



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE**

**ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA TERMINAL Y EL POLIMORFISMO DE  
ENOS GLU298ASP EN POBLACIÓN MEXICANA**

**TESIS DE POSGRADO**

**PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN**

**NEFROLOGIA**

**PRESENTA**

**DRA. ORALIA ALEJANDRA OROZCO GUILLÉN**

**N. AUTORIZACION 733**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. JUVENAL TORRES PASTRANA**

**MEXICO D.F, 2012**



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.

**INVESTIGADORES Y TUTORES:**

**ORALIA ALEJANDRA OROZCO GUILLEN**

**Investigador Principal y Responsable de protocolo de Investigación**

Residente de Tercer año de Nefrología

**DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA**

**Investigador Principal, Asesor y Director de Tesis**

Jefe de División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación,

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE. Teléfono: 52003513. Correo:

[ipcanto@yahoo.com.mx](mailto:ipcanto@yahoo.com.mx)

**DR. JUVENAL TORRES PASTRANA**

**Investigador Participante y Co-Director de Tesis**

Jefe del Servicio de Nefrología y Titular del curso de Nefrología del Centro Medico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

**DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ**

**Investigador Participante y Co- Director de Tesis**

Adscripción: División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación,

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE. Teléfono: 55755306. Correo:

[rmcoralv@prodigy.net.mx](mailto:rmcoralv@prodigy.net.mx)

**DR. LUIS VICENTE GUTIÉRREZ LARRAURI**

**Investigador Participante**

Medico Internista y Medico Adscrito al servicio de Nefrología del hospital “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE

**MVZ. AGUSTIN CORONEL**

**Investigador participante**

Laboratorio de Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, CMN 20 Noviembre, ISSSTE.

**Esta Tesis fue realizada en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica del Centro Medico Nacional 20 de Noviembre bajo la dirección de la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina, la Co- dirección del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez y el apoyo del MVZ Agustín Coronel**

Esta Tesis esta dedicada a Mi Padre por que es la Luz de mi vida entera

Y a Mi madre, por ser la fuerza y fortaleza de mi corazón

Gracias a ambos, los admiro y amo profundamente.

#### Agradecimientos

A Luis Vicente Gutiérrez Larrauri por ser mi compañero, cómplice, amigo y amor; gracias por que con tu ejemplo me has inspirado día a día para ser mejor, Te amo y te admiro muchísimo.

A la Dra. Paty Canto, por creer y apoyar mis ideas; por sus comentarios, correcciones y aportaciones a este trabajo pero sobre todo por abrirme las puertas de su laboratorio. Mil gracias.

A Agustín Coronel, por que con tu constancia, disciplina y conocimientos me ayudaste a concluir este proyecto.

A mis pacientes y a todos aquellos voluntarios que apoyaron este proyecto, muchísimas gracias.

## GLOSARIO

<b>ERC</b> .....	Enfermedad Renal Crónica
<b>ERCT</b> .....	Enfermedad Renal Crónica Terminal
<b>PCR</b> .....	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>e NOS</b> .....	Sintasa de óxido Nítrico Endotelial
<b>GLU</b> .....	Glutamina
<b>ASP</b> .....	Asparagina
<b>TRR</b> .....	Terapia de Reemplazo Renal
<b>DM</b> .....	Diabetes Mellitus
<b>HAS</b> .....	Hipertensión Arterial Sistémica
<b>HD</b> .....	Hemodiálisis

## **ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA TERMINAL Y EL POLIMORFISMO DE ENOS GLU298ASP EN POBLACIÓN MEXICANA**

### **RESUMEN**

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es identificada como “daño renal de una duración igual o mayor a 3 meses”. Existen ciertas causas que hacen más susceptible al ser humano a padecer esta enfermedad, entre ellas las genéticas.

El objetivo de este estudio es investigar si la presencia de un polimorfismo de la sintasa de Oxido Nítrico (eNOS), está asociado con la presencia de enfermedad renal crónica en población mestiza.

Para ello realizamos un estudio de casos y controles donde incluimos a 65 pacientes con ERC y a 60 personas sanas a los cuales se les buscó el polimorfismo de eNOS Glu298Asp para lo cual se realizó discriminación alélica por PCR de tiempo real.

Las diferencias entre el alelo y las frecuencias en el genotipo entre grupos fueron evaluadas por  $Ji^2$

La frecuencia de eNOS Glu298ASP entre grupos no mostro significancia estadística, sin embargo la frecuencia del alelo T no se encontró en los casos pero si en los controles confiriendo un efecto protector para ERC.

Nuestros resultados sugieren que la presencia del polimorfismo de eNOS Glu298Ap en pacientes sanos confiere un factor de protección para desarrollar Enfermedad Renal Crónica en población Mestiza Mexicana.

## INTRODUCCIÓN

### Marco Teórico

La enfermedad Renal Crónica (ERC) fue definida en el año 2002 por la National Kidney Foundation de Estados Unidos (K/DOQI, 2002) como “daño renal de una duración igual o mayor a tres meses, caracterizado por anomalías estructurales o funcionales con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular a menos de  $60\text{ml}/\text{min}/1.72\text{m}^2$ ”. Estadificaron cinco etapas en la evolución de la enfermedad crónica renal, las cuales se basan en la presencia de daño estructural y/o la disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG).

