

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRIA

**FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES R138Q Y R229Q DEL GEN NPHS2 EN
LOS PACIENTES CON SINDROME NEFROTICO PRIMARIO Y SU CURSO
CLINICO**

Tesis que presenta:

DR. JOSÉ MANUEL UBILLO SÁNCHEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE NEFROLOGIA PEDIÁTRICA

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dr. DIEGO J. ARENAS ARANDA
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana
Centro Médico Nacional Siglo XXI

TUTOR:

Dra. ALEJANDRA AGUILAR KITSU
Jefe del servicio de Nefrología Pediátrica
Hospital de Pediatría CMN SXXI

ASESOR METODOLOGICO:

Dr. MIGUEL ANGEL VILLASIS KEEVER

LUGAR DE PRESENTACION:

Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI

Fecha de Presentación:

31 de Octubre de 2013



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.

INDICE

| | Pág. |
|--------------------------------------|------|
| RESUMEN..... | 3 |
| INTRODUCCION..... | 4 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 11 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACION | 12 |
| JUSTIFICACION..... | 13 |
| HIPOTESIS..... | 14 |
| OBJETIVOS..... | 15 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 16 |
| DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO..... | 17 |
| DEFINICION DE LAS VARIABLES..... | 19 |
| ANALISIS ESTADISTICO..... | 22 |
| ASPECTOS ETICOS..... | 22 |
| RESULTADOS..... | 23 |
| DISCUSION..... | 32 |
| CONCLUSIONES..... | 39 |
| ANEXOS..... | 40 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 45 |

RESUMEN

FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES R138Q Y R229Q DEL GEN NPHS2 EN LOS PACIENTES CON SÍNDROME NEFRÓTICO PRIMARIO Y SU CURSO CLÍNICO. Aguilar MA, Villasis MA, Ubillo JM, Arenas D.

OBJETIVOS: Establecer la frecuencia de las mutaciones R138Q y R229Q en los pacientes con síndrome nefrótico atendidos en la consulta externa del HPCMN SXXI. Describir el curso clínico y tratamiento médico de los pacientes con las mutaciones R138Q y R229Q y compararlos con aquellos que no las presentan.

MATERIAL Y METODOS: Estudio transversal, comparativo, analítico. Realización en la Clínica de Síndrome Nefrótico del HPCMN Siglo XXI y Unidad de Investigación Médica de Genética Humana del HPCMN SXXI. Se identificaron a los pacientes con el diagnóstico de síndrome nefrótico primario de la clínica de síndrome nefrótico, en el periodo de enero del 2010 a diciembre del 2011 con un seguimiento mínimo de 6 meses. Se tomó una muestra sanguínea para extracción de DNA y búsqueda de las mutaciones R138Q Y R229Q en el gen NPHS2 utilizando primers. *Análisis estadístico:* los resultados se presentan como frecuencias simples y porcentajes, así como con medianas y valores mínimo y máximo. Se compararon grupos con prueba exacta de Fisher y U-Mann Whitney.

RESULTADOS: Se invitó a participar en el estudio a 160 pacientes que acudieron a consulta externa, de los cuales 28 aceptaron, 82% eran del sexo masculino. La mediana para la edad al diagnóstico fue de 3 años, el tiempo de evolución tuvo una mediana de 3 años 9 meses. 67.8% fueron catalogados como corticorresistentes y 32.1% como corticosensibles. Todos los pacientes recibieron esquema con esteroides, todos los corticorresistentes tuvieron esquemas combinados, el 53% con ciclosporina y 26% con ciclofosfamida, el resto con otros inmunomoduladores. Al momento del estudio todos los corticosensibles se encontraban en remisión, en cambio los corticorresistentes el 52% en remisión total, 26% se encontraban activos y 21% en remisión parcial. Se realizó biopsia renal a los 19 corticorresistentes, en 12 se encontró proliferación mesangial. En 4 pacientes se identificó alguna mutación, 3 era corticorresistentes y un corticosensible. Se reportó una delección de timina en la posición 647, dos casos con R229Q y un cambio de aminoácido en Q215Q. No se encontró el cambio R128Q. La edad al diagnóstico de los pacientes con mutación fue de 70 meses, el predominio fue de sexo femenino ($p=0.01$). La tasa de filtrado glomerular y de creatinina sérica al diagnóstico y al momento del estudio se mantuvieron en parámetros normales en ambos grupos, la proteinuria fue mayor en pacientes con mutación al diagnóstico, así como la duración de administración de ciclosporina fue mayor en los pacientes con mutación con una variación de 2 a 11 años.

CONCLUSIONES: La frecuencia de mutaciones asociados al gen NPHS2 en este estudio fue del 15%. No hubo correlación de la evolución clínica. Es conveniente continuar con la búsqueda de polimorfismos en niños con síndrome nefrótico para ofrecer en un futuro un tratamiento dirigido para evitar la progresión hacia la enfermedad renal crónica.

INTRODUCCION

El síndrome nefrótico (SN) se caracteriza por la presencia de proteinuria, hipoalbuminemia, edema, hiperlipidemia. El término idiopático fue usado para describir a un grupo heterogéneo que condicionaban glomerulopatías con pérdida de proteínas que ocurrían predominantemente en los niños. Sin embargo, en los últimos años se replanteo el concepto tomando en cuenta las mutaciones genéticas que alteran los componentes de la barrera glomerular.ⁱ

La incidencia anual del síndrome nefrótico es de 2 a 7 casos por cada 100,000 niños menores de 18 años y con una prevalencia de cerca de 16 casos por cada 100,000 personas, lo que lo convierte en una enfermedad relativamente común en niños.ⁱⁱ

El síndrome nefrótico de cambios mínimos (SNCM) ocupa el 76% de los casos de nefropatía en niños de 1 a 12 años y el 43% de los jóvenes de 13 a 19 años, con un aparente pico de aparición entre los 2 y 3 años. La ocurrencia familiar se reporta hasta en el 3.3%, afectando con mayor frecuencia a los hermanos.ⁱⁱⁱ Por definición, no presenta anormalidades en inmunoglobulinas, complemento o biopsias renales por microscopia de luz. Las posibles anormalidades se observan únicamente a nivel ultraestructural siendo lo principal el borramiento de los procesos podocitarios de las células epiteliales viscerales.^{iv}

Solo el 10% de los niños con síndrome nefrótico primario no responden a los esteroides y representa un factor de mal pronóstico.^v La corticorresistencia se define como la persistencia de proteinuria después de 4 semanas de dosis altas

de prednisona oral (60mg/m²SC/d) seguidos de la administración en días alternos por 4 semanas de prednisona. Dicha condición se considera como factor pronóstico para complicaciones extrarrenales.^{vi}

Las lesiones histológicas vistas en el síndrome nefrótico (SN) idiopático corticorresistente son: lesiones glomerulares mínimas (LGM), proliferación mesangial difusa (PMD), así como la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS).^{vii} El hecho de que existan pacientes cuyas biopsias en un inicio sean compatible con cambios mínimos y después se demuestre proliferación mesangial difusa o glomeruloesclerosis hace pensar que estos tres tipos histológicos en el síndrome nefrótico primario sean un espectro de la misma enfermedad.^{viii}

A 10 años, el 30-40% de los pacientes con SN corticorresistente puede desarrollar insuficiencia renal terminal.^{ix} Sin embargo, también otros factores pueden contribuir a complicación, como los hallazgos histológicos de la biopsia inicial. Laercio y col. al analizar la histopatología de 85 pacientes pediátricos, encontraron que en los 21 pacientes corticorresistentes, el 48% tenía lesión membranoproliferativa, siguiendo en frecuencia la lesión glomerular de cambios mínimos (24%) y la esclerosis focal y segmentaria (19%).^x

En la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), aproximadamente el 80% de los pacientes no responde a esteroides. Salomón y colaboradores han reportado que el 60% de los pacientes desarrollan insuficiencia renal crónica en un periodo de diez años. La lesión glomerular y túbulo intersticial en esto niños es muy grave y si la uremia se alcanza en un tiempo menor de dos años existe el

riesgo de recurrencia en el injerto. Hasta el 30% de los pacientes que desarrollan enfermedad renal crónica pueden presentar recurrencia posterior al trasplante renal.^{xi}

En estos momentos, con respecto al SN se está estudiando la asociación con cambios en algunos genes que determinan la evolución y sobre todo el posible tratamiento. Estos genes codifican los elementos estructurales de la barrera de filtración como la hendidura diafragmática y el citoesqueleto de los podocitos (NPHS1, NPHS2, CDA2P, TRCP6, ACTN4), otros se expresan en la membrana basal glomerular (LAMB2) y en la mitocondria (C0Q2). También se incluyen genes del grupo de factores de transcripción necesarios para el funcionamiento y desarrollo normal de los podocitos (WT1, LMX1B).^{xii}

