



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

“BÚSQUEDA DE VARIACIONES EN LA SECUENCIA DEL GEN
NPHS2 EN NIÑOS MEXICANOS CON SÍNDROME NEFRÓTICO
IDIOPÁTICO Y SU CORRELACIÓN CON EL FENOTIPO CLÍNICO”.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
SUBESPECIALIDAD EN:
NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:
DR. JAVIER ZAPATA MAY.

ASESORES DE TESIS:
DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“Búsqueda de variaciones en la secuencia del gen NPHS2 en niños mexicanos con síndrome nefrótico idiopático y su correlación con el fenotipo clínico”.

Dra. Mara Medeiros Domingo
Asesora de Tesis

Dr. Luis Velásquez Jones
Asesor de Tesis

M. en C. Benjamín Antonio Rodríguez Espino
Co-asesor

AGRADECIMIENTOS:

A dios, por darme continuamente sus bendiciones, fortaleza, optimismo y regalarme la oportunidad de vivir la vida con intensidad.

A mis padres y mi hermana Vane, por la paciencia y constante apoyo, pero sobre todo por el amor que me demuestran todos los días.

A Karen por la dicha de conocer a una mujer tan hermosa tanto por fuera como por dentro. Así como por el maravilloso milagro de regalarme 2 hermosas niñas.

A la Dra Mara Medeiros, por enseñarnos como debe vivirse la profesión médica con intensidad y constancia.

A los Drs. Saúl y Dr. Luis Velásquez por su enseñanza académica, transmitirnos sus experiencias y finalmente por sacarnos de los apuros más frecuentes en esta tan demandante área de la nefrología pediátrica.

A todo el servicio de nefrología y laboratorio de genética en verdad muchas gracias.

ÍNDICE:

1. Objetivos	5
2. Antecedentes	6
3. Marco Teórico	7
4. Planteamiento del problema	17
5. Justificación	18
6. Hipótesis	19
7. Características del lugar donde se realizó el estudio	20
8. Tipo de estudio	21
9. Cronograma	22
10. Población	23
11. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	24
12. Plan de análisis estadístico	25
13. Descripción de variables	26
14. Material y métodos	27
15. Financiamiento	37
16. Aspectos Éticos	37
17. Resultados	38
18. Discusión	44
19. Conclusiones	45
20. Bibliografía	46
21. Anexos	53

OBJETIVOS:

1. General:

- a. Conocer la frecuencia de variaciones en la secuencia del gen NPHS2 en los niños con síndrome nefrótico idiopático.

2. Específicos:

- a. Correlacionar la respuesta al tratamiento, las lesiones histológicas y la presencia o ausencia de variaciones en el gen de NPHS2.
- b. Correlacionar la presencia de variaciones en el gen NPHS2 con la evolución a insuficiencia renal crónica.

ANTECEDENTES:

El síndrome nefrótico es un trastorno de la infancia el cual se define como la pérdida de proteínas por la barrera de filtración glomerular y es caracterizado por edema, proteinuria masiva, hipoalbuminemia e hiperlipidemia. Mutaciones 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-5.¹

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.²

Berdeli y colaboradores estudiaron 295 niños turcos con síndrome nefrótico, 41 de los pacientes con componente familiar, 254 casos esporádicos donde se encontraron 53 mutaciones en el gen NPHS2, 37 de ellas fueron casos nuevos.³

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 nefrótico idiopático corticodependiente así como de recaídas frecuentes, en el que incluyeron 20 niños, no encontraron mutaciones en estos genes.⁴

En México no existe información 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.¹

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”.²

Clinicamente, el síndrome nefrótico idiopático há sido dividido en 2 categorías en base a la respuesta a la terapia esteroidea: Síndrome nefrótico sensible a esteroides y síndrome nefrótico corticoresistente. En el síndrome nefrótico, más del 75% de los pacientes exhiben la histología de glomerulosclerosis focal y segmentaria en biopsias renales y un número considerable de pacientes progresa a enfermedad renal crónica.³

Se ha observado que 90 a 95% de estos pacientes responde habitualmente al tratamiento con corticosteroides, 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.⁵ 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/m²SC/día por 6 semanas y posteriormente 40mg/m²SC/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.⁶

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 $\alpha\beta 1$ -integrina y los α y β -dístroglicanos.⁷

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.⁹

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.⁸⁻¹⁰

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.⁷

Varios estudios han indicado que la nefrina, una proteína transmembrana con una gran porción extracelular con 8 dominios ligados a inmunoglobulina, es crucial para la estructura del diafragma de hendidura.⁸ 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).⁹

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.⁹ 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.⁹

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 patogénica aún no ha sido identificada.¹⁰

Algunos pacientes 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.¹¹ Aún 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.¹²

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.²

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.

Muchos avances han incrementado el entendimiento de causas genéticas de síndrome nefrótico corticorresistente de causa familiar, por ejemplo el Gen NPHS1 que codifica para la nefrina, solo se ha encontrado en los niños con síndrome nefrótico congénito, y a su vez con características del síndrome nefrótico congénito tipo finlandés.⁸ El gen NPHS2 que codifica para podocina, cuya mutación causa síndrome nefrótico autosómico recesivo representa una causa frecuente que ocurre entre 20-30% del síndrome nefrótico corticorresistente.¹³

Otros genes fueron ACTN4, que codifica para alfa actinina 4, WT1 que codifica para Tumor de Wilms y TRPC6 que codifica el receptor del canal catiónico 6 y se han implicado en la codificación de proteínas de los podocitos.¹⁴⁻¹⁶

