



ETZAEI ANTONIO JUÁREZ  
IMSS-CMN-SXXI-HP

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**FRECUENCIA DE LAS VARIANTES ALELICAS R229Q Y R138Q DEL GEN *NPHS2* DE ACUERDO A LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DEL SINDROME NEFROTICO PRIMARIO RESISTENTE A ESTEROIDES EN PACIENTES DE LA EDAD PEDIATRICA**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :**  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A :**  
**ETZAEI ANTONIO JUAREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**

**COMITÉ TUTORAL:**  
**DR. ELIAS PIEDRA IBARRA**  
**DR. SERGIO VACA PACHECO**  
**DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**  
**DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS**  
**M.EN C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCIA**

**2012**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## AGRADECIMIENTOS

### *A MI MAMÁ: NOHEMI JUÁREZ REYES*

*A quien me ha heredado el tesoro más valioso que pueda dársele aun hijo: AMOR. A quien sin escatimar esfuerzo alguno, ha sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quien la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quien nunca podré pagar todos sus desvelos ni aun con las riquezas más grandes de todo el mundo. Por esto y mucho más....*

**GRACIAS!!!**

### *A MI PAPÁ: GUILLERMO ANTONIO CRÚZ*

*A quien a pesar de estar lejos de mí durante mucho tiempo, me ha enseñado que siempre debo mirar hacia el frente. Y los buenos momentos que compartimos fueron gratos.*

### *A MIS HERMANOS Y HERMANA: GUILLERMO, MISSAEL E ITZEL*

*A quienes a pesar de que no convivimos mucho, me han tenido paciencia y ante la adversidad nunca me han dejado solo y me han sabido brindar su comprensión y cariño. A quienes siempre me han dicho que nunca hay que bajar la mirada.*

### *A MI CUÑADA: ALMA ARIAS SÁNCHEZ*

*A quien tuvo la fortuna de conocer a mi hermano RAMSES y juntos poder darme el tesoro más grande y valioso del mundo, a mi sobrino CESAR GIOVANNY.*



*UN AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA MUY ESPECIAL A MI HERMANO  
“RAMSES ANTONIO JUÁREZ” †*

*A mí querido y amado hermano RAMSES, quien me enseñó que la vida es tan hermosa que debemos luchar por ella a cada momento, quien me enseñó que debemos vivir y disfrutar todos y cada uno de los momentos que la vida nos ofrece.*

*A quien me enseñó que la familia es tan importante como la vida misma, quien me ha enseñado a luchar por lo que quieres sin importar los obstáculos que se te pongan enfrente.*

*A quien siempre me visitaba solo para que pasáramos un momento juntos y no estuviera siempre platicando con el silencio y conviviendo con la soledad.*

*A quien me ha dejado un hermoso hijo, para que le cuide y le eduque de la mejor manera, para que le enseñe a ser una persona de bien y de provecho.*

*A quien en los últimos meses me ha hecho llorar por su ausencia y me haces mucha falta.*

*“SIEMPRE TE LLEVARE EN MI MEMORIA Y CORAZON”*

*“EN PAZ DESCANCES HERMANO” (05/01/1991- 03/08/2012)*



*A mí tutor: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA*

*Por brindarme gran parte de su conocimiento y experiencia, por haberme brindado todo su apoyo y comprensión en los últimos tres años, pero sobre todo en el último año, el cual fue realmente muy complicado para mí.*

*A LA DRA. MA. CARMEN PALACIOS REYES.*

*A quien aprecio y valoro mucho, por todo el apoyo, comprensión y conocimiento que me ha brindado. Pero sobre todo por la gran amistad que hemos logrado consolidar en el poco tiempo que tenemos de conocernos.*

*A todos mis amigos:*

*Del laboratorio:*

*M. en C. Felipe, Biol. Rodrigo, Dr. Manuel, Biol. José Luis, Dr. José Luis, Biol. Elisa, Biol. Montserrat, etc.*

*De la FESI:*

*Dr. Rodrigo, Dr. Saúl, Dr. Juan Carlos, Dr. Carlos (charly), Dr. Daniel, Biol. Cynthia, Biol. Raúl y todos los demás con quienes compartí muchos momentos felices.*

*Residentes de genética del IMSS-CMN-SXXI-HP:*

*Dra. Mariana Rives, Dra. Daniela Juárez, Dra. Judith, Dra. Leila, Dr. Huicochea, Dr. Cristian, Dr. Miguel.*

*Al servicio de secuenciación de la UNAM-FESI-UBIPRO, por haber proporcionado el equipo y material necesario para el análisis de nuestras muestras.*



## Índice

<b>1. Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Subtipos clínicos del Síndrome Nefrótico.....</b>	<b>8</b>
2.1.1. Síndrome Nefrótico Congénito.....	8
2.1.2. Síndrome Nefrótico Sensitivo a Esteroides.....	8
2.1.3. Síndrome Nefrótico Resistente a Esteroides.....	9
2.2. Etiología.....	9
2.3. Función Renal Normal.....	10
2.4. Tratamiento.....	10
2.5. Genes Asociados.....	11
2.5.1. Gen <i>NPHS2</i> (Podocina).....	11
<b>3. Antecedentes.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Justificación.....</b>	<b>16</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>17</b>
5.1. Objetivo General	
5.2. Objetivos Particulares	
<b>6. Diagrama de flujo.....</b>	<b>18</b>
<b>7. Materiales y Métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>8. Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>9. Discusión.....</b>	<b>38</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>11. Bibliografía.....</b>	<b>43</b>



## Frecuencia de las variantes alélicas p.R229Q y p.R138Q del gen *NPHS2* de acuerdo a la respuesta al tratamiento del Síndrome Nefrótico Primario Resistente a Esteroides en pacientes en edad pediátrica

### 1. RESUMEN

El Síndrome Nefrótico es una de las patologías más frecuentes de la edad pediátrica. Caracterizado por presentar anasarca, proteinuria, hipercolesterolemia e hipoalbuminemia. Siendo la población de 4 a 8 años de edad la más afectada, estimándose su presentación en el 10% de los casos, de los cuales, aproximadamente el 60% progresan a insuficiencia renal. El SNRE es una enfermedad genéticamente heterogénea, la cual puede estar causada por cambios alélicos en distintos genes, como *NPHS1*, *NPHS2*, *ACTN4*, entre otros. El gen *NPHS2* codifica la Podocina, una proteína transmembrana que consta de 383 aminoácidos, la se encuentra implicada en el filtrado glomerular.

Detectar las variantes alélicas *R229Q* y *R138Q* del gen *NPHS2* mediante la técnica de secuenciación en pacientes pediátricos con SNRE.

Se realizó un estudio observacional analítico en individuos con diagnóstico de SNRE del Hospital de pediatría del CMN SXXI (pacientes), e individuos adultos sin antecedentes personales y/o datos clínicos del SN (controles). Se obtuvo muestra de sangre periférica, a partir de la cual se realizó extracción de DNA mediante kit comercial (QIAGEN), se corroboró la integridad en gel de agarosa al 1X, la pureza (1.8-2) y la concentración (200-800 ng/μl) en nanodrop. Se realizó el diseño de oligonucleótidos con el programa Primer 3', para amplificar los exones 5 y 3 del gen *NPHS2*, (correspondientes a los sitios de las variantes alélicas *R229Q* y *R138Q*) mediante PCR de punto final; posteriormente se realizó secuenciación automatizada. Se utilizó el método de la Xi cuadrada para el análisis estadístico.

Se estudiaron 94 individuos, 47 con SNRE (de 2 a 17 años) y 47 controles. Se obtuvieron las secuencias de 47 pacientes para la variante *R229Q*, encontrándose en dos pacientes del género femenino (frecuencia del 4%) y no se encontraron en los controles (47). La mutación *R138Q* no se identificó en ninguno de los dos grupos.

Los 2 pacientes del género femenino (4%) con SNRE vistos en el HP del CMN SXXI IMSS, podrían estar asociados al polimorfismo *R229Q*, cabe mencionar que estos son casos esporádicos por lo que concluimos, es el motivo por el cual no fue encontrado en los controles. Mediante el análisis estadístico pudimos determinar que no hay diferencia significativa entre los grupos incluidos en el estudio. La mutación *R138Q* no se encontró en esta población.



## **Frecuencia de las variantes alélicas p.R229Q y p.R138Q del gen *NPHS2* de acuerdo a la respuesta al tratamiento del Síndrome Nefrótico Primario Resistente a Esteroides en pacientes en edad pediátrica**

### **2. INTRODUCCIÓN**

El Síndrome Nefrótico (SN) es una de las patologías renales más frecuentes de la edad pediátrica, que se caracteriza por proteinuria, edema generalizado, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia y oliguria (Hogg et al. 2000; Donckerwolke et al.1997). El SN consiste en un desorden de la permeabilidad selectiva de la membrana glomerular que puede ser primario (85-90%) o secundario (10-15%), en el contexto de una enfermedad sistémica (Churg et al. 1970).

En niños, la variedad de SN más frecuente es aquella caracterizada por cambios histológicos mínimos en el glomérulo: Síndrome Nefrótico con cambios mínimos (SNCM) y con respuesta a la corticoterapia o corticosensibles (ISKDC 1981,2004, Sellares et al. 1998). Los niños con Síndrome Nefrótico resistente a los esteroides, pueden tener diferentes patrones histológicos entre los que se encuentra la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), la mayor diferencia entre el SNSE y el SNRE se observa en la progresión de la GEFS hacia la enfermedad renal terminal, lo cual raramente ocurre en el SNCM (Broyer et al. 1997, Schlesinger et al.1968).

La incidencia anual de esta enfermedad es de 2-7 casos por cada 100,000 habitantes en la población general y su prevalencia anual en menores de 16 años de edad es de 15 casos por cada 100,000 habitantes, con una prevalencia acumulativa de 15.7 casos por cada 100,000 niños (Churg et al.1970, ISKDC 1981). La Asociación Internacional para el Estudio de las Enfermedades Renales (AIER), reportó 471 niños con SN primario, de los cuales el 78.1% respondió a la corticoterapia, y de estos el 91.8% tuvieron histología de cambios mínimos. El SN suele aparecer principalmente en niños de 2-8 años de edad, con una máxima incidencia de los 3 a los 5 años de edad (Barrat et al. 1999). El 80% son menores de 6 años al momento de la presentación de la enfermedad, con una media de 2.5 años para el SNCM y de 6 años para la SNRE (ISKDC 2004).



Los varones son afectados con mayor frecuencia que las niñas, en una proporción de 2:1, aunque en adultos la proporción es igual. La incidencia familiar es del orden de 35.5% y existe una predisposición genética y de factores ambientales determinantes en la distribución por grupos étnicos de esta enfermedad (Sharples et al. 1985).

Por décadas el SN ha sido separado en dos grandes categorías de acuerdo a la respuesta al tratamiento con esteroides, el Síndrome Nefrótico Sensitivo a Esteroides (SNSE) al que corresponden aproximadamente el 80% de los casos y el Síndrome Nefrótico Resistente a Esteroides (SNRE) con el restante 20% de niños con SN (Lancet et al. 1988).

## 2.1. Subtipos clínicos de Síndrome Nefrótico

### 2.1.1. Síndrome Nefrótico Congénito

EL Síndrome Nefrótico Congénito se define como la aparición de éste durante los primeros 3 meses de vida, ocasionado en su mayoría por la aparición de anomalías en genes codificadores de proteínas específicas del podocito (con excepción de los secundarios a enfermedades infecciosas) (ISKDC 1981,2004).

### 2.1.2. Síndrome Nefrótico Sensitivo a Esteroides

Se define como la remisión completa del síndrome clínico y/o bioquímico, después de la respuesta al tratamiento con Prednisona administrado según los protocolos ya establecidos. Según la evolución de este, es que se divide en dos categorías:

- **Recaídas infrecuentes:** pacientes sensitivos a esteroides con una primera y única manifestación (brote único) o con un número de recaídas menor a 3 en un periodo de 6 meses, o menor a 4 en un año, en cualquier momento de la evolución (ISKDC 1981,2004).
- **Corticodependientes:** este se da cuando los pacientes con Síndrome Nefrótico, presentan dos recaídas consecutivas al rebajar la Prednisona o durante las dos semanas siguientes a la supresión del tratamiento (ISKDC 1981,2004).



### 2.1.3. Síndrome Nefrótico Resistente a Esteroides

Este se define como la persistencia del Síndrome Nefrótico clínico y/o bioquímico, tras la corticoterapia administrada según los protocolos ya establecidos (Tun et al.1996).