El gen NPHS2 codifica para la proteína podocina con expresión única a nivel renal. Es una proteína de 383 aminoácidos, compuesta por una porción N - terminal de 102 aminoácidos de un dominio transmembrana de 16 a 18 aminoácidos.^{xiii} La mutación del gen NPHS2 se ha visto relacionada con el síndrome nefrótico corticorresistente de inicio temprano. *In vivo* se encuentra que la nefrina está ubicada en la hendidura del diafragma e interactúa con la podocina en unión con la proteína asociada a CD2 (CD2AP). La podocina y la nefrina (codificada por el gen NPHS1), se unen al citoesqueleto del podocito (proteínas transmembrana) y su disrupción no sólo afecta el diafragma de hendidura, sino la integridad de todo el proceso podocitario.^{xiv}

Se han identificado mutaciones en NPHS2 en la mayoría de las familias con GEFS autosómico recesiva (ARFSGS) y en algunos casos esporádicos.^{xv} En una población europea se hizo una búsqueda intencionada de mutaciones del gen NPHS2 en 671 pacientes con SN esporádico y en 205 casos familiares, identificándola en el 20.8% y 45-55% respectivamente. La mayoría de los sujetos reclutados eran niños con SN corticorresistente.^{xvi}

La importancia de las mutaciones asociadas a podocina en SN heterocigotos aún no es clara, ya que GEFS asociada a mutaciones NPHS2 es una condición recesiva que requieren un defecto molecular de ambos alelos para determinar un efecto patológico.^{xvii} También es evidente que las mutaciones heterocigotas no siempre se asocian con proteinuria, el mejor ejemplo son los padres de pacientes portadores de mutaciones esporádicas homocigotos que son, por definición, sanos.^{xviii} Mientras que los estudios en familiares de pacientes afectados deben realizarse a fin de excluir proteinuria subclínica, las posibilidades del papel patogénico de las mutaciones del NPHS2 debe tenerse en cuenta. La primera posibilidad es que la mutación de los genes de la podocina probablemente tenga por objeto las secuencias reguladoras o no mutaciones en regiones codificantes. Una segunda posibilidad es la concomitancia de las mutaciones en uno o más genes que podría producir un efecto aditivo en el marco de una herencia multigénica. Un mecanismo final y, probablemente más plausible para explicar la proteinuria en los portadores heterocigotos, está relacionado con cierta susceptibilidad para desarrollar proteinuria, donde otros factores genéticos pueden representar algún papel patogénico.^{xix}

Se han reportado más de 50 mutaciones NPHS2, tanto homocigotas o heterocigotas, en 79 pacientes con un carácter familiar y 54 casos esporádicos. Las mutaciones reportadas involucran toda la longitud del gen. Los estudios hasta ahora publicados se refieren de la población europea donde la mutación R138Q es más frecuente en Alemania y Francia en 45%, y la variante P20L se observó principalmente en Italia y Turquía. Un caso único implica la presencia de mutaciones heterocigotas NPHS2 asociadas con la variante R229Q que puede ser un polimorfismo con efectos funcionales. Esta asociación se encontró en 33 casos familiares y en 2 SN esporádicos.^{xx}

Específicamente, no se conoce la frecuencia del alelo de la variación de la secuencia R229Q, pero se ha descrito en individuos sanos del 3% al 13%. En EUA se reportó en 1,577 personas sanas una asociación entre R229Q con microalbuminuria en la población general, lo que sugiere una interacción más compleja de esta variante.^{xxi} Tsukaguchi, et al. es su estudio donde se incluyeron 30 familias con GEFS y herencia autosómico recesiva, así como 91 pacientes con GEFS primario. En 6 se presentó mutación heterocigoto en el aminoácido R229Q. Purificando las proteínas podocina y nefrina *in vitro* se estudió el efecto de esta mutación, revelando una disminución en la adhesión de ambas proteínas. Por lo que las mutaciones R229Q únicas, parecen ser insuficientes para causar GEFS, pero aumentan la susceptibilidad al daño renal en estado heterocigoto.^{xxii}

En otro estudio realizado en 2002 se reportó que la mutación más comúnmente encontrada en la población del norte de Arabia y Europa era la alteración en R138Q, tanto en homocigotos como en heterocigotos, en 21 de 165

familias y 19 de 253 niños con GEFS. La mutación del alelo R138Q de la podocina mantiene dentro del retículo endoplasmático, no permitiendo la adecuada interacción con la nefrina.^{xxiii} Weber et al. reportó que la mutación R138Q está asociada con la aparición temprana (11.8 ± 3.2 meses en 15 pacientes), y los portadores de la variante R229Q presentan un inicio tardío de la proteinuria, en general, entre la primera y segunda década de la vida respuesta a las drogas.^{xxiv}

Existen pocas publicaciones sobre la evolución hacia la insuficiencia renal crónica terminal en pacientes con mutaciones. En un estudio prospectivo con 34 pacientes que tenían mutación esporádica NPHS2 y 10 casos familiares, se describe que 12 pacientes con mutación esporádica progresaron a insuficiencia renal terminal después de 73 meses (rango 6-155) desde el inicio de la proteinuria; mientras que nueve con mutación familiares, la desarrollaron después de un seguimiento a 76 meses (rango 18-162).^{xxv}

Se realizó una revisión en 48 pacientes con mutaciones NPHS2, homocigotas o heterocigotas, incluyendo R138Q y 15 con R229Q asociada con otra mutación NPHS2. GEFS fue el rasgo predominante en 39 pacientes del primer grupo y en 15 del grupo NPHS2 R229Q heterocigotos. En las biopsias de diez pacientes, se reportaron como de cambios renales leves; con proliferación mesangial con depósitos de IgM en 8 casos y, 2 pacientes con cambios mínimos. En uno hubo un depósitos de C3 inespecíficos. Por lo tanto, la histopatología renal no es sugestiva de una enfermedad hereditaria asociada con mutaciones NPHS2.^{xxvi}

En nuestro país, se reportan dos estudios relacionado a la característica del síndrome nefrótico primario, el primer estudio es en las edades no habituales en el Hospital de Pediatría en la ciudad de Guadalajara en el cual se refiere que no se encontró un predominio de género y que la lesión histopatológica mas frecuente asociada es la proliferación mesangial difusa^{xxvii}; el segundo estudio se realizo en el Hospital de Pediatría de Centro Medico Nacional Siglo XXI en el cual es un estudio retrospectivo con los pacientes de síndrome nefrótico corticorresistentes donde se determino resultados de la remisión y supervivencia renal encontrándose una remisión similar y con frecuencia de menor progresión a la enfermedad renal a lo que se reporta en la literatura^{xxviii}.

Actualmente no se cuentan con reportes en la literatura sobre correlación entre las alteraciones renales asociadas a mutaciones de NPHS2 y la respuesta al tratamiento en los pacientes que han sido catalogados como síndrome nefrótico corticosensibles o corticorresistentes, por lo que se debería determinar la expresión de las mutaciones R138Q y R229Q en los pacientes con síndrome nefrótico del HPCMNSXXI así como su respuesta al tratamiento y su evolución a la insuficiencia renal crónica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Servicio de Nefrología Pediátrica del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI cuenta con la clínica de Síndrome Nefrótico aproximadamente desde 1995. La experiencia con el manejo de los pacientes corticorresistentes ha mostrado un difícil control y más de la mitad de ellos requieren de manejo farmacológico de alto costo. Debido a esto, hemos llevado a cabo estrategias terapéuticas para poder tratar a los pacientes con resultados parcialmente positivos. Por otra parte, por lo menos una tercera parte de los pacientes en los que intentan estas estrategias terapéuticas no responden o solo parcialmente.

Consideramos necesario identificar la frecuencia de mutaciones R138Q y R229Q del gen NPHS2 en nuestra población ya que si desde un inicio se tiene el reporte de la mutación en un paciente de primera vez, se podría optimizar el tratamiento farmacológico y establecer su pronóstico.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la frecuencia de las mutaciones R138Q y R229Q del gen NPHS2 en los pacientes con síndrome nefrótico primario corticosensibles y corticorresistentes que asisten a la consulta externa del Hospital de pediatría Centro Médico Nacional SXXI?

¿Existe diferencia en el curso clínico de los pacientes con síndrome nefrótico primario que presentan las mutaciones R138Q y R229Q del gen NPHS2, con respecto a aquellos que no las presentan?

JUSTIFICACIÓN

El síndrome nefrótico es una de las principales glomerulopatías en la infancia, con deterioro de la función renal en algunos casos, sobre todo aquellos sin respuesta a tratamiento inicial. De acuerdo a los reportes de la literatura internacional, el paciente con síndrome nefrótico portador de las mutaciones R138Q y R229Q del gen NPHS2 presenta peor pronóstico, y el saber la frecuencia en nuestra población y su correlación con la evolución clínica, optimizaría los recursos y el pronóstico de los pacientes. Se hace necesario determinar la relación de las mutaciones NPHS2 (R138Q y R229Q) con respecto a la respuesta al tratamiento, para determinar si es conveniente incluir su detección, como parte del protocolo diagnóstico y terapéutico, con lo cual posiblemente se puedan disminuir recaídas y remisiones parciales. Con esta información, aquellos pacientes con la presencia de éstas mutaciones podrían recibir de manera temprana un manejo adecuado para disminución de las complicaciones y progresión hacia el daño renal, y así intentar lograr un mejor control de la enfermedad y correlacionarlo con el tratamiento.