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.¹⁷

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).⁴

Recientes estudios genéticos revelan que los defectos moleculares en un componente estructural del diafragma de hendidura causa Glomerulosclerosis focal y segmentaria en una fracción significativa de síndrome nefrótico familiar. Estudios europeos de grandes cohortes de síndrome nefrótico corticorresistente detectaron mutaciones en NPHS2 en 45-55% de casos familiares y en 8-20% de los casos esporádicos, mientras que estudios asiáticos solo reportan polimorfismos sinónimos sin detectar mutaciones de NPHS2 causales de Glomeruloesclerosis focal y segmentaria.¹⁸ Una característica distintiva es que estos pacientes habitualmente no responden al tratamiento con corticosteroides ni otros medicamentos inmunosupresores.¹⁹

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.¹⁷ 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 CD2.¹¹

Así mismo se ha implicado un posible rol para el gen WT1 (gen asociado al tumor de Wilms en la patogénesis de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria y como causa de síndrome nefrótico corticorresistente e incluso asociado a entidades sindrómicas como el síndrome de Frasier.²⁰⁻²¹

Otro aspecto importante a mencionar es que existen, específicamente genes recesivos que causan síndrome nefrótico resistente que incluyen 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, laminina –Beta 2, alfa-actinina-4 y fosfolipasa C-1 que conducen a síndrome nefrótico corticorresistente de inicio en la infancia ²²⁻³³. A este respecto, cabe mencionar que en base a los estudios sobre correlación genotipo-fenotipo los pacientes con mutaciones NPHS2 muestran histología de glomeruloesclerosis focal y segmentaria, en aproximadamente 80% de los casos, edad de inicio de la enfermedad menor de 6 años , progresión a enfermedad renal terminal, corticorresistencia y tiene un riesgo reducido de recurrencia para recurrencia de glomerulosclerosis en el riñón trasplantado.³⁴ Así mismo por lo general tampoco hay buena respuesta a inmunosupresores.³⁵

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:⁵ 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. Los hallazgos mencionados ya tienen actualmente implicaciones en el manejo de los pacientes con síndrome nefrótico idiopático ³⁶⁻⁴⁵.

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.⁹

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 finlandesa⁴⁶⁻⁴⁹.

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 (OMIM# 194080).⁵⁰⁻⁵¹

Análisis previos de mutaciones de grandes cohortes revelaron que un alto porcentaje de niños con corticorresistencia es monogénica y que las mutaciones en podocina (NPHS2) Y gen WT1 sucede aproximadamente en el 30% de niños con síndrome corticorresistente.⁵²

Por todo lo anterior se planea el siguiente estudio prospectivo dirigido a determinar la presencia de variaciones en la secuencia del gen 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 edad de inicio de la enfermedad, respuesta a los tratamientos instituidos y seguimiento de la función renal posterior.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Recientemente se han identificado diferentes mutaciones en los genes que codifican la producción de diversas moléculas del filtro glomerular (podocitos y diafragma de hendidura), uno de los genes estudiados que codifica proteínas componentes de dicho diafragma es NPHS2 (podocina). En otros países se ha reportado que de los pacientes con síndrome nefrótico idiopático, entre 0 y 37.5% de los pacientes presentan mutaciones en el gen NPHS2. Se desconoce la frecuencia de la población mexicana.

JUSTIFICACIÓN:

En este momento no se cuenta en nuestro País con estudios que indiquen la frecuencia de las mutaciones en el gen NPHS2 en niños con síndrome nefrótico idiopático. Tampoco se conoce su correlación con 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:

Alrededor de 20 a 30% de los pacientes con síndrome nefrótico idiopático presentan variaciones en la secuencia del gen NPHS2.

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, México DF. 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 en Nefrología y Metabolismo Mineral, 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 –prospectivo.

CRONOGRAMA:

- Enero 2008:
 - 1.- Realización de marco teórico y antecedentes
- Febrero – Abril 2008:
 - 2.- Captura de pacientes, toma de muestras, examen físico y recolección de datos del expediente clínico
- Marzo – Abril 2008
 - 3.-Captura de pacientes, toma de muestras, examen físico
- Feb 2008 – Junio 2009
 - 4.-Recolección de datos y secuenciación de DNA
- Mayo – Junio 2008
 - 5.-Análisis de datos obtenidos
- Junio – Julio 2008
 - 6.-Redacción de conclusiones y término de la tesis.

	Ene-Abril 2008	May-Ago	Sept-Dic	Ene. 2009	Feb-may	Jun	Jul
Marco teórico y antecedentes	xxx						
Captura de pacientes, muestreo	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx		
Recolección de datos y secuenciación del ADN	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx
Análisis de datos obtenidos						x	xx
Redacción de conclusiones y termino de tesis							xxx

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:

➤ Criterios de inclusión:

- Edad al inicio del síndrome nefrótico entre 1 mes a 15 años.
- 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/m²/hora.
- Ausencia de enfermedades que causan síndrome nefrótico en niños.
- Aceptación mediante consentimiento informado y asentimiento de los menores que puedan otorgarlo.

➤ Criterios de exclusión:

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

➤ Criterios de eliminación:

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

PLAN DE ANALISIS ESTADÍSTICO:

- Estadística descriptiva de frecuencias.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES:

➤ Variable independiente:

- Presencia de variaciones en el gen NPHS2.

➤ Variables dependientes:

- Remisión. Desaparición de las manifestaciones clínicas del síndrome nefrótico (edema, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) y de la proteinuria (menos de 4 mg/h/m^2 , en colección nocturna de 12 horas).
- Recaída. Se considera recaída la reaparición de la proteinuria: mayor de 40 mg/hora/m^2 en orina de colección nocturna de 12 horas.
- Corticorresistencia. No respuesta al tratamiento con corticosteroides a dosis de $60 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, por 4 semanas.
- Corticosensible: respuesta al primer tratamiento con corticoesteroides a $60 \text{ mg/m}^2/\text{d}$.
- Corticosensible con recaídas frecuentes: respuesta al primer tratamiento con corticoesteroides presentando recaídas en número de 2 en 6 meses o 4 en un año.
- No respuesta a otros tratamientos instituidos.
- 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 45 pacientes pediátricos 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 2008-junio 2009.

