



Departamento de Medicina  
Facultad de Medicina y Odontología  
Universidad de Santiago de Compostela

**GENES IMPLICADOS EN LA  
GLOMERULOESCLEROSIS FOCAL Y  
SEGMENTARIA AUTOSÓMICA  
DOMINANTE**

**Memoria presentada por la  
Licenciada María Sánchez  
Ares para optar al Grado de  
Doctora por la Universidad de  
Santiago de Compostela.**

**Santiago de Compostela, 2011**

**ISBN 978-84-9887-766-3 (Edición digital PDF)**

La presente tesis ha sido realizada gracias a la financiación otorgada por el Contrato Predoctoral María Barbeito concedido por la Xunta de Galicia.

La imagen de la portada que representa la estructura normal del podocito mediante microscopía electrónica de barrida ha sido obtenida del artículo de Smoyer WE & Mundel P, J Mol Med 76:172-183 (1998).



El Doctor **D. Xosé Manuel Lens Neo**, Licenciado en Medicina por la Universidad de Santiago de Compostela, Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona y Facultativo Especialista de Nefrología, y el Doctor **D. Juan Jesús Gómez-Reino Carnota**, Licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, Catedrático de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral **GENES IMPLICADOS EN LA GLOMERULOESCLEROSIS FOCAL Y SEGMENTARIA AUTOSÓMICO DOMINANTE** de la Licenciada en Biología Molecular y Biotecnología D<sup>a</sup> María Sánchez Ares, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Odontología, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su defensa ante el Tribunal Correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, firman el siguiente certificado en Santiago de Compostela a 5 de Mayo del 2011.

Fdo. Dr Xosé Manuel Lens Neo

Fdo. Prof Juan Jesús Gómez-Reino Carnota



# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo que aquí presento es el resultado del esfuerzo conjunto de muchas personas que, con palabras y hechos, me han ayudado a llegar al final de este camino.

En primer lugar me gustaría darle las gracias a mi director de tesis, el Dr Lens. Gracias por haberme permitido entrar a formar parte de su grupo de investigación y poder llegar a realizar esta tesis. Gracias por haber confiado en mí y haberme dado la libertad de poner en práctica alguna disparatada idea.

Gracias a Marina, compañera y amiga, que no solo me ha ayudado en el trabajo diario de laboratorio sino que también ha sido mi apoyo en los momentos en los que pensaba que este trabajo no saldría adelante.

Gracias a mis dos mentoras y amigas en este mundo de la ciencia, Patri y Sonia. Para mí sois un ejemplo de personas y profesionales. Gracias Patri, porque aun estando lejos nunca has dejado de tener un momento para ayudarme, escucharme y darme apoyo en los momentos más difíciles. Gracias por haberme acogido en tu casa y hacer que pasase tres semanas que guardo como uno de los mejores recuerdos de mi vida. Gracias Sonia por haberme enseñado a no rendirme frente a nada ni a nadie. Por haberme escuchado como doctoranda y amiga y haberme enseñado, creo que sin saberlo, como se puede llegar a ser una buena investigadora. Y por supuesto, gracias por esas tardes de compras, discusiones y aprendizaje de vocabulario.

Gracias a mis chicos del lado oscuro, Ezequiel, Bruno y Toño. Me habéis llevado por el camino de la perdición y de la risa. Habéis estado siempre ahí para echarme una mano, muchas veces dejando vuestro trabajo

de lado. Gracias por todas las charlas sobre todas las cosas y sobre ninguna, sin duda he aprendido de vosotros lo que es la generosidad sin pedir nada a cambio.

Gracias a mis compañeros de laboratorio durante estos años, a los que están y a los que ya se han ido (desde el 1 al 5 y ahora desde el 2 al 12, laboratorios no numerados incluidos). Gracias Miguel Nefro por enseñarme a manejar el Illustrator, “tienes razón”, las figuras se ven mejor. Gracias Jana por haber acudido cada vez que me volvía loca con el Photoshop y con otras cosas. Gracias a los guapetones de Anatomía Patológica (Elena y Ángel) por haberme dejado molestarles y haberme hecho reír tanto. Algun@s os habéis convertido en mucho más que compañeros.

Gracias a todas mis amig@s del colegio, instituto, carrera y post-carrera por haberme apoyado durante todos estos años.

Gracias a mis compañeras de piso por haberme ayudado a reírme después de un duro día de trabajo.

Gracias a mi madrina, mi tía y el resto de mi familia por haber estado ahí animándome y dándome los mejores consejos. Desde donde estéis gracias.

Por último, el mayor GRACIAS, sin dudarlo, es para mis padres. No hay palabras en el mundo para describir lo que sois para mí.

**GRACIAS A TODOS y CARPE DIEM**



**A mis Padres  
que han colaborado en cada paso  
de esta tesis con su apoyo y cariño.**



# ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
RESUMEN	23
ABSTRACT	25
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>29</b>
<b>1.1. <u>Sistema de filtración renal: estructura y funcionamiento</u></b>	<b>29</b>
<b>1.1.1. Organización de la nefrona: glomérulo y sistema tubular</b>	<b>29</b>
1.1.1.1. <u>Mecanismo de filtración renal</u>	32
1.1.1.2. <u>Filtración glomerular</u>	33
1.1.1.2.1. <i>Composición de la barrera de filtración glomerular</i>	33
1.1.1.2.1.1. <i>Endotelio capilar</i>	33
1.1.1.2.1.2. <i>Podocitos</i>	34
1.1.1.2.1.3. <i>Membrana glomerular basal</i>	34
1.1.1.2.1.4. <i>Interacción entre podocitos: diafragma de filtración glomerular</i>	36
1.1.1.2.1.5. <i>Interacción de los podocitos con la membrana glomerular basal</i>	39
1.1.1.3. <u>Selectividad de la barrera de filtración</u>	41
1.1.1.4. <u>Sistema de reabsorción y secreción tubular</u>	43
<b>1.2. Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria</b>	<b>44</b>
<b>1.2.1. Formas hereditarias de la Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria</b>	<b>49</b>
1.2.1.1. <u>Glomeruloesclerosis focal y segmentaria de herencia autosómica dominante</u>	<b>50</b>

1.2.1.1.1. <i>Diagnóstico: características clínicas y biopsia renal</i>	50
1.2.1.1.2. <i>Tratamiento y evolución del daño renal</i>	51
1.2.1.1.2.1. <i>Tratamiento inicial</i>	51
1.2.1.1.2.2. <i>Evolución de la esclerosis glomerular: insuficiencia renal terminal</i>	52
1.2.1.1.3. <i>Genes responsables de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria autosómica dominante</i>	53
1.2.1.1.3.1. <i>ACTN4</i>	53
1.2.1.1.3.2. <i>TRPC6</i>	55
1.2.1.1.3.3. <i>CD2AP</i>	58
1.2.1.1.3.4. <i>INF2</i>	61
1.2.1.2. <u>Glomeruloesclerosis focal y segmentaria de herencia autosómica recesiva: genes responsables</u>	62
1.2.1.2.1. <i>NPHS1</i>	62
1.2.1.2.2. <i>NPHS2</i>	64
1.2.1.2.3. <i>PLCE1</i>	65
<b>II. OBJETIVOS</b>	
2. OBJETIVOS	69
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1. <u>Cohorte de pacientes</u>	73
3.2. <u>Selección de genes candidatos para la GEFS-AD</u>	74
3.2.1. Genes candidatos seleccionados y criterios para su selección	74
3.2.1.1. <i>ITGA3</i>	74

3.2.1.2. <i>FN1</i>	75
3.2.1.3. <i>NEPH1</i>	76
3.2.2. Confirmación de un gen candidato	77
3.3. Procesamiento de las muestras de los pacientes	77
3.3.1. Protocolo de extracción de ADN	77
3.3.2. Amplificación y secuenciación de genes: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción de secuenciación	78
3.3.2.1. <u>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</u>	78
3.3.2.2. <u>Cebadores empleados para la amplificación de genes</u>	79
3.3.2.2.1. <i>Gen ACTN4</i>	79
3.3.2.2.2. <i>Gen TRPC6</i>	80
3.3.2.2.3. <i>Gen CD2AP</i>	81
3.3.2.2.4. <i>Gen INF2</i>	82
3.3.2.2.5. <i>Gen ITGA3</i>	83
3.3.2.2.6. <i>Gen FN1</i>	84
3.3.2.2.7. <i>Gen NEPH1</i>	86
3.3.2.3. <u>Electroforesis en geles de agarosa</u>	86
3.3.2.4. <u>Purificación enzimática del producto de PCR</u>	87
3.3.2.5. <u>Reacción de secuenciación</u>	88
3.3.2.6. <u>Purificación de la reacción de secuenciación</u>	88
3.3.2.7. <u>Análisis de las secuencias</u>	89
3.3.2.8. <u>Análisis de cosegregación</u>	89
3.3.3. Caracterización de mutaciones	89
3.3.4. Estudios de conservación aminoacídica	91

3.3.5. Análisis estructural de la mutación L245P	92
3.3.6. Determinación de motivos y dominios proteicos	92
<b>IV. RESULTADOS</b>	
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>95</b>
<b>4.1. <u>Genotipo</u></b>	<b>95</b>
4.1.1. Estudio mutacional de los genes responsables de la GEFS-AD	95
4.1.1.1. <u>Cambios nucleotídicos en <i>ACTN4</i></u>	95
4.1.1.2. <u>Cambios nucleotídicos en <i>TRPC6</i></u>	96
4.1.1.3. <u>Cambios nucleotídicos en <i>CD2AP</i></u>	99
4.1.1.4. <u>Cambios nucleotídicos en <i>INF2</i></u>	102
4.1.2. Estudio mutacional de los genes candidatos seleccionados para la GEFS-AD	107
4.1.2.1. <u>Cambios nucleotídicos en <i>ITGA3</i></u>	107
4.1.2.2. <u>Cambios nucleotídicos en <i>FN1</i></u>	110
4.1.2.3. <u>Cambios nucleotídicos en <i>NEPH1</i></u>	111
<b>4.2. <u>Fenotipo</u></b>	<b>112</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>117</b>
5.1. <u><i>ACTN4</i> como gen responsable de la GEFS-AD</u>	118
5.2. <u><i>TRPC6</i> como gen responsable de la GEFS-AD</u>	125
5.2. <u><i>INF2</i> como gen responsable de la GEFS-AD</u>	130
5.4. <u><i>ITGA3</i>, <i>FN1</i> y <i>NEPH1</i> como genes candidatos para la GEFS-AD</u>	133

<b>5.5. <u>Correlación genotipo-fenotipo en familias con GEFS-AD</u></b>	<b>134</b>
<b>5.6. <u>Perspectivas de futuro</u></b>	<b>136</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>141</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>145</b>





## ABREVIATURAS

<b>ACTN4</b>	Alfa actinina 4
<b>AD</b>	Autosómica dominante
<b>ADH</b>	Hormona antidiurética
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AKT</b>	Serina-Treonina quinasa
<b>AMP</b>	Adenosín 5' monofosfato
<b>ANK</b>	Anquirina
<b>AR</b>	Autosómica recesiva
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BAD</b>	Proteína agonista de muerte celular asociada a BCL2
<b>BCL2</b>	Linfoma de célula B 2
<b>BFG</b>	Barrera de filtración glomerular
<b>C</b>	Conservativo
<b>C3</b>	Factor del complemento C3
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CCD</b>	Dispositivo de carga acoplada
<b>CD2</b>	Cúmulo de diferenciación 2
<b>CD2AP</b>	Proteína de asociación a CD2
<b>CDH3</b>	P-caderina
<b>CH</b>	Dominio de unión a la actina homólogo la calponina
<b>cM</b>	Centimorgan
<b>COL4A1</b>	Colágeno tipo IV alfa 1
<b>COL4A6</b>	Colágeno tipo IV alfa 6
<b>COOH-terminal,</b>	Extremo carboxilo-terminal
<b>C-terminal</b>	
<b>CP</b>	Proteína bloqueadora de la actina
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc

<b>DAAM</b>	Del inglés <i>Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis</i>
<b>DAD</b>	Del inglés <i>Diaphanous autoinhibitory domain</i>
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DIA</b>	Del inglés <i>Diaphanous homolog (Drosophila)</i>
<b>DID</b>	Del inglés <i>Diaphanous inhibitory domain</i>
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleósidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMD</b>	Esclerosis mesangial difusa
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>Exo I</b>	Exonucleasa I
<b>FH1</b>	Dominio de homología a formina 1
<b>FH2</b>	Dominio de homología a formina 2
<b>FHOD</b>	Del inglés <i>Formin Homology Domain protein</i>
<b>FMN</b>	Del inglés <i>Formin</i>
<b>FMNL</b>	Del inglés <i>Formin-like</i>
<b>FN1</b>	Fibronectina 1
<b>GEFS</b>	Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria
<b>GMP</b>	Guanosina 5' monofosfato
<b>HA</b>	Hipertensión arterial
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IgSF</b>	Superfamilia de las inmunoglobulinas
<b>INF2</b>	Formina invertida 2 (Inverted formin 2)
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trisfosfato
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor de IP <sub>3</sub>
<b>IRT</b>	Insuficiencia Renal Terminal
<b>ITGA3</b>	Integrina alfa 3
<b>LCK</b>	Proteína tirosina quinasa específica de leucocitos
<b>LM</b>	Laminina
<b>mA</b>	Miliamperios