HIPOTESIS

1. Hasta el 10% de los pacientes con síndrome nefrótico primario que asisten a la consulta externa del Hospital de pediatría Centro Médico Nacional SXXI presentan mutaciones R138Q y R229Q del gen NPHS2
2. Los pacientes con las mutaciones R138Q y R229Q del gen NPHS2 presentarán evolución hacia la corticorresistencia en un 60% y deterioro de la función renal en un 30%.

OBJETIVOS

Generales

- Establecer la frecuencia de las mutaciones R138Q y R229Q en los pacientes con síndrome nefrótico atendidos en la consulta externa del Hospital de pediatría Centro Médico Nacional SXXI

Específicos

- Describir el curso clínico y tratamiento médico de los pacientes con síndrome nefrótico que presentan las mutaciones R138Q y R229Q
- Comparar el curso clínico y tratamiento médico de los pacientes con síndrome nefrótico que presentan las mutaciones R138Q y R229Q con aquellos que no las presentan

MATERIAL Y METODOS

Lugar de Realización

Clínica de Síndrome Nefrótico del Hospital de Pediatría de UMAE Centro Médico Nacional Siglo XXI y Unidad de Investigación Médica de Genética Humana del Hospital de Pediatría UMAE CMN SXXI

Diseño del estudio

Transversal, comparativo, analítico.

Población de Estudio.

Pacientes pediátricos con diagnóstico de síndrome nefrótico primario, adscritos al servicio de Nefrología Pediátrica, del Hospital de Pediatría UMAE CMN SXXI.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico clínico y bioquímico de síndrome nefrótico primario.
2. Edad menor de 17 años.
3. Pacientes que firmen la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con síndrome genético ya establecido que se asocie con síndrome nefrótico primario.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

Se identificaron a todos los pacientes con el diagnóstico de síndrome nefrótico primario que asistieron a la clínica de Síndrome Nefrótico del Hospital de Pediatría, UMAE, Centro Médico Nacional Siglo XXI en el periodo comprendido de enero del 2010 a diciembre del 2011 con un seguimiento mínimo de 6 meses.

Una vez informados los tutores y pacientes de las implicaciones de su participación se solicitó la firma de una carta de consentimiento; aquellos pacientes mayores de 8 años de edad se le solicitó su participación con la firma de la carta de asentamiento; y se les tomó una muestra sanguínea por venopunción con la obtención de 7ml, así como al familiar que los acompañaba en la consulta para muestra de referencia, con mención especial se tomaron muestras a dos hermanos con síndrome nefrótico así como a su padre.

Las muestras obtenidas se enviaron de manera rutinaria a la Unidad de Investigación Médica de Genética Humana del Hospital de Pediatría CMN SXXI. A partir de las muestras sanguíneas se realizó la extracción de DNA para NPHS2 utilizando primers para detección de las mutaciones en estudio, mediante la secuenciación de producto amplificado (Anexo 2).

Del expediente clínicos se tomaron los datos para la ficha de identificación del paciente, inicio de la enfermedad, tratamiento recibido y respuesta a este, así como reporte histológico de la biopsia, en caso de haberse realizado.

El esquema empleado en la clínica de Síndrome Nefrótico Corticorresistente es el inicio de ciclosporina a dosis de 2 a 5mg/kg/día, se

administra en dos dosis al día; el caso de presentar deterioro de la función renal o ciclosporinoresistencia (falta de después de 6 meses de tratamiento) se inician bolos de ciclofosfamida de 500 a 750 mg/m²/dosis, dividida en dos dosis, con administración mensual de los bolos los cuales pueden ser de 6 a 12 meses, dependiendo el momento en que se logre la respuesta. Si el paciente persiste activo después de 6 meses de administración de ciclofosfamida se le considera como falta de respuesta por lo que se hace el cambio a mofetil micofenolato (600 a 1200 mg/m²/día). Al iniciar cualquier esquema de tratamiento en los pacientes corticorresistentes se agrega prednisona a 1 mg/kg/día; si la proteinuria inicial es mayor de 100 mg/m²/hr se administran bolos de metilprednisolona a dosis de 10 mg/kg/día por tres días. A las 4 semanas se inicia la reducción de la prednisona. De persistir la proteinuria en rango nefrótico tras dos meses, a pesar del tratamiento con metilprednisolona, se valora el cambio de tratamiento de ciclosporina a ciclofosfamida o de ciclofosfamida a mofetil micofenolato.

La remisión completa del síndrome nefrótico se definió como la presencia de proteinuria menor de 4 mg/m²/hr y albumina sérica mayor de 3.5 gr/dL. Remisión parcial es proteinuria entre 4 y menor de 40 mg/m²/hr o hipoalbuminemia entre 2.5 y 3.5 gr/dL. El síndrome nefrótico activo es cuando existe proteinuria mayor de 40 mg/m²/hr.

DEFINICION DE VARIABLES

| VARIABLE INDEPENDIENTE | | | |
|---|--|--------------------|-------------------------|
| VARIABLE | DEFINICION CONCEPTUAL | ESCALA DE MEDICION | CATEGORIA |
| MUTACION R229Q y R138Q EN EL GEN NPHS2 | Mutaciones puntuales que ocasiona el cambio del aminoácido arginina (R) a glutamina (Q). - Se realizo en una sola determinación | Nominal | Presente Ausente |

| VARIABLES DEPENDIENTES | | | |
|--|--|--------------------|--|
| VARIABLE | DEFINICION CONCEPTUAL | ESCALA DE MEDICION | CATEGORIA |
| EDAD AL DIAGNÓSTICO DEL SINDROME NEFRÓTICO | Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha en que se realiza el diagnóstico de síndrome nefrótico | Cuantitativa | Años |
| RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ESTEROIDES | Situación de respuesta al tratamiento con esteroides en el síndrome nefrótico. Corticosenible: remisión completa dentro de las primeras 8 semanas de tratamiento con esteroides. Corticorresistente: persistencia de proteinuria patológica al cabo de 8 semanas de tratamiento con esteroides incluyendo aquellos que recibieron tres bolos de metilprednisolona. Se catalogo en un solo momento | Nominal | Corticosenible Corticorresistente |
| TRATAMIENTO RECIBIDO EN PACIENTES CORTICORRESISTENTES | Esquema de medicamento recibido Ciclosporina, Ciclofosfamida, Ciclofosfamida - ciclosporina, | Nominal | Ciclosporina, Ciclofosfamida, Ciclofosfamida-ciclosporina, |
| DETERIORO DE LA FUNCION RENAL (ENFERMEDAD RENAL CRONICA) | - Daño renal por tres o más meses, definido por anomalías del riñón estructurales o funcionales, con o sin disminución de la filtración glomerular (FG), manifestado por anomalías patológicas o marcadores de daño renal, incluyendo anomalías en la composición de la sangre u orina o anomalías en los estudios por imágenes - Filtrado glomerular < 60 ml por minuto por 1,73 m ² durante tres meses o más, con o sin daño renal | Nominal | Si No |

| TIEMPO DE SEGUIMIENTO A DAÑO RENAL | - Se realizo en dos determinaciones Periodo de tiempo transcurrido entre el diagnóstico y daño renal | Cuantitativa | Meses |
|------------------------------------|---|--------------|---|
| ALTERACION HISTOLOGICA | <p>Cambios Mínimos: cambios histológicos mínimos en el glomérulo con el microscopio de luz, en la inmunofluorescencia con hallazgo de ausencia completa de complejos inmunes, fibrina y otros materiales extraños, en la microscopia electrónica los cambios están restringidos a las células epiteliales viscerales del glomérulo</p> <p>Proliferación Mesangial: Incremento patológico de la matriz mesangial, de las células del mesangio o de ambas.</p> <p>Glomeruloesclerosis focal y segmentaria: lesión glomerular que se caracteriza por ser focal y segmentaria, esto es, que afecta algunos glomérulos y parte del ovillo glomerular. Los otros glomérulos son Ópticamente normales o presentan leves alteraciones.</p> <p>Glomérulonefritis membranoproliferativa: glomérulonefritis crónica que se caracteriza histológicamente por proliferación de las células del mesangio, incremento en la matriz mesangial, y engrosamiento de las paredes de los capilares del glomérulo. El engrosamiento de las paredes se dice algunas veces que es resultado de la interposición de citoplasma mesangial o de la matriz entre la membrana basal y el endotelio de la pared capilar</p> <p>Glomérulonefritis membranosa: Enfermedad glomerular que se manifiesta clínicamente por proteinuria, y en ocasiones por otras características del síndrome nefrótico. Histológicamente se caracteriza por depósitos en la pared del capilar glomerular entre la célula epitelial y la membrana basal y por un engrosamiento de la membrana. También son características unas proyecciones hacia afuera de la membrana entre los depósitos epiteliales en forma de "púas".</p> <p>- Se realiza en una sola determinación</p> | Nominal | <p>Cambios mínimos</p> <p>Proliferación mesangial</p> <p>Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria</p> <p>Glomérulonefritis Membranoproliferativa</p> <p>Glomérulonefritis membranosa</p> |

VARIABLE UNIVERSAL

| VARIABLE | DEFINICIONCONCEPTUAL | ESCALA DE MEDICION | CATEGORIA |
|----------|--|--------------------|-----------------------|
| SEXO | Relacionado con la biología y la identidad sexual de los seres vivos, hoy en día es mayormente utilizado para hacer referencia a las diferencias sociológicas que se establecen en los individuos de una sociedad de acuerdo al género que pertenecen. | Nominal | Masculino Femenino |

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis descriptivo: fue de acuerdo con la escala de medición de las variables.