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

- 1) En sangre: biometría hemática, creatinina, triglicéridos, colesterol, proteínas totales y fracciones, complemento hemolítico sérico: fracciones C3 y C4, inmunoglobulinas, calcio, fósforo y fosfatasa alcalina.
- 2) En orina: examen general de orina, proteinuria cuantitativa en colección nocturna de orina de 12 horas.
- 3) 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.ORG⁵⁴.

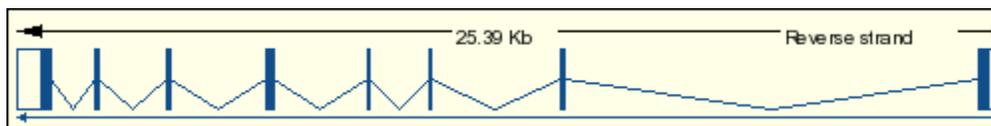


Figura 2. Estructura del gen NPHS2 (podocina), de acuerdo a la información reportada en ENSEMBLE.ORG. Como se observa el gen tiene un tamaño aproximado de 25.39 kb y esta constituido por 8 exones.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa PRIMER3⁵⁵ disponible en línea (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), de manera general se consideraron los siguientes parámetros para el diseño:

- 1) Se diseñaron flanqueando al menos 50 pares de bases antes y después del exón blanco.
- 2) Se verificó que los oligonucleótidos no cayeran en posiciones donde se localizaba algún tipo de polimorfismo.
- 3) Se diseñaron con una T_m 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.
- 4) Se calculó de manera informática los juegos de oligonucleótidos para que 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 μ l:

- Buffer de reacción 1x
- 2.5 mM de $MgCl_2$
- 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 sulfóxido (DMSO).
- Agua ultrapura (MilliQ) suficiente para completar 20 μ l.

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).

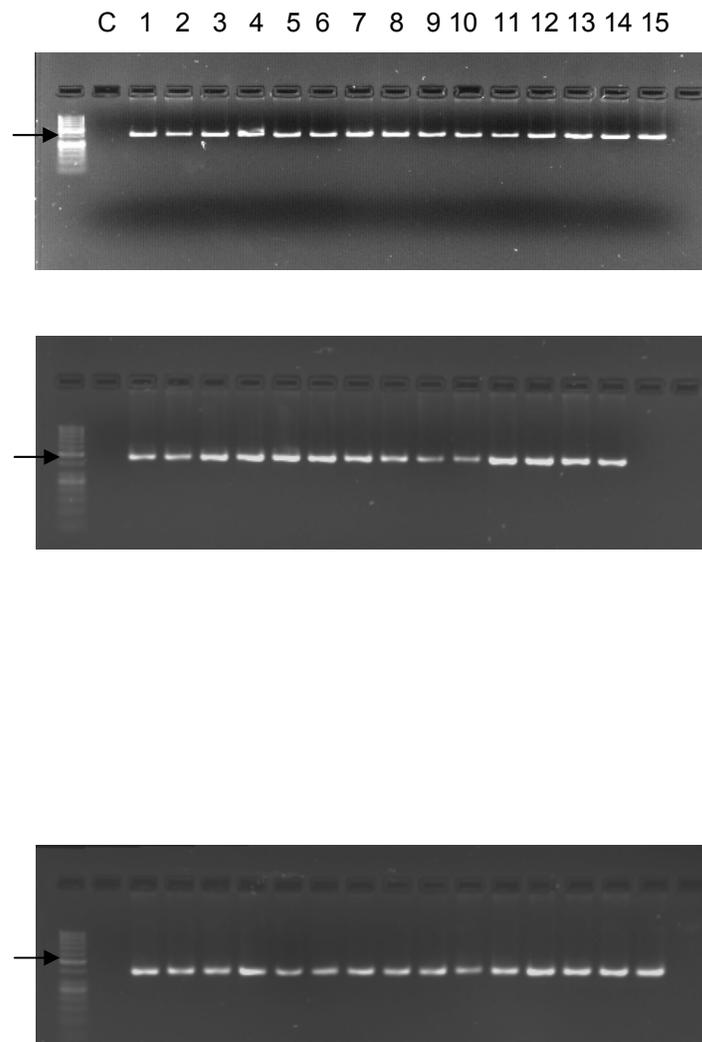


Figura 3. Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa a 2 % de los productos de PCR obtenidos para los exones 2 (297 pb), 4 (393 pb) y 5 (480 pb) de los 45 pacientes. Se empleó un marcador de peso molecular de 50 pb, la flecha indica la banda correspondiente a 400 pb. C= control negativo.

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 μ l de reacción de PCR (\approx 1 μ g de DNA) y se agregaron 2 μ l (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 μ l de la reacción purificada (\approx 200 ng de DNA) para elaborar la mezcla de reacción para secuenciación:

- 1 μ l de BigDye Terminator (BigDye® Terminator v3.1, Applied Biosystems®)
- 1 μ l de PCR.
- 0.25 μ l de oligonucleótidos (2.5 pmol).
- 800 μ l 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 μ l 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 NPFS2 obtenida previamente como control comparativo así como cada una de los SNPs (Tabla 2) reportados en las bases de datos citadas.