## 2.2. Etiología

El Síndrome Nefrótico cortico-resistente familiar autosómico recesivo (**SRNS** o **NPHS2** [OMIM no. 604766]) se caracteriza por la aparición de proteinuria en la primera infancia, la resistencia a tratamientos inmunosupresores, y progresión temprana de la enfermedad hacia enfermedad de cambios mínimos y GEFS. La causa de la enfermedad es una mutación en el gen *NPHS2*, que codifica para la proteína Podocina. También se han detectado mutaciones en el gen *NPHS2* en casos esporádicos de SN resistente a corticoides, en algunos casos de SN congénito, y en casos de GEFS familiar de inicio tardío (Caridi et al. 2003). La herencia digénica de mutaciones en *NPHS1* y *NPHS2*, resultando en un *triallelic hit* (mutaciones sobre tres alelos de los cuatro de los dos genes *NPHS1* y *NPHS2*) parece que modifica el fenotipo del Síndrome Nefrótico Congénito del tipo Finlandés (SNF) al de la GEFS (Koziell et al. 2009). Todas las formas de nefropatía causada por mutaciones en el gen *NPHS2* son resistentes a corticoesteroides (Caridi et al. 2003).

El SN se caracteriza por afectarse la membrana glomerular del riñón, lo que conlleva disminución en la filtración glomerular y por lo tanto disminución en la producción de orina.

La membrana basal glomerular está recubierta por células especializadas (podocitos) que presentan proyecciones (pedicelos). Los pedicelos se interdigitan sobre la membrana basal glomerular, de tal manera que forman poros de 20-40 nm de ancho, esto con el fin de impedir el paso de proteínas de tamaño mayor como lo es la albúmina (Boute et al., 2000).



### 2.3. Función Renal normal

La orina es producida por el riñón mediante eliminación selectiva de sustancias del plasma sanguíneo y posterior reabsorción controlada de agua, iones, sales, azúcares y otros carbohidratos, así como de proteínas de bajo peso molecular. Sea cual sea el volumen y la concentración de orina, esta contendrá la cantidad de desechos e iones adecuada para mantener la homeostasis bioquímica interna (Guyton 1997).

La incapacidad de producir orina concentrada o diluida es un rasgo importante de la insuficiencia renal, al igual que los datos de excreción insuficiente de productos de desechos nitrogenados y otras sustancias (Guyton 1997).

### 2.4. Tratamiento

El SN se caracteriza por una pérdida selectiva de la permeabilidad glomerular, con la consecuente proteinuria masiva, alteraciones del metabolismo proteico, lipídico, y algunos ejes del sistema endocrino. Existen múltiples terapias publicadas para el manejo de esta enfermedad, sin embargo existe consenso respecto a que los corticoides son la primera línea de tratamiento. El tratamiento para el SNRE es todo un reto para los nefrólogos pediatras. Dado el mal pronóstico de esta forma de SN estos pacientes son habitualmente sometidos a prolongados y agresivos tratamientos, con el objetivo de obtener la remisión de la enfermedad (Shankland. et. al. 2000). Los tratamientos que hasta el momento se han utilizado son: corticoides, agentes alquilantes (ciclofosfamida y cloranbucil) por vía oral o vía intravenosa, micofenolato, ciclosporina o tacrolimus, estos tratamientos buscan tener un efecto inmunológico, sin embargo, la mayoría de estos pacientes muestran progresión a enfermedad renal terminal, por lo que es necesario recurrir a la diálisis o en su defecto al trasplante renal (Hoson et al. 2000; Kasiasek et al. 1995).

Existen varios tratamientos para el SNRE en pacientes pediátricos, propuestos en la literatura mundial. Los agentes alquilantes tienen efecto terapéutico sobre el Síndrome Nefrótico Resistente a Esteroides, de los cuales la ciclofosfamida es el más usado, con una dosis de 3mg/Kg de peso (Hotson 2009).



## 2.5. Genes asociados

Estudios realizados mediante clonación posicional han revelado defectos en 4 diferentes genes como causas monogénicas de SN en casos familiares.

Mutaciones recesivas en el gen *NPHS1*, que codifica para la Nefrina (**OMIM no. 602716**), causan SN Congénito del tipo Finlandés (**Kestila et al., 1998**). Mutaciones recesivas en el gen *NPHS2*, que codifica para la Podocina (**OMIM no. 604766**), causan SNRE tipo 1 (**Boute et al., 2000**). Mutaciones en el gen *ACTN4*, que codifica para la  $\alpha$ -actinina 4 (**OMIM no. 604638**), han sido identificadas como causas autosómicas dominantes de SNRE (**Kaplan et al., 2000**). Un locus adicional para una forma autosómica dominante para el SNRE ha sido mapeado en el cromosoma 11q21-q22 (**OMIM no. 603965**) (**Winn et al., 1999**).

La identificación de los genes candidatos para las formas monogénicas del SNRE demuestra la importancia de los factores genéticos para la patogénesis del SN. A través de la identificación de estos tres genes como causantes del SN, sus productos (Nefrina, Podocina y  $\alpha$ -actinina 4) se han identificado como factores de gran importancia para la realización de los procesos podocitarios y la función de la Hendidura del Diafragma de la Membrana Glomerular, quienes constituyen la primer molécula de filtración del glomérulo (**Somlo et al., 2000**).

### 2.5.1. GEN *NPHS2* (PODOCINA)

#### LOCALIZACIÓN EN EL MAPA GENÉTICO

El gen *NPHS2* se localiza en la cadena antisentido del brazo largo del cromosoma 1 en la posición 25-31 (1q25-q31), este gen presenta un total de 25,413pb distribuidas en 8 exones (regiones codificantes) y 7 intrones (regiones no codificantes), (**Boute et al., 2000**).

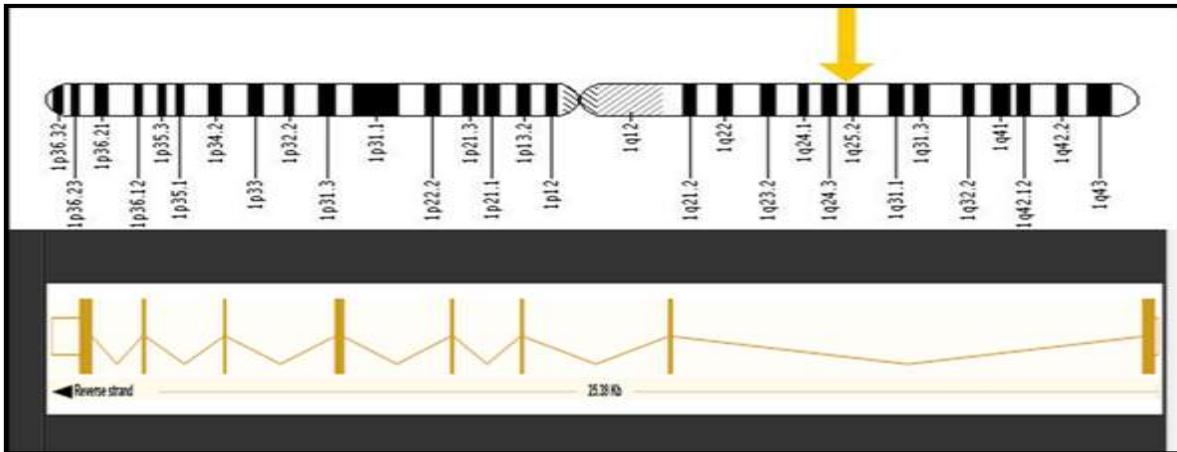


Fig1. Esquema del gen *NPHS2*, mostrando su localización en el cromosoma 1, así como los 8 exones y sus 7 intrones (imagen tomada directamente de la base de datos *NCBI*. 2011).

## Descripción

El gen *NPHS2* codifica para la Podocina, una proteína que se expresa exclusivamente en el riñón, a nivel de los podocitos, está constituida de 382 aminoácidos, compuesta por una porción N-terminal de 102 aminoácidos, con un dominio transmembranal de 16 a 18 aminoácidos. Los podocitos son células epiteliales especializadas que recubren la membrana basal del glomérulo renal, y ellos se encargan de regular la filtración glomerular a través de la hendidura del diafragma. La Podocina juega un papel muy importante en la estabilidad de la barrera de filtración glomerular. (Roselli et al., 2004).



### 3. ANTECEDENTES

Berdeli et al. En el 2007 estudiaron 295 niños originarios de Turquía con SNRE. El análisis mutacional fue realizado mediante el método de secuenciación de DNA directa. La proporción en la frecuencia de mutaciones fue de 24.7% para todos los casos, 29.2% para los casos familiares y 24% para los casos esporádicos de SNRE. Ellos mostraron que las mutaciones más comunes fueron localizadas en el exón 5 y que las mutaciones encontradas en el exón 4 incrementan el riesgo de la enfermedad renal en estadio final.

Maruyama et al. En el 2003 aislaron DNA genómico de 36 niños japoneses con insuficiencia renal crónica causada por el SNRE o por la alta proteinuria, analizaron los 8 exones y las regiones intrón - exón del gen *NPHS2* utilizando PCR y secuenciación directa. Ellos concluyeron que las mutaciones encontradas en el gen *NPHS2* no son la mayor causa de insuficiencia renal crónica causada por el SNRE esporádico o por la alta proteinuria en niños japoneses.

Chernin et al. En el 2008 extrajeron DNA genómico de sangre periférica de 18 niños afroamericanos, después de haber evaluado los 8 exones del gen *NPHS2*, los investigadores declararon que en niños afroamericanos, la frecuencia de mutaciones es mucho más baja que en grandes cohortes de niños con SNRE en la población general.

Bakr et al. En el 2008 sugirieron que las mutaciones son prevalentes en niños egipcios con SNRE esporádico, y esto podría explicar en parte el pronóstico menos favorable reportado en estos pacientes.

Otro estudio realizado por Cho et al. En el 2008, mostró que la incidencia de mutaciones en el gen *NPHS2*, son más raras en niños coreanos. Ellos sugieren que el diagnóstico genético de las mutaciones del gen *WT1* es altamente recomendable para niños con SNRE, especialmente en niños y niñas pero con anomalías en los genitales.

Se han descrito más de 30 mutaciones en el gen *NPHS2* (Caridi et al. 2003; Nishibori et al. 2004). La mayoría se encuentran en la región que codifica el dominio C-terminal de la proteína, lo que sugiere un papel funcional para este dominio. La mutación más común, p.R138Q, es probable que se deba a un efecto fundador en el norte de Europa. Se ha observado que el 89% de los niños



homocigotos para la mutación p.R138Q de la Podocina presentan anomalías cardíacas, fundamentalmente hipertrofia ventricular izquierda y estenosis pulmonar, y un 20% de ellos presentaban episodios repetidos de insuficiencia cardíaca (Frishberg et al. 2006), lo cual sugiere que la Podocina puede desempeñar algún papel en el desarrollo cardíaco normal. La variante de la Podocina p.R229Q, que se encuentra alrededor del 4% de la población europea, se asocia con un riesgo aumentado de presentar microalbuminuria (Pereira et al. 2004) y también se puede asociar con un riesgo aumentado de presentar GEFS en población europea, pero no en la africana. Asimismo, polimorfismos en el promotor del gen *NPHS2* modifican su expresión y parece que podrían estar asociados con diversas enfermedades glomerulares (glomerulonefritis IgA, GEFS) así como su con su evolución (Di Duca et al. 2006).

En un estudio reciente, se encontraron mutaciones en el gen *NPHS2*, en un 43% de 147 pacientes (81 familias) corresponden a SNRE familiar autosómico recesivo (Wever et al. 2004), en sólo un 10,5% de 172 pacientes con SNRE esporádico y en ningún paciente con esclerosis mesangial difusa. Por otro lado, también se han detectado mutaciones en el gen de la Podocina en 45-55% de pacientes con Síndrome Nefrótico familiar y en 8-20% de pacientes con Síndrome Nefrótico esporádico en la infancia.

Debido a que los pacientes con mutaciones en el gen *NPHS2* son resistentes al tratamiento tanto con esteroides como con fármacos citotóxicos, se ha propuesto buscar dichas mutaciones en *NPHS2* en pacientes con GEFS antes de comenzar con estos tratamientos, con la intención de evitar potenciales efectos secundarios. Asimismo, la recurrencia de la GEFS en pacientes con estas mutaciones es rara (menor de un 8%) mientras que ocurre en un 30% de pacientes con GEFS esporádica (Vincenti et al. 2005).

