopático.

Encontramos el siguientes polimorfismos sinónimos no reportados en la pagina del NCBI de SNPs:

Exón 1 en el SNP *rs1079292* = A/G (13.3%) y homocigoto G/G (86.6%).

## REFERENCIAS

1. Gordillo PG, Mota HF, Velásquez JL. Nefrología pediátrica. México: Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México; 1976.
2. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Hangan D, Ozaltin F, Zenker M, Hildebrandt F and members of the Arbeitsgemeinschaft für Paediatric Nephrologie Study Group. Nephrotic syndrome in the first year of life: Two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics*. 2007; 119: e907-e919.
3. Yeon HC, Lee JH, Choi HJ, Lee BH, Ha IS, Choi Y, Cheong HI, WT1 and NPHS2 mutations in Korean children, with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrol* 2008; 23: 63-70.
4. Gbadegesin R, Hinkes B, Vlangos C, Mucha B, Liu J, Hopcian J, Hildebrandt F, Mutational analysis of NPHS2 and WT1 in frequently relapsing and steroid-dependent nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol* (2007) 22:509–513.
5. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2: 529-42.
6. Hodson EM, Knight JF, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy in nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Arch Dis Child*. 2000; 83: 45-51.
7. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. *J Pediatr*. 1981; 98: 561-4.
8. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006; 69: 2131-47.
9. Tryggvason K, Wartiovaara J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10: 543-9.
10. Kriz W, Hackenthal E, Nobiling R, Sakai T, Elger M, Hahnel B. A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney Int*. 1994; 45: 369-76.
11. St John PL, Abrahamson DR. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int*. 2001; 60: 1037-46.
12. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nature Clin Pract Nephrol*. 2006; 2: 271-82.

13. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, Garin EH. A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 603-10.
14. Meyrier A. Nephrotic focal segmental glomerulosclerosis in 2004: an update. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19: 2437-44.
15. Izzedine H, Brocheriou I, Eymard B, Le Charpentier M, Romero NB, Lenaour G, Bourry E, Deray G. Loss of podocyte dysferlin expression is associated with minimal change nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2006; 48: 143-50.
16. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Moriniere V, Tete MJ, Legendre C, Niaudet P, Antignac C. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int.* 2004; 66: 571-9.
17. Niaudet P. Genetic forms of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19: 1313-8.
18. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M, Zalewski I, Imm A, Ruf EM, Mucha B, Bagga A, Neuhaus T, Fuchshuber A, Bakkaloglu A, Hildebrandt F. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 722-32.
19. Niaudet P, Gubler MC. WT1 and glomerular diseases. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 1653-60.
20. Mucha B, Ozaltin F, Hinkes BG, Hasselbacher K, Ruf RG, Schultheiss M, Hangan D, Hoskins BE, Everding AS, Bogdanovic R, Seeman T, Hoppe B, Hildebrandt F, and members of the APN Study Group. Mutations in the Wilms' tumor gene 1 cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res.* 2006; 59: 325-31.
21. Aucella F, Bisceglia L, De Bonis P, Gigante M, Caridi G, Barbano G, Mattioli G, Perfumo F, Gesualdo L, Ghiggeri GM. WT1 mutations in nephrotic syndrome revisited. High prevalence in young girls, associations and renal phenotypes. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 1393-8.
22. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22: 350-4.
23. Meyrier A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Clin Pract Nephrol.* 2005; 1: 44-54.
24. Doublier S, Musante L, Lupia E, Candiano G, Spatola T, Caridi G, Zennaro C, Carraro M, Ghiggeri GM, Camussi G. Direct effect of plasma permeability factors from patients with

idiopathic FSGS on nephrin and podocin expression in human podocytes. *Int J Mol Med*. 2005; 16: 49-58.

25. Savin VJ, McCarthy ET, Sharma M. Permeability factors in focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol*. 2003; 23: 147-60.

26. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases: Insights from animal models. *Kidney Int*. 2005; 67: 404-19.

27. Dijkman H, Smeets B, van der Laak J, Steenberg E, Wetzels J. The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2005; 68: 1562-72.

28. Abeyagunawardena AS, Sebire NJ, Risdon RA, Dillon MJ, Rees L, van't Hoff W, Kumarasiri PV, Trompeter RS. Predictors of long-term outcome of children with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2007; 22: 215-21.