<b>MAC</b>	Complejo de Adhesión de Membrana
<b>MAGUK</b>	Guanilato quinasas asociadas a membrana
<b>MAP</b>	Proteína quinasa mitogénica activa
<b>MEK</b>	MAP quinasa quinasa
<b>MGB</b>	Membrana glomerular basal
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>Min</b>	Minutos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	No conservativo
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>ND</b>	Dato no disponible
<b>NEPH1</b>	Proteína de unión a nefrina 1
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de activación de células T
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NH<sub>2</sub>-terminal,</b>	Extremo amino-terminal
<b>N-terminal</b>	
<b>NPHS1</b>	Nefrina
<b>NPHS2</b>	Podocina
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PI<sub>3</sub>K</b>	Fosfoinosítido-3-hidroxiquinasa
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
<b>PKB</b>	Proteína quinasa B
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PKG</b>	Proteína quinasa dependiente de GMP cíclico
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLCE1</b>	Fosfolipasa C épsilon 1

<b>PLCY1</b>	Fosfolipasa C gamma 1
<b>PLCXc, PLCYc</b>	Dominios catalíticos denominados X e Y
<b>PT</b>	Post-trasplante
<b>RA1</b>	Dominio de asociación a Ras 1
<b>RA2</b>	Dominio de asociación a Ras 2
<b>RasGEF</b>	Dominio intercambiador de nucleótidos de guanina de Ras
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>s</b>	Segundos
<b>SAP</b>	Fosfatasa alcalina de camarón
<b>SH3</b>	Dominio de homología 3 con las Src
<b>SN</b>	Síndrome Nefrótico
<b>SNF</b>	Síndrome Nefrótico Finlandés
<b>SP</b>	Dominio espectrina
<b>SV40</b>	Virus del simio 40
<b>TBE</b>	Ácido bórico-tris
<b>TRP</b>	Receptor de potencial transitorio
<b>TRPA</b>	Receptor de potencial transitorio tipo anquirina
<b>TRPC6</b>	Receptor de potencial transitorio catiónico 6
<b>TRPM</b>	Receptor de potencial transitorio tipo melastina
<b>TRPML</b>	Receptor de potencial transitorio tipo mucolipina
<b>TRPN</b>	Receptor de potencial transitorio tipo no mecanopotencial
<b>TRPP</b>	Receptor de potencial transitorio tipo poliquistina
<b>TRPV</b>	Receptor de potencial transitorio tipo vaniloide.
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>WASP 2</b>	Familia de proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich
<b>WH2</b>	Dominio C-terminal homólogo a WASP 2
<b>WT</b>	Forma salvaje

<b>ZO-1</b>	<i>Zonula ocludens-1</i>
<b>A</b>	Alfa
<b>B</b>	Beta
<b>γ</b>	Gamma
<b>K</b>	Kappa
<b>μl</b>	Microlitro



## RESUMEN

El término Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria (GEFS) describe un patrón histológico caracterizado por la presencia de ciertos glomérulos con esclerosis (focal) en parte de su superficie (segmentaria). Esta histología puede ser el resultado de numerosas etiologías entre las que se encuentra la genética. Dentro de las formas genéticas está la GEFS de herencia autosómica dominante (AD) con afectación exclusivamente renal.

Aunque la diversidad de síntomas clínicos es característica de la patología, un rasgo que siempre está presente es la proteinuria. La ausencia de un tratamiento efectivo para esta enfermedad provoca una progresiva disminución de la función renal que acaba por desembocar en una insuficiencia renal terminal. Esto genera que el paciente requiera una terapia de reemplazamiento, bien sea diálisis, trasplante o ambas.

La proteinuria está generada por una alteración en la barrera de filtración glomerular (BFG) compuesta por los capilares fenestrados, la membrana glomerular basal y las prolongaciones podocíticas. Hasta el momento se han descrito tres genes implicados en la generación de la GEFS-AD: la  $\alpha$ -actinina 4 (*ACTN4*), el canal de receptor transitorio de potencial catiónico 6 (*TRPC6*) y la formina invertida 2 (*INF2*). Estas tres proteínas presentan expresión podocítica y están muy relacionadas con la dinámica del citoesqueleto.

Hasta el momento solo se ha identificado el gen responsable de la patología en unas 30 familias de todo el mundo, entre ellas una de las 5 familias que componen nuestra cohorte. El análisis por secuenciación directa de *INF2* en dicha familia reveló que los individuos afectados presentaban una mutación en el exón 6 de dicho gen, lo que provocaba la sustitución de una leucina por una prolina en la posición 245 de la proteína. Esta mutación se localiza en el dominio inhibidor de la proteína (DID).

Es la primera vez que se identifica este cambio patogénico, ya que todos los encontrados anteriormente se situaban en los cuatro primeros exones del gen. Este hallazgo refuerza la responsabilidad de INF2 en esta patología además de ampliar la región de localización de mutaciones en el gen.



## ABSTRACT

*The term Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) describes a histologic pattern characterized by the presence of some glomeruli with sclerosis (focal) in a significant part of its surface (segmental). This histology can be the result of numerous etiologies, being genetics one among of them. The autosomal dominant (AD) inheritance of FSGS with exclusive renal involvement is one of these genetic forms.*

*Although the diversity of clinical symptoms is characteristic of the disease. Proteinuria is a trait that is always present. The absence of an effective treatment for the disease causes a progressive loss of renal function with a likely outcome to end-stage renal disease (ESRD). That provokes a requirement of a renal replacement therapy: dialysis, transplantation or both.*

*Proteinuria is caused by an alteration in the glomerular filtration barrier (GFB) composed of a fenestrated endothelium, the glomerular basement membrane and the foot processes of the podocytes. To date only three genes have been involved in the AD-FSGS: the  $\alpha$ -actinin 4 (ACTN4), the transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6) and the inverted formin 2 (INF2). These three proteins have podocyte expression and are closely related to the dynamics of the cytoskeleton.*

*So far, the gene responsible for the disease is only known in 30 families worldwide, including one of the 5 families in our cohort. Direct sequencing analysis of INF2 gene in this family revealed that affected individuals had a mutation in exon 6. This change causes a substitution of leucine for proline at position 245 of the protein. This mutation is located in the inhibitor domain of the protein (DID).*

*It is the first time that this pathogenic change is identified, since all previously mutations found were at the first four exons of the gene. This*

*finding reinforces the responsibility of INF2 in this disease in addition to expanding the region of localization of mutations in the gene.*

---

# **I. INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Sistema de filtración renal: estructura y funcionamiento

### 1.1.1. Organización de la nefrona: glomérulo y sistema tubular

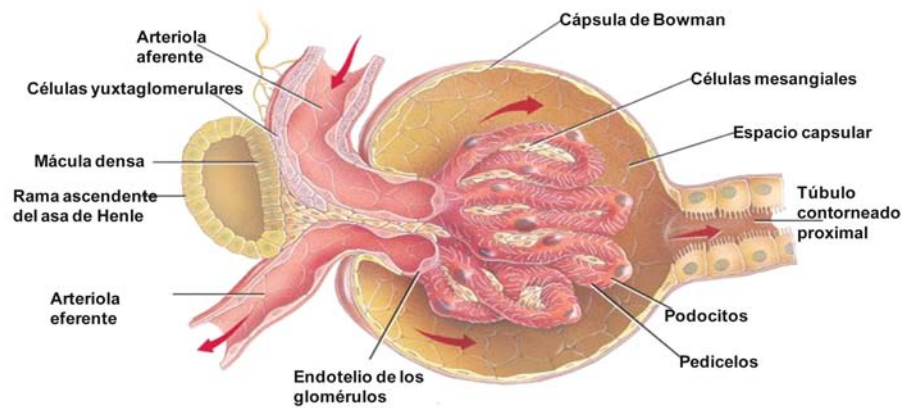
El riñón es un órgano indispensable para el mantenimiento de la homeostasis corporal ya que lleva a cabo una serie de funciones vitales: control de la osmolaridad, excreción de desechos metabólicos y sustancias nocivas, y secreción de hormonas con acciones muy diversas (eritropoyetina, renina). La unidad encargada de realizar dichas funciones se localiza mayoritariamente en la corteza renal y se denomina nefrona.

Cada nefrona consta de un glomérulo y un sistema tubular. El glomérulo se encuentra envuelto por la cápsula de Bowman, una estructura a modo de copa de doble pared, compuesta por un epitelio externo o parietal y un epitelio interno o visceral, quedando entre ambas capas una cavidad estrecha denominada espacio urinario o de Bowman, que está en continuidad con el túbulo proximal y que se encuentra ocupada por un ovillo de capilares. El conjunto compuesto por la cápsula y los capilares se denomina corpúsculo renal. Éste tiene un polo vascular, donde las arteriolas aferente y eferente se continúan con los capilares glomerulares, y un polo urinario donde se continúan con la luz del túbulo contorneado proximal.

Las células de la capa visceral se denominan podocitos y poseen una estructura con numerosas prolongaciones primarias radiales que se ramifican dando lugar a las prolongaciones podocíticas secundarias conocidas como pedicelos. Estos se interdigitan con los de los podocitos adyacentes, manteniéndose una separación entre ellos por medio de estrechos espacios intercelulares que permiten la salida del filtrado plasmático de los capilares glomerulares y su entrada en el espacio capsular,

denominándose hendiduras de filtración. Entre los podocitos y los capilares se encuentra la membrana glomerular basal (MGB), y en ella el espacio entre pedicelos adyacentes está atravesado por el diafragma de filtración. Los podocitos junto con los capilares y la MGB constituyen la barrera de filtración glomerular (BFG).

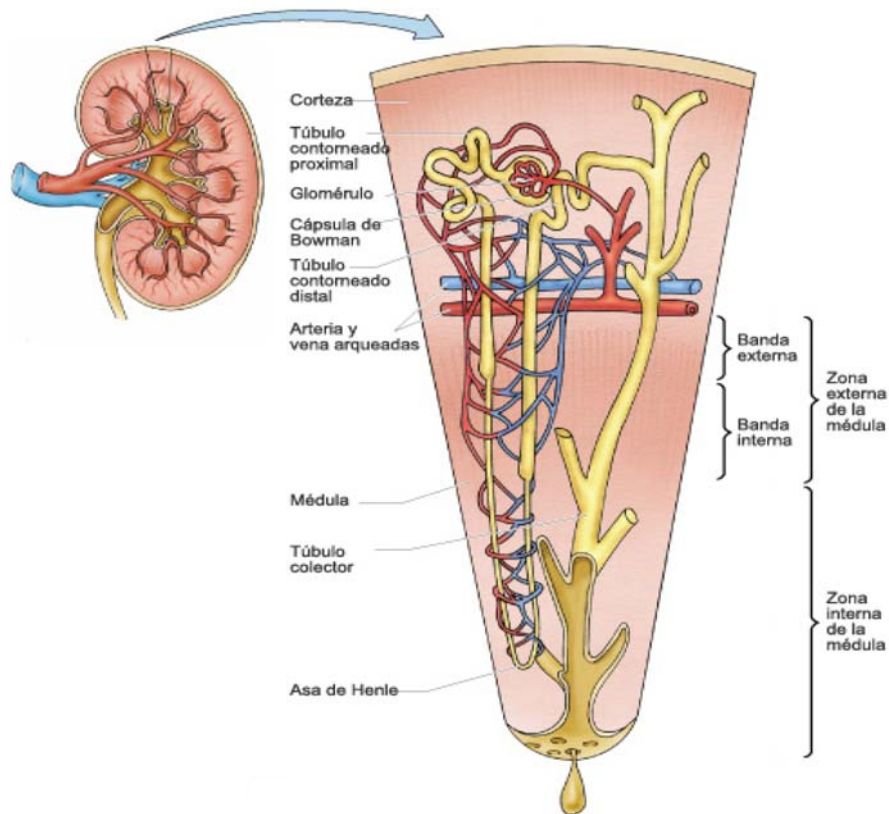
Los espacios que quedan entre los capilares glomerulares están ocupados por un tejido conectivo especial denominado mesangio, cuyas funciones principales son mantener la estructura y función de la BFG, y eliminar residuos de filtración. El mesangio está compuesto por las células mesangiales y la matriz extracelular. Las células mesangiales emiten numerosos pseudópodos, en cuyo interior se localizan filamentos de actina y miosina anclados a la membrana, hecho que les confiere capacidad contráctil. Estas células son las encargadas de producir los componentes de la matriz mesangial (colágeno, proteoglicanos, fibronectina) (Figura 1.1.).



**Figura 1.1. Estructura glomerular.**

El sistema tubular renal es el encargado de reabsorber todas las sustancias útiles que se filtraron a nivel glomerular, tales como iones de

sodio y potasio, glucosa, aminoácidos y agua, así como de excretar algunas otras nocivas tales como el ácido úrico.