En 14 familias con SNRE autosómico recesivo, Boute et al. (2000) identificaron 10 diferentes mutaciones en el gen *NPHS2*. Tres mutaciones resultaron por variantes alélicas o por un codón de paro prematuro, seis fueron deleciones; la mutación p.R138Q fue identificada en 6 diferentes familias. Los resultados mostraron que la Podocina juega un papel crucial en la función de la barrera de filtración glomerular.



**Tsukaguchi et al. (2002)** identificaron un polimorfismo en el gen *NPHS2* (p.R229Q), el cual contribuye al desarrollo de la enfermedad renal, caracterizada por presentar proteinuria y glomeruloesclerosis focal-segmentaria (GEFS) en 6 familias. Los ensayos de expresión funcional in vitro de la proteína mutante p.R229Q, disminuye su compromiso con la Nefrina (*NPHS1*), (41.5% comparado con la del tipo silvestre), lo que sugiere una disminución funcional mínima. **Tsukaguchi et al. (2002)** concluyeron que la variante p.R229Q por si sola probablemente no cause la enfermedad renal, pero si aumenta la susceptibilidad hacia la enfermedad renal, cuando se convine con otras mutaciones patógenas del gen *NPHS2*.

**Hinkes et al. (2007)**. Entre 975 niños con Síndrome Nefrótico en 10 años de seguimiento, estudiaron 89 individuos de 80 familias europeas, cuyas manifestaciones aparecieron en el primer año de la vida y cuando se analizan en su conjunto, tanto los que se manifestaron después de los 3 meses de edad como los que tenían criterios de SNC, tenían mutaciones en el gen *NPHS2* en el 39,1 % de los casos, aunque señalan que esta incidencia de mutación puede variar de una región a otra. Ninguno de los niños de este estudio respondió al tratamiento con esteroides.

**Ruf et al. (2004)**. Hicieron el análisis mutacional de 190 pacientes con Síndrome Nefrótico resistente a esteroides (SNRE) de 165 familias diferentes y como muestra control, de 124 pacientes con Síndrome Nefrótico sensitivo a esteroides (SNSE) de 120 familias. Se detectaron mutaciones homocigóticas u homocigóticas compuestas para el gen *NPHS2* en 43 individuos de las 165 familias con SNRE (26 %) y por el contrario no encontraron estas mutaciones en ninguno de los miembros de las 120 familias con SNSE. Se trasplantaron 20 pacientes con SNRE sin mutaciones en el gen *NPHS2* y en 7 (35 %) hubo recurrencia del SN, mientras la recurrencia solo se presentó en 2 (8 %) de los 24 trasplantados con mutaciones en el gen *NPHS2*. Ninguno de los 29 pacientes con mutaciones en el gen *NPHS2* que fueron tratados con ciclosporina A o ciclofosfamida tuvieron remisión completa del SN. De los resultados de este estudio concluyen que los pacientes con mutaciones en el gen *NPHS2* que no responden al tratamiento con esteroides tienen reducido riesgo de recurrencia de GEFS en un riñón trasplantado, y como estos hallazgos pueden afectar el plan de tratamiento de un niño con SNRE, sugieren realizarle el estudio para detectar estas mutaciones, si es posible y el paciente lo acepta, al comenzar el tratamiento con esteroides.



#### 4. JUSTIFICACIÓN

El SNRE es un problema de salud pública, con alto costo a nivel mundial. Dentro de los pacientes con SNRE, la resistencia a esteroides es un marcador de mal pronóstico para la remisión total o parcial de la enfermedad. Esta enfermedad se caracteriza por presentar alteraciones en los mecanismos moleculares de la regulación del filtrado glomerular, por lo que los estudios moleculares deberán tener un fuerte impacto en el conocimiento de esta patología y permitirán identificar marcadores de pronóstico y diagnóstico de esta enfermedad.

Hasta el momento en México no se han realizado estudios moleculares relacionados con la enfermedad, ni en niños ni adultos.

El contar con diversos marcadores moleculares de respuesta al tratamiento, ofrece la oportunidad de optar por un mejor esquema costo-efectivo para cada paciente. Con base a los estudios genético moleculares del SNRE primario es probable que se puedan encontrar dichos marcadores; de ser así, se daría una mejor atención al paciente, al ofrecerle un tratamiento con mayores posibilidades de éxito, disminuyendo incluso, el costo, en comparación con otros tratamientos a largo plazo, que probablemente no tendrían efecto, así como la posibilidad de evolucionar a insuficiencia renal crónica.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Determinar la frecuencia de las variantes alélicas p.R229Q y p.R138Q del gen *NPHS2*, en pacientes de la edad pediátrica con SNRE que no remitieron al tratamiento.

### 5.2. Objetivos particulares

- Determinar el estatus alélico, de las variantes alélicas p.R229Q y p.R138Q, del gen *NPHS2*, en pacientes en edad pediátrica con SNRE primario.
- Establecer el estado alélico, de las variantes alélicas p.R229Q y p.R138Q, del gen *NPHS2*, en familiares de los pacientes en edad pediátrica con SNRE primario.
- Relacionar la presencia o ausencia de las variantes alélicas p.R229Q y p.R138Q, del gen *NPHS2*, con la respuesta al tratamiento del SNRE primario.



## 6. DIAGRAMA DE FLUJO

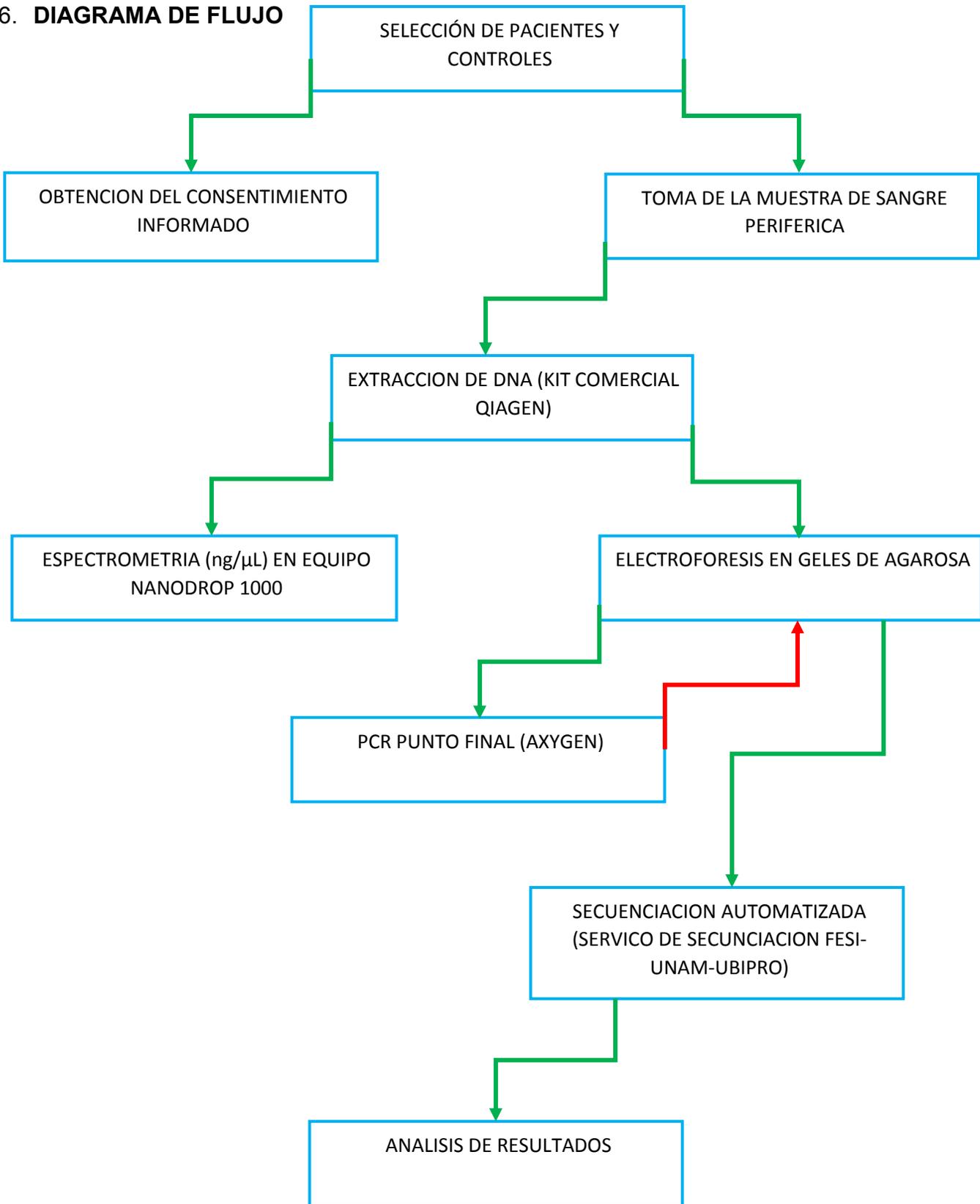


Fig. 2. Diagrama de flujo de actividades realizadas durante la fase experimental.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño de estudio

Casos y controles

### Lugar donde se realizó el proyecto

El proyecto se realizó en el laboratorio de Genómica y Proteómica Funcional de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, con el apoyo del servicio de Nefrología, del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Cuadro 1. Criterios de inclusión

<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Niños de 2-16 años 11 meses de edad con diagnóstico de SNRE primario.</b>	Padres o hermanos de los pacientes que accedieron a la toma de la muestra y que no presentaron evidencia de enfermedad renal.
<b>Pacientes con ausencia demostrable de enfermedades sistémicas que se asocien a SNRE.</b>	
<b>Pacientes con un seguimiento mínimo de seis meses.</b>	

En el cuadro se muestran los criterios de inclusión.



**Cuadro 2. Criterios de exclusión**

<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Se excluyeron a todos los pacientes que se perdieron durante el seguimiento del estudio, por cambio a otro hospital.</b>	Se excluyeron a todos los individuos que se perdieron durante el seguimiento del estudio, por el cambio de sus familiares a otro hospital.

En el cuadro se muestran los criterios de exclusión de pacientes y controles.

**Cuadro 3. Criterios de eliminación**

<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Pacientes de los que no se tuvo adecuado seguimiento durante el estudio.</b>	Se eliminaron todos los individuos de los que no se tuvo un adecuado seguimiento durante el estudio.
<b>Pacientes que durante el estudio se les diagnosticó SNRE secundario.</b>	Individuos en los que la muestra no fue obtenida o no fue suficiente para el estudio molecular del gen <i>NPHS2</i> .
<b>Pacientes en los que la muestra no se obtuvo o fue insuficiente para el estudio molecular del gen <i>NPHS2</i>.</b>	

En el cuadro se observan los criterios de eliminación tanto para los pacientes como para los controles.



## **Aprobación del estudio**

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital de pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

## **Grupos de estudio**

### **Pacientes**

En este estudio fueron incluidos 47 Pacientes (27 hombres y 20 mujeres) de la edad pediátrica (2-16 años 11 meses de edad) diagnosticados con SNRE, referidos del servicio de nefrología del hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **Controles**

Como grupo control fueron incluidos 47 individuos sanos, sin proteinuria, los cuales fueron los familiares de los pacientes.

El Síndrome Nefrótico fue definido como proteinuria mayor a los 40mg/m<sup>2</sup>/h, hipoalbuminemia menor a los 2.5 g/dL, hipercolesterolemia mayor a los 250 mg/dL, oliguria y la presencia de edema.

El SNRE fue definido como la pérdida de la respuesta al tratamiento diario durante un periodo de 6-8 semanas de Prednisona (2 mg/kg).

### **Obtención de las muestras de sangre periférica y cartas de consentimiento informado.**

Las muestras de sangre periférica así como las cartas del consentimiento informado, de los pacientes con SNRE y del grupo control, fueron proporcionados por el servicio de Nefrología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.



## **Extracción de DNA genómico a partir de células nucleadas de sangre periférica (kit comercial de QIAGEN)**

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se colocaron 900µl de RBCL y 300µL de sangre periférica (proporción 3:1), homogeneizándose mediante acción mecánica, para después ser centrifugados a 16000g durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante recuperando la pastilla de leucocitos, que se encuentra adherida en el fondo del tubo Eppendorf, posteriormente se agregaron 300 µl de solución de lisis de células blancas y se homogeniza mediante agitación para que la solución comience a actuar sobre los leucocitos, después de 2 minutos se agregan 100 µl de solución presipitadora de proteínas, homogenizando por agitación, para después centrifugar a 16000g por 2 minutos a 4° C, recuperando el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1.5ml estéril, se agregaron 500 µl de isopropanol previamente enfriado a -80°C, se homogenizó manualmente hasta poder observar la hebra de DNA genómico, se centrifugó durante 2 minutos a 16000g a una temperatura de 4°C para precipitar la molécula de DNA genómico, posteriormente se desechó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 300 µl de etanol al 75%, homogeneizándose mediante agitación y centrifugando la mezcla durante 2 minutos a 16000g a 4°C con el fin de eliminar de impurezas a la molécula de DNA genómico, se desechó el sobrenadante, se dejó secar la muestra por 30 segundos y posteriormente fue hidratada con agua libre de DNAsas (30 µl -50 µl ) y finalmente se conservó a -80°C hasta su uso.