29. Abrantes MM, Cardoso LSB, Lima EM, Silva JMP, Diniz JS, Bambirra EA, Oliveira EA. Clinical course of 110 children and adolescents with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2006; 21: 482-9.

30. Paik KH, Lee BH, Cho HY, Kang HG, Ha IS, Cheong AI, Jin DK, Moon KC, Choi Y. Primary focal segmental glomerular sclerosis in children: clinical course and prognosis. *Pediatr Nephrol*. 2007; 22:389-95.

31. Gipson DS, Gibson K, Gipson PE, Watkins S, Moxey-Mims M. Therapeutic approach to FSGS in children. *Pediatr Nephrol*. 2007; 22: 28-36.

32. Troyanov S, Wall CA, Miller JA, Scholey JW, Cattran DC. Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 1061-8.

33. Gipson DS, Chin H, Presler TP, Jennette C, Ferris ME, Massengill S, Gibson K, Thomas DB. Differential risk of remission and ESRD in childhood FSGS. *Pediatr Nephrol*. 2006; 21: 344-9.

34. Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A. Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 388-93.

35. Ghiggeri GM, Catarsi P, Scolari F, Caridi G, Bertelli R, Carrea A, Sanna-Chaerchi S, Emma F, Allegri L, Cancarini G, Rizzoni GF, Perfumo F. Cyclosporine in patients with

steroid-resistant nephrotic syndrome: An open-label, nonrandomized, retrospective study. *Clin Ther.* 2004; 26: 1411-8.

36. Velásquez JL, Dobras RB, Ocotitla J, Zavala N, Ramón GG, Romero NB, Gomezchico VR, Medeiros M, Muñoz AR. Tratamiento con ciclosporina en niños con síndrome nefrótico corticorresistente. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1996; 53: 109-15.

37. Imaizumi T, Kawasaki Y, Matsuura H, Matsumoto A, Takano K, Suyama K, Hashimoto K, Suzuki H, Hosoya M. Efficacy of steroid pulse, plasmapheresis, and mizoribine in a patient with focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22: 1215-8.

38. Marks SD. How have the past 5 years of research changed clinical practice in paediatric nephrology. *Arch Dis Child.* 2007; 92: 357-61.

39. Fogo AB. Can glomerulosclerosis be reversed? *Nature Clin Pract Nephrol.* 2006; 2: 290-1.

40. Abrantes MM, Cardoso LSB, Lima EM, Silva JMP, Diniz JS, Bambirra EA, Oliveira EA. Predictive factors of chronic kidney disease in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 1003-12.

41. Fine RN. Recurrence of nephrotic syndrome/focal segmental glomerulosclerosis following renal transplantation in children. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22: 496-502.

42. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1387-1401.

43. Schumacher V, Scharer K, Wuhl E, Altrogge H, Bonzel KE, Guschmann M, Neuhaus TJ, Pollastro RM, Kuwertz-Broking E, Bulla M, Tondera AM, Mundel P, Helmchen U, Waldherr R, Weirich A, Royer-Pokora B. Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations. *Kidney Int.* 1998; 53: 1594-1600.

44. Hasselbacher K, Wiggins RC, Matejas V, Hinkes BG, Mucha B, Hoskins BE, Ozaltin F, Nürnberg G, Becker C, Hangan D, Pohl M, Kuwertz-Bröking E, Griebel M, Schumacher V, Royer-Pokora B, Bakkaloglu A, Nürnberg P, Zenker M, Hildrebrandt F. Recessive missense mutations in LAMB2 expand the clinical spectrum of LAMB2-associated disorders. *Kidney Int.* 2006; 70: 1008-1012.

45. Kuusniemi AM, Merenmies J, Lahdenkari AT, Holmberg C, Salmela K, Karikoski R, Rapola J, Jalanko H. Glomerular sclerosis in kidneys with congenital nephrotic syndrome (NPHS1). *Kidney Int.* 2006; 70: 1423-31.