Las variables con escala de medición cuantitativa se presentan con mediana y valores mínimos y máximos, ya que no tuvieron distribución normal. En el caso de variables cualitativas, se expresan en porcentajes y frecuencias simples.

Análisis inferencial: la comparación de las variables cualitativas entre grupos fue con la prueba exacta de Fisher; mientras que las cuantitativas, con U Mann Whitney.

Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0

ASPECTOS ETICOS

De acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, el estudio correspondió a la clasificación de riesgo mínimo, ya que se realizó una sola toma de sangre de 7 ml. Se solicitó consentimiento informado a los padres, informándoles sobre el objetivo del estudio y a los mayores de 8 años de edad su asentimiento bajo informado. El proyecto fue autorizado por el Comité Local de Investigación y Ética, con el número de registro: 2011-3603-50 (Anexo 1).

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 las mutaciones R138Q y R229Q, se utilizó la base de datos, números de folio para identificar a los pacientes participantes en el proyecto y de esa forma conservar el anonimato.

RESULTADOS

Durante los primeros meses del año 2011 se realizó una revisión de los registros de pacientes atendidos en la clínica de síndrome nefrótico del servicio de Nefrología del Hospital de Pediatría, y se identificaron aproximadamente 270 pacientes. Entre mayo y junio del 2011 se invitó a participar en el estudio a 160 pacientes que acudieron a su consulta externa, de los cuales 28 aceptaron. La estrategia para la participación fue tomar la muestra sanguínea durante la consulta, se tomó muestra sanguínea a los pacientes así como a un familiar sano como control para el procesamiento de la muestra.

De los 28 pacientes estudiados, 23 eran de sexo masculino (82%) y, la mediana edad al momento de la evaluación fue de 11 años (mín. 2 – máx. 17 años); mientras que la mediana de la edad al diagnóstico de síndrome nefrótico fue de 3 años (mín. 1 – máx. 14 años). En tanto que el tiempo de evolución, desde el diagnóstico hasta el momento de la evaluación, tuvo una mediana de 3 años 9 meses (mín. 2 meses – máx. 15 años).

Del total, 19 (67.8%) fueron catalogados con síndrome nefrótico corticorresistente y 9 (32.1%) corticosensible. Los pacientes corticosensibles tenían menor tiempo de seguimiento (mediana 2 años 4 meses; mín. 2 meses - máx. 6 años 1 mes), que los corticorresistentes (mediana 11 años; mín. 4 meses - máx. 15 años). Como se observa en el Cuadro 2, todos los pacientes recibieron tratamiento con esteroides; mientras que todos los corticorresistentes tuvieron esquemas combinados con esteroide, siendo la mayor proporción (53%) con ciclosporina, seguido de ciclofosfamida (26%), los otros inmunomoduladores empleados fueron

mofetil micofenolato y azatioprina. En el momento del estudio, con el tratamiento instituido todos los pacientes corticosensibles se encontraban en remisión; en cambio, en los corticorresistentes el 52.6% (n=10) estaba en remisión total, 5 (26.3%) pacientes con síndrome nefrótico activo y 4 (21%) en remisión parcial.

En los 19 pacientes corticorresistentes se les realizó la biopsia renal, en los cuales en 12 se encontró proliferación mesangial difusa, 3 pacientes tuvieron datos compatibles con cambios mínimos, 2 casos de glomeruloesclerosis focal y segmentaria, 1 caso de glomérulonefritis membranoproliferativa tipo I y, en el último se reportó con cambios mínimos y proliferación mesangial focal.

Cuadro 1. Características generales de los 28 pacientes con síndrome nefrótico.

| | Total (n=28) | Corticosensibles (n=9) | Corticorresistentes (n=19) |
|---|------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| | Mediana (min-max) | Mediana (min-max) | Mediana (min-max) |
| Edad (años) | 11 (2-17) | 10 (2-17) | 14 (3-17) |
| Sexo | | | |
| Femenino | 5 (18)* | 2 (22) | 3 (16) |
| Masculino | 23 (82) | 7 (88) | 16 (84) |
| Edad al diagnóstico (años) | 3 (1-14) | 3 (1-12) | 3 (2-14) |
| Proteinuria (mg/m²/h) | | | |
| Inicial | 76 (44-629) | 60 (44-206) | 85 (47-629) |
| Final | 3.3 (0.4-291) | 2.2 (0.4-3.7) | 4.4 (1.1-291) |
| Creatinina (mg/dl) | | | |
| Inicial | 0.4 (0.1-5.3) | 0.4 (0.2-3.2) | 0.4 (0.1-5.3) |
| Final | 0.5 (0.3-0.8) | 0.4 (0.3-0.6) | 0.5 (0.3-0.8) |
| Función renal (ml/min/1.73m²SC) | | | |
| Inicial | 173.5 (12-376) | 112 (19-134) | 179 (12-376) |
| Final | 198 (45-376) | 136 (98-156) | 166 (45-376) |

Cuadro 2. Tratamiento y estado clínico de los pacientes con síndrome nefrótico.

| | Total (n=28) | Corticosenibles (n=9) | Corticorresistentes (n=19) |
|--|-----------------|--------------------------|-------------------------------|
| Tratamiento | | | |
| Esteroides | 9 (32)* | 9 (100) | |
| Esteroides, ciclosporina | 10 (36) | - | 10 (53) |
| Esteroides, ciclosporina, ciclofosfamida | 5 (18) | - | 5 (26) |
| Esteroides, ciclosporina, ciclofosfamida, otro [%] | 4 (14) | - | 4 (21) |
| Estado clínico en el momento de la evaluación* | | | |
| Remisión total | 19 (67.8)* | 9 (100) | 10 (52.6) |
| Remisión parcial | 4 (14.2) | - | 4 (21.0) |
| Activo | 5 (17.8) | - | 5 (26.3) |
| Mutación* | 4 | 1 | 3 |

*n (%)

%MMF y azatioprina

Pacientes en quienes se detectó con alguna mutación

Para la amplificación de los exones 5 y 3 del gen NPHS2, donde se podría localizarse las variantes R229Q y R138Q respectivamente, se realizó PCR punto final, con el fin de poder determinar la temperatura de alineación de los oligonucleótidos correspondientes a cada uno de los exones a estudiar. Posterior a las reacciones de PCR, para cada paciente, se realizó la reacción de secuenciación directa en un secuenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem, Massachusetts, EUA). Las variantes encontradas fueron secuenciadas por duplicado, en ambas cadenas del DNA.

De los 28 pacientes incluidos en el estudio, en 4 pacientes se identificó alguna mutación; de estos, 3 tenían síndrome nefrótico corticorresistente y 1 corticosensible. En el paciente corticosensible se identificó una delección de timina en la posición 647 del exón 5 del gen de NPHS2 (Fig.1); mientras que en los corticorresistentes, hubo 2 pacientes con R229Q y 1 con cambio de aminoácidos en las secuencias nucleótidos de Q215Q. No hubo casos con R138Q.

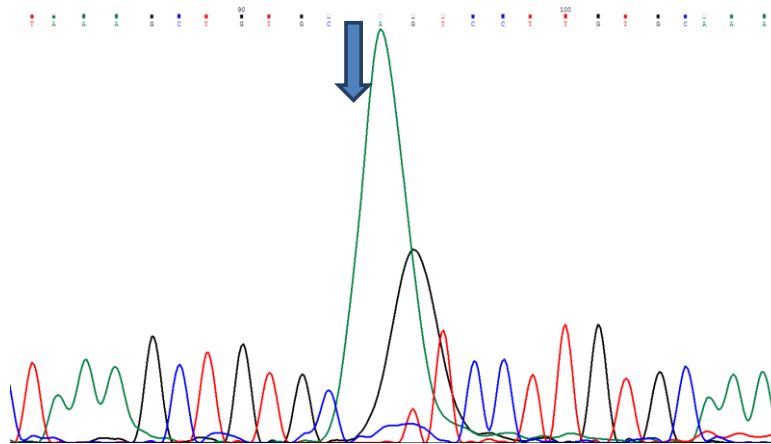


Fig. 1. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen NPHS2, del paciente corticosensible, comparado con un control sano. La flecha nos indica el sitio de las mutaciones encontradas en este paciente (delección de una timina).