<sup>1,2</sup>

La ERC es un proceso multifactorial de carácter progresivo e irreversible que frecuentemente conduce a un estado terminal (ERCT) en el cual la función renal se encuentra lo suficientemente deteriorada como para que el paciente fallezca necesite terapia de remplazo renal (TRR), es decir, diálisis o trasplante.<sup>1,2,3</sup>

En el 2008, el Instituto Nacional de la salud y la excelencia clínica (NICE) modificó la clasificación de K/DOQI para ERC subdividiendo la etapa 3 en ERC3a y ERC3b, en la cual la TFG es estimada entre  $50$  a  $45\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$  y  $44$  a  $30\text{ml}/\text{min}/1.72\text{m}^2$ , respectivamente.<sup>2</sup>

## **Epidemiología**

Al igual que en otros países, México está envuelto en un proceso de transición epidemiológica a través del cual ciertas enfermedades crónico degenerativas como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial han desplazado a las enfermedades infecciosas de las principales causas de muerte.<sup>5</sup> Asimismo, la ERC es una enfermedad frecuente presente tanto en las dos patologías mencionadas arriba, como en las que son originadas por alguna causa infecciosa, genética o endocrinológica. Cuando la ERC alcanza un estado terminal (ERCT) y no es tratada de manera efectiva, conduce a la muerte en poco tiempo debido a su naturaleza discapacitante y progresiva.

Como resultado del incremento constante en su incidencia durante las últimas décadas, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial han alcanzado proporciones epidémicas. Los datos de la ENSA 2000 muestra que la prevalencia de la diabetes es del 7.2%, lo cual equivale a más de 7 millones de mexicanos afectados (principalmente adultos mayores de 60 años); y la ENSANUT2006 revela que la prevalencia de hipertensión arterial es de 16.3%. Debido a la fuerte correlación que existe entre la ERC, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial se entiende que la frecuencia de la primera continuará en aumento si la de la diabetes y la de la hipertensión siguen incrementándose.

En el 2005, las estadísticas de mortalidad mostraron que la ERCT fue por sí misma, la décima causa de muerte a nivel nacional, dando origen a más de 10 mil fallecimientos. Además, existen reportes que revelan que alrededor de 60 mil personas mueren cada año por esta enfermedad aunque otra condición sea registrada como la principal causa de muerte. El problema de la ERCT ya posee dimensiones alarmantes, la estadística revela

que el número de casos de ERC continuará en aumento: si las condiciones actuales persisten, para el año 2025 habrá cerca de 212 mil casos y se registrarán casi 160 mil muertes relacionadas a dicha enfermedad.

Con base en los datos del Registro de diálisis y Trasplante del Estado de Jalisco y del Instituto Mexicano del Seguro Social, se calcula que existen aproximadamente 40 mil pacientes en alguna modalidad de diálisis (Instituto Mexicano del Seguro Social 2006). De 1993 a 2001, México experimentó un aumento en la población de diálisis del 11% anual. En nuestro país existe una de las prevalencias más elevadas de diabetes mellitus a nivel mundial, y se estima que en los siguientes años aumentará en un 250%.

Correa-Rotter, durante el 2005 reportó que la prevalencia de la ERC era aproximadamente del 25% en la población en general entre 25 y 40 años de edad.<sup>1,5</sup>

### **Factores de riesgo y complicaciones para ERC**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbimortalidad en los pacientes con ERC. En 1998, Foley et al., encontraron que los pacientes con ERCT tiene un riesgo 30 veces mayor de morir por enfermedad cardiovascular y este riesgo es 65 veces mayor entre las edades de 45 y 54 años y 500 veces mayor en pacientes más jóvenes. Este riesgo no solo es atribuible al proceso patológico subyacente como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, conocidos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, sino también a la correlación que existe entre la uremia y la aterosclerosis acelerada. Como se muestra en el cuadro 1, en la ERC es frecuente encontrar factores de riesgo cardiovasculares tradicionales como hipertensión arterial, dislipidemia, edad avanzada.

Por otra parte, en la uremia hay una disminución en la excreción de citocinas, las cuales producen un estado crónico inflamatorio lo que aunado al incremento de homocisteína y a la acumulación de productos finales de la glucosilación genera disfunción endotelial y estrés oxidativo, lo que explica el elevado riesgo de mortalidad cardiovascular que presentan los pacientes con ERC.<sup>1,2,3</sup>

Tabla 1.

**Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en la ERC**

Tradicionales	Relacionados a ERC
Diabetes mellitus	Homocisteinemia
Hipertensión	Anemia
Edad avanzada	Hipervolemia
Vida sedentaria	Inflamación
Tabaquismo	Estrés oxidativo
↓ LDL    ↑ HDL	Hipercoagulabilidad

### **Etiología**

Las causas de la ERC son diversas, y se pueden agrupar en enfermedades vasculares, enfermedades glomerulares primarias, enfermedades glomerulares secundarias, enfermedades tubulointersticiales y uropatías obstructivas.<sup>5</sup>

Hace varios años la causa más común de la ERC eran los cambios glomerulares referidos como glomerulonefritis; hoy en día, la disminución en la mortalidad de los pacientes con diabetes mellitus e hipertensión arterial sistémica ha permitido que dichas enfermedades evolucionen a complicaciones como la ERC, Y han sustituido a las glomerulonefritis como causas más frecuentes de enfermedad renal.<sup>5</sup>