46. Patrakka J, Kestila M, Wartiovaara J, et al. Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int.* 2000; 58: 972-80.
47. Holmberg C, Tryggvason K, Kestilä MK, Jalanko HJ. Congenital nephrotic syndrome. En: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, editores. *Pediatric nephrology*. Fifth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 503-16.
48. Srivastava T, Garola RE, Kestila M, Tryggvason K, Routsalainen V, Sharma M, Savin VJ, Jalanko H, Warady BA. Recurrence of proteinuria following renal transplantation in congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 711-718.
49. Denys P, Malvaux P, Berghe HVD, Tanghe W, Proesmans W. Association d'un syndrome anatomopathologique de pseudohermaphrodisme masculin, d'une tumeur de Wilms, d'une nephropathie parenchymateuse et d'un mosaicisme XX/XY. *Arch Fr Pediatr.* 1967; 24: 729-39.
50. Drash A, Sherman F, Hartmann W, Blizzard R. A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumour, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr.* 1970; 76: 585-93.
51. [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM)
52. The European Bioinformatic Institute and Genome Research Limited and Others. ENSEMBLE.ORG. <http://www.ensemble.org>. Consultada en Julio 2008.
53. Rozen S, Skaltsky HJ, Primer3 on the WWW for general user and four biologist programmers. En: *Bioinformatic methods and protocols: Methods in molecular biology*. Krawetz S, Misener S. Editores, Humana Press, Totowa Nueva Jersey 2000. pp 365-386.

# **ANEXOS**

Cuadro . Clasificación etiológica del síndrome nefrótico con glomerulosclerosis segmentaria y focal

---

A. Idiopático

B. Formas genéticas

1. No sindrómicas

- a) NPHS1 (nefrina): síndrome nefrótico tipo finlandés (autosómico recesivo)
- b) NPHS2 (podocina): síndrome nefrótico corticorresistente con glomerulosclerosis segmentaria y focal autosómico recesivo
- c) ACTN4 (alfa-actinina 4): síndrome nefrótico familiar autosómico dominante
- d) CD2AP (proteína asociada a CD2): síndrome nefrótico con glomerulosclerosis segmentaria y focal autosómico dominante
- e) TRPC6 (canal catiónico del receptor potencial transitorio-6)
- f) WT1 (tumor de Wilms-1)

2. Sindrómicas

- a) Síndrome de Frasier: WT1
- b) MELAS:\* mt DNA tRNA
- c) Síndrome de Alport: COLA3, A4, A5 (COL: colágeno)
- d) Enfermedad de Fabry: GLA (alfa-galactosidasa A)
- e) Síndrome uña-rótula: LMX1B (factor de transcripción Lim)
- f) Síndrome renal-coloboma con oligomeganefronia: PAX2

C. Formas reactivas

1. Posadaptativas

- a) Masa renal reducida: displasia renal, cirugía ablativa, nefropatía del reflujo, nefritis intersticial crónica
- b) Masa renal inicial normal: obesidad, anemia de células falciformes, cardiopatías congénitas cianógenas

2. Asociadas a medicamentos o drogas

- a) Ciclosporina, tacrolimus
- b) Pamidronato, litio
- c) Interferón alfa
- d) Heroína
- e) Adriamicina y aminonucleósido de puromicina en experimentos animales

3. Asociadas a virus

- a) Parvovirus B19
- b) Virus de la hepatitis C
- c) Virus simiano SV40

---

\*MELAS: miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios semejantes de "ataques".