El caso con síndrome nefrótico corticosensible correspondió a una paciente del sexo femenino con edad al diagnóstico de 7 años, en quien la evolución fue a la remisión total en el primer ciclo de esteroides. Sin embargo, presentó una recaída que se asoció a que las dosis y el tiempo del primer esquema de esteroides fue inadecuado. Posterior a reiniciar esquema con esteroides pero a dosis correcta, se logró nuevamente la remisión. Cabe señalar que durante su evolución no hubo deterioro de la función renal, por lo que no se consideró necesario realizar biopsia renal.

En cuanto a los 2 casos corticorresistentes positivos para R229Q, ambos fueron pacientes femeninos que tenían 2 y 10 años de edad en el momento del diagnóstico del síndrome nefrótico (Fig. 2 y 3). Se confirmó la corticorresistencia por falta de respuesta a esteroides durante 8 semanas. En las 2 pacientes, a fin de llevar a la pacientes a remisión, el tratamiento continuó con ciclosporina, siendo el tiempo de administración de 2 años para la primer paciente, con dosis de inicio de 3.1 mg/kg/día, pero al momento de alcanzar la remisión completa la dosis era 3.7 mg/kg/día. En la segunda paciente, la remisión fue a los 8 meses con una dosis

inicial de 3.1 mg/kg/día y, cuando se llegó a la remisión completa la dosis era de 5.4 mg/kg/día. Estas 2 pacientes tampoco presentaron deterioro de la función renal durante su evolución. En ambas pacientes la biopsia renal fue compatible con proliferación mesangial difusa.

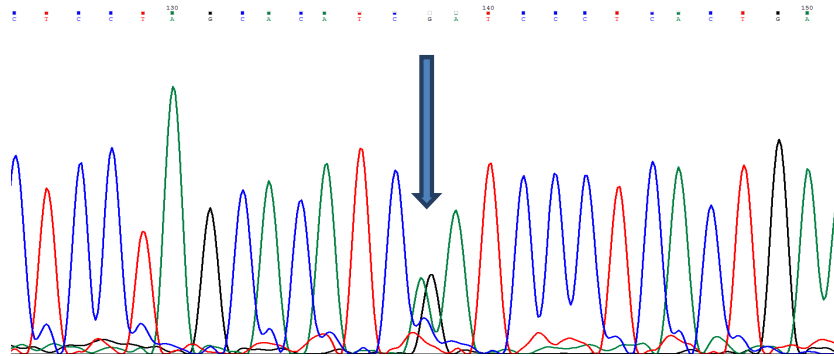


Fig. 2. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen NPHS2 del paciente corticorresistente de 2 años de edad comparándose con un control sano, la flecha señala para el polimorfismo R229Q.

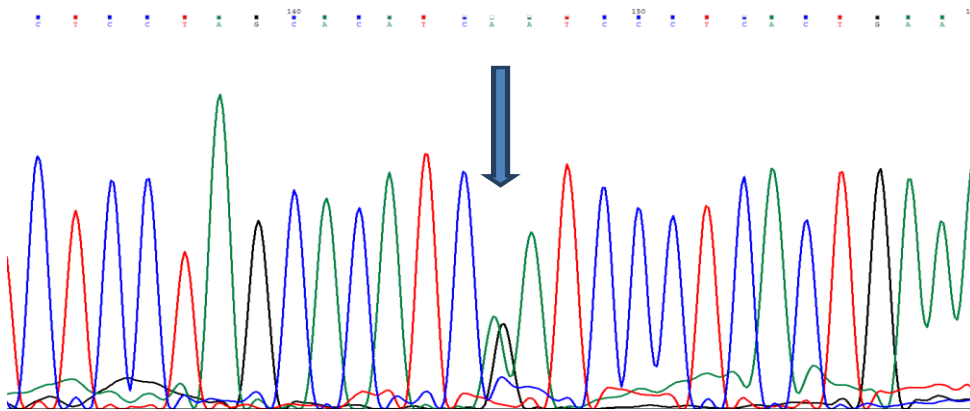


Fig. 3. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen NPHS2 del paciente corticorresistente de 10 años de edad comparada con un control sano, la flecha señala el polimorfismo R229Q.

Con respecto al paciente que presentó cambio de secuencia de nucleótidos Q215Q (Fig. 4), correspondió a un preescolar masculino, con edad al diagnóstico

de 4 años. La corticorresistencia se determinó después de no obtener respuesta al esquema completo de esteroide; por esta razón se inició ciclosporina a dosis de 3 mg/kg/día, cuya administración se mantuvo durante 11 años pero con incrementos paulatinos de la dosis hasta de 5 mg/kg/día. Durante este periodo se presentaron 4 recaídas relacionadas a infección de vías aéreas superiores; en estos episodios fue necesario incrementar las dosis. El reporte de la biopsia renal fue de proliferación mesangial difusa. Al momento de la realización de este estudio, el paciente se encontraba en remisión parcial (proteinuria de 30 mg/m²/h), y deterioro de la función renal (tasa de filtración 75 ml/min/1.73m²SC), con egreso posterior por mayoría de edad, siendo aún manejado con ciclosporina al momento de su egreso.

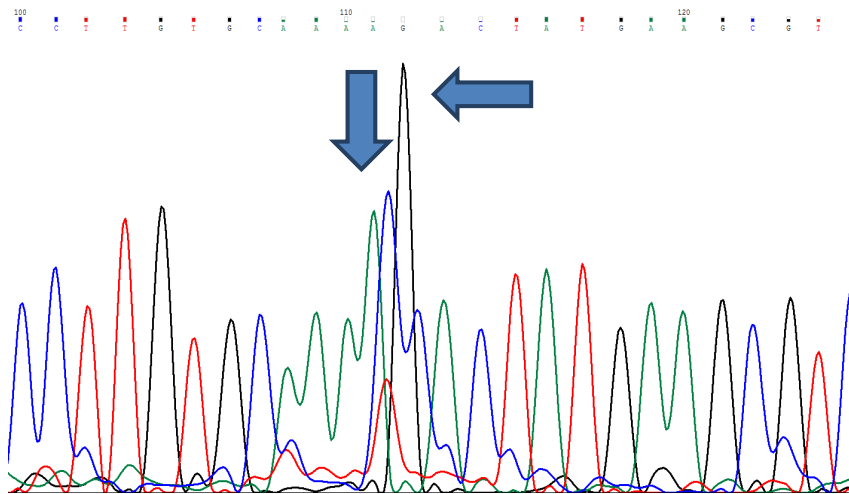


Fig. 4. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen NPHS2, del paciente corticorresistente, las flechas nos muestran las inserciones (A 657-658 y G 658-659), considerándose probable polimorfismo Q215Q. La secuencia fue comparada con un control sano.

Comparación del cuadro clínico considerando la presencia de mutación

A fin de identificar si existían diferencias en cuanto a su evolución y respuesta al tratamiento entre los pacientes con y sin presencia de alguna mutación, se construyó el Cuadro 3. Encontramos que la edad al diagnóstico en los pacientes que no presentaron mutación tuvo una mediana de 36 meses (18-171) siendo menor que en los pacientes que presentaron mutación, siendo la mediana de 70 meses (24-130). El predominio del sexo masculino fue mayor (22/24) en los pacientes que no se encontró mutación, ya que en 3/4 con mutación eran del sexo femenino, lo cual fue estadísticamente significativo ($p = 0.01$).

La creatinina sérica al diagnóstico en ambos grupos fue similar (0.5 y 0.4 mg/dL, respectivamente), pero es de destacar que un paciente en el grupo sin mutación tenía niveles de 5.3 mg/dL esta elevación asociado a un evento de necrosis tubular aguda. En el momento de la última evaluación, la mediana del grupo con mutación fue un poco más alta que el otro grupo, ya que un paciente tuvo una cifra de 2.1 mg/dL, sin alcanzar significancia estadística ($p = 0.07$). La tasa de filtrado glomerular tuvo una tendencia similar a los valores de creatinina, tanto al momento del diagnóstico como en la última evaluación; a pesar que en ambos grupos hubo pacientes con algún grado de deterioro de la función renal. Con respecto a la proteinuria se observó que, en el momento del diagnóstico, fue mayor en los pacientes con presencia de mutación (mediana 103.5 mg/m²/h vs. 76.5 mg/m²/h). Para el momento de última evaluación, las medianas de ambos grupos fueron de 1.5 y de 3.3 mg/m²/h, considerándose como remisión completa.