**Figura 1.2. Estructura del sistema tubular.**

El glomérulo renal se continúa con el túbulo proximal por medio de su polo urinario. Este sistema está constituido por cinco regiones; el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, que se encuentra dividida en tres segmentos funcionalmente diferentes, rama descendente delgada, rama ascendente delgada y rama ascendente gruesa. Esta última se continúa con el túbulo distal que en el lugar donde contacta con la arteriola aferente provoca que células de su pared se transformen dando lugar a la mácula

densa, que va a formar parte del aparato yuxtaglomerular (también compuesto por las células yuxtaglomerulares y las células mesangiales extraglomerulares), que es el encargado de regular el funcionamiento de la nefrona ya que es el responsable de la síntesis de la renina. A partir de esta región el túbulo distal se hace más tortuoso formando el túbulo contorneado distal, el cual se une a un conducto colector por medio del túbulo colector. Los túbulos colectores de varias nefronas se unen en el mismo conducto colector. Los espacios que quedan entre los túbulos renales están ocupados, además de por vasos sanguíneos y linfáticos, por tejido conectivo laxo (Figura 1.2.).

#### 1.1.1.1. Mecanismo de filtración renal

La formación de la orina está determinada por la coordinación de tres procesos distintos, la filtración, la reabsorción y la secreción, que tienen lugar a lo largo de la nefrona. En el glomérulo se lleva a cabo el primer paso de la filtración del plasma sanguíneo en dirección a la cápsula de Bowman generándose el ultrafiltrado. La reabsorción hacia la sangre de determinados componentes que se han filtrado útiles al organismo tiene lugar desde el lumen de los túbulos y la secreción de aquellas sustancias que no han sido filtradas pero que deben ser excretadas ocurre desde la sangre al interior del túbulo.

La sangre que llega al riñón lo hace por medio de la arteria renal que se va ramificando hasta dar lugar a las arteriolas aferentes, cada una de las cuales está encargada de irrigar un único glomérulo. Al entrar en el glomérulo, la arteriola da lugar a la formación de los capilares glomerulares. La porción terminal de estos capilares se une para formar la arteriola eferente, a través de la cual la sangre abandona el glomérulo.



### 1.1.1.2. Filtración glomerular

El primer obstáculo para la filtración del plasma viene dado por la presencia de la barrera de filtración glomerular. Ésta se encuentra constituida por tres capas que interaccionan entre sí: el endotelio capilar fenestrado, la membrana glomerular basal y los podocitos. La capacidad del riñón para retener proteínas plasmáticas es esencial para la vida. Anormalidades genéticas o adquiridas en cualquiera de las capas que componen la barrera se han relacionado con la alteración de la filtración glomerular, la aparición de proteinuria y la generación de enfermedades renales<sup>1</sup>.

#### 1.1.1.2.1. *Composición de la barrera de filtración glomerular*

##### 1.1.1.2.1.1. *Endotelio capilar*

Los tejidos capilares están formados por una capa de células endoteliales extremadamente aplanada, una gruesa lámina basal y una pequeña red de fibras reticulares. Los capilares glomerulares son fenestrados, es decir, presentan unos poros, pero a diferencia de otros capilares fenestrados carecen de diafragma. El área fenestrada representa del 20-50% de toda la superficie de células endoteliales. El lumen del endotelio está recubierto por una capa de glicocáliz que le confiere una elevada carga negativa (Figura 1.3)<sup>2</sup>.

Las presiones que tienden a expulsar líquido de los capilares son mayores que las que tienden a retenerlo, debido a lo cual se filtra líquido a través de las paredes de los capilares hacia la cápsula de Bowman.

#### 1.1.1.2.1.2. *Podocitos*

Los podocitos son células epiteliales polarizadas altamente diferenciadas. Constan de un voluminoso cuerpo celular con unas largas prolongaciones podocíticas primarias que se ramifican dando lugar a los procesos podocíticos secundarios o pedicelos.

El cuerpo celular contiene una gran cantidad de orgánulos lo cual es síntoma de un elevado nivel anabólico y catabólico. Presentan unas largas prolongaciones denominadas procesos podocíticos primarios que se ramifican dando lugar a los pedicelos. Las prolongaciones de podocitos adyacentes se interdigitan entre sí dando lugar a la formación de los poros de filtración.

Una característica importante de la estructura podocítica es la presencia de un citoesqueleto muy desarrollado responsable de la forma celular y el mantenimiento de los procesos podocíticos. El cuerpo celular y los procesos primarios están compuestos principalmente por microtúbulos y filamentos intermedios. Por su parte la arquitectura de los pedicelos se mantiene por la presencia de haces de filamentos de actina que se extienden a lo largo del eje longitudinal de los pedicelos, y por una red de actina subcortical que se dispone rodeando los haces de actina de modo que estos no se encuentran en contacto directo con la membrana plasmática. El citoesqueleto de los procesos podocíticos es el responsable del establecimiento de las uniones entre podocitos y de la interacción de dichos podocitos con la MGB (Figura 1.3)<sup>3</sup>.

#### 1.1.1.2.1.3. *Membrana glomerular basal*

La MGB está situada entre la capa de podocitos y la de células endoteliales, jugando un papel fundamental en procesos de filtración glomerular, adhesión, migración y diferenciación celular. Se trata de un tipo

especial de membrana ya que muestra un elevado espesor. Entre sus componentes más importantes se encuentran: el colágeno tipo IV, la laminina, nidogén o los proteoglicanos<sup>4</sup>.

El colágeno tipo IV es el componente estructural más abundante de las membranas basales donde forma una estructura reticular que actúa como esqueleto. Cada monómero de colágeno está compuesto por tres cadenas polipeptídicas que se pliegan formando una tripe hélice. Se conocen 6 tipos de cadenas polipeptídicas denominadas cadenas alfa ( $\alpha$ ) que están codificadas por seis genes distintos (*COL4A1-COL4A6*). En la MGB encontramos el colágeno  $\alpha3\alpha4\alpha5$ (IV).

Otro de los componentes más abundantes de la membrana glomerular basal son las lamininas. Éstas constituyen una gran familia de glicoproteínas heterotriméricas compuestas por una cadena  $\alpha$ , una  $\beta$  (beta) y una  $\gamma$  (gamma) que se organizan en una estructura en forma de cruz. Hasta el momento se han identificado 5 cadenas  $\alpha$ , 4 cadenas  $\beta$  y 3 cadenas  $\gamma$ , que dan lugar a la formación de 15 isoformas distintas de lamininas. En el caso de la membrana glomerular basal la isoforma que está presente es la laminina  $\alpha5, \beta2, \gamma1$  (LM-521)<sup>5</sup>.

El nidogén, también conocido como entactina, es una glicoproteína sulfatada que contiene tres dominios globulares mediante los cuales se une al colágeno, la laminina y el perlecán estableciendo puentes entre ellos<sup>6</sup>.

El cuarto de los componentes más abundantes en las membranas son los proteoglicanos. Se trata de glicoproteínas compuestas por un núcleo proteico al que se anclan, normalmente, cadenas de glucosaminoglicanos heparán sulfato que generan una fuerte naturaleza aniónica. En la MGB se encuentran mayoritariamente dos tipos de proteoglicanos, el perlecán y la agrina (Figura 1.3)<sup>7</sup>.

#### 1.1.1.2.1.4. *Interacción entre podocitos: diafragma de filtración glomerular*

Los pedicelos adyacentes se unen entre sí mediante una variante de las uniones adherentes denominada diafragmas de filtración (*slits diaphragms*) dando lugar a la formación de pequeños espacios intercelulares denominados poros o hendiduras de filtración que permiten la salida del filtrado plasmático de los capilares glomerulares y su entrada en el espacio capsular. Se cree que son numerosas las proteínas implicadas en este tipo de unión que presentan un papel estructural o de transducción de señales, aunque hasta el momento se conoce un número reducido. Estudios moleculares sugieren que las proteínas del diafragma de filtración forman una estructura similar a una cremallera<sup>8,9</sup>. Ya en los años 70, Rodewald y Karnoswsky postularon que este diafragma presentaba una estructura en forma de cremallera, en donde, de la membrana lateral de los pedicelos de podocitos adyacentes se extendían unas varillas que conectaban con un filamento central<sup>10</sup>. Entre las proteínas que forman parte del diafragma de filtración se encuentran: *zonula ocludens-1*, la nefrina, la proteína de unión a nefrina 1, FAT, la podocina, la proteína asociada a CD2 y la P-cadherina.

La primera que se localizó fue la proteína *zonula ocludens-1 (ZO-1)*, que es un miembro de la familia de las guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK). Esta proteína se localiza en la cara citoplasmática de estas uniones intercelulares situadas en los pedicelos, expresándose de una manera continua en los puntos de inserción de los diafragmas de filtración. Su función se relaciona con la organización de las señales de transducción y se ha visto que es capaz de interactuar con proteínas implicadas en las uniones célula-célula (occludina,  $\alpha$ -catenina) y con el citoesqueleto de actina (espectrina, F-actina)<sup>11</sup>.

Una de las proteínas más conocida, y más importante, de las que se encuentran en el diafragma es la nefrina. El gen que codifica para esta proteína, *NPHS1*, fue descubierto en el año 1998 como responsable del síndrome nefrótico tipo 1<sup>12</sup>. Es una glicoproteína transmembrana tipo 1, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) y homóloga al complejo de moléculas de adhesión a membrana (MACs). Su expresión es específica de los podocitos glomerulares y predominantemente se localiza en el diafragma de filtración. Forma homodímeros con otras moléculas de nefrina por medio de su porción extracelular actuando como receptor de superficie que permite la transmisión de señales al citoesqueleto de actina y constituye el “esqueleto” del diafragma de filtración<sup>13 14</sup>.

Relacionada con la nefrina se ha identificado la proteína de unión a nefrina 1 codificada por el gen *NEPH1* y que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas<sup>15</sup>. Como su nombre indica, esta proteína interacciona con la nefrina formando complejos oligoméricos, relación que parece necesaria para mantener las características normales de la BFG<sup>16-18</sup>.

FAT es una proteína transmembrana miembro de la familia de las cadherinas que presenta el mismo patrón de expresión que la nefrina y ZO-1. Participa en el establecimiento de interacciones homofílicas dependientes de  $Ca^{+2}$ .<sup>19</sup> También podría participar directamente en la polimerización de la actina durante la formación de los procesos podocíticos así como en su mantenimiento<sup>20</sup>.

Mediante estudios de clonación posicional se descubrió un nuevo gen, *NPHS2*, que codifica para una proteína integral de membrana denominada podocina que pertenece a la familia de las estomatinas, las cuales están involucradas en el andamiaje del citoesqueleto. Su nombre proviene del lugar en el que se expresa de forma exclusiva, los podocitos, en concreto se ha visto que forma parte del diafragma de filtración. La mutación del gen

que codifica para esta proteína provoca el síndrome nefrótico autosómico recesivo resistente a esteroides tipo 2<sup>21</sup>. La podocina junto con la nefrina y la NEPH1 forman un complejo proteico que actúa como un receptor transmembrana y que media la transducción de señales<sup>20</sup>.

Otra de las proteínas identificadas como constituyente del diafragma de filtración fue la proteína asociada a CD2 (*CD2AP*). En un primer momento fue identificada como una proteína que se une al dominio citoplasmático de CD2 y que potencia su agrupamiento. CD2 es un marcador de células T e interviene favoreciendo la interacción de estas células con las células presentadoras de antígenos<sup>22</sup>. Posteriormente se vio que esta proteína presentaba expresión renal, en concreto se localiza en el podocito, y en células de los túbulos colectores y proximales<sup>23,24</sup>. En el podocito, CD2AP se une directamente a la F-actina por su extremo carboxilo-terminal (COOH-terminal, C-terminal)<sup>25</sup>, y establece a su vez enlaces con la nefrina, es decir, parece que actúa como proteína de unión entre el citoesqueleto de actina y la nefrina<sup>26</sup>. Además se ha visto que CD2AP también interacciona con la podocina en el diafragma de filtración<sup>27</sup>.

Distintos estudios han revelado que la podocina, la nefrina y CD2AP se localizan en regiones concretas de la membrana plasmática de los podocitos que se denominan balsas lipídicas (*lipid rafts*). Se trata de microdominios de la membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y esfingolípidos. Estas balsas presentan gran importancia en procesos de regulación y transducción de señales así como en la adhesión celular. La podocina puede unirse directamente al colesterol y reclutarlo al diafragma de filtración, contribuyendo así a la formación de un supercomplejo compuesto por lípidos y proteínas. La presencia del colesterol es necesaria para el correcto funcionamiento de los canales iónicos asociados a la podocina<sup>27,28</sup>.