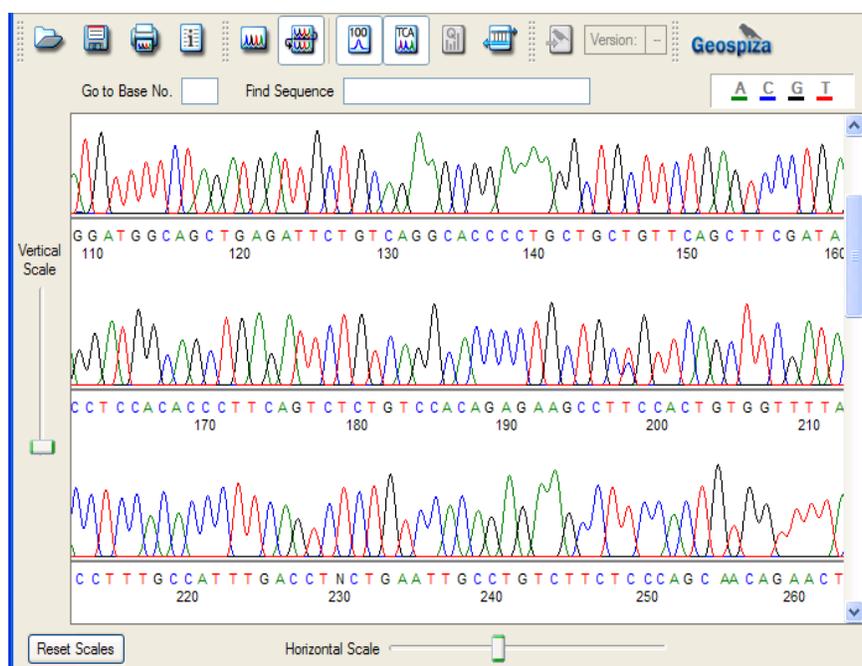


Figura 4. Ejemplo de electroferograma.

```

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  CACAGGGACTGCGCTCCCGTGCCCTAGCGCTCCCGCGCTGCTGCTCCAGCCGCGCGCA
   |||
117 CACAGGGACTGCGCTCCCTTGCCCTAGCGCTCCCGCGCTGCTGCTCCAGCCGCGCGCA

61  GCTCTGAGGATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTCCTCCAGGGAGTCCCGCGGCGAGGCGGC
   |||
177 GCTCTGAGGATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTCCTCCAGGGAGTCCCGCGGCGAGGCGGC

121 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAGAGGGCAAGGCGAGAGGAGCGGCGGAGCGCGGG
   |||
237 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAGAGGGCAAGGCGAGAGGAGCGGCGGAGCGCGGG

181 CGCCAGGAGGCTGGGCCCCGAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGCCC
   |||
297 CGCCAGGAGGCTGGGCCCCGAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGCCC

241 CGAGCCGCCCGCCACGGTGGTGGACGTGGATGAGGTCGAGGCTCCGCGAGGAGGGC
   |||
357 CGAGCCGCCCGCCACGGTGGTGGACGTGGATGAGGTCGAGGCTCCGCGAGGAGGGC

301 ACCGAGGTGGTGGCGCTGTTGGAGAGCGAGCGGCCCGAGGAAG
   |||
417 ACCGAGGTGGTGGC

```

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

Tabla 2. SNPs reportados para el gen NPHS2 humano (Podocina)⁵⁴.

	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	No Sinónimo.	T=Pro [P] C=Leu [L]	2 142
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	Nó Sinónimo	T=Leu [L] Pro [P]	2 375
		Antisentido.				
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		

RESULTADOS:

Fueron incluidos 45 niños con diagnóstico de síndrome nefrótico, veintiocho de los cuales fueron de género masculino (62%) y diecisiete fueron del género femenino (38%) (Tabla 1).

La edad inicio al diagnóstico se presentaron de la siguiente forma: 0-2 años 22 pacientes (48%), de 3-5 años 11 pacientes (25%), de 6-8 años 4 pacientes (9%) y 9-11 años 3 pacientes (7%), 12-14 años 3 pacientes (7%), 15-17 años sólo 2 pacientes (4%).

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 reportaron cuatro como corticosensible de recaídas frecuentes (9%), uno corticodependiente (2%), cuarenta como corticorresistente (89%).

El tiempo de seguimiento fue de 12 meses \pm 0.74 DS. Cuatro pacientes evolucionaron a insuficiencia renal y recibieron trasplante renal (9%), nueve con insuficiencia renal crónica estadio I y II según guías KDOQUI (20%), y treinta y dos conservaron la función renal (71%).

Los hallazgos histopatológicos fueron: glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GSFS) en veinticuatro pacientes 52%, nueve con proliferación mesangial difusa (PMS) 20%, nueve con lesiones glomerulares mínimas (AGM) 20%, uno con glomerulonefritis endo y extracapilar con formación de semilunas fibrosas y celulares (GMN) 2.0%, 1 con alteraciones histológicas tipo Finlandés 2%, y dos con glomeruloesclerosis global 4%.

Durante el tiempo de seguimiento de estudio los pacientes han recibido los siguientes tratamientos: sólo esteroides cinco de ellos (11%), esteroide mas ciclosporina treinta y tres (74%), esteroide más tacrolimus cinco (11%), esteroide más micofenolato dos (4%).

Los cinco pacientes catalogados como corticodependiente y recaídas se encuentran recibiendo dosis bajas de esteroides en días alternos.

De los cuarenta pacientes que han recibido tratamiento inmunosupresor treinta (75%) han tenido buena respuesta al tratamiento y diez (28%) hasta el momento la respuesta no ha sido adecuada.

Tabla 1. Demografía de los 45 pacientes incluidos en el estudio.