Modificado de Barisoni y colaboradores.<sup>2</sup>

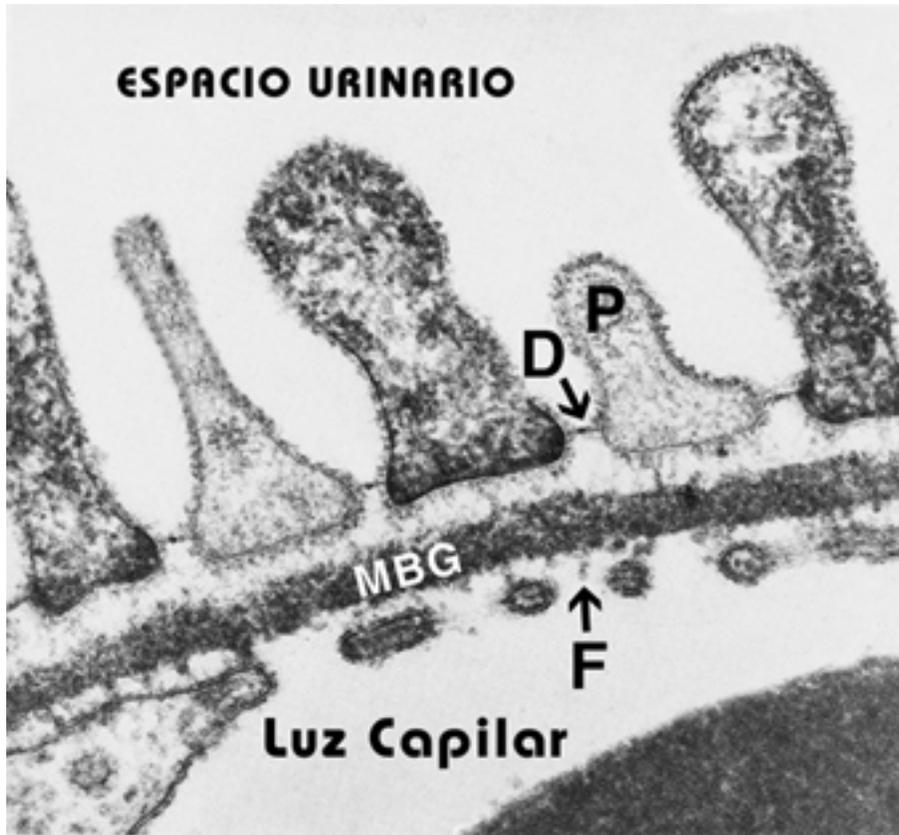


Figura 3. Estructura de la barrera de filtración del glomérulo. MBG: membrana basal glomerular.

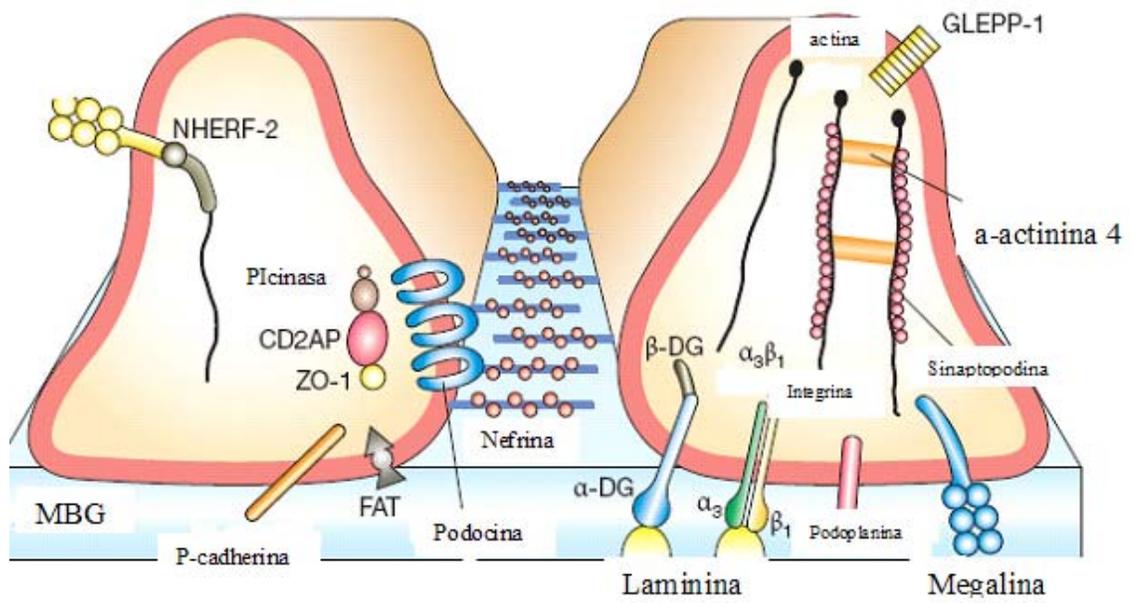


Figura 4. Componentes de los podocitos y el diafragma de hendidura.