Por otra parte, el óxido nítrico derivado de las células endoteliales, está relacionado profundamente con el mantenimiento del tono vascular. Existen diferentes factores de riesgo asociados a ERC entre ellos están los genéticos.<sup>4</sup> Se ha descrito que polimorfismos en la sintasa de óxido nítrico (*eNOS*) puede manifestarse como un deterioro de la generación de óxido nítrico y el cual ha sido relacionado como un factor que influye en el deterioro de la enfermedad renal hacia mayores complicaciones cardiovasculares o bien hacia falla renal terminal.<sup>4,7,9.</sup>

El polimorfismo Glu298Asp de la *eNOS* ha sido el que más se ha asociado (en reportes en la literatura) como uno de los factores que influyen o bien como un factor de riesgo para el deterioro de la función renal hacia falla renal terminal de cualquier etiología. Lo anterior debido a que su presencia se ha relacionado con una mayor incidencia de eventos cardiovasculares.<sup>4,6,7,8</sup>

### ***Oxido Nítrico***

El óxido nítrico generado por el endotelio es un potente vasodilatador. Se trata de una pequeña molécula que pesa 30 daltons, que se sintetiza, a través de la oxidación de la L-arginina, por la familia de la óxido nítrico sintasa (NOS). Existen 3 isoformas en las que la enzima ha sido identificada: 2 constitutivas; *eNOS* neuronal y *eNOS* endotelial, y la inducible. La óxido nítrico sintasa endotelial *eNOS* es la más abundante en la circulación y la que contribuye en mayor medida a regular el tono vascular antes los cambios presentados.

Aparte de contribuir a la vasodilatación, el óxido nítrico ha ganado la atención por su papel como un neurotransmisor en el cerebro y un agente citotóxico dirigido hacia células tumorales, así como un potente regulador de la hemodinámica no solo sistémica si no también intrarrenal, por lo tanto cualquier factor que lo altere puede tener un impacto importante sobre el deterioro de la función renal.

La reducción en la producción de óxido nítrico es el primer paso para la aparición de un sin número de enfermedades. La incidencia de las enfermedades cardiovasculares en la población con ERC es alta, siendo esta la causa más importante de muerte en este grupo.<sup>5,6</sup>

### ***Papel de los Polimorfismos de eNOS en la Enfermedad Renal Terminal***

Los mecanismos de la nefropatía diabética no han sido aclarados, se han propuesto varias hipótesis entre ellas, una alteración en la función vasodilatadora derivada de un tono vasomotor anormal, sobre todo en fases tempranas de la diabetes. Por lo anterior existen estudios que revelan que los pacientes con ERC y nefropatía diabética tienen una predisposición mayor a cursar con complicaciones cardiovasculares, lo anterior probablemente debido a un componente genético, ya que se ha observado que diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de la eNOS puede incrementar la respuesta vascular incrementando el estrés oxidativo.<sup>7</sup>

El polimorfismo más estudiado en relación a ERC secundaria a nefropatía diabética e hipertensión es el G-894T→Glu298Asp localizado en el exón 7 del gen eNOS. Es importante mencionar que esta asociación es relacionada como de riesgo para peor

evolución una vez que se tiene ERC.<sup>7</sup> Asimismo, el polimorfismo Glu298Asp es considerado un factor que favorece el estrés oxidativo, trombofilia, infarto al miocardio, hipertensión e incluso preeclampsia. Además dicho polimorfismo, ha sido involucrado en la génesis y la evolución de la disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular en pacientes con ERC en hemodiálisis secundaria a nefropatía diabética, pues esta alteración afecta la respuesta vascular incrementando el estrés oxidativo debido a la reducción de la actividad de la eNOS.<sup>9</sup>

Existen diversos estudios de asociación del polimorfismo Glu298Asp y ERC secundaria a nefropatía diabética e hipertensión llevados a cabo en población japonesa, china, coreana, caucásica, italiana e Indú.<sup>6-14</sup> Algunos de esos estudios sugieren que la ERC asociada a diabetes se relaciona más con dicho polimorfismo, otros estudios no reportan correlación y algunos otros revelan que existe mayor asociación respecto a la presencia de Glu298Asp y la ERC asociada a hipertensión arterial.<sup>4,8</sup>

Sin embargo, no existen estudios de asociación de dicho polimorfismo y ERC en población mestiza-Mexicana, por lo anterior resulta interesante estudiar si en nuestra población mestizo mexicana la presencia de este polimorfismo se asocia con una evolución más rápida o no hacia falla renal terminal sea cual sea la etología de la enfermedad renal.

## **JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad renal crónica es uno de los principales problemas de salud pública Mundial. En México, existen alrededor de 40 mil pacientes en diálisis, por lo que representa una de las enfermedades más costosas a no solo en nuestro país si no a nivel mundial en material de tratamiento, lo cual constituye un reto económico para los sistemas de salud.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbi-mortalidad en los pacientes con ERC ya que se ha reportado que estos pacientes tienen un riesgo de mortalidad por complicaciones cardiovasculares 30 veces mayor que la población en general. Este riesgo es 65 veces mayor en pacientes entre 45 y 54 años y 500 veces mayor en pacientes más jóvenes, lo anterior debido a la correlación entre la uremia y la aterosclerosis acelerada.

El óxido nítrico y su sintasa juegan un papel clave para el proceso aterosclerótico. Diversos polimorfismos del gen que codifica a la *eNOS* han sido investigados en relación a enfermedad renal terminal; sin embargo el que más se ha asociado con este padecimiento es el Glu298Asp, siendo el alelo Asp relacionado a la presencia de un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares en pacientes en hemodiálisis. De igual forma se ha observado que este alelo en pacientes diabéticos se asocia a una progresión de la nefropatía diabética hacia la falla renal terminal.<sup>8,9</sup>

Debido a que la diversidad genética de nuestra población es amplia y de que los estudios publicados se han realizado en diversas poblaciones diferentes a la nuestra, resulta

interesante evaluar el polimorfismo Glu298Asp de eNOS en población mestiza-Mexicana con enfermedad renal crónica terminal.