## **Determinación de la integridad del DNA genómico mediante electroforesis en geles de agarosa.**

Se verificó la integridad del DNA genómico extraído de las células nucleadas, realizando una mezcla de 2 µl del material genético con 2 µl de buffer de carga y 2 µl de sybr gold el cual es un agente intercalante, todo esto mediante electroforesis en geles de agarosa, al 1%, embebidos en un buffer al 1%(TBE), durante 60 minutos a 90 volts y 45 miliampers con el fin de evitar el sobrecalentamiento del buffer y del gel, disminuyendo problemas de corrida.



**Fig. 3. Cámara de electroforesis BIO-RAD, para geles de agarosa. (Imagen tomada directamente de productos BIO-RAD. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))**

#### **Observación del DNA en el fotodocumentador**

Una vez concluido el tiempo de corrida de la electroforesis, se toma el gel de agarosa con las muestras que ya migraron y se coloca en la plataforma del fotodocumentador para ser irradiado con rayos ultravioleta para excitar el agente intercalante (sybr gold), para que pueda emitir fluorescencia y de esa manera poder observar la integridad de las muestras de DNA genómico. (fig.4).



**Fig. 4. Fotodocumentador de luz ultravioleta para geles de agarosa. (Imagen tomada directamente de productos BIO-RAD. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))**

## Cuantificación de DNA genómico

Las muestras de DNA genómico, fueron cuantificadas en un espectrofotómetro para cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas NanoDrop ND-1000, con el fin de obtener la cantidad y pureza de cada una de las muestras (fig. 5).



Fig. 5. Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Imagen tomada de: <http://www.microgen.ouhsc.edu/nanodrop.htm>

## Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos para los exones 5 y 3 del gen *NPHS2*, se realizó a partir de regiones intrónicas, mediante el programa PRIMER 3 PLUS y fueron verificados con el programa Oligo 4.

Cuadro.4. Características de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

REGION	NOMBRE	SECUENCIA	T <sub>m</sub>	%CG	Tamaño del Amplicon
Exón 5	R229Q-F	TCTGCCTAGATCGTGACCAA	59.4°C	50%	201pb
Exón 5	R229Q-R	GGCGATGCTCTTCCTCTCTA	59.7°C	55%	201pb
Exón 3	R138Q-F	TATGCCAAGGCCTTTTGAAG	60.2°C	45%	205pb
Exón 3	R138Q-R	GCATGGGTTGAAGAAATTGG	60.3°C	45%	205pb

La temperatura media (T<sub>m</sub>), para ambos pares de oligonucleótidos es de 58.2°C.



## Secuencia de los exones 3 y 5 del gen *NPHS2*.

### Exón 3

AGTATTAATAGAAATTTTTCTGTTCTCAAAACAAAAAATTTCTGATATCTAGGATCATTCT **TATGCCAAGGCCTT**  
**TTGAAG**ACTTTTTCTTTCTGGGAGTGATTTGAAAGGATTAATTTCTTTAG **GTTGTACAAGAGTATGAAAGAGTA**  
**ATTATATTCCGACTGGGACATCTGCTTCCTGGAAGAGCCAAAGGCCCTG**GTAAAAAACACTCTTTTTTTCTAAA  
CACCTCTCCTGACTTG **CCAATTTCTCAACCCATGC**AGATTTGTAATATGGACCTCAGATTAAATGAAGTAACTT

### Exón 5

GGAGCCCAAGAATCAAGCCTGTCATCCAAACTTTTT **TCTGCCTAGATCGTGACCAA** **AGACATGTTTATAATGGAGA**  
**TAGATGCCATTTGCTACTACCGAATGGAAAATGCCTCTTTCTCCTAAGCAGTCTTGCTCATGTATCTAAAGCTG**  
**TGCAATTCCTTGTCAAACCACTATGAAGCGTCTCCTAGCACATCGATCCCTCACTGAAATTTCT** **TAGAGAGGA**  
**AGAGCATCGCC** **CAAGATGCAAAGGTA**CTTAGATAAACATAATGGCCAATATGCTGAAATATTTATCTTTTATTCAT

Fig. 6. Secuencia parcial de los exones 3 y 5 del gen *NPHS2*, donde se muestra en azul la posición de los oligonucleótidos, para cada exón.

## Amplificación de los exones 5 y 3 del gen *NPHS2*, mediante PCR punto final.

A partir de las muestras de DNA genómico obtenidas, se amplificaron las regiones de los exones 5 y 3 del gen *NPHS2* por la técnica de PCR punto final.

Una vez obtenida la temperatura de alineación ( $T_m$ ) de los oligonucleótidos para los exones 5 y 3, se llevo a cabo la amplificación de ambos exones para los 47 pacientes y los 47 controles.

## Composición de la mezcla de reacción de PCR

La mezcla de reacción para la PCR punto final está constituida de: Buffer de reacción 1X,  $MgCl_2$  a 1.5mM, dNTP's al 0.200mM, *Taq Pol* (platinum) a 1.5 Uds., oligonucleótidos forward y reverse a 20pM/ $\mu$ l, DNA a una concentración de 100ng/ $\mu$ l, aforando la mezcla de reacción a un volumen final de 30  $\mu$ l, con agua miliQ.

## Condiciones de PCR

El programa que se utilizó para la reacción de PCR punto final fue: un choque térmico de 95°C durante 10 minutos para activar la enzima *Taq Pol*, seguido por el paso de \*desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, la temperatura de \*alineamiento fue de 58.2°C durante 30 segundos,



la \*elongación a 72°C durante 30 segundos, se agregó el paso de elongación final con una temperatura de 72°C durante 4 minutos y una temperatura de conservación final a 4°C por tiempo indefinido.

\*La reacción se realizó durante 30 ciclos en un termociclador AXYGEN, con una placa de 96 pocillos.

### **Determinación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.**

Se verificó la integridad de los productos de PCR obtenidos, realizando una mezcla de 2µl del producto, con 2 µl de buffer de carga y 2 µl de agente intercalante (sybr gold), mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, embebidos en un buffer al 2% (TBE), dejando que los productos migren durante 90 minutos, con una corriente de 90 volts, y 45 miliampers, posteriormente fueron irradiados con luz ultravioleta, con el fin de excitar la agente intercalante, para que este emita fluorescencia y poder determinar la presencia e la integridad de los productos.

### **Secuenciación de los productos de PCR.**

Se realizó secuenciación directa de los productos de PCR, con el paquete comercial Big Dye en un analizador genético automatizado de *Aplied Biosystems* (servicio de secuenciación de la FES-IZTACALA-UBIPRO). Las secuencias arrojadas por el analizador se compararon con las ya reportadas en las bases de datos (NCBI y ENSEMBL).

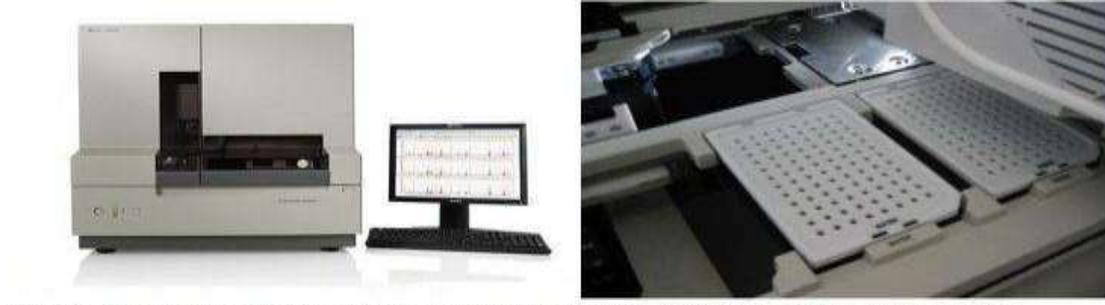
### **Purificación de los productos de la reacción de secuenciación**

La purificación se llevó a cabo por el método de precipitación alcohólica de acuerdo al protocolo de *Aplied Biosystems*. Posteriormente las muestras se secaron en un concentrador al vacío (*Speed Vacuum*) para eliminar los residuos de etanol. Una vez secas, se resuspenden en formamida y se desnaturalizan a 96°C durante 5 minutos.

## Secuenciación automatizada

Finalmente, las muestras se separaron por electroforesis capilar en un analizador genético AB 3130 con el paquete de *Sequencing Analysis v.5.3* (fig. 7).

Las variantes identificadas, fueron confirmadas por duplicado en ambas hebras del DNA (productos de PCR) en reacciones independientes.



**Fig.7.** Secuenciador automatizado 3130 de *Applied Biosystems*, basado en electroforesis capilar, placas utilizadas para la secuenciación. (Imagen tomada de productos *appliedbiosystems.com*).

## 8. RESULTADOS

### Análisis electroforético y espectrofotométrico de DNA genómico

Muestras de DNA genómico de pacientes con SNRE y de sus controles analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y en un fotodocumentador irradiando al gel con rayos ultravioleta. En la fig. 8, se muestra la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa donde se observa la integridad del DNA genómico, así como su alto peso molecular.

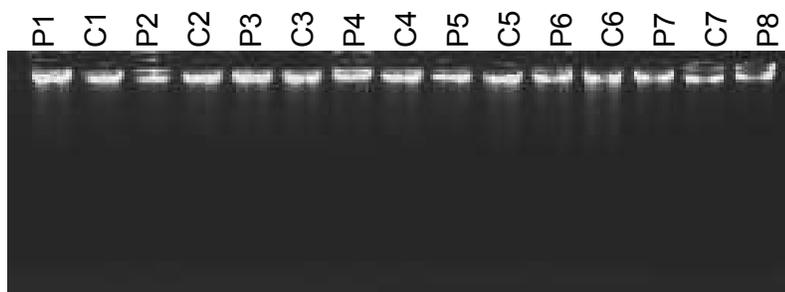


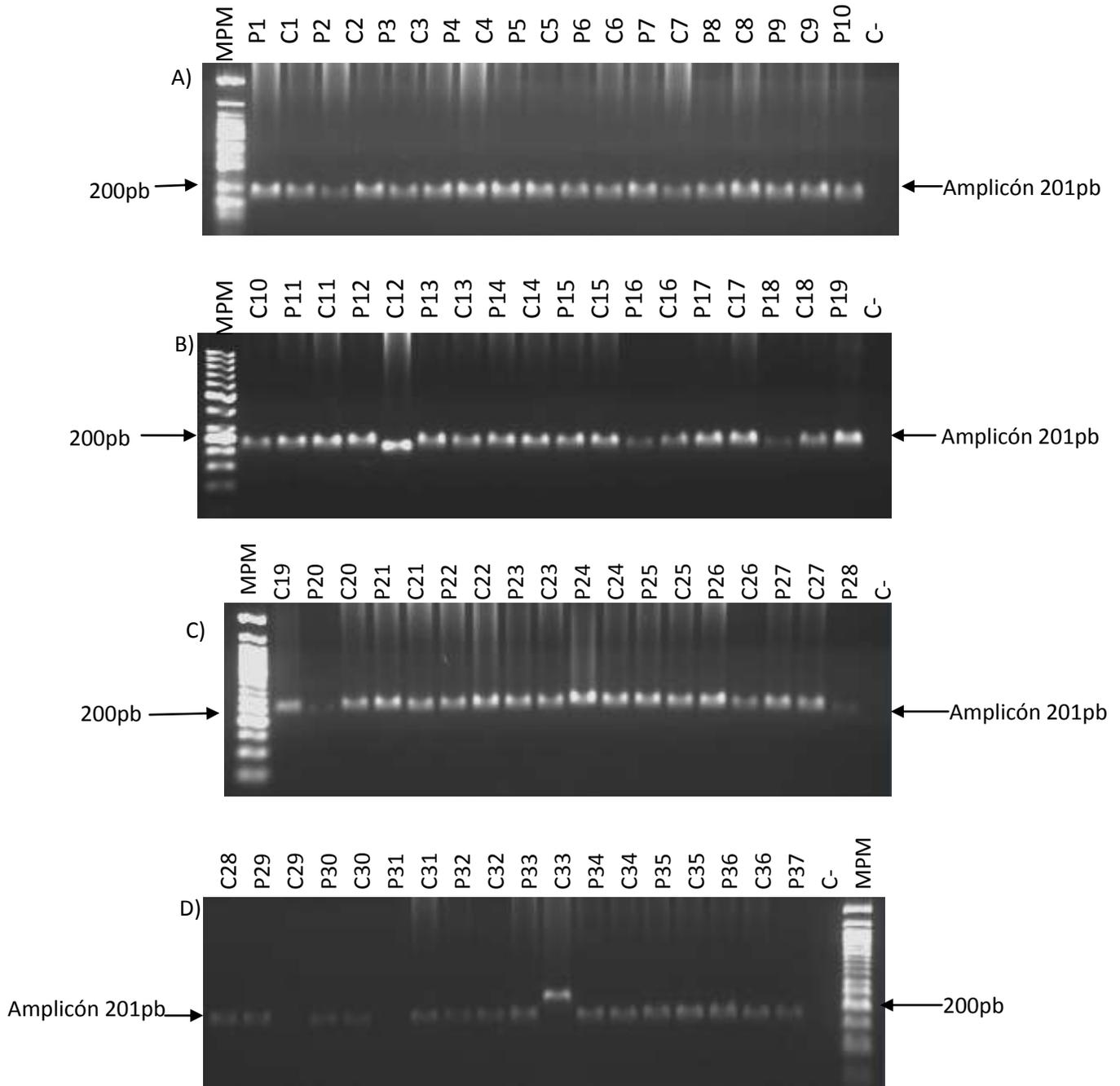
Fig.8. Fotografía de un gel de agarosa, en el que se puede apreciar muestras de DNA genómico, el cual se caracteriza por su alto peso molecular. Con la P y números arábigos se identifican a los pacientes y con la C y números arábigos se identifican a los controles.