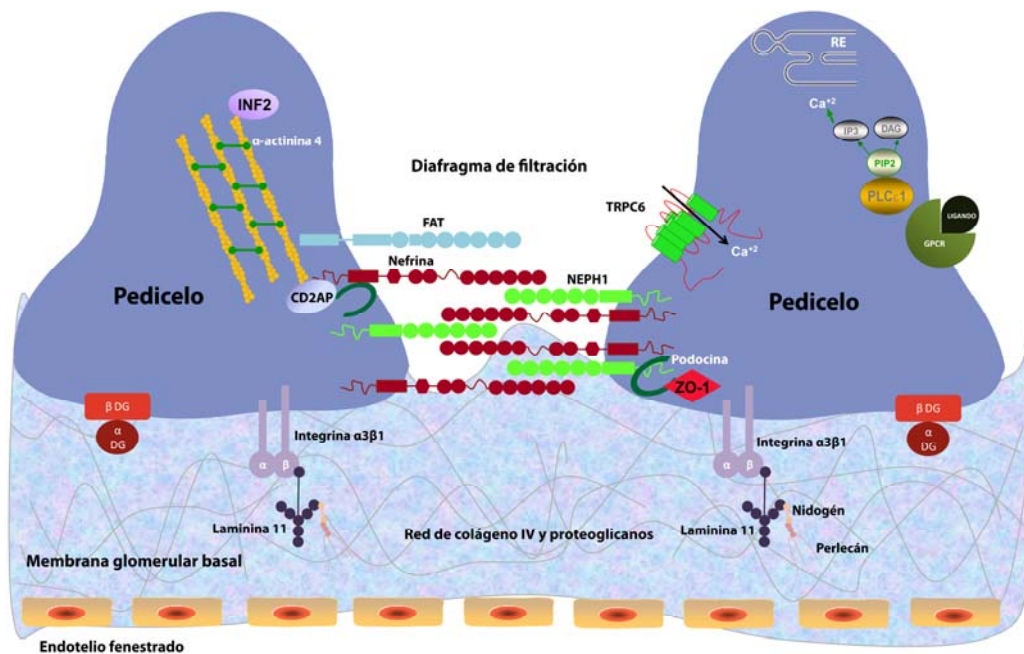
Por último, dentro de las proteínas más conocidas y mejor estudiadas del diafragma de filtración se encuentra la P-cadherina (*CDH3*). Las cadherinas constituyen una familia de glicoproteínas implicadas en la adhesión homofílica célula-célula dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y se encuentran unidas al citoesqueleto de actina por medio de las cateninas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . En concreto esta cadherina posee un lugar de unión a la  $\beta$ -catenina en el lado citoplasmático. Algunos estudios sugieren que interacciones homofílicas de las P-cadherinas se localizan en el diafragma formando puentes entre procesos podocíticos adyacentes (Figura 1.3.)<sup>29,30</sup>.

#### 1.1.1.2.1.5. *Interacción de los podocitos con la membrana glomerular basal*

La interacción del citoesqueleto con la MGB es fundamental para mantener la arquitectura de los procesos podocíticos. Los podocitos establecen contacto a través de sus pedicelos con la MGB por medio de las fibras de estrés, filamentos de actina contráctiles de gran tamaño entrelazados por la  $\alpha$ -actinina. En dicha interacción intervienen moléculas de matriz de la MGB, las cuales actúan como ligandos para los receptores de adhesión transmembrana situados en los procesos podocíticos. Así mismo intervienen moléculas responsables de la señalización célula-matriz y de la transmisión de fuerzas mecánicas que fuerzan al citoesqueleto para formar un agregado de adhesión molecular<sup>31</sup>.

Las integrinas son los principales receptores de adhesión celular que median la unión célula-matriz. Su nombre hace referencia a su capacidad de integrar el exterior celular (matriz extracelular) con el interior celular (citoesqueleto) Constituyen una familia de proteínas transmembrana heterodiméricas y glicosiladas que actúan como receptores de adhesión celular. Cada molécula consta de dos subunidades, una  $\alpha$  y otra  $\beta$ , que se

unen de forma no covalente. Los dominios extracelulares de las integrinas se unen a ligandos de la matriz, mientras que los dominios citoplasmáticos forman complejos multimoleculares con proteínas implicadas en la señalización celular así como con proteínas adaptadoras que proporcionan una conexión con el citoesqueleto. Como las integrinas carecen de actividad enzimática intrínseca deben reclutar proteínas que controlen los procesos dependientes de adhesión. Entre ellas podemos encontrar proteínas intracelulares del citoesqueleto (talina, vinculina, paxilina y  $\alpha$ -actinina) o moléculas implicadas en procesos de señalización (quinasas, fosfatasa). Las integrinas activan distintas cascadas de señalización encargadas de la organización del citoesqueleto, la regulación de genes y de diversos procesos y funciones celulares <sup>32-34</sup>. En el podocito la integrina que encontramos es la  $\alpha 3\beta 1$  que interacciona con los distintos componentes de la MGB.



**Figura 1.3. Estructura simplificada de la Barrera de Filtración Glomerular.**



Además de las integrinas también tienen su papel en esta unión el complejo de los distroglicanos. Éstos, al igual que las integrinas son moléculas de adhesión compuestas por dos subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  establece por uno de sus lados interacciones con componentes de la MGB como la laminina o la agrina, y por su dominio C-terminal se une a la subunidad  $\beta$ . Ésta cruza la MGB y se une mediante su dominio citosólico a la actina por medio de otras proteínas como la distrofina o utrofina (Figura 1.3.)<sup>35,36</sup>.

#### 1.1.1.3. Selectividad de la barrera de filtración

El proceso mediante el cual la barrera realiza el ultrafiltrado del plasma sanguíneo ha sido objeto de debate desde los años 70<sup>37</sup>, y aún en la actualidad sigue sin haber un consenso sobre cómo se produce. No se conocen con absoluta certeza los mecanismos que determinan cómo la BFG excluye la entrada de proteínas en el espacio urinario y si hay algún componente de la misma que tenga una mayor implicación en la selectividad. Parece que dos de las características más importantes de los solutos, tamaño y carga, son las que van a determinar su paso o restricción en la BFG<sup>38</sup>.

La existencia de una selectividad por tamaño está universalmente aceptada, de modo que la barrera es muy permeable al agua, electrolitos y moléculas de pequeño tamaño, mientras que opone resistencia al paso de proteínas del tamaño de la albúmina o mayor. Determinar que capa o capas de la BFG están más implicadas en la selectividad por tamaño sigue siendo objeto de numerosas investigaciones.

En el caso de la proteinuria glomerular existen estudios que aportan distintas conclusiones sobre cuál de los componentes de la barrera constituye

la principal capa de filtración. Algunos autores proponen que la MGB es la principal barrera de filtración para las proteínas, que el endotelio es muy permeable y los podocitos sólo recuperan parte de las proteínas que se filtran. Dicha hipótesis proviene de estudios realizados con ferritina, ya que ésta era capaz de pasar el endotelio pero no la MGB, localizándose pequeñas cantidades de ferritina en los podocitos.

Otros estudios sugieren que moléculas grandes como la ferritina son retenidas por la MGB, mientras que el diafragma de filtración impide el paso de moléculas más pequeñas como sería la albúmina debido a su estructura.<sup>31</sup>.

Un punto de mayor controversia es la existencia de una selectividad en función de la carga de la molécula. Lo que en los años 70 y 80 no se consideraba una idea discutible pasó a suscitar dudas a medida que avanzaba el conocimiento sobre la BFG<sup>39</sup>. Comenzaron a partir de ese momento a publicarse estudios que apoyaban o no la existencia de esta barrera, además de especular sobre su localización, basándose en resultados experimentales que sus detractores no consideraban concluyentes<sup>38</sup>.

Algunos autores consideran que esta barrera se localiza en la MGB, ya que entre sus componentes se encuentran los glicosaminoglicanos sulfatados, como es el caso del heparán sulfato. Además la membrana que recubre el diafragma y los procesos podocíticos está recubierta por un glicocáliz rico en sialoproteínas, como la podocalixina, y en moléculas sulfatadas. Otros estudios sostienen que aunque la MGB posea una carga negativa fija, ésta no contribuye a la selectividad de las moléculas<sup>1,31</sup>.

#### 1.1.1.4. Sistema de reabsorción y secreción tubular

El sistema de túbulos es el encargado de llevar a cabo otros dos procesos fundamentales para la formación de la orina final, la reabsorción de ciertas sustancias necesarias para el organismo y la secreción de otras que van a ser eliminadas. En las células del túbulo proximal se captan, aproximadamente, las dos terceras partes del agua, el cloruro y el sodio, así como la práctica totalidad del bicarbonato, azúcares, aminoácidos y péptidos que se encuentran en el ultrafiltrado. La porción descendente del asa de Henle es, prácticamente, impermeable al cloruro de sodio (NaCl) y muy permeable al agua, aumentando la osmolaridad del fluido tubular. La rama ascendente es más permeable al NaCl y es completamente impermeable al agua, lo que determina que el líquido que fluye por el asa ascendente se vaya haciendo progresivamente menos hipertónico. La parte gruesa de la rama ascendente del asa de Henle es impermeable al agua y existe un transportador para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a su interior. La reabsorción de solutos sin reabsorción de agua hace que el líquido que sale del asa ascendente gruesa sea hipotónico con respecto al plasma. El túbulo contorneado distal es completamente impermeable al agua; la osmolaridad del fluido tubular disminuye todavía más, haciéndose hipoosmótica con respecto al plasma. El sistema de túbulos colectores es la parte más importante de la nefrona a la hora de ajustar la excreción renal de agua,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  al estado de llenado del volumen extracelular y su composición. La permeabilidad al agua de los túbulos colectores está regulada por la hormona antidiurética (ADH). En los túbulos colectores corticales se produce cuantitativamente la mayor salida de agua, mientras que en los túbulos medulares y papilares, la osmolaridad del intersticio se va haciendo progresivamente mayor, lo que determina una reabsorción adicional de agua hasta alcanzar una osmolaridad máxima.

## **1.2. Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria**

La definición del término Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria (GEFS) ha suscitado en el mundo científico múltiples controversias al ser considerada por algunos investigadores como una entidad clínico-patológica por sí misma, mientras que otros la definían como un patrón histológico con distintas etiologías. Los primeros casos de GEFS fueron descritos en 1957 por el Dr Arnold Rice Rich en niños. Este patólogo observó que no en todos los casos de lo que denominaban lesión de cambios mínimos se percibía el mismo patrón histológico. En algunos de ellos se producía un engrosamiento de la MGB y se observaban depósitos hialinos. Estas lesiones al cabo del tiempo provocaban una obliteración completa de la arquitectura normal del glomérulo. A sus estudios siguieron otros en los que comenzaron a plantearse la hipótesis de que la GEFS podría considerarse una enfermedad independiente mas que una variación o un estado más tardío de la lesión de cambios mínimos<sup>40</sup>.

Durante años esta glomeruloesclerosis fue tratada como una enfermedad por sí misma que no tenía una etiología conocida pero que se caracterizaba por ir acompañada de proteinuria<sup>41</sup>. En otros pacientes que mostraban este patrón histológico se observaba también hematuria microscópica, hipertensión, progresión lenta hacia la insuficiencia renal terminal (IRT) o ausencia de respuesta al tratamiento con corticoides e inmunosupresores<sup>42,43</sup>.

La heterogeneidad clínica que se observaba en los pacientes con GEFS (distinta edad de aparición, diferente respuesta a esteroides, distinta evolución del paciente, etc) estableció la idea de que la GEFS era un patrón histológico resultado de múltiples etiologías.

Estudios de microscopía nos han permitido determinar que la GEFS consiste en una lesión renal que genera esclerosis en algunos de los

glomérulos (focal) pero ésta no afecta a la totalidad del mismo (segmentaria). La esclerosis consiste en un endurecimiento del órgano o tejido debido a un aumento de los tejidos conjuntivos. Suele producirse debido a un daño del tejido como resultado de inflamaciones, problemas en la perfusión o procesos de envejecimiento. Igualmente, una enfermedad autoinmune puede desembocar en una esclerosis. La consecuencia es una producción incontrolada de tejido conjuntivo, que conlleva un endurecimiento de los órganos afectados haciendo que estos pierdan su elasticidad.

Actualmente la GEFS está considerada como una de las mayores causas de fallo renal y su frecuencia sigue aumentando con el tiempo tanto en niños como en adultos. En personas de raza negra la prevalencia es de 2 a 4 veces mayor que en las personas de raza blanca<sup>44,45</sup>.

La heterogeneidad fenotípica de los pacientes ha hecho que sea de vital importancia determinar cuál es la causa de la aparición de este patrón histológico, con el fin de determinar el mejor tratamiento para los pacientes. Los distintos estudios que se han realizado a lo largo de los años han intentado establecer una clasificación de la GEFS basada en su etiología, aunque esta organización va cambiando constantemente debido a la incorporación de nuevas causas de origen. En la actualidad las causas más frecuentes de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria se recogen en dos categorías:

- Formas primarias:
  - Idiopáticas: serían aquellas que presentan un origen incierto.
  - Genéticas: se incluyen aquí las formas sindrómicas, en las que el paciente manifiesta la GEFS como parte de un

síndrome, y las que se limitan a una afectación renal que se denominan no sindrómicas.

- Formas secundarias:
  - ✓ Asociadas a infecciones: VIH, SV40, citomegalovirus...
  - ✓ Inducidas por medicamentos o drogas: como es el caso de la heroína, el interferón- $\alpha$ , litio...
  - ✓ Debido a respuestas adaptativas funcionales-estructurales: displasia renal, agenesia renal unilateral, hipertensión, obesidad, diabetes...

Otra de las clasificaciones de GEFS que se ha llevado a cabo con el objetivo de proporcionar una herramienta para identificar diferencias en la presentación, evolución y patogénesis de la enfermedad, y que puede ser aplicada tanto a las formas primarias como secundarias, es la de las variantes histopatológicas dentro de la GEFS. Esta clasificación basada en los hallazgos patológicos de la biopsia incluye cinco subtipos histológicos: variante colapsante (uno o más glomérulos con colapso global o segmental), variante de lesión en el extremo glomerular (implica la parte del glomérulo cercana al origen del túbulo proximal), variante celular (asociada con hiper celularidad en el espacio capilar), variante perihiliar (la esclerosis se sitúa en el polo vascular) y la variante no específica (la esclerosis se puede localizar en cualquier parte del glomérulo, se conoce como variante NOS). A partir de los resultados extraídos de estudios de biopsias, se ha visto que la variante NOS es la más común, mientras que la variante celular es el subtipo raro<sup>46-50</sup>.