Características Demográficas. de 45 pacientes estudiados.	Pacientes (n/%).
Genero:	
-Masculino	28 (62%)
-Femenino	17 (38%)
Clasificación según respuesta a esteroide:	
-Corticosensible con recaídas frecuentes	4 (9%)
-Corticoresistente	40(89%)
-Corticodependiente	1 (2%)
Función Renal (n/%)	
-Conservada	32 (71%)
-IRC	9 (20%)
-IRC y transplante renal	4 (9%).
Lesión Histopatológica:	
-Alteración histológica tipo finlandés.	1 (2%)
-Glomeruloesclerosis focal y segmentaria.	24 (52%)
- Proliferación Mesangial Difusa.	9 (20%)
- Alteraciones glomerulares mínimas	9 (20%)
- Proliferación endo y extracapilar con semilunas	1 (2%)
- Glomeruloesclerosis global.	2 (4%)
Tratamiento instituido durante evolución:	
Prednisona	5 (11%)
Prednisona + Ciclosporina	33 (74%)
Prednisona + Tacrolimus	5 (11%)
Prednisona + Micofenolato.	2 (4%)

En los 45 pacientes se exploró el gen NPHS2 (podocina) y cada uno de los polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con los sitios de corte y plegamiento (Splicing) reportados, obteniéndose los siguientes resultados:

De los resultados obtenidos, no se ha encontrado ninguna mutación en el gen NPHS2 en los 45 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:

Exón 1. Se analizaron 20 pacientes, encontrando que este exón cuenta con tres SNP, el *SNP rs12406197* se reporta internacionalmente alelo en dirección sentido T/G, en el presente estudio se encontró los siguientes alelos: heterocigoto T/G (35%), monocigoto G/G (45%) y T/T (15%), todo dentro de la región 5' UTR del gen.

El *SNP rs12123397* reporta alelo en dirección sentido C/G, en este estudio se encontró heterocigoto C/C (90%), heterocigoto A/C (5%), heterocigoto A/A(5%) que codifican para el mismo aminoácido: Alanina.

En el *SNP rs1079292* se reporta con alelo heterocigoto A/G, nosotros encontramos homocigoto G/G (75%), heterocigoto A/G(10%), heterocigoto A/A (5%) que codifican para el aminoácido reportado: Glicina.

El **exón 2**, cuenta con un solo *SNP rs3738423* con alelo en dirección sentido T/C en la tercera posición del codón que codifica Leucina, encontramos en 44 pacientes con alelos homocigotos C/C (100%), ambos codifican al mismo aminoácido: Serina, en este SNP se reporta internacionalmente alelos en Europa A/G (16%) y G/G (84%), en Asia A/G (13%) y G/G (87%), Africa, A/G (8%) y G/G (92%).

En el **exón 3** se encuentra con *SNP rs12240233* reportado en la base de datos de SNPs del NCBI con los alelos en dirección sentido T/C en la segunda posición del codón que codifica T= Leucina y C= Prolina (este último implica mutación), en 44 pacientes analizados 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.

En el **exón 4** de 15 pacientes analizados, no se encontró diferencia alguna en ninguno de los pacientes con respecto a lo reportado internacionalmente.

En el **exón 5**. Se analizaron 32 pacientes sin encontrarse mutación. En su *SNP Rs12568913* con alelo en dirección sentido T/C, localizado en el tercer codón 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**. De 15 pacientes analizados no se encontró mutaciones con respecto a lo reportado internacionalmente.

El **exón 8**. Este exón cuenta con la mayor parte de los *SNP en el gen NPHS2*. El *SNP rs5005771* reportado en la base de datos de SNPs del NCBI con los alelos G/A en la tercera posición del codón que codifica para Alanina. En los 32 pacientes 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%), Asia C/C (100%), Afro americanos C/C (97%), C/T (2%), Asia C/C (100%), Sub Sahara C/C (98%), T/T (2%).

El *SNP rs1410592* con alelo en dirección sentido T/C localizado en el tercera posición del codón que codifica para Alanina; encontramos en los 32 pacientes estudiados alelos T/C (65%) y homocigoto T/T (21.8 %) y C/C (12.5 %), 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 dirección sentido G/A en la tercera posición del codón que codifica para Leucina; se encontró en 32 pacientes de estudio con alelos homocigoto A/A (100%) el cual codifica 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%).

Para el SNP *rs4399118* con alelo en dirección sentido T/C, en la segunda posición del codón que codifica T=Leucina y C= prolina (mutación) encontramos en 32 pacientes alelo homocigoto C/C (71.2%) y homocigoto G/G (28.8%), que codifica para el aminoácido Leucina, igual al reportado. La diversidad poblacional en Europa, Asia y África han reportado G/G en el 100%.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó una búsqueda de mutaciones o variaciones no sinónimas en el gen de NPHS2, analizando los 8 exones de la región codificadora de dicho gen, no encontrando mutaciones o polimorfismos no sinónimos. Esto contrasta con los hallazgos de Berdelli y colegas que encontró una tasa de mutación de NPHS2 de 24.7% para todos los casos con síndrome nefrótico resistente estudiados y también lo reportado por Hinkes y cols, que encontró 37.5% de mutaciones del gen NPHS2.^{2,3}

Sin embargo la baja prevalencia de dicha mutación concuerda con lo encontrado por Maruyama y colaboradores que en una cohorte de 36 pacientes concluyeron que dicha mutación no era una causa importante de insuficiencia renal crónica asociada a síndrome nefrótico corticorresistente.⁵⁶ Así como también Chernin y colaboradores en un estudio de niños afroamericanos con Síndrome nefrótico corticorresistente no hallaron mutaciones en el gen NPHS2.⁵⁷

El estudio sin embargo encontró una variabilidad en los alelos descritos en los SNP de los 8 exones del gen NPHS2 los cuales son diferentes a los reportados para las poblaciones europeas, asiáticas, africanas descritos en el NCBI. Dichas variaciones sinónimas se encuentran en el exón 1 SNP rs1079292, exón 2 SNP rs3738423, exón 3 SNP rs12240233, exón 5 SNP rs12568913, exón 8 SNP rs5005771, rs1410592, rs3818587. Dichos polimorfismos son sinónimos y no repercuten en la conformación de la proteína final.