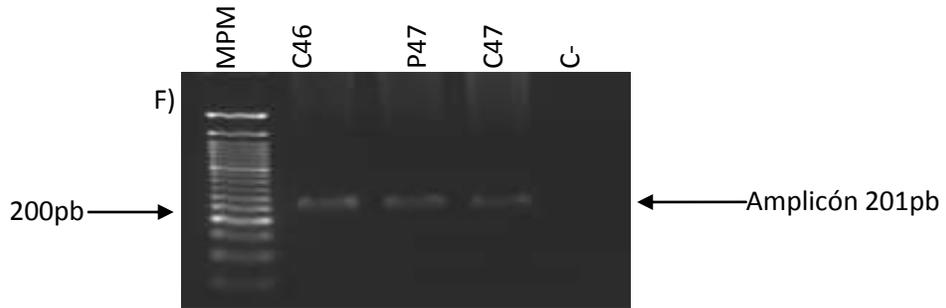
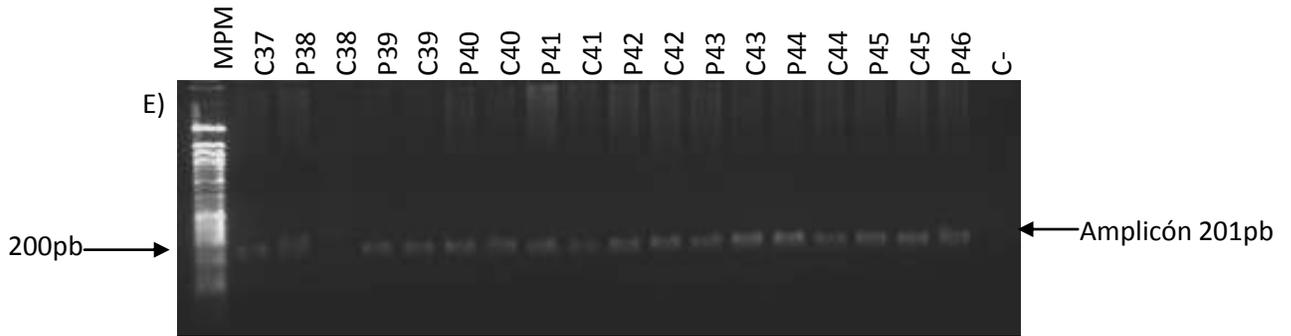
### Amplificación de los exones 5(p.R229Q) y 3 (p.R138Q) del gen *NPHS2*

Para la amplificación de los exones 5 y 3 del gen *NPHS2*, donde podrían localizarse las variantes alélicas p.R229Q y p.R138Q respectivamente, se realizó PCR punto final, con el fin de determinar la temperatura de alineación de los oligonucleótidos correspondientes a cada uno de los exones a estudiar. Una vez que se logró estandarizar la técnica de PCR, se amplificaron los exones 5

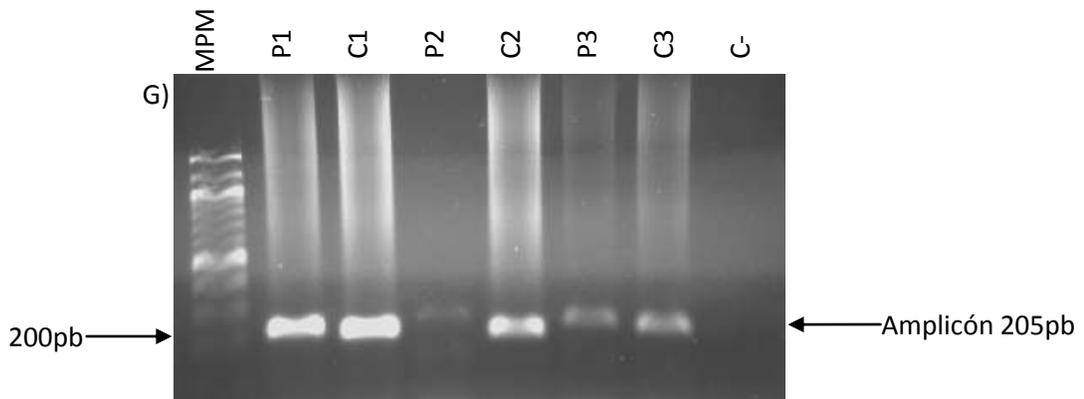


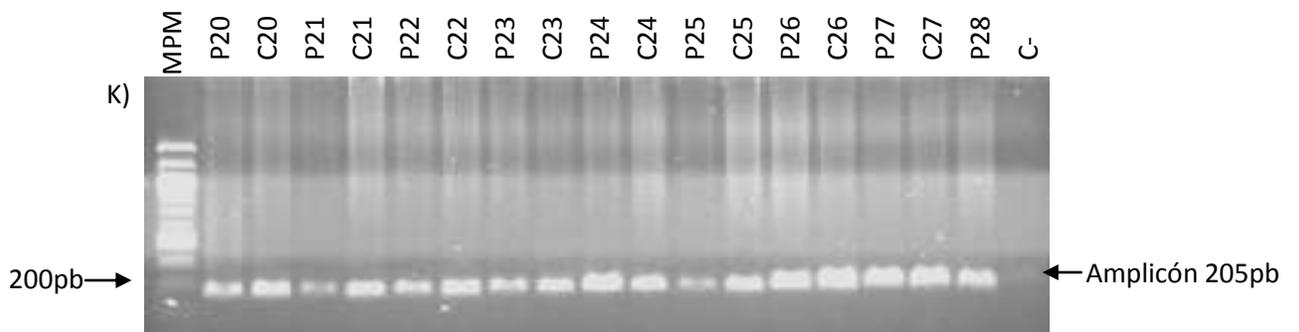
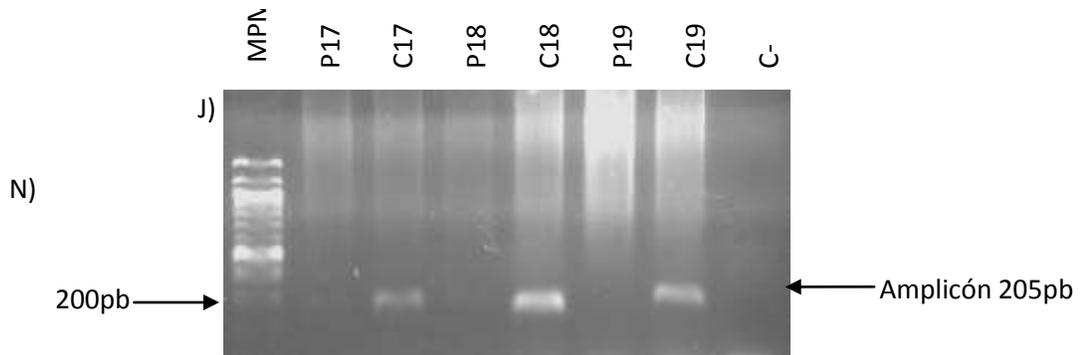
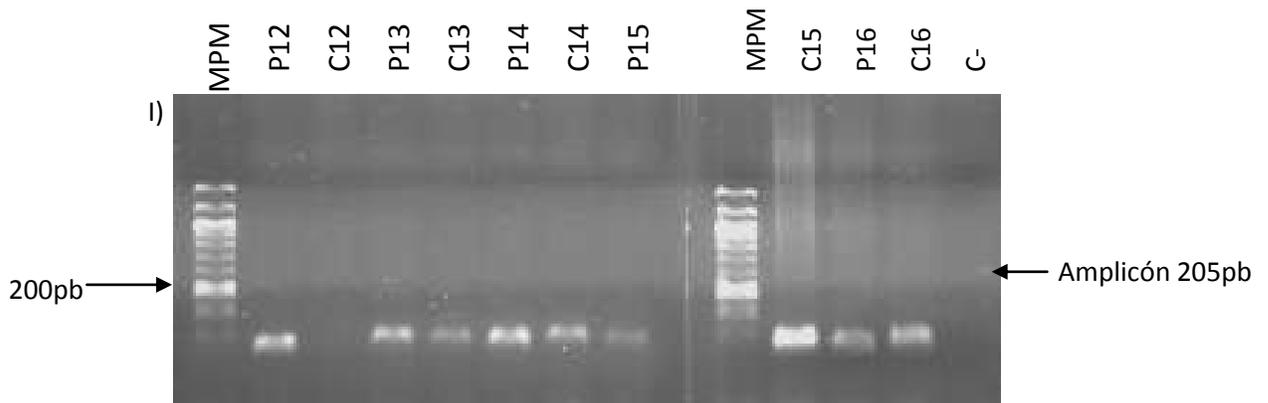
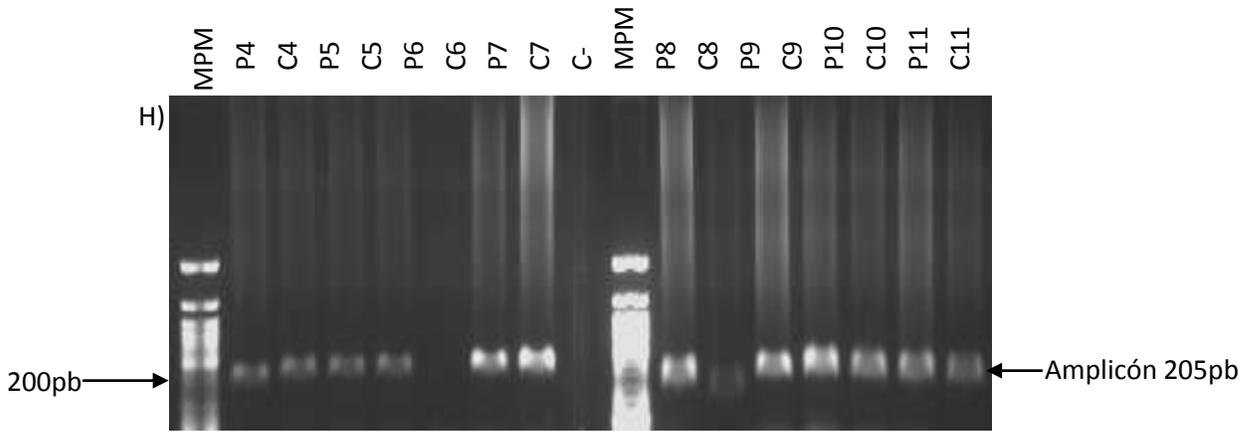
(p.R229Q) y 3 (p.R138Q) del gen *NPFS2* de los 47 pacientes así como de los 47 controles (figs. 9 y 10). Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2%, posteriormente los geles se visualizaron mediante la irradiación con luz UV en un transiluminador para determinar la presencia de los productos de PCR de ambos exones.