Con base en lo anterior y de obtener resultados positivos se pudieran encaminar esfuerzos con el fin de modificar positivamente la historia natural de la enfermedad y dirigir terapéuticas que retarden dicha progresión.

### ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

Debido a los resultados contradictorios de asociación de Glu298Asp y ERC descritos en diversas poblaciones y a que el acervo genético de nuestra población determinado por el mestizaje es diferente a otras poblaciones del mundo e incluso es diferente entre nuestra propia población nos planteamos la siguiente pregunta:

¿El polimorfismo 298Asp de *eNOS* se asocia a la presencia de enfermedad renal crónica terminal en hemodiálisis causada por diabetes o por hipertensión arterial en pacientes de origen mestizo-Mexicano de una muestra de la población de la ciudad de México D.F.?

#### **Objetivo General**

Determinar si existe asociación del polimorfismo Glu298Asp del gen *eNOS* con presencia de enfermedad renal crónica terminal en pacientes en hemodiálisis secundaria a nefropatía diabética o hipertensión arterial en pacientes de origen mestizo-Mexicano.

### ***Hipótesis***

El alelo 298Asp del gen *eNOS* se asocia a la presencia de enfermedad renal crónica terminal de etiología diabética o hipertensiva.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

### ***Sujetos***

Se incluyeron sujetos de origen étnico mestizo-Mexicano (dado por al menos tres generaciones de la familia en este país y que no se encuentren relacionadas biológicamente entre sí) que acudían a consulta al Centro Médico Nacional “20 Noviembre”. Tanto los sujetos con ERCT (casos) como los sujetos sanos (controles) que aceptaron ingresar al estudio, firmaron la carta de consentimiento informado.

### ***Casos***

Se incluyeron pacientes con ERC en estadio 5 en hemodiálisis secundaria a Diabetes Mellitus o Hipertensión Arterial Sistémica.

Todos los sujetos fueron de origen mestizo-Mexicano de una muestra de la población del Centro Médico Nacional “20 Noviembre”, reclutados durante el periodo comprendido entre enero 2012 a mayo 2012.

### ***Controles***

Se incluyeron sujetos de origen mestizo-Mexicano clínicamente sanos que acudían a la consulta externa en el periodo antes descrito, sin antecedentes de patología, neoplásica o infecciosa, se les practicó una historia clínica completa, así como estudios generales

(biometría hemática, química sanguínea y perfil de lípidos de no más de 6 meses de antigüedad). Se incluyeron aquellos pacientes con índice de masa corporal (IMC) menor a 29.9, que no estuvieran bajo tratamiento farmacológico.

#### ***Criterios de inclusión de los controles***

- Pacientes que firmaron el consentimiento Informado
- Pacientes antecedentes de enfermedades infecciosas agudas o crónicas y sin antecedentes de neoplasias que se conocieran sanos
- Pacientes que no tomaran ninguna medicación farmacológica.

#### ***Criterios de Inclusión de los casos***

- Pacientes que firmaron el consentimiento informado.
- Paciente con enfermedad renal terminal (ERCT) en hemodiálisis convencional de etiología diabética (es decir pacientes con determinaciones de glucosa al azar mayores a 126mg/dl, A1C>7%, carga oral de glucosa después de 2hrs>200mg/dl) vs pacientes con ERCT de etiología Hipertensiva ( Hipertensión arterial sistémica, glomerulopatias, litiasis, otras)
- Pacientes que reciban hemodiálisis 3 veces x semana de 3 a 4 hrs con aclaramiento menor a 10ml/min y KTV mayor a 1.2.

### ***Criterios de Exclusión***

- Que no aceptaran firmar la carta de consentimiento informado.
- Pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas de origen reumatológico, como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o algún tipo de coagulopatía.
- Pacientes con infección activa (infecciones en los 3 meses previos).

### ***Criterios de Eliminación***

- Pacientes con infradialisis (medido por KTV menor a 1.2).
- Que presenten alguna infección al momento de la toma de muestra
- Que presente algún proceso inflamatorio sistémico activo agudo

### ***Diseño del estudio***

Se trata de un estudio descriptivo, transversal y comparativo.

Tanto los casos como los controles, se les aplicó un cuestionario en donde se evaluó los factores de riesgo, asimismo, se les realizaron estudios de laboratorio en el momento en el que se tomó la muestra o bien se consideraron los exámenes de hasta 6 meses previos.

Previo firma de carta de consentimiento, se procedió a la toma única de una muestra de 5 ml de sangre de una vena periférica, para la posterior extracción del DNA de los leucocitos de sangre periférica.