## **Proteinuria**

La proteinuria es uno de los signos más importantes de la enfermedad renal. Consiste en la presencia de niveles no fisiológicos de proteína en la orina (>150 mg/l). La contribución de la proteinuria a la progresión del fallo renal terminal sigue siendo una cuestión de debate. Probablemente su efecto depende de la causa que genera la proteinuria<sup>51</sup>.

En la mayoría de los casos se debe a una alteración de la permeabilidad en la BFG lo que provoca la presencia de proteínas de tamaño similar o superior a la albúmina en la orina, es lo que se denomina proteinuria glomerular. En otras patologías es debida a un defecto en la reabsorción de proteínas en el túbulo renal; en los casos más comunes de proteinuria tubular, la cantidad de proteínas que llega al túbulo proximal excede su capacidad de reabsorción, de tal manera que aparecen en la orina cantidades variables de proteínas de bajo peso molecular (particularmente fragmentos de inmunoglobulinas)<sup>52</sup>.

En consecuencia, el conocimiento de la fisiología de la proteinuria es de extrema importancia para el diagnóstico y el posterior tratamiento de las enfermedades renales.

Bajo condiciones normales, sólo una pequeña parte de las proteínas de peso molecular intermedio son capaces de atravesar la BFG y alcanzar el espacio de Bowman y la luz tubular; mientras que el paso de proteínas de bajo peso molecular ocurre prácticamente sin restricción. Sin embargo, sólo una pequeña parte de estas proteínas alcanzan la orina final ya que son reabsorbidas en el túbulo renal proximal. Las proteínas filtradas son recuperadas del lumen del túbulo proximal por un proceso de endocitosis mediado por receptores específicos. En concreto por el complejo formado por la megalina/cubilina que se expresa en la región luminal de las células epiteliales de este túbulo. La unión del ligando al complejo provoca que

ambos se internalicen en vesículas endosomales. El repertorio de ligandos de la megalina es muy variado: proteínas de unión a vitaminas, enzimas e inhibidores de enzimas, hormonas, toxinas, lipoproteínas, albúmina, hemoglobina, mioglobina... En el caso de la cubilina, algunos ligandos son los mismos que los de la megalina (proteínas de unión a vitamina D, albúmina, hemoglobina, mioglobina), pero también presenta algunos exclusivos como es la transferrina o la apolipoproteína AI<sup>52</sup>.

El receptor se recicla a la membrana plasmática y su ligando proteico es transferido a los lisosomas donde se hidrolizan. Los aminoácidos resultantes retornan a la circulación a través de la membrana contraluminal<sup>53</sup>.

Cuando se producen alteraciones en la selectividad por tamaño, y puede que también por carga, en la pared capilar glomerular se incrementa el paso de proteínas de mediano y alto peso molecular a la luz tubular. Estas proteínas compiten entre ellas y con las de bajo peso molecular por la reabsorción por las células epiteliales del túbulo proximal. En consecuencia, cuando la carga filtrada de proteínas sobrepasa la capacidad de los sistemas de transporte estas comienzan a aparecer en la orina final. Esta alteración en el proceso de recaptación provoca la alteración de la señalización en la región tubular proximal y de la actividad de factores de transcripción. Estos fenómenos provocan la generación de radicales de oxígeno dependientes de la proteína quinasa C (PKC), la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) asociada a la regulación de genes y la síntesis de varias proteínas inflamatorias que generan fibrosis del intersticio<sup>54</sup>.

Independientemente de las causas que determinan la proteinuria, un número creciente de estudios experimentales y clínicos indican que el paso de proteínas a través de la barrera capilar glomerular provoca efectos secundarios en el riñón. Así, en la mayoría de las enfermedades



glomerulares numerosas evidencias muestran una clara asociación entre la magnitud de la proteinuria y la tasa de declinación de la función renal. Los pacientes con proteinuria en un rango nefrótico (>3 gramos/24 horas) al inicio de la enfermedad tienen peor pronóstico que aquellos con menor proteinuria. Por otra parte, la disminución de la proteinuria se asocia a una disminución de la progresión del daño renal.

Es interesante, sin embargo, que la correlación entre el daño tubular y la progresión de la enfermedad renal es mayor que entre ésta y el daño glomerular.

### **1.2.1. Formas hereditarias de la Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria**

En los últimos años los avances de la investigación en el campo de la genética han permitido mejorar el conocimiento de diferentes enfermedades renales hereditarias. Entre ellas se encuentran las formas familiares que presentan un patrón histológico de GEFS, que incluyen a las enfermedades renales sindrómicas y las no sindrómicas.

Aunque el objetivo de esta tesis es el estudio de los genes responsables de la GEFS con herencia autosómica dominante (AD), con afectación exclusivamente renal y que normalmente aparece en edad adulta, debemos hacer una reseña sobre los genes que causan la GEFS autosómica recesiva (AR) debido a la estrecha relación que existe entre todos ellos.

### 1.2.1.1. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria de herencia autosómica dominante

#### **1.2.1.1.1. *Diagnóstico: características clínicas y biopsia renal***

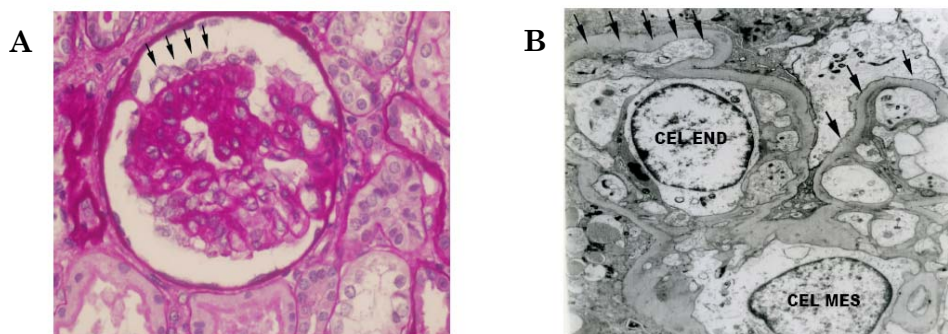
Como se ha mencionado anteriormente, la determinación de la etiología de GEFS resulta fundamental. Para ello lo primero que se debe tener en cuenta es la historia clínica del paciente (enfermedades anteriores, ingesta de fármacos, resultado de analíticas...), ya que es necesario descartar que pueda ser una forma secundaria a otra patología. Al tratarse de una enfermedad hereditaria la historia familiar es de gran importancia, ya que proporciona información de si otros miembros de la familia padecen o han padecido alteraciones renales, además de permitir determinar si se trata de una forma de herencia autosómica dominante. Otros dos rasgos de vital importancia son los valores de proteinuria y creatinina en suero que proporcionan información sobre el estado de la función renal.

Uno de los métodos fundamentales para el diagnóstico de esta enfermedad es la realización de una biopsia renal. La microscopía óptica revela la presencia de zonas de esclerosis parciales en algunos glomérulos y un engrosamiento de la matriz mesangial y de la MGB debido al aumento de la síntesis de colágeno tipo IV. La lesión contiene a menudo un depósito de material eosinófilo. Los podocitos aparecen como células alargadas y con numerosas vacuolas. Se observan sinequias entre la cápsula de Bowman y el ovillo de capilares. En estados más avanzados de la enfermedad la esclerosis de los glomérulos es global y se observa atrofia tubular y fibrosis intersticial por lo que la biopsia no aporta información para el diagnóstico de la enfermedad.

La microscopía electrónica permite realizar un estudio a nivel ultraestructural. Los podocitos además de presentar vacuolas aparecen

separados de la MGB. Se observa una fusión de los procesos podocíticos y una pérdida de los poros de filtración (Figura 1.4).

Los estudios de inmunofluorescencia generalmente muestran depósitos de IgM (inmunoglobulina M) y C3 (factor del complemento C3) en la inmunofluorescencia. Se cree que estos depósitos no representan complejos inmunes ni son patogénicos y que son el resultado de atrapamiento de proteínas plasmáticas.



**Figura 1.4. Histopatología de la biopsia renal del paciente III:3 de la familia CHUS\_GEFS\_II.** A. Tinción PAS (del inglés *periodic acid-Shiff*) (X330) que muestra una distribución focal y segmentaria de las lesiones escleróticas. El glomérulo de la imagen muestra un daño esclerótico segmental y una monocapa de podocitos que se superpone a la zona dañada. B. El estudio con microscopía electrónica de la biopsia muestra una hiperplasia de los podocitos con fusión de los procesos podocíticos, un aumento irregular del espacio subendotelial y ausencia de depósitos densos (X 11.000; Philip 208 SM). *CEL END*: célula endotelial, *CEL MES*: célula mesenquimal. Cortesía del Dr Eduardo Vázquez Martul. CHUAC. A Coruña.

#### 1.2.1.1.2. *Tratamiento y evolución del daño renal*

##### 1.2.1.1.2.1. *Tratamiento inicial*

En un primer momento los pacientes con GEFS-AD son tratados con corticoides y ciclosporina. Hasta el momento no se conoce ningún caso con

herencia autosómica dominante que no sea resistente al tratamiento con esteroides.

**1.2.1.1.2.2. Evolución de la esclerosis glomerular: insuficiencia renal terminal**

El mecanismo responsable de la generación de la esclerosis no se conoce con exactitud. En un primer momento se consideraron las células mesangiales como las principales responsables del desarrollo de la GEFS debido a un aumento en la producción de proteínas de la matriz que obliterarían los capilares. No obstante, no hubo una demostración que explicase con claridad este hecho. En la década de los 80 se estableció que era el podocito el mayor responsable de la progresión de la glomeruloesclerosis principalmente por dos hechos: que los podocitos del riñón adulto eran incapaces de replicarse y que la pérdida de podocitos provoca la disminución de la separación del ovillo de capilares de la cápsula de Bowman.

La respuesta característica de los podocitos frente a un daño es un cambio en su forma. Se produce una simplificación gradual del patrón de interdigitación de los procesos podocíticos que sufren un proceso de fusión, también denominado borramiento de los procesos podocíticos. Los podocitos se convierten en células alargadas y aplanadas y el número de poros de filtración se reduce. Además sufren un aumento de vacuolas lipídicas y la aparición de depósitos hialinos. Estos daños estructurales permiten un aumento de la filtración proteica. Progresivamente pierden sus conexiones con la MGB provocando su separación de la misma. El que se produzca una pérdida de podocitos genera que los podocitos vecinos se hipertrofien para suplir su función, lo que los hace más vulnerables a daños. Este hecho será el responsable del carácter progresivo de la degeneración glomerular así como del fallo renal<sup>55</sup>.

Al desprenderse, los podocitos dejan áreas “desnudas” en la MGB. Como una de las funciones de los podocitos es dar estabilidad a los capilares al amortiguar los gradientes de presión externos generados a través de la pared del capilar, al perderse provoca la formación, en esas regiones de la membrana, de unas protuberancias que entran en contacto con las células parietales y la cápsula de Bowman, generándose una adhesión del ovillo de capilares con la cápsula, es decir, una sinequia. Este evento marca el inicio del desarrollo de la glomeruloesclerosis, que en un primer momento afectará sólo a parte de algunos glomérulos (focal y segmentaria)<sup>56,57</sup>.

En biopsias de GEFS también se observa daño tubular y fibrosis intersticial. El daño en los podocitos produce que aumente la cantidad de proteínas plasmáticas que alcanzan los túbulos. Esto genera una excesiva reabsorción proteica en los túbulos proximales, los cuales responden secretando citoquinas que generan una respuesta inflamatoria. Esta reacción provoca una fibrosis intersticial y una degeneración tubular<sup>58</sup>.

La ausencia de un tratamiento efectivo para la GEFS-AD genera que el daño glomerular vaya evolucionando, generándose una esclerosis global. Esto provoca una reducción de la función renal que acaba desencadenando en una insuficiencia renal terminal. Los pacientes son sometidos a diálisis hasta que reciben un trasplante renal.

#### **1.2.1.1.3. *Genes responsables de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria autosómica dominante***

##### **1.2.1.1.3.1. *ACTN4***

Fue en el año 1998 cuando Mathis *et al* publicaron por primera vez el ligamiento de una familia con GEFS con un patrón de herencia autosómico dominante a la región cromosómica 19q13<sup>59</sup>. Abrieron así el camino para la

búsqueda de genes responsables para la GEFS-AD; aunque no fue hasta el año 2000 cuando se pudo refinar esta localización cromosómica (19q13.1) gracias a los estudios realizados en tres familias que mostraban ligamiento a esta región. Se pudo llevar a cabo entonces un estudio de varios genes definidos como posibles candidatos que dio como resultado la identificación del gen *ACTN4* como responsable de esta patología en estas tres familias<sup>60</sup>.

Este gen codifica para una proteína denominada  $\alpha$ -actinina 4 que se encarga de establecer puentes entre los filamentos de actina. Está compuesto por 21 exones que dan lugar a una proteína que consta de 911 aminoácidos. La  $\alpha$ -actinina 4 presenta dos dominios CH (dominios de unión a la actina homólogos a la calponina) en el extremo amino-terminal (NH<sub>2</sub>-terminal, N-terminal) que permiten la unión con la actina, una región cilíndrica central compuesta por 4 repeticiones de espectrina que forman una triple  $\alpha$ -hélice y dos dominios EF que permiten la interacción con el calcio<sup>61</sup>.