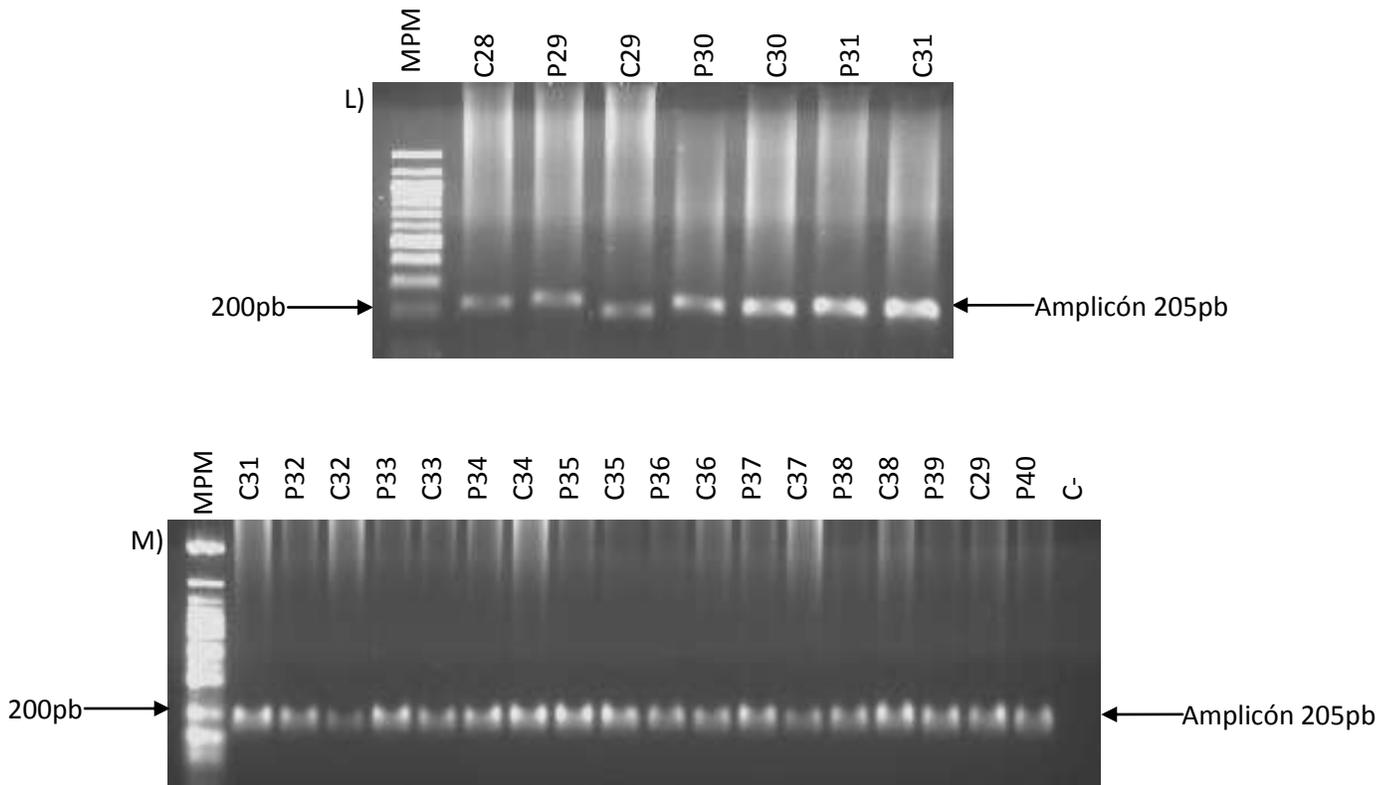




**Fig.9.** Imagen de los productos de amplificación del exón 5 del gen *NPHS2*, separados por electroforesis en geles de agarosa. En los incisos: A, B, C, D, E y F, se identifican a los pacientes con la letra P y números arábigos, con la letra C y números arábigos se identifican a los controles. Con la letra C- al control negativo y con las letras MPM, el marcador de peso molecular.







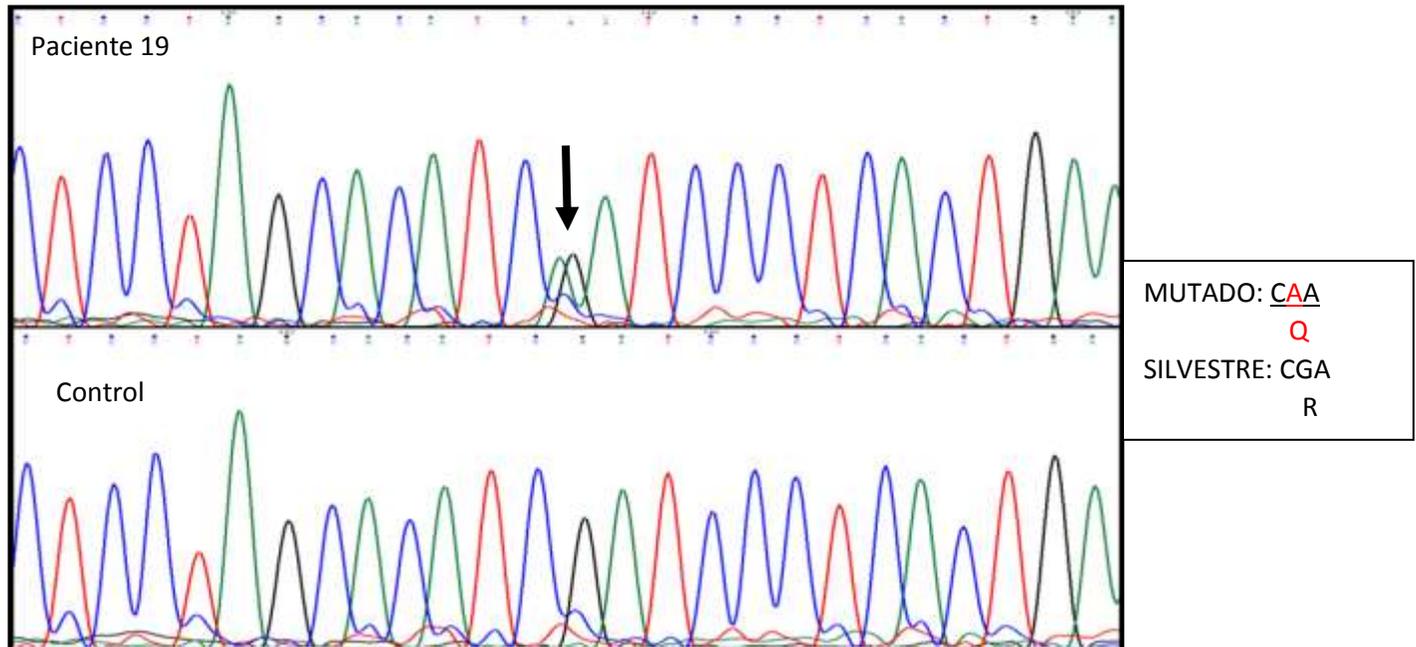
**Fig.10.** Imagen de los productos de PCR, del exón 3, separados por electroforesis en gels de agarosa al 2%. Con la letra P y número arábigo, se identifican a los pacientes, con la letra C y número arábigo, se identifican a los controles, con la letra C- el control negativo y con las letras MPM, se denota el marcador de peso molecular.

El análisis molecular de los exones 5 y 3 del gen *NPHS2* permitió identificar la presencia del polimorfismo c.R229Q en el exón 5 del gen *NPHS2*, en dos pacientes del sexo femenino con SNRE, esta variante corresponde a la sustitución de una de una Guanina por una Adenina en la posición 686 (G686A), provocando un cambio del aminoácido Arginina (R) por Glutamina (Q), en el codón 229.

## Análisis de las secuencias

Posterior a las reacciones de PCR, para cada paciente y los controles, se realizó la reacción de secuenciación directa en un secuenciador ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystem, servicio de secuenciación de la UBIPRO, FESI-UNAM, MÉXICO*) (fig. 8). Las variantes encontradas fueron secuenciadas por duplicado, en ambas cadenas del DNA.

Las secuencias que arrojaron los Electroferogramas tanto de pacientes como de controles fueron comparadas con las secuencias ya reportadas en 2 bases de datos (*NCBI y ENSEMBL*) empleando la herramienta *BLAST (Basic Alignment Sequence Tool)*. Esta metodología nos permitió identificar variantes en el exón 5 del gen *NPHS2* en muestras de cuatro pacientes con SNRE.



**Fig.11. Electroferograma de la secuencia parcial del exon5 del gen *NPHS2* del paciente 19 y su control, la flecha señala el estado heterocigoto para el polimorfismo R229Q.**

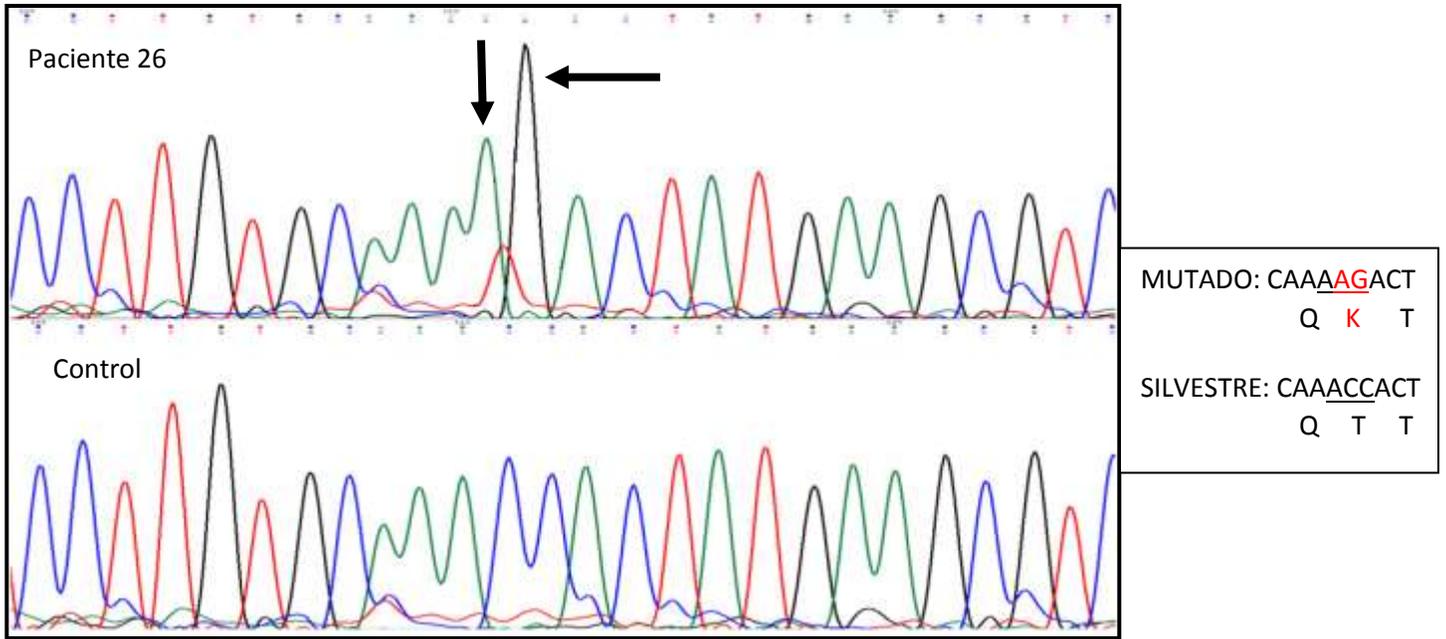


Fig.12. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen *NPHS2*, del paciente 26, en comparación con su control. Las flechas nos muestran los cambios (C658A y C659G), encontradas en este paciente.