### ***Extracción de DNA de sangre periférica***

Se extrajo el DNA a partir de sangre periférica, para ello, la sangre se depositó en tubos de 5 ml con etilen diamino tetra acetato disódico (EDTA) 0.5M, pH 8, como anticoagulante. Las muestras se colocaron en hielo agregándosele sacarosa-tritón 2X (Sacarosa 0.64M, Trizma-base 0.02M, MgCl<sub>2</sub> 0.01M y Tritón 100X al 2%) y agua desionizada (ddH<sub>2</sub>O). Los leucocitos se separaron por centrifugación y se decantó el sobrenadante HT esencial para la obtención de un botón nuclear. Para lisar los leucocitos se añadió amortiguador de lisis nuclear, pH 8.2, (Trizma-base 10 mM, NaCl 400 mM y Na<sub>2</sub>EDTA 2mM), sulfato dodecílico sódico (SDS) al 20% y Proteinasa K [20 mg/ml]. Se dejó incubar por 14 h a 37° C y se adicionará después de dicho lapso NaCl saturado para luego centrifugarse. El sobrenadante se transfirió a tubos de 15 ml y el DNA precipitándose con dos volúmenes de etanol absoluto, se agitó por inversión. Posteriormente, el DNA se lavó en etanol frío al 70%, y se dejó secar a temperatura ambiente, se re suspendió en ddH<sub>2</sub>O, almacenándose a -20° C para su análisis posterior. Se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría. Para conocer la calidad de las muestras se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

### ***Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real***

El análisis del SNP G894T→Glu298Asp en el exón 7 (rs1799983) se realizó tanto en el DNA de las pacientes como de las controles. Este análisis se llevó a cabo mediante discriminación alélica por PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis de acuerdo con el sistema PCR allelic discrimination TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Todas las reacciones se realizaron con 10-20 ng de DNA, 2.5 ul de TaqMan Universal

Master Mix 2x (AB), 0.25 ul de los iniciadores y la sonda (40x) y agua a un volumen final de 15 ul. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos correspondientes. El PCR en tiempo real se realizó en el equipo LightCycler 480 II (Roche) con las siguientes condiciones: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min y 50 ciclos de amplificación (92°C por 15s y 60°C por 1.30 min). Para cada ensayo se utilizó el TaqMan® SNP Genotyping Assays específico: ensayo ID: C\_3219460\_20.

### ***Análisis Estadístico***

Se realizó un análisis exploratorio de cada una de las variables, para evaluar la calidad de la información. Se calcularon las frecuencias relativas, medidas de tendencia central y de dispersión para las diversas variables.

Para examinar la asociación en las variables discretas se utilizó la prueba de  $\chi^2$  en caso de cumplir con los requerimientos para la misma, caso contrario se utilizó la prueba exacta de Fisher.

Se llevó a cabo el análisis de las frecuencias alélicas del polimorfismo del gen *eNOS*. Se evaluó en toda la población si el polimorfismo analizado sigue el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se empleó la prueba de  $X^2$  para establecer si existió asociación genética de un alelo con un fenotipo determinado. Se utilizó un modelo estadístico de regresión logística para identificar los predictores, ajustado por posibles factores confusores. Se consideró diferencia significativa cuando  $p < 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA Versión 8-2007.

### ***CONSIDERACION ÉTICAS***

Para la realización de este estudio, se obtuvo la aprobación del Comité de Investigación Científica como de la Comisión de Ética en Investigación en Salud, del ISSSTE (No. 733). Todos los participantes que aceptaron ingresar al estudio, firmaron previamente una carta de consentimiento informado que permitirá disponer de la información y las muestras de DNA. La forma de consentimiento informado se estructuró acorde con las disposiciones de la Secretaría de Salud en materia de investigación en humanos.

Asimismo, para conservar la privacidad y confidencialidad de los datos obtenidos en el cuestionario que se aplicó, así como los datos obtenidos del estudio de los polimorfismos, se utilizó la base de datos, números de folio para identificar a los participantes en el proyecto y de esa forma conservar el anonimato.

Los riesgos implícitos en la toma de las muestras de sangre, mismas que se solicitaron para la obtención del ADN, son considerados mínimos.

## RESULTADOS

Se incluyeron 130 sujetos de ambos sexos, distribuidos de la siguiente manera: 65 controles y 65 casos (34 con ERC secundaria a diabetes mellitus y 31 secundaria a hipertensión arterial).

La media de edad para los controles fue de 36, para los casos con ERC-DM 59.4 y para los casos de ERC-HTA 37.7 (Tabla 2).

**Tabla 2. Edad de los grupos de estudio**

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESV. EST</b>	<b>MINIMO</b>	<b>MAXIMO</b>
Controles	65	36.01587	10.033	20	64
ERC-DM	34	59.44118	12.59194	26	80
ERC-HTA	31	37.70968	14.12844	20	67
Total	130	42.64844	15.51661	20	80

N= número de sujetos; Desv. Est= desviación estándar; ERC-DM= enfermedad renal crónica-diabetes mellitus; ERC-HTA= enfermedad renal crónica-hipertensión arterial sistémica.

En la siguiente tabla se puede muestra el peso tanto de los controles como de los casos.

**Tabla 3. Peso de los grupos de estudio**

	<b>N</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESV. EST</b>	<b>MINIMO</b>	<b>MAXIMO</b>
Controles	65	65.2254	10.24179	45	95
ERC-DM	34	64.03529	11.01924	41.1	93
ERC-HTA	31	59.38387	13.89957	44	102
Total	130	63.49453	11.57953	41.1	102

N= número de sujetos; Desv. Est= desviación estándar; ERC-DM= enfermedad renal crónica-diabetes mellitus; ERC-HTA= enfermedad renal crónica-hipertensión arterial sistémica.

El consumo de tabaco se observó predominantemente en pacientes sanos Tabla 4.