Finalmente, también se analizó el uso de ciclosporina como medicamento de primera línea en los pacientes corticorresistentes. En los pacientes con mutación, la variación del tiempo de administración varió desde 2 y hasta 11 años (mediana 5 años 1 mes), mientras que en quienes no tuvieron mutación el tiempo fue un poco menor: mediana de 3 años 10 meses (mín. 1 año, máx. 10 años). En cuanto a la dosis, la mediana en ambos grupos fue de 5mg/kg/día, siendo las dosis mínimas y máximas casi iguales.

Cuadro 3. Comparación de las características de los pacientes con síndrome nefrótico entre quienes se identificó y no se identificó mutación.

| Característica | Sin mutación (n=24) | Con mutación (n=4) | p |
|--|------------------------|-----------------------|------|
| | Mediana (min-max) | Mediana (min-max) | |
| Sexo | | | |
| Femenino | 2 (8.3)* | 3 (75) | 0.01 |
| Masculino | 22 (91.6) | 1 (25) | |
| Uso ciclosporina | 13 (54.2)* | 3 (75) | 0.41 |
| Corticorresistencia | 15 (62.5)* | 3 (75) | 0.54 |
| Proteinuria (mg/m²/h) | | | |
| Inicial | 76.5 (44-629) | 103.5 (47-144) | 0.87 |
| Última valoración | 3.3 (0.5-291) | 1.9 (0.4-30) | 0.18 |
| Creatinina sérica (mg/dl) | | | |
| Inicial | 0.4 (0.1-5.3) | 0.5 (0.2-0.6) | 0.46 |
| Última valoración | 0.5 (0.3-0.8) | 0.75 (0.4-2.1) | 0.07 |
| Tasa filtrado glomerular (ml/min/1.73m²SC) | | | |
| Inicial | 121(12-376) | 138 (98-173) | 0.92 |
| Última valoración | 150 (45-376) | 105 (72-158) | 0.12 |

* n (%)

DISCUSIÓN

La mutación NPHS2 (OMIM#604766) se reporta como el gen asociado con mayor frecuencia al síndrome nefrótico corticorresistente esporádico y siendo en la población pediátrica entre el 10 y 28% de los casos corticorresistentes esporádicos. Los últimos estudios realizados del síndrome nefrótico primario han identificado que existe una relación con mutaciones en el gen NPHS2, el cual codifica la proteína podocina con expresión única a nivel renal. Büscher et al, en 2010, publicó un estudio en población alemana de 91 pacientes pediátricos con síndrome nefrótico de los cuales 65 fueron corticorresistentes. Ellos buscaron mutaciones en los genes NPHS1, NPHS2, WT1 y LAMBD2 e identificaron que el 52% presentaban alguna mutación, pero solo 10 (11%) fue en el gen NPHS2^{xxix}. En el presente estudio identificamos un 15% de sujetos con mutación; sin embargo, a pesar que a frecuencia es semejante, conviene mencionar que existen diferencias en los estudios; por ejemplo, nuestros pacientes son de una población seleccionada, ya que este hospital es un centro de referencia en la cual se reciben a pacientes con síndrome nefrótico después de haber sido tratados en sus hospitales generales de zona, quienes no tuvieron una respuesta adecuada. De esta forma, es entendible cómo la frecuencia de corticorresistencia en este estudio es mayor (67%) a otros estudios donde se han buscado mutaciones o polimorfismos. Además, en el presente estudio se busco mutaciones de un solo gen a diferencia de ellos que fue en 4. Por último, en estudios previos, las mutaciones de NPHS2 se han identificado en su mayoría entre familias con GEFS que tienen herencia autosómica recesiva; en el presente, ningún paciente presentaba esta característica debido a que los hermanos así como su padre no

se detecto mutación, por lo que se determino que todos los pacientes tenían síndrome nefrótico primario esporádico. ^{xxx}La mayor debilidad del estudio que realizamos es la poca población que se incluyó, por lo que se debe considerar que nuestra muestra no sería representativa así mismo se deberá mejorar la estrategia de captación de los pacientes ya que muchos de los pacientes rechazaron su participación por temor a una nueva venopunción ya que al acudir a la consulta previamente se había tomado muestras sanguíneas por lo que se debió aprovechar esas tomas de muestra para que la población de estudio su pudiera haber incrementado y que los resultados fueran mas representativos.

En un estudio realizado por Santín, et al., en 2011 reportaron en una población española de 204 pacientes pediátricos con síndrome nefrótico, que el 6% de los pacientes menores de 13 años presentaban la mutación, y que los sujetos de 13 a 17 años de edad (adolescentes) la mutación se presentó en el 25%^{xxxi}. De nuestra población 42% tenían una edad de 13 a 17 años, y en ninguno se identificó la mutación. Esto probablemente se deba al tamaño de población que se estudió, lo cual no descarta que este comportamiento sea semejante o distinto al estudio antes mencionado. Con respecto al predominio del sexo femenino en nuestro estudio es de importancia este dato, ya que en la mayoría de los artículos solo se hace referencia sobre la edad de presentación y no se refiere si existe predominio por algún sexo por lo que se debería darle el énfasis necesario para determinar si el genero también juega un papel sobre la presencia de las mutaciones.

En este estudio, no se entraron pacientes con la mutación R138Q, a pesar de que es la mutación de NPHS2 más frecuente, esto puede ser explicado a que los

reportes de R138Q se han realizado en población afroamericana y europea^{xxxii}. En cambio, dos pacientes si se identificó R229Q, el cual se considera el segundo más frecuente en la mutación NPHS2. Esta característica se ha relacionado con incremento en el riesgo para corticorresistencia, de GEFS, de progresión hacia falla renal crónica, así como de glomerulopatía familiar^{xxxiii}. Se refiere que la mutación R229Q se puede presentar hasta en el 10% de la población sana, no se detecto esta mutación en las muestras de referencia de sanos que se tomaron junto con los pacientes, esto seria debido a que al igual que la muestra de los pacientes no seria representativa para la estimación en la población sana en general. La histopatología de los pacientes con presencia de mutación en nuestro estudio el predominio fue de proliferación mesangial difusa en tres casos ya que uno de los pacientes no se realizó la biopsia renal por su comportamiento corticosensible, por lo que nuestra variedad histopatológica no es similar a lo reportado a la literatura donde el predominio es de GEFS.

En otra publicación, por Santín, et al., en el 2011 refiere que de una población de 148 pacientes con síndrome nefrótico corticorresistente provenientes de 139 familias, se identificaron 6 variantes alélicas a nivel del gen NPHS2 en la mutación 229, de las cuales 3 fueron esporádicas y 3 familiares, lo que da un total de 4%, siendo menor a lo identificado en nuestro estudio^{xxxiv}.

Con respecto a la respuesta a ciclosporina y esteroide como terapéutica de primera línea en los pacientes catalogados como corticorresistente posterior a la toma de biopsia renal; el comportamiento de los pacientes descritos en este

estudio, es semejante con respecto a lo referido en la literatura. La respuesta terapéutica a la ciclosporina fue del 53%, similar a lo documentado por Kari, et al es del 45% de remisión total^{xxxv}. Asimismo, la edad de presentación 2 y 10 años de los pacientes se encuentra entre los límites descritos por Caridi, et al ⁷ (1.5 y 9.8 años). Se ha demostrado que la ciclosporina tienen efectos directos sobre vías de señalización intracelular y la arquitectura del citoesqueleto podocitario por lo que las modificaciones asociadas a las mutaciones de NPHS2 son a nivel de la podocina por lo que la respuesta deber ser mejor^{xxxvi}.

La respuesta inicial al tratamiento con esteroides puede orientar en alguna medida sobre el tipo de resistencia por lo que los pacientes que desarrollan corticorresistencia tras una o varias recaídas después de una buena respuesta inicial, probablemente tendría mayor importancia investigar causas farmacodinámicas de resistencia en quienes nunca han respondido a los esteroides. La respuesta de los pacientes con mutación fue mejor a la ciclosporina que aquellos que no lo presentaron, además encontramos que se presenta más rápido la corticorresistencia por lo que se podría tomar como un factor determinante en los pacientes corticorresistentes durante su evolución. Las dosis empleadas de ciclosporina en los pacientes sin presencia de mutación fue menor pero aún dentro de las dosis reportadas en la literatura, pero el tiempo de administración fue mayor en los corticorresistentes esto asociado a que los pacientes con mutación se reportan con respuesta a la ciclosporina hasta los 6 meses. La respuesta la ciclosporina en estos pacientes es más lenta por lo que

amerita incrementos paulatinos de la dosis así que el tiempo de seguimiento es mayor que en aquellos pacientes que no presentan la mutación.