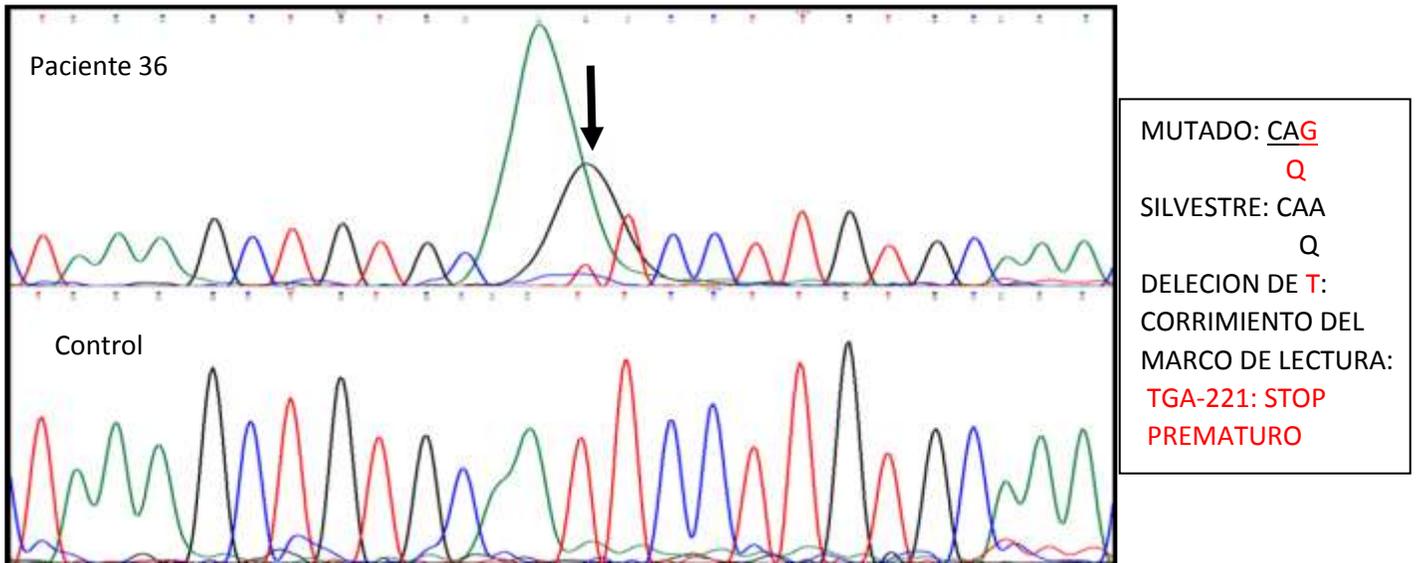


Fig.13. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen *NPHS2*, del paciente 36, comparado con un control sano. La flecha nos indica el sitio de las mutaciones encontradas en este paciente. (Cambio de A-G y deleción de una T).

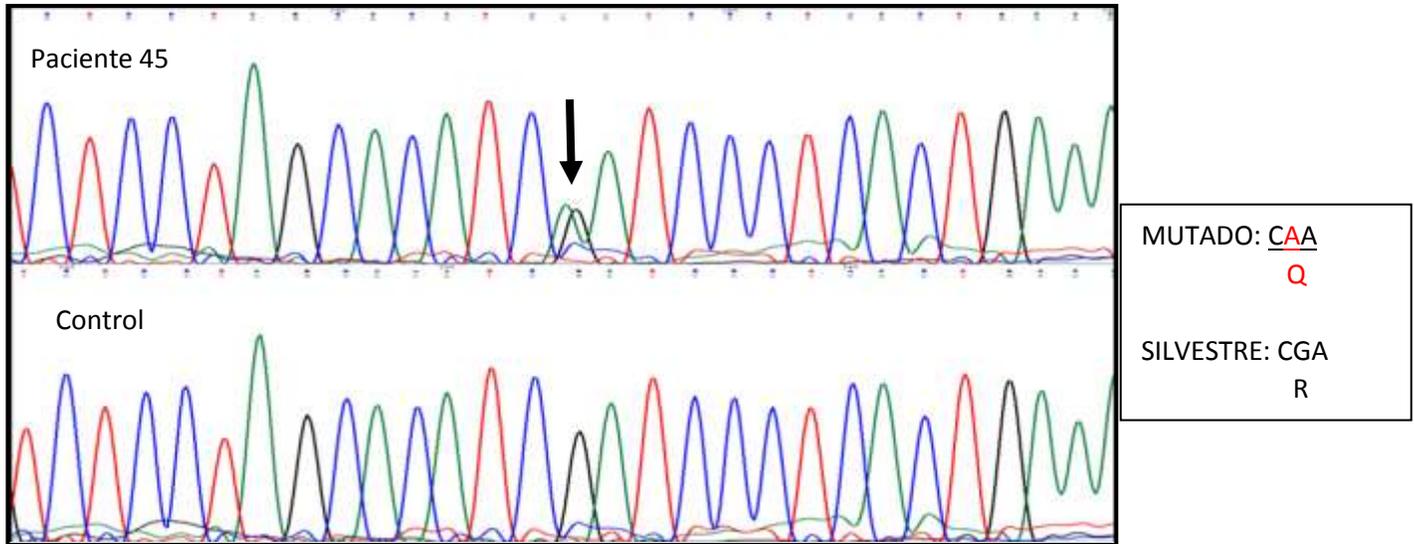


Fig.14. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen *NPHS2*, del paciente 93, comparado con su control. La flecha señala el estado heterocigoto del polimorfismo R229Q.

**Cuadro.5. variantes alélicas encontradas**

Paciente	Tipo	Cr: Pb	Alelos	A.A.	A.A. coordenadas	Clase	Fuente	Nota
VSL-SN-19	Exónico (Exn. 5)	1:	G686A	R229Q	229(2)	Mutación de Sentido Equivocado	NCBI ENSEMBL	
AMDJ-SN-26	Exónico (Exn. 5)	1:	C658A	T219K	219(2)	Mutación de Sentido Equivocado		X
AMDJ-SN-26	Exónico (Exn. 5)	1:	C659G	T219K	219(3)	Mutación de Sentido Equivocado		X
JAVM-SN-36	Exónico (Exn. 5)	1:	A645G	Q215Q	215(3)	SNP Sinónimo		X
JAVM-SN-36	Exónico (Exn. 5)	1:	T647	TGA 221	-----	Delección Stop prematuro		X
KGH-SN-45	Exónico (Exn. 5)	1:	G686A	R229Q	229(2)	Mutación de Sentido Equivocado	NCBI ENSEMBL	

Variantes encontradas en los pacientes con SNRE estudiados en el presente trabajo.

x. Las marcadas con X corresponde a las variantes que al momento no se encuentran reportadas en la literatura.



## Análisis de las secuencias

Después de haber realizado la Reacción en Cadena de la Polimerasa y la electroforesis de los productos de PCR de los pacientes con SNRE, se realizó la reacción de secuenciación directa en un secuenciador *ABI PRISM 3130* (*Applied Biosystem, UBIPRO, FESI-UNAM, MEXICO*). Las variantes detectadas fueron secuenciadas dos veces, en ambas cadenas del DNA.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las ya reportadas en dos bases de datos públicas (*NCBI* y *ENSEMBL*), mediante la herramienta de *BLAST* (*Basic Alignment Sequence Tool*) y con las muestras control, esta estrategia permitió identificar un total de 5 variantes en las muestras de pacientes con SNRE.

Las 5 variantes alélicas fueron identificadas en el exón 5 del gen *NPHS2*: R229Q, C658A, C659G, Q215Q y T647<sup>ΔT/ΔT</sup>.

El polimorfismo R229Q, fue encontrado en dos muestras de pacientes con SNRE (muestras 19 y 45) y corresponde a una variante de sentido equivocado, la cual presenta el cambio de una guanina por una Adenina (G>A) (figs. 11 y 14) E1 y E4, en la posición 686 de la cadena de DNA, la cual genera el cambio del aminoácido Arginina por Glutamina en la posición 229. Esta variante no fue encontrada en ninguna de las muestras control, además de que ya ha sido reportada por (Tsukaguchi et al. 2002 y 2006).

La segunda y tercera variante se detectaron en la muestra de un paciente con SNRE, de las cuales la segunda variante corresponden al cambio de una Citocina por una Adenina (C>A) en la posición 658 de la secuencia nucleotídica del Electroferograma del paciente 26, (fig.12), la tercera variante corresponde al cambio de una Citocina por una Guanina (C>G) en la posición 659 en la secuencia parcial del exón 5 del gen *NPHS2* del paciente 26, provocando el cambio del aminoácido Treonina (T) por el aminoácido lisina (K), como se demuestra en la (fig.12). Estas variantes no se localizaron en las muestras control, además de no estar descritas en las bases de datos públicas (*variantes-ENSEMBL, SNPdb, OMIM-NCBI*).



La cuarta variante alélica que fue detectada en uno de los pacientes (muestra 36), corresponde al cambio de un solo nucleótido o SNP, el cual se determinó como un SNP sinónimo, ya que al haber un cambio de una Timina por una guanina (A645G), este no provoca que cambie la secuencia aminoacídica (Q215Q) (fig. 13).

La variante número 5 detectada en uno de los pacientes (muestra 36), corresponde a la delección de una Timina (T) en la posición 647 del exón 5 del gen *NPHS2*, conllevando un corrimiento en el marco de lectura de la secuencia de nucleótidos de DNA, generando un codón de paro prematuro (TGA-221). Esta variante no se encuentra reportada en las bases de datos públicas. (fig.13).



## 9. DISCUSIÓN

En varias investigaciones clínicas como las de Tsukaguchi *et al.* 2002, se ha demostrado que los pacientes con SNRE presentan mutaciones a lo largo del gen *NPHS2*, en el presente trabajo, en 4 de 47 pacientes de la edad pediátrica con SNRE, hemos encontrado 5 variantes alélicas, de las cuales 4 son nuevas y hasta el momento no han sido reportadas en las bases de datos públicas (*variantes-ENSEMBL, SNPdb, OMIM-NCBI*).

En un estudio realizado, en un grupo de pacientes con SNRE, provenientes de Europa y África, se detectaron variantes alélicas en el gen *NPHS2*, incluyendo las variantes más comunes como R138Q, la cual se cree que se debe a un efecto fundador en el norte de Europa, y R229Q, la cual se encuentra asociada con un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad en población caucásica. (Weber *et al.* 2004).

En el presente trabajo se utilizó la técnica de PCR punto final para la amplificación de los exones 3 y 5 del gen *NPHS2*, donde se localizarían las variantes alélicas R138Q y R229Q respectivamente, al observar que los productos de PCR se encontraban en el peso esperado, consideramos que fueron lo suficientemente confiables para su secuenciación. Dado que no teníamos un control positivo, tomamos la decisión de secuenciar tres muestras, cabe mencionar que las muestras pertenecen a diferentes personas, donde la primera muestra corresponde a uno de los pacientes, la segunda es de uno de los controles y la tercera pertenece a un individuo que no se encuentra incluido en este estudio. Las secuencias obtenidas se compararon con las de las bases de datos por medio de la herramienta *BLAST* y al comprobar que las secuencias presentaron una homología del 100% decidimos secuenciar el resto de las muestras.

Mediante la secuenciación de los productos de PCR pudimos identificar 5 variantes alélicas exclusivamente en el exón 5, pero ninguna en el exón 3. Las variantes alélicas que localizamos en las muestras de pacientes, fueron secuenciadas por duplicado y en ambas cadenas del DNA, con la finalidad de asegurar que las variantes encontradas, realmente fueran cambios en el material genético y no que se deban a errores ocasionados por el programa que fue utilizado para su análisis.



Mediante la técnica de secuenciación directa, identificamos la variante R229Q del gen *NPHS2* en 2 pacientes con SNRE, la cual presenta una frecuencia del 4% en nuestro grupo de estudio, ésta variante ya ha sido reportada por Tsukaguchi *et al.* 2002, con una frecuencia del 4% en un grupo de pacientes con SNRE provenientes Irán, ellos realizaron un ensayo *in vitro* de la proteína mutante R229Q. Sus resultados demostraron que la proteína mutante disminuye su afinidad por la proteína Nefrina (*NPHS1*) la cual también se encuentra involucrada en el filtrado glomerular.

La variante R229Q ha sido reportada recientemente por Jungraithmayr *et al.* 2011 con una frecuencia del 3.7% en su grupo de estudio. Ellos encontraron ésta variante en estado heterocigoto, sugiriendo de igual manera que Caridi *et al.* 2003 que la variante por sí sola no es capaz de ocasionar la enfermedad, pero que si predispone al paciente a ser más susceptible a la enfermedad.

En el presente trabajo, hemos identificado la variante R229Q en estado heterocigoto en ambos pacientes, lo que nos sugiere, por un lado de acuerdo a lo reportado por Tsukaguchi *et al.* 2002, que la Podocina al presentar la variante R229Q en estado heterocigoto, esté disminuyendo su afinidad con la Nefrina, ya que la asociación de éstas dos proteínas son indispensables para la formación de la hendidura del diafragma glomerular. El que los pacientes sigan presentando proteinuria, es un indicador de que no se está formando la hendidura del diafragma o poro glomerular, permitiendo el paso de proteínas con un tamaño mayor a los 40 nm como lo es la albumina.