Al comparar la asociación entre el grupo de estudio y el hábito tabáquico, la  $\chi^2=9.46$ ; demostró asociación estadísticamente significativa.  $P=0.008$

**Tabla 4. Tabaquismo de los grupos de estudio**

<b>Grupo</b>	<b>No Fumadores</b>	<b>Fumadores</b>	<b>Total</b>
Controles	44	21	65
ERC- DM	32	2	34
ERC-HTA	25	6	31
Total	100	29	130

ERC-DM= enfermedad renal crónica-diabetes mellitus; ERC-HTA= enfermedad renal crónica-hipertensión arterial sistémica.

Asimismo, al analizar la presencia de dislipidemia entre el grupo control y los grupos de estudio se observó diferencia estadísticamente significativa para dislipidemia  $\chi^2 = 75.8$ ; demostrando también asociación.  $P=0.002$ .

**Tabla 5. Presencia de dislipidemia en los sujetos de estudio**

	<b>Sin dislipidemia</b>	<b>Con dislipidemia</b>	<b>Total</b>
Controles	59	6	65
ERC-DM	2	32	34
ERC-HTA	8	23	31
Total	68	61	130

ERC-DM= enfermedad renal crónica-diabetes mellitus; ERC-HTA= enfermedad renal crónica-hipertensión arterial sistémica.

Con respecto al polimorfismo Glu298Asp del gen *eNOS*, el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg determinó que se encontraba en equilibrio ( $P > 0.05$ ), ya que la distribución de los genotipos observados no difirió de los genotipos esperados tanto para los casos como para los controles.

Con respecto al análisis genético, se pudo observar que la frecuencia del alelo *G* fue para el grupo control del 84.62% y del 92.31 % para todo el grupo de pacientes y para el alelo *T* del 15.38% (controles) y del 7.69% para todos los casos; sin embargo no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $RM=0.458$ ; I.C. al 95%=. 0.206-1.022;  $P= 0.0522$ ). Al realizar

el análisis por grupo de pacientes, observamos que el grupo de pacientes con ERC-HT presentó una frecuencia del alelo *G* del 93.55% y del alelo *T* del 6.45%, con una RM= 0.379; I.C. al 95%=. 0.124-1.162; *P*= 0.08.

En la tabla 6 se muestra la distribución genotípica de los sujetos de estudio, observando que no se encontró diferencias significativas entre los grupos.

**Tabla 6. Distribución del polimorfismo Glu298Asp del gen *eNOS***

Gen <i>eNOS</i> Número de referencia Internacional rs1799983		Grupo			IRC-HTA
		Controles	Todos los Casos	IRC-DM	
<i>eNOS</i>	<i>Distribución genotípica</i>				
	G/G	47 (72.3%)	55 (84.6%)	28 (82.4%)	27 (87.1%)
	G/T	16 (24.6%)	10 (15.4%)	6 (17.6%)	4 (12.9%)
	T/T	2 ( 3.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0 %)
Total		65 (100%)	65 (100%)	34 (100%)	31 (100%)
<i>Frecuencia alélica</i>					
<i>G</i>		84.6%	92.3%	91.2%	93.6%
<i>T</i>		15.4%	7.7%	8.8%	6.4%
<i>Hardy-Weinberg</i>		<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05

ERC-DM= enfermedad renal crónica-diabetes mellitus; ERC-HTA= enfermedad renal crónica-hipertensión arterial sistémica.

## **DISCUSIÓN**

La enfermedad renal crónica es una condición patológica de origen multifactorial donde las características genéticas así como el medio ambiente además de los factores propios del paciente como la alimentación o la exposición a ciertas sustancias, se encuentran involucrados en la génesis y en su desarrollo.

En nuestra población Mestizo mexicana encontramos que la dislipidemia y el tabaquismo son factores de riesgo asociados de manera importante con el desarrollo de Enfermedad Renal Crónica Terminal encontrando significancia estadística.

Las complicaciones cardiovasculares son las principales causas de muerte en paciente con ERCT (Asakimori, 2004<sup>4</sup>), siendo la mortalidad cardiovascular en pacientes con diálisis del alrededor de 10 a 20 veces más frecuentes que la población general (Asakimori, 2004<sup>4</sup>).

Entre los diversos factores implicados en el deterioro de la función renal, los cambios en la hemodinámica se cree que son importantes. El óxido nítrico es un factor de relajación derivado del endotelio, el cual actúa como un regulador potente de la hemodinámica intrarrenal (Nagase, 2003<sup>7</sup>).

La disfunción endotelial y la arterioesclerosis prematura son consideradas factores genéticos potenciales que pudieran acelerar la ERC hacia glomerulonefritis crónica y nefropatía diabética. Estudios *in vivo* llevados a cabo en ratas, han demostrado que presentan concentraciones elevadas de óxido nítrico, por lo que se sugiere que éste, juega un rol en la génesis de la hiperfiltración e hiperperfusión observadas en la diabetes, que se relaciona con hipertrofia glomerular con expansión mesangial e incremento en la presión intracapilar [Noiri, 2002<sup>21</sup>].

Recientemente, varios estudios han demostrado que polimorfismos de la *eNOS* se relacionan con la hemodinámica renal(He Y et al, 2002<sup>8-10</sup>; siendo uno de los más estudiados el Glu298Asp. Diversos estudios han sugerido que el polimorfismo Glu298Asp de *eNOS* tiene consecuencias funcionales, los análisis *in vitro* han proporcionado una visión en que un modelo recesivo de Asp298 quizá afecta la función de la proteína, debido a que el Asp298 de *eNOS* se somete a un rompimiento catalítico selectivo en las células endoteliales y el tejido vascular, reduciendo así la generación del óxido nítrico vascular [Díaz-Olguín, 2012<sup>23</sup>]

Por otra parte, se ha observado que el alelo de riesgo Asp se asocia a la ERCT en hemodiálisis y el genotipo homocigoto *TT* (Asp/Asp) se asocia principalmente con un incremento en el riesgo de complicaciones cardiovasculares y con ello peor pronóstico en la ERC (Noiri, 2002<sup>21</sup>, Nagase, 2003<sup>7</sup>).