En humanos se conocen cuatro genes (*ACTN1-4*) que codifican para  $\alpha$ -actinina, altamente homólogos y conservados entre especies. La  $\alpha$ -actinina 2 y 3 se expresan en los sarcómeros del músculo esquelético y cardíaco, mientras que la expresión de la  $\alpha$ -actinina 1 y 4 es ubicua. En el riñón de humanos se expresa únicamente la  $\alpha$ -actinina 4, que se localiza predominantemente en los procesos podocíticos y en los capilares.

El análisis de la secuencia de *ACTN4* reveló que cada una de las familias presentaba una sustitución aminoacídica no conservativa (K228Q, T232I, S235P) que se situaba en el exón 8 y afectaba a la región proteica situada entre el dominio de unión a la actina y el primer dominio *rod*. Todas ellas generan un aumento de la unión de la proteína a los filamentos de actina, lo que podría provocar una alteración en la dinámica normal de los filamentos de actina. Un dato importante que reveló el análisis fue la

existencia de una penetrancia incompleta, es decir, la mutación se encontraba no sólo en pacientes afectos sino también en aquellos pacientes que no mostraban ningún síntoma de la enfermedad<sup>60</sup>.

#### 1.2.1.1.3.2. *TRPC6*

La existencia de al menos otro gen responsable de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria autosómica dominante ya había quedado de manifiesto tras los estudios de Kaplan *et al*<sup>60</sup>. En el año 1999 Winn *et al* publican un trabajo en el que describen el fenotipo de una gran familia de Nueva Zelanda diagnosticada con GEFS-AD que no mostraba ligamiento a la región 19q13.1<sup>62</sup>. Tras este resultado este grupo realizó nuevos análisis de ligamiento en ésta y en otras familias en las que *ACTN4* no era responsable de la patología. La familia de origen neozelandés mostró un claro ligamiento al brazo largo del cromosoma 11, en concreto a la región 11q21-q22, pero en las otras familias no se obtuvieron unos valores de ligamiento significativos. Este hecho confirmaba la heterogeneidad genética de esta enfermedad y la existencia de al menos 3 genes responsables de la GEFS-AD<sup>63</sup>.

Tras unos años en los que se logró el refinamiento de la región candidata a unos 2.1 centimorgan (cM) por medio de análisis haplotípicos, y el estudio de 42 genes candidatos que se encontraban en esa región, se determinó que el gen responsable de la patología en la familia neozelandesa era *TRPC6*. Dicho gen está compuesto por 13 exones que dan lugar a la formación de una proteína de 931 aminoácidos denominada canal de receptor transitorio de potencial catiónico 6 (TRPC6). El análisis de su secuencia nucleotídica reveló que el exón 2 presentaba una mutación no conservativa que provocaba la sustitución de una prolina (Pro, P) por una glutamina (Gln, Q) en la posición 112 de la proteína (P112Q)<sup>64</sup>.

Simultáneamente, Reiser *et al* publicaron la identificación de 5 variantes heterocigotas en *TRPC6* en 5 familias no relacionadas que presentaban GEFS-AD (N134S, S270T, K874Stop, R895C y E897K)<sup>65</sup>.

*TRPC6* pertenece a la superfamilia de los canales de receptores transitorios de potencial (TRP), la cual está compuesta por un grupo diverso de canales catiónicos no selectivos permeables al calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) y al sodio ( $\text{Na}^{+}$ ). Esta superfamilia se divide a su vez en siete subfamilias que se clasifican en dos grupos. El primero de ellos está compuesto por cinco subfamilias de canales: *TRPC* o canónicos, *TRPV* o vaniloide, *TRPM* o melastatina, *TRPA* o anquirina y *TRPN* o no mecanopotencial. El segundo grupo está constituido por dos subfamilias, *TRPP* o poliquistina y *TRPML* o mucolipina. Dentro de la subfamilia *TRPC* se diferencian siete subunidades proteicas (*TRPC1-7*), aunque en humanos solo se expresan seis ya que *TRPC2* es un pseudogén, es decir, no presenta expresión. En base a su secuencia nucleotídica estas siete proteínas se pueden subdividir en cuatro subgrupos: *TRPC1*, *TRPC2*, *TRPC3/6/7* y *TRPC4/5*.

Desde el punto de vista estructural, los canales TRP son homo- o hetero-tetrámeros formados por la asociación de cuatro subunidades en torno a un eje de simetría central que coincide con el poro iónico<sup>66</sup>. Cada subunidad consta de una proteína formada por seis segmentos transmembrana (S1-S6) con un lazo hidrofóbico entre el S5 y el S6 que estructura el poro iónico. Los extremos N-terminal y C-terminal son ambos intracelulares pero los motivos y dominios que presentan son distintos en cada subfamilia<sup>67-69</sup>.

La subfamilia *TRPC* se caracteriza por presentar en el extremo N-terminal de tres a cuatro repeticiones de anquirina (ANK) que median el reconocimiento molecular a través de las interacciones proteína-proteína; y un dominio “*coiled-coil*” que está formado por dos o más hélices  $\alpha$  que se



enrollan como los ramales de una cuerda y que intervienen en la interacción proteína-proteína. En la región del extremo C-terminal se localiza el dominio TRP el cual está constituido aproximadamente por 25 residuos aminoacídicos. Dentro de este dominio se encuentra la caja TRP compuesta por seis aminoácidos (EWKFAR) altamente conservados en esta subfamilia. En este extremo también se ha descrito la presencia de dominios de unión a calmodulina (CaM) y de dominios de unión PDZ<sup>70</sup>.

Mediante estudios con quimeras se identificaron dos dominios de interacción implicados en la oligomerización de los canales TRPC. El primer dominio abarca las repeticiones de ANK y el dominio “*coiled-coil*” y es el responsable del ensamblaje de los extremos N-terminal de TRPCs adyacentes. El segundo engloba la región del poro, incluyendo la unión entre los segmentos 4 y 5, y el extremo C-terminal, y se encarga de la interacción entre el extremo C-terminal y el N-terminal de subunidades adyacentes<sup>71</sup>.

La familia TRPC puede subdividirse en dos subgrupos funcionalmente distintos. Uno de ellos está compuesto por TRPC1, TRPC4 y TRPC5, mientras que el otro incluye a TRPC3, TRPC6 y TRPC7. Todos los miembros de un mismo subgrupo pueden ensamblarse bien sea para formar homotetrámeros o heterotetrámeros. Así mismo se ha visto que también pueden darse agrupamientos entre miembros de los dos subgrupos funcionales, como es el caso de TRPC1 y TRPC3<sup>72</sup>. Estudios recientes han mostrado que se pueden formar tetrámeros entre subunidades de las distintas subfamilias de TRP. Entre las nuevas combinaciones se han visto TRPC1/TRPC6/TRPV4 y TRPA1/TRPV1<sup>70</sup>.

El canal TRPC6 presenta una expresión ubicua, con niveles más elevados en los pulmones, ovarios, placenta y bazo. En general podríamos decir que esta proteína se encuentra en tejidos ricos en células del músculo liso<sup>73</sup>. En el riñón, TRPC6 se expresa en tres tipos de células del glomérulo,

las células endoteliales capilares, las mesangiales y los podocitos) y en el compartimento túbulo-intersticial. En la mayor parte de estas células se expresan en compañía de otros miembros de la subfamilia TRPC, como es el caso de TRPC3<sup>74</sup>. En el riñón también hay expresión de canales de otras subfamilias, en concreto de la TRPV (TRPV4, 5, 6)<sup>75</sup>.

Los canales TRPC están implicados en diversas funciones biológicas como el crecimiento celular, la homeostasis, la sensibilidad mecánica, y en la entrada de calcio en las células dependiente de la fosfolipasa C (PLC).

#### 1.2.1.1.3.3. *CD2AP*

En el año 2003 Kim *et al* publicaron un estudio sobre el papel de la proteína de asociación a CD2 (CD2AP) en ratones heterocigotos para la misma. Observaron que estos mostraban anormalidades glomerulares como expansión mesangial e hiper celularidad, lesiones que recordaban al patrón de la GEFS de humanos, aunque carecían de proteinuria. En este estudio también estudiaron que ocurría con CD2AP en pacientes afroamericanos con GEFS idiopática y en afroamericanos con VIH asociada a GEFS. Los resultados mostraron que dos pacientes con GEFS idiopática presentaban una variante nucleotídica en uno de los alelos que afectaba al aceptor de corte y empalme (*splicing*) del exón 7, dando lugar a una proteína incompleta que carece de un 80% de la proteína original. Esta mutación reduce la expresión de CD2AP, es decir, no se produce expresión del alelo mutado, generándose una haploinsuficiencia que parece que podría favorecer la GEFS<sup>76</sup>.

La implicación de este gen en el desarrollo de la GEFS ya había comenzado a vislumbrarse en el año 1999 cuando Shin *et al* publicaron un artículo en el que se relacionaba esta proteína con el desarrollo del síndrome nefrótico (SN) en ratones. Hasta ese momento sólo se conocía su implicación

en el sistema inmune, ya que esta proteína interviene en la interacción de células T con células presentadoras de antígeno. Estos autores generaron un ratón *knockout* de CD2AP que mostraba evidencias de patología renal (proteinuria, aumento de creatinina, afectación glomerular)<sup>23</sup>.

Estos primeros estudios y el hecho de que CD2AP formase parte de la estructura del diafragma de filtración llevaron a pensar que este gen podía estar ser responsable de la GEFS-AD<sup>24,26</sup>.

El gen *CD2AP* codifica para la proteína de asociación a CD2, una proteína transmembrana, que se localizó en un principio en los linfocitos T y que facilita su adhesión con las células presentadoras de antígenos<sup>22</sup>. Este gen se localiza en el cromosoma 6, en la posición 6p12 y consta de 18 exones que dan lugar a una proteína de 639 aminoácidos. La proteína presenta en la región N-terminal tres dominios de homología 3 con las Src (SH3), seguidos de una secuencia rica en prolina, un dominio *coiled-coil* y 4 lugares de unión a la actina en el extremo C-terminal<sup>25</sup>. Su expresión es ubicua; en el caso del riñón se localiza en la cara citoplasmática de los podocitos, formando parte de la estructura del diafragma de filtración y en células de los túbulos colectores y proximales<sup>24,26</sup>.

CD2AP muestra una estrecha asociación con la nefrina y la podocina ya que las tres se localizan en las balsas lipídicas. En este complejo, la podocina interacciona a través de su extremo C-terminal con CD2AP y nefrina. CD2AP actúa como un punto de anclaje entre las proteínas del poro de filtración, podocina y nefrina, y el citoesqueleto de actina de los podocitos<sup>26,27</sup>. Además de tener un papel estructural, esta proteína participa en procesos de señalización celular junto con la nefrina y la podocina. La nefrina y CD2AP se unen a una subunidad de la fosfoinosítido-3-hidroquinasa (PI3K), y conjuntamente estimulan la activación dependiente de PI3K de la serina-treonina quinasa (AKT). La importancia de esta

señalización no se conoce con exactitud, pero se sabe que uno de los sustratos de fosforilación es BAD (proteína agonista de muerte celular asociada a BCL2), una proteína proapoptótica de la familia BCL-2 (linfoma de célula B 2); Bad fosforilado se encuentra inactivado impidiendo que la apoptosis se lleve a cabo. La atenuación de esta señal podría conducir a la muerte celular de los podocitos<sup>77</sup>.

Se ha visto además que CD2AP tiene un papel en la regulación del citoesqueleto de actina. Esta proteína interacciona con una proteína bloqueadora de la actina (CP, del inglés *actin-capping protein*) debido a la presencia de un motivo de unión a CP. La proteína bloqueadora limita el crecimiento de filamentos de actina pre-existentes y potencia la ramificación de nuevos filamentos por el complejo Arp2/3. CD2AP tiene la capacidad de bloquear parcialmente la actividad de las proteínas CP además de ser capaz de desbloquear los extremos de crecimiento rápido de los filamentos de actina. Estas propiedades le confieren a CD2AP la posibilidad de generar cambios en el citoesqueleto de actina, aunque estos no parecen ser suficientes para se desarrolle una GEFS<sup>78</sup>.

En el año 2007 se describe el caso de un niño con GEFS que presentaba una mutación en homocigosis (R612X) que daba lugar a un codón de parada prematuro que suponía la pérdida de 27 aminoácidos de la proteína original. Los padres eran heterocigotos para dicha mutación y ninguno de ellos mostraba signos de la patología. Estudios *in vitro* revelaron que esta mutación provocaba una alteración en la interacción de CD2AP con el citoesqueleto de actina, ya que la cantidad de proteína mutada que se unía a la actina era del 6%. Además se vio que no había expresión de la proteína en los linfocitos del niño con la mutación en heterocigosis mientras que en los padres se expresaba en cantidades normales<sup>79</sup>. A partir de este artículo se replanteó el papel de *CD2AP* en la GEFS y se comenzaron a plantear nuevas hipótesis sobre cómo su alteración influiría en el desarrollo de la patología.