Por otro lado, el haber identificado la variante R229Q en estado heterocigoto, nos sugiere de acuerdo a lo reportado por Caridi *et al.* 2003, que la variante por sí sola no es causante de la enfermedad, pero que probablemente si esté predisponiendo a los pacientes a ser más susceptibles a ésta, si se encuentra asociada a otras mutaciones del gen *NPHS2* o de otros genes.

En estudios previos como los de Weber *et al.* 2004 y Jungraithmayr *et al.* 2011, se han reportado más de 30 variantes alélicas en estado homocigoto y en estado heterocigoto a lo largo del gen *NPHS2* en sus grupos de estudio, las cuales, ellos asumen que se encuentran asociadas al



desarrollo de la enfermedad, en nuestro estudio, aparte de la variante R229Q, hemos encontrado 4 variantes nuevas (C658A, C659G, Q215Q y T647) en el exón 5 del gen *NPHS2*.

Dos mutaciones que encontramos (C658A y C659G) en el mismo paciente y en el mismo codón (219), corresponden a mutaciones de sentido equivocado. Las variantes que hemos encontrado en nuestro estudio se localizan en el extremo C-terminal de la Podocina, mientras que Fuchshuber *et al.* 1995, menciona que la gran mayoría de las mutaciones se encuentran agrupadas en el extremo N-terminal de la Podocina, al paso del tiempo se han descubierto nuevas mutaciones y la posición general de ellas ya no es en el extremo N-terminal, sino que ahora la gran mayoría de ellas se localizan en el extremo C-terminal como lo demostró Frishberg *et al.* 2006, lo que nos sugiere un papel fundamental en el funcionamiento de éste dominio, y que probablemente las mutaciones que encontramos en nuestro estudio estén modificando la estructura tridimensional de la proteína Podocina, ya que a nivel de aminoácido el cambio corresponde al de una Treonina por una Lisina (T219K), y así, de esta manera, se esté causando un fenotipo más severo al momento de presentar la enfermedad.

Otra de las variantes que identificamos en uno de los pacientes con SNRE, (A645G) corresponde a un SNP que produce una mutación con sentido (Q215Q), el cual no afecta al producto final, dado que al cambiar una Adenina por una Guanina en la tercera posición del triplete, es muy poco probable que éste sea afectado, dado que en el código genético es degenerando, lo que nos indica que diferentes tripletes codifican para el mismo aminoácido.

La cuarta variante corresponde a la delección de una Timina en la posición 647, provocando el corrimiento del marco de lectura, generando un codón de paro prematuro en la posición 663, lo que nos sugiere, que al producirse la proteína, ésta sea una proteína incompleta, lo que nos sugiere nuevamente al menos un par de cosas, una es que la proteína producida presente pérdida de función, lo que significa que la proteína no funcione para nada, y por otro lado, que la proteína mutante, esté funcionando para algo que no le corresponde, lo que significa que la proteína ha obtenido lo que conocemos como ganancia de función, así, de esta manera la pérdida o ganancia de función de la proteína Podocina, podría ser lo que esté causando el Síndrome Nefrótico Resistente a Esteroides.



Nosotros no podemos asegurar ninguna de estas posibilidades, ya que no hemos realizado estudios a nivel de transcrito ni a nivel de proteína.

Nosotros hemos realizado una ardua investigación documental, en busca de algún reporte acerca de las 4 nuevas variantes que hemos identificado en nuestro grupo de estudio, hasta el momento no ha sido encontrado ningún reporte por parte de otros grupos de investigación, en los que se mencione alguna de las variantes que nosotros encontramos.



## 10. CONCLUSIONES

La presencia de variantes más comunes como el polimorfismo R229Q, mejorara la detección de portadores, así como el asesoramiento genético y de esta manera poder ofrecer un mejor esquema de tratamiento y la eliminación de los corticoesteroides como una opción terapéutica. La sustitución de una Guanina (G) por una Adenina (A), reprime el sitio de corte de la enzima *Cla1*, impidiendo la detección rápida de esta mutación. La investigación adicional es requerida para determinar si un fenotipo leve puede estar asociado con la heterocigocidad de las variantes encontradas en el gen *NPHS2*, así como si la homocigocidad para el polimorfismo R229Q tiene alguna disfunción renal. La gravedad de la enfermedad asociada con las variantes en el gen *NPHS2* es demasiado variable, lo que sugiere que otros factores genéticos y ambientales, están involucrados en el desarrollo del síndrome nefrótico resistente a esteroides. La identificación de tales factores, así como variantes alélicas en el gen de la Podocina (*NPHS2*), mejorara el diagnóstico y el tratamiento del síndrome nefrótico resistente a esteroides.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Bakr A, Yehia S, El-Ghannam D, Hammad A, Ragab M, Sarhan A, Al-Husseni F, Al-Morsy Z. *NPHS2* mutations. *Indian Journal of Pediatrics*. 2008; 75(2): 135-8.
2. Barrat T, Avner E, Harmon W. *Pediatric Nephrology*. Lippincott Williams & Wilkins 4<sup>o</sup> edition 1999.
3. Berdeli A, Mir S, Yavascan O, Serderoglu E, Bak M, Aksu N, Oner A, Anarat A, Donmez O, Yildiz N, Sever L, Tabel Y, Dusunsel R, Sonmez F, Cakar N. *NPHS2* (podocin) mutations in Turkish children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*. 2007; 22: 2031-40.
4. Boute N, Gribouval N, Roselli S, Benessy F, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genetics* 2000; 24, 349-354
5. Broyer M, Meyrier A, Niaudet P. Minimal changes and focal segmental glomerulosclerosis. *Textbook of Clinical Nephrology* 2<sup>o</sup> edition Oxford University Press 1997.
6. Caridi G, Bertelli R, Scolari F, Sanna-Cherchi S, Di Duca M, Ghiggeri G. Podocin mutations in sporadic focal-segmental glomerulosclerosis occurring in adulthood. *Kidney International* 2003; 64: 365.
7. Chernin G, Heeringa SF, Gbadegesin R, Liu J, Hinkes BG, Vega-Warner V, Hildebrandt F. Low prevalence of *NPHS2* mutations in African American children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*. 2008; 23: 1455-60.
8. Cho HY, Lee JH, Choi HJ, Lee BH, Ha IS, Choi Y, Cheong HI. *WT1* and *NPHS2* mutations in Korean children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*. 2008; 23: 63-70.
9. Churg J, Aviv R, White H. Pathology of the Nephrotic Syndrome. A report for the International Study of Kidney Disease in Children. *Lancet* 1970; 1: 129.
10. Di Duca M, Oleggini R, Sanna-Cherchi S, Pasquali L, Di Donato A, Parodi S, Bertelli R, Caridi G, Frasca G, Cerullo G, Amoroso A, Schena FP, Scolari F, Ghiggeri GM, TheEuropean IgA Nephropathy Consortium. *Cis* and *trans* regulatory elements in *NPHS2* promoter: implications in proteinuria and progression of renal disease. *Kidney International* 2006; 70: 1332-41.
11. Donckerwolke R, Vande Walle J. Pathogenesis of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney International* 1997; 51(Suppl58): S72-S74.



12. Frishberg Y, Feinstein S, Rinat C, Becker-Cohen R, Lerer I, Raas-Rothschild A, Ferber B, Nir A. The heart of children with steroid-resistant nephrotic syndrome: is it all podocin? *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17: 227-31.
13. Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, Gubler M, Broyer M, Beckmann J, Niaudet P, Antignac C. Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Human Molecular Genetics* 1995; 4 (11): 2155-8.
14. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Hangan D, Ozaltin F, Zenker M, Hildebrandt F. Nephrotic syndrome in the first year of life: Two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics*. 2007; 119: 2907-e19.
15. Hodson E, Habashy D, Craig J, Interventions for idiopathic steroid-resistant nephritic syndrome in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010, Issue 11.
16. Hodson E, Knight J, Willis N, Craig J. Corticosteroid therapy in nephrotic syndrome: a meta analysis of randomized controlled trials. *Archives of Disease in Childhood* 2000; 83: 45-51.
17. Hogg R, Portmann R, Milliner D, Lemley K, Eddy A, Ingelfinger J. Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children. Recommendations from a pediatric nephrology Panel established at the National Kidney Foundation Conference of Proteinuria, Albuminuria, Risk, Assessment Detection and Elimination (PARADE). *Pediatrics* 2000; 5: 5
18. International Study of Kidney Disease in Children. The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. *Journal of Pediatrics* 1981; 98: 561-4.
19. Jungraithmayr T, Hofer K, Cochat P, Chernin G, Cortina G, Fargue S, Grimm P, Knueppel T, Kowarsh A, Neuhaus T, Pagel P, Pfeiffer K, Schäfer F, Schönermark U, Seeman T, oenshoff B, Weber S, Winn M, Zschocke J, Zimmerhackl L. Screening for *NPHS2* Mutations May Help Predicted FSGS Recurrence after Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22: 579-585.
20. Kaplan M, Kim S, North K, Rennke H, Correia L, Tong H, Mathis B, Rodríguez-Pérez J, Allen P, Beggs A, Pollak M. Mutations in *ACTN4*, encoding  $\alpha$ -actinin 4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genetics*. 2000; 64: 251-256.
21. Kasiazek J, Wyszynski T. Short versus long initial prednisolone therapy for initial episode of nephritic syndrome. *Acta Pediatrics* 1995; 84: 8899-8993.
22. Kestilä, M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Routsalainen V, Morita T, Nissinen M, Kashtan C, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell* 1998; 1: 575-582.



23. Koziell A, Grech V, Hussain S, Lee G, Lenkkeri U, Tryggvason K, Scambler P. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Human Molecular Genetics* 2002; 11: 379-88.
24. Maruyama K, Lijima K, Ikeda M, Kitamura A, Tsukaguchi H, Yoshiya K, Hoshii S, Wada N, Uemura O, Satomura K, Honda M, Yoshikawa N. NPHS2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatrics of Nephrology*. 2003; 18: 412-6.
25. Nishibori Y, Liu L, Hosoyamada M, Endou H, Kudo A, Takenaka H, Higashihara E, Bessho F, Takahashi S, Kershaw D, Routsalainen V, Tryggvason K. Disease-causing missense mutations in NPHS2 gene alter normal nephrin trafficking to the plasma membrane. *Kidney International* 2004; 66: 1755-65.
26. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, Cunha R, Herkenhoff F, Pollak M, Mill J, Krieger J. NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney International* 2004; 65: 1026-30.
27. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gubler M, Antignac C. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *American Journal of Pathology* 2002; 160: 131-139.
28. Ruff RG, Lichtenberger A, Karle SM, Hass HP, Anacleto FE, Schulthesis M, Zalewski I, Imm A, Ruf E, Mucha B, Bagga A, Neuhaus T, Fuchshuber A, Bakkaloglu A, Hidebrandt F. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004; 15: 722-32.
29. Schlesinger P, Sultz H, Mosher W, Feldman J. The nephrotic syndrome. Its incidence and implications for the community. *American Journal of Diseases of Children* 1968; 116: 623-32.
30. Sellarés V. *Manual de Nefrología Clínica, Diálisis y Trasplante Renal*. 1ª edition Madrid: Harcourt Brace España 1998; 105-141.
31. Shankland S, Eitner F, Hudkins K, Goodpaster T, D'Agati V, Alpers C. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: role in podocyte proliferation and maturation. *Kidney International* 2000; 58(2): 674-683.
32. Sharples P, Poulton J, White R. Steroid responsive nephrotic syndrome is more common in Asians community. *Archives of Disease in Childhood* 1985; 60: 1014-7.
33. Tsukaguchi H, Sndhakar A, Cam Le T, Nguyen T, Yao J, Schwimmer J, Schachter A, Poch E, Abreu P, Appel G, Pereira A, Kalluri R, Pollak M. NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *The Journal Clinical Investigation* 2002; 110 (11): 1659-66.
34. Tune B, Lieberman E, Mendoza S. Steroid-resistant nephrotic focal segmental glomerulosclerosis: A treatable disease. *Pediatric Nephrology* 1996; 10(6): 772-8.
35. Vincenti F, Ghiggeri GM. New insights into the pathogenesis and therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *American Journal of Transplantation* 2005;5(6): 1179-85.



36. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinière V, Tête M, Legendre C, Niaudet P, Antignac C. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney International* 2004; 66(2): 571-9.
37. Winn M, Conlon P, Lynn K, Howell D, Slotterbeck B, Smith A, Graham F, Bembe M, Quarles L, Pericak-Vance J. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1999; 58(2): 113–120.