En el presente estudio analizamos en sujetos de origen mestizo-Mexicano si la ERCT secundaria a diabetes mellitus o a hipertensión arterial sistémica se asociaba al polimorfismo Glu298Asp del gen *eNOS*. No encontramos una asociación significativa; sin embargo, si observamos una tendencia de asociación del alelo Asp con ERCT.

Nagase et al.<sup>7</sup>, analizó el mismo polimorfismo en pacientes de Japón con ERC secundaria a nefropatía diabética, hipertensión arterial, entre otras, en estadios terminales en hemodiálisis, encontrando que el genotipo Asp/Asp se asociaba en forma significativa con EFR secundaria tanto a diabetes como a otras patologías.

Asimismo, otro grupo de investigadores observaron, que pacientes japoneses con ERCT secundario a diabetes en hemodiálisis, también se asociaba en forma significativa el

genotipo Asp/Asp con la patología, no encontrando asociación con ERCT secundaria a otras enfermedades (Noiri 2002<sup>21</sup>). En forma interesante, dichos autores llevaron a cabo estudios funcionales *in vitro*, encontrando que el alelo T (Asp) se asociaba en forma significativa a una disminución de óxido nítrico y acumulación de nitratos en comparación del alelo G (Glu).

En contraste, Asakimori et al.<sup>4</sup>, estudio sujetos del mismo grupo étnico con ERCT en hemodiálisis no secundaria a nefropatía diabética y analizaron los riesgos de complicaciones cardiovasculares; no encontrando asociación.

Cabe mencionar que en los tres estudios citados arriba, el alelo de riesgo que predominó para ERCT fue el alelo T y genotipo TT (Asp/Asp). En contraste, en nuestra población de mestizos-Mexicanos, observamos que el alelo T (Asp) predomina en los sujetos control y el análisis estadístico aunque no significativo mostró una tendencia hacia protección de este alelo (RM=0.458; I.C. al 95%=. 0.206-1.022; P= 0.0522). En forma interesante esta tendencia de asociación se observó cuando comparamos a los sujetos control *versus* los sujetos con ERCT secundaria a hipertensión (RM= 0.379; I.C. al 95%=. 0.124-1.162; P= 0.08). En forma interesante, nosotros observamos esta tendencia en el grupo de ERCT por hipertensión en contraste a lo descrito en la literatura, en donde la asociación lo observan en pacientes con ERC secundaria a diabetes<sup>21</sup>

No es la primera vez que en un grupo étnico determinado un alelo o genotipo es considerado de riesgo y en otro grupo étnico es considerado de protección. Reforzando lo anterior, Canto et al<sup>22</sup>, observó que en población de mujeres con preeclampsia de origen

mestizo-Maya un polimorfismo en el gen *MTHFR* y uno en *GSTP1* se asociaba en forma inversa a preeclampsia en relación a mujeres de origen asiático y caucásico. De igual forma sus resultados estuvieron de acuerdo al predominio de uno u otro alelo en otras patologías diferentes a preeclampsia.

Lo anterior descrito por Canto et al.<sup>22,24</sup>, y lo observado en nuestro estudio, posiblemente es secundario a nuestro acervo genético. La población mestiza-Mexicana está constituida por una mezcla de genes europeos y africanos con genes de indios nativos<sup>24</sup>, presentando una proporción de genes amerindios del 56%, de caucásicos del 40% y del 4% de genes africanos<sup>25</sup>. Según el Instituto Nacional de Antropología, un mestizo-Mexicano se define como una persona que nació en México, tiene un apellido derivado del español, y tiene una familia de antepasados mexicanos de tres generaciones<sup>26,27</sup>.

## **CONCLUSIONES**

- Nuestros resultados sugieren que Glu298Asp presentó una tendencia a asociarse a ERCT secundaria a hipertensión arterial sistémica en pacientes mestizos-Mexicanos.
- Observamos que a diferencia de otros grupos étnicos, el alelo Asp pudiera jugar en nuestra población un rol de protección.
- La discrepancia en nuestros resultados y lo descrito previamente en otras poblaciones, puede ser debido a las limitaciones en el poder estadístico en nuestra muestra, por lo cual, no se descarta una posible asociación.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo de estudio: **Asociación entre Enfermedad Renal Crónica Terminal y el polimorfismo de eNOS Glu298Asp en población mexicana.**

Existen algunos estudios en el mundo que revelan que la presencia de una modificación genética del ácido glutámico por ácido aspártico en la posición 298, es un factor de riesgo para llegar a la falla renal terminal si se padece enfermedad renal crónica. El objetivo del estudio es detectar en nuestra población mestizo americana quienes tienen esta variación genética y quienes no.

Para ello, se tomará una muestra de sangre la cual será procesada en el laboratorio. Al final del estudio se les dará a los participantes el resultado. El procedimiento no tiene efectos adversos y únicamente se requiere una muestra de sangre.

El paciente tendrá en todo momento la posibilidad de retirarse del estudio. Los resultados del estudio son confidenciales y se darán a cada participante de manera individual.