#### 1.2.1.1.3.4. *INF2*

A finales del 2009 se describió el último gen responsable de la GEFS-AD. Al igual que había ocurrido en los casos anteriores, los estudios de clonación posicional permitieron determinar la existencia de un locus para la patología en la región cromosómica 14q32. Tras el estudio de varios genes se vio que el responsable de la GEFS en nueve familias era *INF2*, un gen que codifica para la proteína formina invertida 2. También, al igual que ocurre con *ACTN4* y *TRPC6* presenta una penetrancia incompleta.<sup>80</sup>

Las forminas se agrupan en humanos en 7 familias: INF( del inglés *inverted-formin*, INF1, 2), FHOD (del inglés *Formin homology domain*, FHOD1,3), DAAM (del inglés *Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis*, DAAM 1, 2), DIA (del inglés *Diaphanous Homology*, DIA1-3), FMNL(del inglés *Formin-like*, FMNL1-3), FMN (del inglés *Formin*, FMN1, 2) y *delphilin*<sup>81</sup>. Estas proteínas presentan un amplio rango de funciones al estar implicadas en el control del los citoesqueletos de actina y microtúbulos: citoquinesis, formación de filopodios, adhesión celular y motilidad, endocitosis, polaridad celular, morfogénesis o estabilización de microtúbulos<sup>82,83</sup>. Se sabe por ejemplo que las proteínas de la familia DIA están implicadas en la nucleación de los filamentos de actina. Recientemente se ha visto que INF1 se asocia a los microtúbulos y que podría estar implicada en su regulación<sup>84</sup>.

Estas proteínas se definen por la presencia de un dominio en el extremo C-terminal altamente conservado denominado FH2 (dominio de homología a formina 2) y por el dominio FH1 (dominio de homología a formina 1), que precede a FH2, y que se caracteriza por presentar una secuencia rica en prolina. Además de éstos, las forminas pueden presentar otros dominios relacionados con su función. FH2 tiene la capacidad de unirse a la actina mientras que FH1 puede unirse a la profilina, una proteína de

unión a la actina que favorece la incorporación de nuevos monómeros de actina. Además este dominio tiene la capacidad de unirse a proteínas señalizadoras con dominios SH3 o WW<sup>85,86</sup>.

El gen que codifica para INF2 consta de 23 exones que dan lugar a una proteína compuesta de 1249 residuos aminoacídicos. La estructura primaria de esta proteína consta de un dominio N-terminal denominado DID (*diaphanous inhibitory domain*), de los dominios FH1 y FH2 y de un dominio C-terminal homólogo a WASP 2 (WH2), que por sus características similares con el dominio DAD (*diaphanous autoinhibitory domain*) presente en otras forminas también se denomina DAD<sup>87</sup>. La interacción de DID-DAD inhibe la despolimerización de la actina, pero no bloquea el proceso de polimerización de los filamentos<sup>88</sup>.

El análisis de expresión de INF2 reveló que en el riñón se localizaba en la región perinuclear de los podocitos, en concreto en la cara citoplasmática del retículo endoplasmático<sup>89</sup>. También se observó un patrón de expresión pericapilar que sugería que se expresaba en otros tipos de células renales<sup>80</sup>.

INF2 al igual que otras forminas está implicada en los procesos de polimerización y despolimerización de la actina, pero además se ha visto que interviene en la regulación de la transcitosis basolateral-apical<sup>90</sup>.

#### 1.2.1.2. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria de herencia autosómica recesiva: genes responsables

##### **1.2.1.2.1. *NPHS1***

En el año 1998 Kestila *et al* publicaron que el gen *NPHS1*, que codifica para la proteína nefrina, era el responsable del inicialmente conocido como síndrome nefrótico de tipo finlandés (SNF), ya que fue en este país donde se

describió por primera vez, y que también es conocido como síndrome nefrótico autosómico recesivo tipo 1<sup>59</sup>.

Este síndrome puede manifestarse intrauterinamente, en neonatos, que suelen nacer prematuramente con una placenta de gran tamaño que en ocasiones les genera deformidades corporales, y también en el primer año de vida. Recientemente se han descrito casos de aparición en la infancia<sup>91</sup>. Los individuos afectados muestran proteinuria masiva que puede comenzar en la etapa intrauterina. También es característico de su fenotipo la presencia de edemas. Los corticoides e inmunosupresores son inefectivos y la insuficiencia renal suele aparecer entre los 6 y 12 meses de edad con lo que acaba siendo necesario, en un breve período de tiempo, el trasplante renal. El principal riesgo que presenta dicho trasplante es la recurrencia del SN en el injerto; el mecanismo responsable de este hecho parece ser una reacción inmunológica contra la nefrina del riñón trasplantado<sup>92</sup>.

Este gen se localiza en el cromosoma 19, en concreto en la región 19q13.1, que como mencionamos anteriormente es donde mapea también el gen *ACTN4*<sup>93,94</sup>. Consta de 29 exones que codifican para la proteína nefrina de 1241 residuos aminoacídicos. La nefrina es una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Su dominio N-terminal extracelular está compuesto por ocho dominios de inmunoglobulina consecutivos seguidos de un dominio de fibronectina tipo III, un corto segmento transmembrana y un extremo C-terminal intracitoplasmático con múltiples residuos de tirosina potencialmente fosforilables<sup>95</sup>.

Su estructura sugiere que se trata de una molécula de adhesión y parece que también está implicada en procesos de señalización. Por distintos estudios se vio que su expresión era exclusiva de los podocitos y que dentro de estos su presencia se restringía a la región del diafragma de filtración. Las moléculas de nefrina se extienden unas hacia otras a partir de pedicelos

adyacentes e interacción por medio de uniones homofílicas, contribuyendo a la formación de la estructura en forma de cremallera del diafragma, estructura que ya se ha descrito previamente donde participan activamente en el proceso de filtración glomerular<sup>13</sup>.

El número y tipo de mutaciones descritas para este gen es muy elevado. Parece que estas provocan que la nefrina quede retenida en el retículo endoplasmática y no pueda migrar a la superficie celular donde ejerce su función<sup>96-98</sup>.

#### 1.2.1.2.2. *NPHS2*

El síndrome nefrótico autosómico recesivo resistente a esteroides tipo 2 está causado por mutaciones en el gen que codifica para la podocina, *NPHS2*. Este gen fue identificado en el año 2000 y recibe este nombre porque su expresión es exclusiva del podocito, en concreto se encuentra formando parte del diafragma de filtración. Previamente ya se había identificado por estudios de ligamiento la región cromosómica en la que se hallaba (1q25-q31)<sup>21,99</sup>.

Este síndrome suele manifestarse en la infancia aunque también se han descrito casos donde se presenta ya en edad adulta de una forma esporádica. Se caracteriza por ser resistente al tratamiento con corticoides, proteinuria, una rápida progresión a la IRT, ausencia de recidiva tras el trasplante y ausencia de manifestaciones extra-renales. Su histología en estados tempranos de la enfermedad muestra un patrón de cambios glomerulares mínimos, pero en estados más tardíos presenta un patrón histológico de GEFS<sup>100</sup>.

El gen *NPHS2* consta de 8 exones que dan lugar a una proteína constituida por 383 aminoácidos. La podocina es un miembro de la familia



de las estomatinas, una fosfoproteína integral de membrana que consta de un dominio N-terminal, un corto dominio transmembrana y un dominio citosólico C-terminal. La proteína presenta una forma “horquilla” y se ha visto que interacciona con la nefrina y CD2AP en las balsas lipídicas<sup>27,101</sup>.

La podocina atrae a la nefrina a las balsas lipídicas. La interacción entre ellas es fundamental para que tengan lugar los procesos de transducción de señales mediados por la nefrina. Se ha visto que mutaciones en la podocina provocan que no pueda reclutar a la nefrina y por lo tanto se van a generar alteraciones en las rutas de señalización<sup>102</sup>.

#### 1.2.1.2.3. *PLCE1*

En el año 2006 se descubrió que mutaciones en el gen *PLCE1*, que codifica para la fosfolipasa C épsilon 1, causan el síndrome nefrótico tipo 3 que se caracteriza por una aparición en una edad temprana, y por la presencia de proteinuria y edemas. El patrón histológico puede ser de esclerosis mesangial difusa (EMD) o GEFS y los pacientes pueden ser resistentes o sensitivos al tratamiento con corticoides. La forma resistente se asocia normalmente con la GEFS y suele dar lugar a IRT necesitando una terapia de reemplazamiento renal en forma de diálisis o trasplante renal.

En este artículo se identificaron mutaciones en 12 hermanos de 6 familias distintas diagnosticados en una edad temprana de SN con EMD y que presentaban una mutación en homocigosis que provocaba la ruptura de la pauta de lectura; y en 2 hermanos con un debut más tardío de la enfermedad y con GEFS que tenían una mutación no conservativa en homocigosis<sup>103</sup>.

Posteriormente se identificaron 3 individuos no afectados que presentaban la misma mutación en homocigosis en *PLCE1* que los individuos afectados relacionados. Este hecho es particularmente inusual en

enfermedades con herencia autosómica recesiva. Hechos como éste abrieron la puerta al planteamiento de distintas hipótesis para explicarlo (posibilidad de ser una enfermedad oligogénica, presencia de genes modificadores, etc).

Este gen se localiza en la región cromosómica 10q23 y consta de 34 exones que dan lugar a la formación de 2 isoformas proteicas, una de 2302 aminoácidos y otra de 1994 aminoácidos. PLCE1 presenta en su región N-terminal un dominio intercambiador de nucleótidos de guanina de Ras (RasGEF), seguido de dos dominios catalíticos denominados X e Y (PLCXc, PLCYc), un dominio regulador C2 y 2 dominios C-terminal RA1 y RA2 (dominio de asociación a Ras 1 y 2). Esta proteína presenta una expresión ubicua<sup>104</sup>.

Esta fosfolipasa cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para generar dos segundos mensajeros, el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros se encargan de regular diversos procesos de crecimiento celular, diferenciación y expresión de genes. No se conoce con claridad el mecanismo por el cual puede causar la GEFS, ya que, al contrario que las otras proteínas asociadas a GEFS, PLCE1 no se expresa en los pedicelos sino en el cuerpo celular del podocito y en los proceso podocíticos primarios<sup>50</sup>.

---

## **II. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

1. Estudio de los genes conocidos como responsables de la Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria de herencia Autosómica Dominante (*ACTN4*, *TRPC6* e *INF2*) para intentar determinar si son los causantes de la patología en nuestra cohorte.
2. Búsqueda y análisis de nuevos genes candidatos, mediante clonación funcional, que puedan explicar la aparición de la GEFS-AD en nuestra cohorte.
3. Análisis de los rasgos fenotípicos para el intento de establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo en la GEFS-AD.



---

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Cohorte de pacientes**

**GRUPO 1:** está compuesto por 5 familias (I-V) diagnosticadas de GEFS que cumplen las siguientes características:

- ✓ Claro patrón de herencia autosómico dominante.
- ✓ Biopsia renal con histología de glomerulosclerosis focal y segmentaria en al menos 1 miembro de la familia.
- ✓ Diagnóstico de la enfermedad en edad adulta ( $\geq 18$  años).
- ✓ Presencia de proteinuria en al menos 2 miembros de la familia de distintas generaciones.

**GRUPO 2:** 2 familias (VI- VII) con un patrón de herencia autosómico recesivo:

- ✓ Patrón de herencia autosómico recesivo.
- ✓ Biopsia renal con histología de glomerulosclerosis focal y segmentaria.
- ✓ Diagnóstico de la enfermedad en edad adulta ( $\geq 18$  años).
- ✓ Presencia de proteinuria.

**GRUPO 3:** 18 pacientes diagnosticados de GEFS esporádica:

- ✓ Ausencia de historia familiar de enfermedad renal.
- ✓ Biopsia renal con histología de glomerulosclerosis focal y segmentaria.
- ✓ Diagnóstico de la enfermedad en edad adulta ( $\geq 18$  años).
- ✓ Presencia de proteinuria.

**GRUPO 4:** 5 individuos sanos que especialmente se caracterizan por:

- ✓ Ausencia de patología renal.
- ✓ Ausencia de antecedentes familiares de enfermedades renales.
- ✓ Edad adulta ( $\geq 18$  años).

### **3.2. Selección de genes candidatos para la GEFS-AD**

Los genes que se conocen hasta el momento como responsables de la GEFS autosómica dominante (*ACTN4*; *TRPC6* y *INF2*) se han descubierto mediante la técnica de la clonación posicional. Ésta consiste en definir una región del genoma que segrega con la enfermedad mediante un análisis de ligamiento en grandes familias.

Dado que nuestra cohorte no está compuesta por familias en las que se puedan realizar análisis de ligamiento con resultados significativos, hemos recurrido a la clonación funcional para la elección de los genes candidatos a estudiar para la GEFS-AD. En este caso tomamos como punto de partida el fenotipo de la enfermedad.

#### **3.2.1. Genes candidatos seleccionados y criterios empleados para su selección**

##### **3.2.1.1. ITGA3**

◆ El *ITGA3* codifica para la subunidad  $\alpha 3$  de un receptor heterodimérico transmembrana de la familia de las integrinas que consta de una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ .

◆ La subunidad  $\alpha 3$  se combina con la subunidad  $\beta 1$  para dar lugar al receptor  $\alpha 3\beta 1$  de expresión baso-lateral podocítica, en concreto se cree que es la única integrina que se expresa en estas células<sup>105</sup>.