En el paciente que se reportó una delección de timina su comportamiento fue corticosensibles, con un solo evento de recaída y con remisión completa con el uso de los esteroides. El cambio de aminoácidos puede ser esperado en el polimorfismo y se han reportado como variantes del NPHS2 o como lo reportado por Shin, et al., que lo refiere como síndrome nefrótico de polimorfismo simple, los cuales pueden hacer a los individuos más susceptibles a presentar síndrome nefrótico.^{xxxvii}

Uno de los hallazgos en este estudio que no habían sido descritos previamente fue que se identificó un paciente con cambio de aminoácidos en la secuencia de nucleótidos Q215Q. Su edad de presentación a los 4 años de edad, catalogado como corticorresistente, manejado con ciclosporina con dosis iniciales de 3 mg/kg/día e incremento paulatino hasta 5mg/kg/día. El tratado durante 11 años y, al momento del estudio, tenía proteinuria significativa y deterioro leve de la función renal (75mlmin1.73m2sc), posteriormente egresado. Se realizó la revisión sobre reportes de esta mutación o polimorfismo en la base de datos OMIM, y no se encontró referencias previas. Por esta razón, se podría considerar que es una mutación o un polimorfismo que se encuentre en nuestra población, por lo que se debería ampliar su búsqueda para determinar su relación al síndrome nefrótico, ya que sea por incremento en la corticorresistencia, o bien, como factor de riesgo para padecer síndrome nefrótico. Es de comentar, que la búsqueda de más polimorfismos a nivel de NPHS2 es un tema de estudio en la actualidad, por lo que

hasta el momento se han descrito más de 30 polimorfismos asociados solo a NPHS2, por lo que el hallazgo de este caso, podría ser parte de estos.

Durante la realización de este estudio no se tenía referencia de alguna publicación similar en población mexicana, actualmente se reportó un estudio en el cual se estudiaron 13 pacientes pediátricos con síndrome nefrótico y dos individuos sanos, los pacientes con síndrome nefrótico 8 eran corticosensibles y 5 corticorresistentes, se analizó el tercer exón del gen NPHS2 detectándose dos mutaciones, siendo L139R en un caso corticosensible y L142P en un caso corticorresistente^{xxxviii}. En nuestro estudio se analizó el exón 5 del mismo gen con los resultados ya comentados, se encontraron otras mutaciones que podría justificarse debido a que no se estudió el mismo exón así como podrían ser otras mutaciones que se presentan en la población mexicana porque no se han reportado en la literatura.

Desde el punto de vista clínico, la búsqueda de mutaciones podría resultar de utilidad. En los casos esporádicos que presentan resistencia demostrada tanto a esteroides como ciclosporina, se podría ser realizar un estudio genético para identificar la presencia de la variante R229Q asociada a mutaciones patogénicas en NPHS2. La demostración de la presencia de esta asociación tiene implicaciones prácticas evidentes, ya que es un fundamento útil para no proseguir con la inmunosupresión³³. Por esta razón, ante pacientes en quienes se detecte alguna mutación podrían recibir de manera temprana un manejo adecuado, lo cual ayudaría a reducir las complicaciones y progresión hacia el daño renal, y así intentar lograr un mejor control de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. En pacientes pediátricos con síndrome nefrótico, la frecuencia de mutaciones asociadas al gen NPHS2 en este estudio fue del 15%: dos casos con R229Q, un caso con Q215Q y un caso con una delección de timina. Sin embargo, no se encontró la presencia de R138Q.
2. Probablemente relacionado con el número de pacientes estudiados, en general, no hubo correlación en el curso clínico.
3. Es conveniente continuar con la búsqueda de mutaciones en niños con síndrome nefrótico, a fin de poder ofrecer en el futuro un tratamiento dirigido, con lo cual se podría evitar la progresión de hacia la enfermedad renal crónica.

ANEXO 1



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorizado

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3603
HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, D.F. SUR

FECHA 07/12/2011

DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

PRESENTE

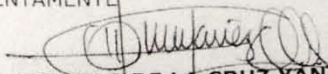
Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES R138Q Y R229Q DEL GEN NPHS2 EN LOS PACIENTES CON SINDROME NEFROTICO PRIMARIO Y SU EXPRESION CLINICA

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

| |
|------------------|
| Núm. de Registro |
| R-2011-3603-50 |

ATENTAMENTE


DR. HERMILO DE LA CRUZ YÁÑEZ

Presidente del Comité Local de Investigación en Salud núm 3603

IMSS

SISTEMA NACIONAL DE SEGURIDAD SOCIAL

ANEXO 2

Obtención y Preservación de DNA genómico

El DNA genómico se obtendrá de linfocitos de sangre periférica anticoagulada con EDTA, mediante el método de altas sales. Aproximadamente 5-7 ml de sangre se centrifugarán a 3500 rpm durante 15 minutos y se separarán los glóbulos blancos de la interfase con una pipeta Pasteur. Los glóbulos rojos remanentes se eliminarán mediante lavados con solución de lisis RCBL (Tris-HCl 10 mM pH=7.6, MgCl₂ 5mM y Na Cl 10 mM). La pastilla de glóbulos blancos se suspenderá con 180 ml de NaCl 5mM y se agregarán 100 ml de SDS al 10%, posteriormente se debe agitar e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente agregar 600 ml de NaCl saturado, agitar e incubar a temperatura ambiente y centrifugar durante 15 minutos a 1500 rpm. Se debe transferir el sobrenadante a un tubo ependorff estéril y precipitar el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto. El DNA se separará mediante centrifugación de la solución alcohólica y lavar con etanol al 70%. Posteriormente se dejará secar a temperatura ambiente. Por último, el DNA se suspenderá con 50 ml de agua desionizada estéril y se almacenará a 4°C hasta su análisis. A todas las muestras obtenidas se les realizará un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calculará mediante la siguiente fórmula:
[DNA(ng/ml)] = (A₂₆₀)(dilución-1)(50ng/ml)

Considerando que 1 densidad óptica a 260 nm equivalen a 50 ng/ml de DNA. La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O₂₆₀ son las óptimas. Para determinar la calidad de las muestras de DNA se realizarán electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.5mg/ml].

Reacción en Cadena de la Polimerasa

A partir de las muestras de ADN obtenidas, se amplificará por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el DNA del VNTR de 31 bp que se localiza desde el límite del exón 13 al límite del intrón 13 del gen de la CBS, utilizando oligonucleótidos conocidos para las direcciones 5' – 3' de la cadena sentido y 5' – 3' de la cadena antisentido, en una reacción bajo las siguientes condiciones:

200 ng de ADN genómico

1.5 U de Taq polimerasa

10 pmol de cada uno de los primers

0.2 mM de dinucleótidos trifosfatados (dNTP's)

3 mM de Cloruro de Magnesio

Agua destilada a un volumen final de 25 µl

Condiciones de PCR (30 ciclos):

- Desnaturalización inicial, 95°, 5 minutos

- Desnaturalización, 95°, 1 minuto
- Alineamiento, 55°, 1 minuto
- Extensión, 72°, 1 minuto

Análisis de secuenciación

Para detectar las mutaciones las mutaciones del gen de la NPHS2 se realizará el análisis de secuenciación automática así como para detectar la presencia de los primer en estudio del producto de PCR para cada uno de los individuos del estudio. Primero se llevará a cabo la purificación de cada uno de los productos de PCR empleando el Kit Rapid PCR purification system de Marligen Biosciences, siguiendo el manual de instrucciones.

Una vez purificados pueden emplearse directamente en la reacción de secuenciación, bajo las siguientes condiciones:

1. Colocar en un tubo de PCR las siguientes cantidades:

- a) 50 ng del producto de PCR purificado.
 - b) 3.2pmol/μl del primer Bst 7973 F / 3.2pmol/μl primer Ban 8344 B.
 - c) 4μl de Big Dye Termocycler 4.0
- Volumen final de 25μl

Condiciones de PCR (30 ciclos):

- Desnaturalización inicial, 95°, 5 minutos
- Desnaturalización, 95°, 1minuto
- Alineamiento, 55°, 1minuto
- Extensión, 72°, 2minutos

Después se empleará el Kit Dye Ex TM 2.0 Spin (250) de Qiagen, para la purificación de las muestras, mostrando las mutaciones estudiadas.

Síntesis de Sondas y Oligonucleótidos

Se diseñarán las sondas y tres juegos de oligonucleótidos de cada una de las secuencias derivadas de las diferentes mutaciones que se estudiarán y del gen de NPHS2. El diseño de los oligonucleótidos se llevará a cabo con el “software primer express”, con el cual se verificará la especificidad de los mismos, se ubicarán en la secuencias de cada gen y se seleccionarán las secuencias adecuadas

Los oligonucleótidos específicos derivados de la secuencia de dichos genes, serán adquiridos en una casa comercial y cada uno de ellos será llevado a una concentración de 100 μM. Asimismo, se realizará una electroforesis en gel de agarosa con el fin de descartar la presencia de oligonucleótidos adicionales.