Yo \_\_\_\_\_ acepto participar en el protocolo "Asociación entre Enfermedad Renal Crónica Terminal y el polimorfismo de eNOS Glu298Asp en población mexicana" ya se me ha explicado que se tomará una muestra de mi sangre y esta será procesada en el laboratorio para identificar si tengo o no una característica genética. No existen riesgos en la realización del estudio, por el contrario con mi autorización contribuyo a generar mayor conocimiento sobre la enfermedad renal en población mexicana.

Nombre y firma del paciente \_\_\_\_\_

Nombre y firma de Testigo \_\_\_\_\_

Nombre y firma de Testigo \_\_\_\_\_

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

Dra. O. Alejandra Orozco Guillén

Residente de 3er año de Nefrología

Octavo piso de la Torre de consulta externa de CMN 20 noviembre

Vo Bo PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA

Dr. Abel archundia Tel. 5200 5003

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cervantes López M. Enfermedad Renal Crónica y su Atención Mediante tratamiento sustitutivo en México. 2010<sup>1ª</sup>ed. Facultad de medicina UNAM
- 2.- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis 2002;39(suppl 1):S1-S266.
- 3.- Early identification and Management of Chronic Kidney Disease in Adults in Primary and Secondary Care. <http://www.nice.org.uk/cg73>
- 4.- Asakimori T, Yorioka N, Tanaka J, Takasugi N, Harada S, Shigemoto K et al. Association Between ENOS Gene Polymorphism and Cardiovascular Events in Nondiabetic Hemodialysis Patients: A Prospective Study. Am J Kidney Dis 44:112-120.
- 5.- INEGI. Dirección General de Estadística. [www.inegi.org.mx/insuficienciarenalcronicaenmexico/](http://www.inegi.org.mx/insuficienciarenalcronicaenmexico/)
- 6.- Yumiko T, Nishijima O, Yokomizo T, Tokunaga T. Et al. Association of eNOS Glu298Asp Polymorphism With end-Stage Renal Disease Hypertension 2002;40;535-540
- 7.- Nagasses, Suzuki H, Wang Y, et al(2003) Association of ecNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. Molecular and cellular Biochem 244:113-118.
- 8.- He Y, Fan Z, Zhang J et al (2011) Polymorphisms of eNOs gene are associated with diabetic nephropathy: a meta-analysis. Mutagenesis 26(2)339-349.
- 9.- Indian J Med Res.2011, May:133(5):487-491

- 10.- Wei D, Shan J, Chen Z, Shi Y. The G894T mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary atherosclerotic heart disease in Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2002; 19 : 471-4
- 11.- Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 : 1083-7.
- 12.- Agema WRP, De Maat MPM, Zwinderman AH, Kastelein JJP, Rabelink TJ, Boven JV, *et al.* An integrated evaluation of endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphisms and coronary artery disease in men. *Clin Sci* 2004; 107 : 255-61.
- 13.- Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31 : 1506-10.
- 14.- Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, *et al.* Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 2002; 87: 525-8.
- 15.- Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE: The *MTHFR* C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1198-1203.
- 16.- Hubner RA, Houlston RS: *MTHFR* C677T and colorectal cancer risk: A meta-analysis of 25 populations. *Int J Cancer* 2006; 120: 1027-35.

- 17.-Zintzaras E, Koufakis T, Ziakas PD, Rodopoulou P, Giannouli S, Voulgarelis M: A meta-analysis of genotypes and haplotypes of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Epidemiol* 2006; 21: 501-10.
- 18.- Luiking YC, Engelen M, Deutz N. Regulation of Nitric Oxide Production in Health and Disease. *Current Opin Nutr Metab Care*,2012 January;13(1):97-104
- 19.- Serrano N, Diaz L, Casas J, Dingorani A, Moreno de Luca D, Paez M. Frequency of eNOS polymorphisms in the Colombian general population. *BMC Genetics* 2010, 11:54
- 20.- Zintaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO Synthase Gene Polimorphisms and Hypertension A Meta- Analysis. *Hypertension*. 2006;48:700-710.
- 21.- Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky S, Association of eNOS Glu298Asp Polimorphism with End – Stage Renal Disease. *Hypertension* 2002;40:535-540.
- 22.- Canto-Cetina ET al. Analysis of Polimorphism en genes(AGT, MTHFR,GPIIIa and GSTP1)Associated with Hypertension, Trombophilia and Oxidative Stress in Mestizo American population In Mexico.
- 23.- Olguin LD, Coral-VAZQUEZ rm, canto Cetina T et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Haplotypes are associated with preeclampsia in maya mestizo women.
- 24.- R. Lisker, E. Ramirez, R. Perez-Briceño, J. Granados and V. Babinsky, Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers, *Hum Biol* **62** (1990), 791–801.

- 25.-C. Bekker-Mendez, J.K. Yamamoto-Furusho, G. Vargas-Alarcón, D. Ize-Ludlow, J. Alcocer-Varela and J. Granados, Haplotype distribution of class II MHC genes in Mexican patients with systemic lupus erythematosus, *Scand J Rheumatol* **27** (1998), 373–376.
- 26.- C. Gorodezky, C. Alaez, M.N. Vázquez-García, G. de la Rosa, E. Infante, S. Balladares, R. Toribio, E. Pérez-Luque and L. Muñoz, The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites, *Hum Immunol* **62** (2001), 979–991.
- 27.- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), La población indígena en México, [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx) (2004).