Sin embargo se encuentra pendiente ampliar el tamaño de la muestra de estudio (80 pacientes) y buscar los polimorfismos nuevos en sujetos controles (100 alelos).

CONCLUSIONES:

En el presente estudio no se encontraron mutaciones o polimorfismos no sinónimos en el gen NPHS2 en un grupo de 45 niños con síndrome nefrótico idiopático. Sin embargo se encuentra pendiente completar el análisis de los exones 1,4,5,6,7 y 8 . así como completar la muestra de nuestra población a 80 pacientes.

Por el momento el Gen NPHS2 no parece ser una alteración frecuente en los niños mexicanos con síndrome nefrótico.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Members of the Arbeitsgemeinschaft für Paediatrische Nephrologie Short versus standard prednisone therapy for initial treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Lancet* 1988 1:380–383.
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 Paediatrische 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.- Berdeli A, Mir S, Yavascan O, Serdaroglu E, Bak M, Aksu N. NPHS2 (podocin) mutations in turkish children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 2031-2040.
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. 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.
- 6.- Gordillo PG, Mota HF, Velásquez JL. *Nefrología pediátrica*. México: Ediciones médicas del Hospital Infantil de México; 1976.
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.- Lahdenkari AT, Kestila M, Holmberg C, Koskimies O, Jalanko H. Nephtrin gene(NPHS1) in patients with minimal change nephritic syndrome (MCNS) *Kidney Int* 2004; 65: 1856-1863. 11.

- 9.- St John PL, Abrahamson DR. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int.* 2001; 60: 1037-46. 12.
- 10.- Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nature Clin Pract Nephrol.* 2006; 2: 271-82. 13.
- 11.- 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.
- 12.- 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.
- 13.- Winn MP Not all in the family: mutations of podocin in sporadic steroid-resistant nephritic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13: 577-579.
- 14.- Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodriguez-Perez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR 2000 Mutations in ACTN4, encoding alpha actinin- 4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24: 251-256.
- 15.- Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006; 69: 2131-47.
- 16.- Winn MP, Conion PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 307: 1801-1804.
- 17.- 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.

- 18.- Furue T, Hattori M, Tsukuguchi H, Kitamura A, Oomori T, Ogino D, Nakakura H, Ashida A, Miura K, Hisano M, Takahashi K, Chikamoto H, Akioka Y, Sakano T. Clinical features and mutational survey of NPHS2 (Podocin) in japans children with focal segmental glomerulosclerosis who underwent transplantation. *Pediatr Trasplantation* 2008; 12:341-346.
- 19.- 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 nephritic syndrome. *J am Soc Nephrol* 2004; 15: 722-32.
- 20.- Niaudet P, Gubler MC. WT1 and glomerular diseases. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 1653-60.
- 21.- Orloff MS, Iyenger SK, Winkler C, Goddard KA, Dart RA, Ahuja TS, Mokrzycki M, Briggas WA, Korbet SM, KIMMEL PL, Simón EE, Trachtman H, Vlahov D, Michel DM, Berns JS, Smith MC, Shelling JR, Kopp JB (2005). Variants in the Wilms Tumor gene are associated with focal segmental glomerulosclerosis in the African American population. *Physiol Genomics* 21: 212-221.
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, Steenbergen 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.- Hinkes B, Vlangos C, Heeringa Saskia, Mucha B, Gbandegesin R, Liu Jinghong, Hasselbacher, Fatih Ozaltin, Hildebrandt F, and members of the APN Study Group. *J Am Soc Nephrol* 2008 19: 190-191.

35. Machuca E, Hummel A, Nevo F, Dantal J, Martinez F, Al-Sabban, Baoudoin V, Abel L, Grunfeld JP, Antignac C. Clinical and epidemiological assesment of steroid-resistant nephrotic síndrome associated with the NPHS2 R229Q variant *Kidney International* 2009; 75: 727-735.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Marks SD. How have the past 5 years of research changed clinical practice in paediatric nephrology. *Arch Dis Child.* 2007; 92: 357-61.
40. Fogo AB. Can glomerulosclerosis be reversed? *Nature Clin Pract Nephrol.* 2006; 2: 290-1.
41. 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.
42. Fine RN. Recurrence of nephrotic syndrome/focal segmental glomerulosclerosis following renal transplantation in children. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22: 496-502.
43. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1387-1401.
- 44 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.

45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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 mosaïcisme XX/XY. *Arch Fr Pediatr.* 1967; 24: 729-39.
51. 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.
52. Cho HY, Lee JH, Choi HJ, Lee BH, HA IS, Choi Y, Cheong HI. WT1 and NPHS2 mutation in Korean children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2008 ; 23: 63-70.
53. www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM.

54. The European Bioinformatic Institute and Genome Research Limited and Others. ENSEMBLE.ORG. <http://www.ensemble.org>. Consultada en Julio 2009.
55. 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, Miseners S. Editores, Humana Press, Totowa Nueva Jersey 2000. pp 365-386.
56. Maruyama K, Iijima K, Ikeda M, et al. NPHS2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatr Nephrol*. 2003; 18: 412-6.
- 57.- Chernin G, Heeringa SF, Gbandegesin R, et al. Low prevalence of NPHS2 mutations in African American children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2008; 23: 1455-60.