## Secuencia DNA del Gen NPHS2 isoforma 001

1 CACAGGGACTGCGCTCCC<sup>A</sup>GTGCCCTAGCGCTCCCGCGCTGCTGCTCCAGCCGCCCGCA  
.....  
.....

61 GCTCTGAGGATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTCCTCCAGGGAGTCCCGCGGGCGAGGCGGC  
.....ATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTCCTCCAGGGAGTCCCGCGGGCGAGGCGGC  
.....-M--E--R--R--A--R--S--S--S--R--E--S--R--G--R--G--G--

121 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAAGAGGGCAAAGGC<sup>S</sup>GAGAGGAGCGCGG<sup>R</sup>AGGCCGCGGC  
52 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAAGAGGGCAAAGGCCGAGAGGAGCGCGGAGGCGCGGC  
18 -R--T--P--H--K--E--N--K--R--A--K--A--E--R--S--G--G--G--R--G--

181 CGCCAGGAGGCTGGGCCCAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGCCC  
112 CGCCAGGAGGCTGGGCCCAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGCCC  
38 -R--Q--E--A--G--P--E--P--S--G--S--G--R--A--G--T--P--G--E--P--

241 CGAGCGCCCGCCGCCACGGTGGTGGACGTGGATGAGGTCCGAGGCTCCGGCGAGGAGGGC  
172 CGAGCGCCCGCCGCCACGGTGGTGGACGTGGATGAGGTCCGAGGCTCCGGCGAGGAGGGC  
58 -R--A--P--A--A--T--V--V--D--V--D--E--V--R--G--S--G--E--E--G--

301 ACCGAGGTGGTGGCGCTGTTGGAGAGCGAGCGGCCCGAGGAAGGTACCAAATCCTC<sup>Y</sup>CGGC  
232 ACCGAGGTGGTGGCGCTGTTGGAGAGCGAGCGGCCCGAGGAAGGTACCAAATCCTC  
78 -T--E--V--V--A--L--L--E--S--E--R--P--E--E--G--T--K--S--S--G--

361 TTAGGGCCCTGTGAGTGGCTTCTTGTCTCATTTCCTGCTCTTCATCATCATGACCTTC  
292 TTAGGGCCCTGTGAGTGGCTTCTTGTCTCATTTCCTGCTCTTCATCATCATGACCTTC



1132 AAAGACTCTCCCATGTTATAG.....  
 378 -K--D--S--P--M--L--\*--.....  
 1261 TAGAAAAGTCACAT<sup>S</sup>GCCTGAGGGAGACACTCTGTCCTCATTCCCTGCCCTTCCTTTGGTT  
 .....  
 .....  
 1321 GCCATATGGAATGGCCATGGAATGCACGAAGTCACAATGCACCATCCATGAGAAGAC<sup>R</sup>GGT  
 .....  
 .....  
 1381 GAAATGATGTAATGACAGAGAAGGCAGACAACATGTTTCC<sup>R</sup>GTGACTCATCTAGTCAGAGC  
 .....  
 .....  
 1441 AATTATGGGAAACAGCTTTGGTCAACATTCTACTTTGGA<sup>R</sup>AGAATTTTGAGTCTAGATGT  
 .....  
 .....  
 1501 GGTAAATTTTGACTTCTGGGAACCTGGTTTCAGATGTCCTTTCCTGTAIGTCCTCTGA  
 .....  
 .....  
 1561 CCCCTTTGGCAAGGTTGCCACAGCTCCCACAGCCCTTCTACAAGCACCTATCATTGGGC  
 .....  
 .....  
 .....  
 1561 CCCCTTTGGCAAGGTTGCCACAGCTCCCACAGCCCTTCTACAAGCACCTATCATTGGGC  
 .....  
 .....  
 .....  
 1621 TTGTCACACTCTATTGCTCTTCTGTCCCA<sup>R</sup>AAGATGCAGTCTTCTCTCCAATGATACTACC  
 .....  
 .....  
 .....  
 1681 AAGTCTTAGTTTTCTCAACCACACTCAATCTTTTTGCTCCACCCTGAATTCCTCACACC  
 .....  
 .....  
 .....  
 1741 TAACCCTGATAGTTACCTAAAGTGACACTTAAATGTTTCAGAGTGAATGCAAAAAGAGA  
 .....  
 .....  
 .....  
 1801 GATGTA<sup>R</sup>CTTGGAGTCGGATATACAATTTATCCCTAATTAAGCATTTTAAAAGGAA  
 .....  
 .....  
 .....