ANEXO 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F. a _____

Por medio del presente, _____ acepto participar en el proyecto de investigación, **FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES R138Q Y R229Q DEL GEN NPHS2 EN LOS PACIENTES CON SINDROME NEFROTICO PRIMARIO Y SU CURSO CLINICO**, registrado ante el Comité Local de Investigación del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, con el número de registro: R-2011-3603-50

Me han explicado que el objetivo de este estudio es buscar si hay algún error en los genes de mi hijo(a) que puedan explicar su enfermedad (síndrome nefrótico) y si esto puede relacionarse con la respuesta al tratamiento con esteroides.

La participación de mi hijo (a) en la investigación es que le tomen una muestra sangre (7 ml que equivale a una y media cucharada) como parte de los exámenes de laboratorio solicitados para vigilancia en la consulta externa de la clínica de síndrome nefrótico.

Se nos informa que las molestias que puede tener mi hijo(a) es dolor en la toma de muestra y moretón en el sitio del piquete.

Manifiesto que la participación de mi hijo(a) es voluntaria, sin remuneración económica y entiendo que conservo el derecho negarme a participar en el estudio, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El investigador principal me ha asegurado que mis datos serán manejados en forma confidencial en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que en todo momento se respetará mi privacidad.

Nombre y firma Padre o tutor del paciente

Nombre y firma Investigador

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

ANEXO 4

CARTA DE ASENTIMIENTO

México, D.F. a _____

Por medio del presente, _____ acepto participar en el proyecto de investigación, **FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES R138Q Y R229Q DEL GEN NPHS2 EN LOS PACIENTES CON SINDROME NEFROTICO PRIMARIO Y SU CURSO CLINICO**, registrado ante el Comité Local de Investigación del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, con el número de registro: R-2011-3603-50

Me han explicado que El objetivo de este estudio es buscar si hay algún error en mis genes que puedan explicar mi enfermedad (síndrome nefrótico) y si esto puede relacionarse con la respuesta al tratamiento con esteroides.

Mi participación en la investigación es que me tomen una muestra sangre (7 ml que equivale a una y media cucharada) como parte de los exámenes de laboratorio solicitados para vigilancia en la consulta externa de la clínica de síndrome nefrótico.

Se me informa que las molestias que puedo tener es dolor en la toma de muestra y moretón en el sitio del piquete.

No existe un beneficio personal inmediato, pero el beneficio con los resultados del estudio puede ser un adelanto científico que mejore el manejo de los pacientes con esta enfermedad.

Manifiesto que mi participación es voluntaria, sin remuneración económica y entiendo que conservo el derecho negarme a participar en el estudio, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El investigador principal me ha asegurado que mis datos serán manejados en forma confidencial en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que en todo momento se respetará mi privacidad.

Nombre y firma Padre o tutor del paciente

Nombre y firma Investigador

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

BIBLIOGRAFIA

ⁱGubler M. Podocyte differentiation and hereditary proteinuria/ nephrotic syndromes. J.Am.Soc. Nephrol 2003; 14, S22-S26.

ⁱⁱBraden GL, Mullern JG, O'Shea MH, Germanin MJ. Changing incident of glomerular disease in adults. Am J Kidney Dis 2000; 35: 878-883.

ⁱⁱⁱR, Kelly CJ. T Cells and Minimal Change Disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 1409-1411.

^{iv}Bonilla-Felix M, Parra C, Dajani T, Ferris M, Swinford RD, Portman RJ, Verani R. Changing patterns in the histopathology of idiopathic nephrotic syndrome in children. Kidney Int 1999; 55: 1885-1890.

^v Garin EH: Síndrome Nefrótico por nefropatía de lesiones mínimas. En: Nefrología Pediátrica, 2da ed, editado por Libros Princeps, 2006, pp. 303-311.

^{vi}Clark AG, Barratt TM: Steroid-responsive nephritic syndrome. In: Pediatric Nephrology, 4th Ed, Barrat TM, Avner ED, Lippincott Williams and Wilkins, 1999, pp 731-747.

^{vii}McEnery PT, Strife CF. Nephrotic síndrome in childhood. Management and treatment in patients with minimal change disease, mesangial proliferation, of focal glomeruloesclerosis .Pediatr Clin North Am 1982; 4: 875-894.

^{viii} Filler G. Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children? Am J Kidney Dis 2003; 6: 1107-1113.

^{ix} Gbadegesin R, Smoyer WE. Nephrotic syndrome. In: Comprehensive Pediatric Nephrology, 1th Ed, Geary DF, Mosby ED, Elsevier, 2008, pp 205-218.

^xLaércio B, Castaño I. Características clínicas e histopatológicas del síndrome nefrótico primario. Colomb Med 2005; 36: 29-33.

^{xi} Salomón R, Gagnadoux MF, Niaudet P. Intravenous cyclosporine therapy in recurrent Nephrotic syndrome after renal transplantation in children. Transplantation 2003; 75: 810-814

^{xii} Caridi G, Trivelli A, Sanna-Cherchi S, et al. Familial forms of Nephrotic Syndrome. Pediatr Nephrol 2010; 25: 241-252.

-
- ^{xiii} Fuchshuber A, Jean G, Lynn KL, Gribouval, et al. Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2155-2158.
- ^{xiv} Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002; 160: 131-139.
- ^{xv} Caridi G, Bertelli R, di duca M, Dagnino M, et al. Broadening the spectrum of disease related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1278-1286.
- ^{xvi} Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, et al. Gene expression profile of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric disease. *J Am Nephrol* 2003; 14: 2958-2966.
- ^{xvii} Tryggvason K, et al. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006; 354(13):1387-1340
- ^{xviii} Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002; 160: 131-139.
- ^{xix} Ratelade J, Aguirre T, Onneti A, Morisset L, et al. Maternal environment interacts with modifier genes to influence progression of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1491-1499.
- ^{xx} Caridi G, Perfumo F, Ghiggeri GM. NPHS2 (Podocin) mutations in nephrotic syndrome. Clinical spectrum and fine mechanisms. *Pediatr Res* 2005; 57: 54R-61R.
- ^{xxi} Pereira A, Abreu AB, Mota GF, Cunha RS, et al. NPHS2 functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int* 2010; 65: 1026-1030.
- ^{xxii} Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen Y, et al. NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002; 110: 1659-1666.
- ^{xxiii} Frishberg Y, Rinat C, Megged O, Shapira E, et al. Mutations in NPHS2 encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 400-405.
- ^{xxiv} Weber S, Gribouval O, Esquivel E, Moriniere V, et al. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004; 66: 571-579.

-
- ^{xxv}Koziell A, Grech V, Hussain S, Lee G, et al. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet* 2002; 11 (4): 379-388.
- ^{xxvi}Ruf I. Partial remission with CyA in a patient with nephrotic syndrome due to NPHS2 mutation. *Pediatr Nephrol* 2009; 24: 2051-2054.
- ^{xxvii} Rios M, Patiño G. Características del síndrome nefrótico primario en edades no habituales, en un hospital pediátrico de tercer nivel en Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2011; 68(4): 271-277
- ^{xxviii} Aguilar MA, Zepeda MC, Ibarra MP, et al. Síndrome nefrótico corticorresistentes: 15 años de experiencia en el Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2012; 69(5): 411 – 417.
- ^{xxix} Buscher AK, Kranz B, Buscher R, et al. Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 2075-2084.
- ^{xxx} Yu Z, Ding J, Huang J, et al. Mutations in NPHS2 in sporadic Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Chinese children. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 902-908.
- ^{xxxi} Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B, et al. Clinical utility of genetic testing in children and adults with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 1139-1148
- ^{xxxii} Karle SM, Uetz B, Ronner V, et al. Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 388-393.
- ^{xxxiii} Köttgen A, Hsu C, Coresh J, et al. The association of podocin R229Q polymorphism with increased albuminuria of reduced estimated GFR in a large population based sample of U.S. adults. *Am J Kidney* 2008 ; 52(5): 868-875.
- ^{xxxiv} Santín S, Tazón- Vega B, Silva I, et al. Clinical value of NPHS2 analysis in early- and adult- onset Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 344-354.
- ^{xxxv} Kairi A, Halawni M. Treatment of Steroid Resistant Nephrotic Syndrome in children. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2010; 21(3): 484-487

^{xxxvi} Segarra A, Jatem E, Agraz I, et al. Treatment of Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis: options in the event of resistance to corticosteroids and calcineurin inhibitors. *Nefrologia* 2013; 33(4): 448 -461.

^{xxxvii} Shin HD, Park BL, Kim LH, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphism with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 397-403.

^{xxxviii} Carrasco JS, Garcia R, Sotelo R, et al. Short communication mutations in NPHS2 (podocin) in Mexican children with nephrotic syndrome who respond to standard steroid treatment. *Genet Mol Res* 2013; 24(2): 2102 – 2107.