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: COLAA3, 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.²

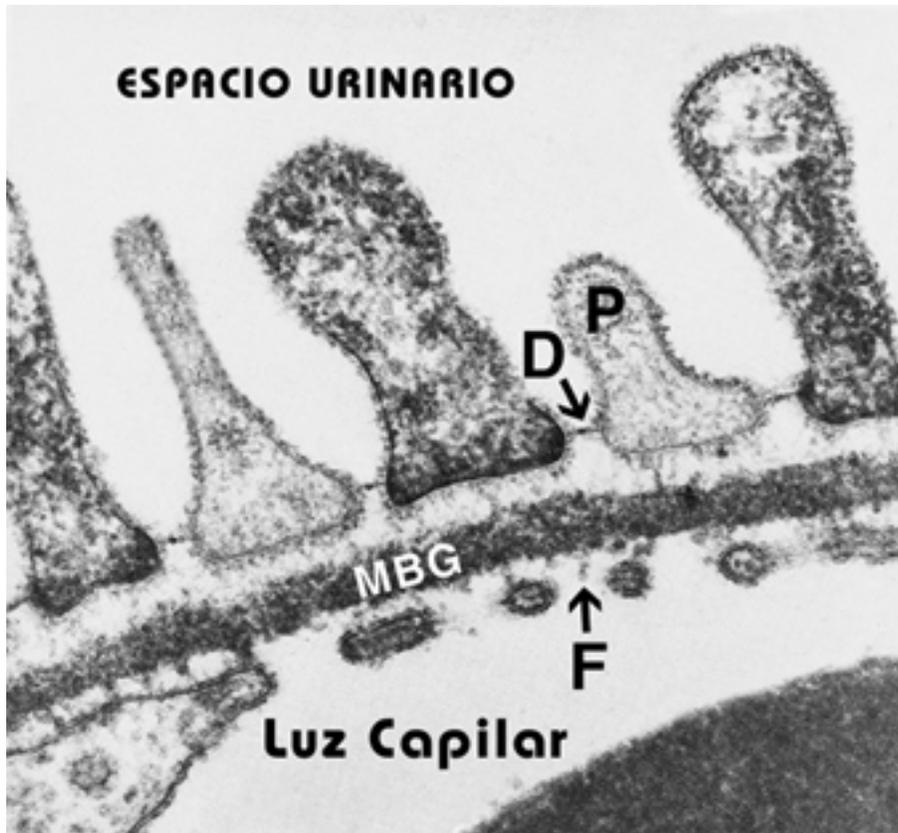


Figura 3. Estructura de la barrera de filtración del glomérulo. MBG: membrana basal glomerular.

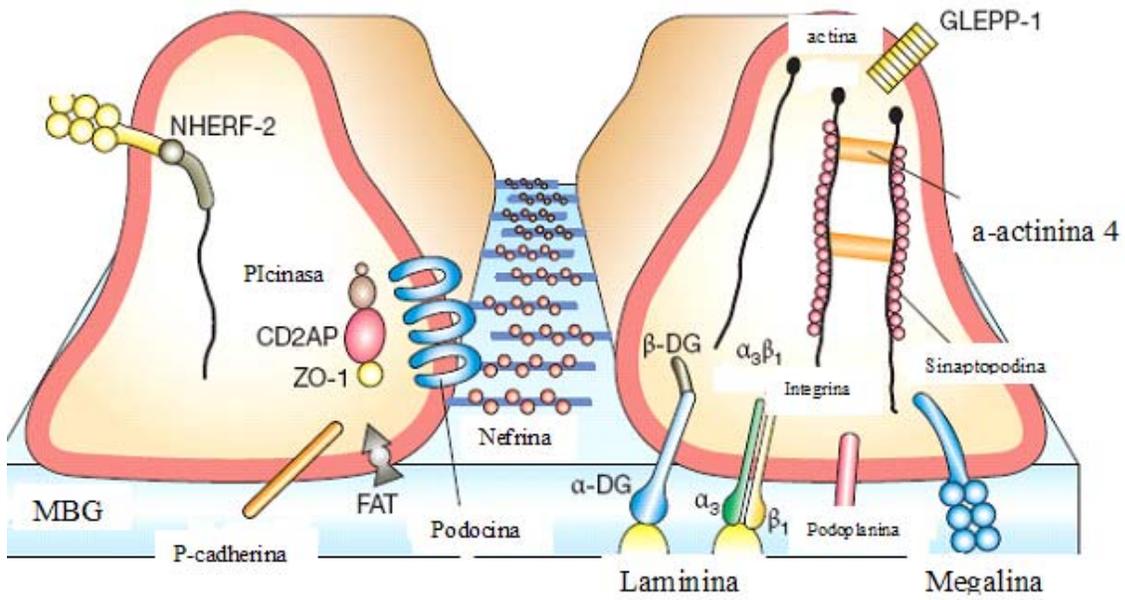


Figura 4. Componentes de los podocitos y el diafragma de hendidura.

Secuencia DNA del Gen NPHS2 isoforma 001

1 CACAGGGACTGGCGCTCCC^AGTGCCCTAGCGCTCCCGCGCTGCTGCTCCAGCCGCCCGCA
.....
.....

61 GCTCTGAGGATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTCCTCCAGGGAGTCCCGGGGCGAGGCGGC
.....ATGGAGAGGAGGGCGCGGAGCTCCTCCAGGGAGTCCCGGGGCGAGGCGGC
.....-M--E--R--R--A--R--S--S--S--R--E--S--R--G--R--G--G--

121 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAGAGGGCAAAGGC^SGAGAGGAGCGGCGG^RAGCCGCGGG
52 AGGACTCCGCACAAGGAGAACAAGAGGGCAAAGGCCGAGAGGAGCGGCGGAGGCGCGGG
18 -R--T--P--H--K--E--N--K--R--A--K--A--E--R--S--G--G--G--R--G--

181 CGCCAGGAGGCTGGGCCCGAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGCCC
112 CGCCAGGAGGCTGGGCCCGAGCCGTCGGGCTCCGGACGGGCGGGGACCCCGGGGAGCCC
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^YGGC
232 ACCGAGGTGGTGGCGCTGTTGGAGAGCGAGCGGCCCGAGGAAGGTACCAAATCCTCCGGC
78 -T--E--V--V--A--L--L--E--S--E--R--P--E--E--G--T--K--S--S--G--

361 TTAGGGCCCTGTGAGTGGCTTCTTGTCCTCATTTCCTGCTCTTCATCATCATGACCTTC
292 TTAGGGCCCTGTGAGTGGCTTCTTGTCCTCATTTCCTGCTCTTCATCATCATGACCTTC

238 -R--K--S--I--A--Q--D--A--K--V--A--L--D--S--V--T--C--I--W--G-

841 ATCAAAGTGGAGAGAATAGAAATTAAGATGTGAGGTTGCCAGCTGGGCTTCAGCACTCA
772 ATCAAAGTGGAGAGAATAGAAATTAAGATGTGAGGTTGCCAGCTGGGCTTCAGCACTCA
258 -I--K--V--E--R--I--E--I--K--D--V--R--L--P--A--G--L--Q--H--S-

901 CTGGCTGTGGAGGCTGAAGCGCAAAGACAAGCCAAAGTGGGATGATTGCTGCAGAAGC^R
832 CTGGCTGTGGAGGCTGAAGCGCAAAGACAAGCCAAAGTGGGATGATTGCTGCAGAAGC^R
278 -L--A--V--E--A--E--A--Q--R--Q--A--K--V--R--M--I--A--A--E--A-

961 GAAAAGGCTGCTTCTGAGTCCCTGAGGATGGCAGCTGAGATTCTGTCAGGCACCCCTGCT
892 GAAAAGGCTGCTTCTGAGTCCCTGAGGATGGCAGCTGAGATTCTGTCAGGCACCCCTGCT
298 -E--K--A--A--S--E--S--L--R--M--A--A--E--I--L--S--G--T--P--A-

1021 GC^YGTTTACCTTCGATACCTCCACACCCTTCAGTCTCTGTCCACAGAGAAGCCTTCCACT
952 GCCGTTTACCTTCGATACCTCCACACCCTTCAGTCTCTGTCCACAGAGAAGCCTTCCACT
318 -A--V--Q--L--R--Y--L--H--T--L--Q--S--L--S--T--E--K--P--S--T-

1081 GTGGTTTTACCTTTGCCATTTGACCT^RCTGAATTGCCTGTCTTCTCCAGCAACAGAACT
1012 GTGGTTTTACCTTTGCCATTTGACCTACTGAATTGCCTGTCTTCTCCAGCAACAGAACT
338 -V--V--L--P--L--P--F--D--L--L--N--C--L--S--S--P--S--N--R--T-

1141 CAGGAAGCCTCCCCTTCCCAAGTCTTCCAAACCTGTTGAGCCACTAAATC^YTAAAAAG
1072 CAGGAAGCCTCCCCTTCCCAAGTCTTCCAAACCTGTTGAGCCACTAAATC^YTAAAAAG
358 -Q--G--S--L--P--F--P--S--P--S--K--P--V--E--P--L--N--P--K--K-

1201 AAAGACTCTCCCATGTTATAGGAAGGATGGGGCATAATGTGACTGTAAAGGGGCCTGCCA
1132 AAAGACTCTCCCATGTTATAG.....

1132 AAAGACTCTCCCATGTTATAG.....
378 -K--D--S--P--M--L--*.....

1261 TAGAAAAGTCACAT^SGCTGAGGGAGACACTCTGTCTCATTCCTGCCCTTCCTTTGGTT
.....

1321 GCCATATGGAATGGCCATGGAATGCACGAAGTACAATGCACCATCCATGAGAAGAC^RGGT
.....

1381 GAAATGATGTAATGACAGAGAAGGCAGACAACATGTTTCC^RGTGACTCATCTAGTCAGAGC
.....

1441 AATTATGGGAACAGCTTTGGTCAACATTCTACTTTGG^RAAAGAATTTTGGAGTCTAGATGT
.....

1501 GGTTAAATTTTACTTCTGGGAACCTTGGTTCAGATGTCCCTTTCACTGTATGTCCTCTGA
.....

1561 CCCCTTTGGCAAGGTTGCCACAGCTCCACAGCCCTTCTTACAAGCACCTATCATTTGGGC
.....

1561 CCCCTTTGGCAAGGTTGCCACAGCTCCACAGCCCTTCCTACAAGCACCTATCATTGGGC

 1621 TTGTCACACTCTATTGCTCTTCTGTCCC^RAAAGATGCAGTCTTCTCTCCAATGATACTACC

 1681 AAGTCTTAGITTTTCTCAACCACACTCAATCTTTTTGCTCCACCCTGAATTCCTCACACC

 1741 TAACCCTGATAGTTACCTAAAGTGACACTTAAATGTTTCAGAGTGAATGCAAAAAAGAGA

 1801 GATGTA^RCTTGGAGTCGGATATACAATTTATCCCTAATTAAAGCATTATAAAGGAA