♦ La función de la integrina  $\alpha3\beta1$  es la de establecer uniones entre los procesos podocíticos y la membrana glomerular basal, posiblemente mediante interacción con proteínas del citoesqueleto por un lado y con componentes de la MGB por el otro, concretamente se une a la laminina<sup>106,107</sup>. La unión del ligando a la integrina provoca el reclutamiento de componentes del citoesqueleto, eventos de fosforilación y reclutamiento y activación de moléculas de señalización que desencadenan en la regulación de la transcripción de genes mediados por integrinas<sup>32</sup>

♦ La integrina  $\alpha3\beta1$  se expresa durante el desarrollo renal en las yemas ureterales donde se cree que está implicada en la ramificación de las mismas<sup>105</sup>.

♦ El modelo de ratón deficiente para la integrina  $\alpha3$  muere durante las primeras 24 horas tras el nacimiento. En los ratones homocigotos se observan anomalías renales severas (podocitos carentes de procesos podocíticos, fragmentación y desorganización de la MGB, etc.). En los lugares donde la integrina  $\alpha3\beta1$  se expresa como integrina exclusiva se observa un fenotipo más severo<sup>105,106</sup>.

### 3.2.1.2. *FN1*

♦ El gen *FN1* codifica para la proteína fibronectina 1, de la cual existen múltiples isoformas<sup>108</sup>.

♦ La fibronectina es uno de los componentes de las membranas basales y permite la unión de ésta con el citoesqueleto intracelular<sup>108,109</sup>.

♦ En los glomérulos renales se expresa en la membrana basal del mesangio y en la que limita la cápsula de Bowman. Parece que también está presente en pequeñas cantidades en la MGB<sup>110</sup>.

- ◆ Se ha visto que mutaciones en el gen *FN1* son responsables de la Glomerulopatía con depósitos de fibronectina (GFND), una patología que comparte características con la GEFS-AD. Ambas poseen un patrón de herencia AD, la enfermedad suele diagnosticarse en la adolescencia temprana, los pacientes presentan proteinuria, hematuria, hipertensión arterial y pueden llegar a IRT necesitando diálisis o trasplante renal<sup>111-113</sup>.

- ◆ Las mutaciones descritas en *FN1* podrían provocar la alteración de las células endoteliales glomerulares y los podocitos generando daños en la BFG lo que daría lugar a la aparición de proteinuria<sup>113</sup>.

### 3.2.1.3. *NEPH1*

- ◆ El gen *NEPH1* codifica para la proteína de asociación a nefrina 1.

- ◆ La proteína *NEPH1* y la nefrina comparten similitudes de secuencia y estructura<sup>15</sup>.

- ◆ Ambas se expresan en la región del diafragma de filtración e interaccionan entre sí. Homo-dímeros o multi-dímeros de *NEPH1* procedentes de pedicelos enfrentados pueden formar interacciones entre sí. Lo mismo ocurre con los heterodímeros formados por *NEPH1* y la nefrina<sup>16,17</sup>.

- ◆ La histología de ratones carentes de expresión de *Neph1* es consistente con la pérdida de proteínas en la orina ya que se observa una fusión de los procesos podocíticos y un aumento de la matriz mesangial. Ambos rasgos son característicos de la GEFS<sup>114</sup>.

♦ Al igual que otros componentes del diafragma de filtración, nefrina y TRPC6, NEPH1 también está fosforilada por tirosinas- quinasas de la familia SRC<sup>115</sup>.

♦ NEPH1 también muestra interacciones con otro de los componentes fundamentales del diafragma de filtración, la podocina. La nefrina, la podocina y la NEPH1 se localizan en las regiones de las balsas lipídicas<sup>116</sup>.

### 3.2.2. Confirmación de un gen candidato

Una vez seleccionados los genes candidatos éstos serán testados individualmente para ver si se encuentran cambios nucleotídicos que sean la causa de la enfermedad. Para ello recurriremos inicialmente a una secuenciación completa del gen en individuos afectados e individuos control.

## 3.3. Procesamiento de las muestras de los pacientes

### 3.3.1. Protocolo de extracción de ADN

- ❖ Protocolo de extracción de muestras frescas de sangre ***GeneAll®GenEx™Genomic*** (General Biosystem, Corea).
- ❖ Protocolo de extracción de muestras de sangre congelada: ***QIAamp DNA Blood Mini Kit*** (Qiagen®, Hilden, Alemania).

### 3.3.2. Amplificación y secuenciación de genes: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción de secuenciación

#### 3.3.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la obtención de un elevado número de copias de las regiones del gen que queremos secuenciar, hemos recurrido a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*). Para la realización de la amplificación fue necesario el uso de dos

cebadores (secuencias nucleotídicas cortas complementarias a una de las hebras de ADN) que flanquean la zona a amplificar y permiten la actividad de enzima de polimerización (ADN polimerasa). En este estudio se realizó la amplificación de los distintos exones de cada gen y de las regiones no traducidas de los genes, que se denominan comúnmente UTR (del inglés *untranslated region*). En cada gen se diferencia un 5'UTR y un 3'UTR. El diseño de los cebadores se realizó mediante el uso del programa Primer3 (versión 0.4.0).

Para la realización de cada reacción de PCR se emplearon los siguientes reactivos en las siguientes proporciones para obtener un volumen final de 25  $\mu$ l:

- 100 ng del ADN genómico extraído del paciente.
- 12,5  $\mu$ l de Biomix™ (Bioline, Alemania). Este reactivo viene a una concentración inicial de 2x e incluye: dNTPs (desoxirribonucleósidos-trifosfato), una Taq ADN polimerasa ultraestable y una solución de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) 50 mM.
- 12 pmol de cada cebador.
- 2,3  $\mu$ l de agua destilada.

En algunos casos, debido a la dificultad de realización de la PCR, se recurrió al uso adicional de 1U de otra Taq polimerasa, la Taq ADN polimerasa estándar de Roche (Roche Applied Science, Alemania). Además para la amplificación de algunas regiones complicadas también se recurrió al uso de 5  $\mu$ l de solución-Q (Qiagen®, Hilden, Alemania).

El diseño de los cebadores se realizó usando el programa *primer3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), usando para ello las secuencias de los genes proporcionadas por la base de datos

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). En las siguientes tablas se recogen las regiones amplificadas y los cebadores usados para ello.

### 3.3.2.2. Cebadores empleados para la amplificación de genes

#### 3.3.2.2.1. Gen *ACTN4*

Tabla 3.1. Cebadores para PCR y secuenciación de *ACTN4*.

<b><i>ACTN4</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>	
<b><u>5'UTR/</u></b> <b><u>Exón 1</u></b>	gCTggTTCAGgTCCgATggC	<b><u>Exón 10</u></b>	gAAgTTgggCTggggAgCAg
	CCAgTCATCTCCTCggTTTCCC		gggATgTCTCCAAGggATgCTg
<b><u>Exones</u></b> <b><u>2, 3</u></b>	AgTTTCCTCACATCTgCCTCCC	<b><u>Exón 11</u></b>	ATTTggACCgTggTCTgCC
	AAggTCAGAAACCgAgCaggAC		gCACCTgAgAAACAgACCCAACg
<b><u>Exón 4</u></b>	CTgAgggAggTggAggAggAC	<b><u>Exón 12</u></b>	TgCTACCTTTCTAAgCCgTgC
	CCACCCACTgACTACCCCTgC		AgACAaggATgggCAAAAaggC
<b><u>Exón 5</u></b>	CTgAgggAggTggAggAggAC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>13,14,15,16</u></b>	AATgAgTCAGggATgggTgAgC
	gCAAACAgggCAggTgggAg		gCACCTggCAgAggAgACg
<b><u>Exón 6</u></b>	CCTggCTTACCCgAggTCAC	<b><u>Exón 17</u></b>	gCCTggCAgAgAAAACCTCCC
	CACAAggCTCTCCCAggCTg		ggCTggTCTTgAACTCCTggg
<b><u>Exones</u></b> <b><u>7, 8</u></b>	AAgATTTACAgAggCACTCCTg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>18, 19</u></b>	ATgggTCCTTgCCCTTCTgC
	CACCAaggCTCTCCCAggCTg		TggCACACAaggATggCAggg
<b><u>Exón 9</u></b>	CAGTCAGCAGTgAggATgCCAAC	<b><u>Exones 20,</u></b> <b><u>21/ 3'UTR</u></b>	ACCCCAgTTCCCTgCTgTgg
	CATCTCgCTgCCACACCTgC		ggAATgggACTgTggggCTg

3.3.2.2.2. Gen *TRPC6*Tabla 3.2. Cebadores para PCR y secuenciación de *TRPC6*.

<b><i>TRPC6</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>	
<b><i>5'UTR/</i></b> <b><i>Exón 1</i></b>	ggAAAAAAgAgTgCgTgCC	<b><i>Exón</i></b> <b><i>8</i></b>	CCATCCTTgCAGCAATCCTA
	CCTCCACTCACTCAggTCCCAg		gAATgAACAAAaggCgAAgA
<b><i>Exón 2</i></b>	CTATTggCCTTCTTggACCg	<b><i>Exón</i></b> <b><i>9</i></b>	CgATCACTggggTCTgAgAg
	TTgACTCTggCTTgTggAggg		CATCTCgCTgCCACACCTgC
<b><i>Exón 3</i></b>	TCTgAAgCATAgTAAAACgTggT	<b><i>Exón</i></b> <b><i>10</i></b>	gggTggTTTACaggTCTgg
	CCCTTTATCCTTATTTAgCACCAA		gCTTCTgAACATCTgTCCCTTT
<b><i>Exón 4</i></b>	gCCATTTgTTTgTTgCCTgT	<b><i>Exón</i></b> <b><i>11</i></b>	CTCagACAACCTCTAACAAACAgC
	ACCCAAGTgTgATTCCCTgA		CTCTgTCACTTACAAAATgCCTgg
<b><i>Exón 5</i></b>	ggAgATCATTggaATgTgCAg	<b><i>Exón</i></b> <b><i>12</i></b>	ACAgCCATCACTTCCAAAagg
	AATgAACCCAaggCAACTgT		TAACAgAACggCggTTggTg
<b><i>Exón 6</i></b>	CAggCTgAgACCTTTCAAACA	<b><i>Exón</i></b> <b><i>13</i></b>	CTTATggTggACTTggAgggAg
	TgCAgTAACCGAACTACTACTgAC		CAACCACAgTgTTTgTTTggg
<b><i>Exón 7</i></b>	ggAgACTTCCATTCgAAAACC	<b><i>3'UTR</i></b>	TTTTCTCCACTgAACCCCTgg
	AgAgTCCCTCCAACTCATTTgT		gCTgTCATAgAgCATCCTTggg



3.3.2.2.3. Gen *CD2AP*Tabla 3.3. Cebadores para PCR y secuenciación de *CD2AP*.

<b><i>CD2AP</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>	
<b><u>5'UTR</u></b> <b><u>/ exón</u></b> <b><u>1</u></b>	gCCTTTgCCTCTgCCTCg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>10</u></b>	ggATTgAATgAAgAggAgAgAC
	gCTgACCgCAGTCgCCTC		gACAgATACTAATgCATgTgAACAC
<b><u>Exón 2</u></b>	ggAgTgAgACATTACgCCCTgC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>11</u></b>	gAgCCTggTAATTCCggTAC
	CCCTAAAgATTgTTTTCTggCAg		gAAATgAACTACTCCCTCCCAg
<b><u>Exón 3</u></b>	TTCTTTgTAGTTggggTgAgTgg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>12</u></b>	TgCCTCTgTCACACTTTTCCAgC
	ATgTAATgCTCTCCTTCTTTgCC		ACAgTTACCgAAgCCATTCCAC
<b><u>Exón 4</u></b>	TTTgTAGTTTggggCTTggg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>13</u></b>	AgCCTTAaggAgAgAgTTTTgCg
	TgCTgCTCTgTCTATCCCAgTgg		TTAAATgCACCACCgCTgTCC
<b><u>Exón 5</u></b>	CCCATAgggTgACgATTTTCAC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>14</u></b>	gggCgAgTgTTgTTTTCC
	CAGTTAggTCCCCATCATAATTgC		CCCTgTTggAATgAACACACC
<b><u>Exón 6</u></b>	CATCTTgCTCTTCTggATATTTCAg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>15</u></b>	gggATATCAgCAACAgTAGCAgC
	CTCACAgCCTCCTCATTCATAACC		gATgTCCACAAAgAATCCCAg
<b><u>Exón 7</u></b>	TAgggAAAgCTgggTAACTg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>16</u></b>	TCATTTTAgTgACTCTTCCTggACC
	ggCACAgATTCAACTACAagg		CgAACTACCACACCCAgCCAC
<b><u>Exón 8</u></b>	CCTTgTAGTTgAATCTgTgCC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>17</u></b>	CTCAgATTTgTCTTggTTTTgCTg
	CAGCTCTTCTAgATTCCAggg		AggAACCgATTACCCAgTTgg
<b><u>Exón 9</u></b>	CATCACTgCACTTCAGCC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>18/</u></b> <b><u>3'UTR</u></b>	CAACCAAATTATAgCATggg
	CTCCTACCTgAATAgCTACATCTg		AAggCTAATCTgTCCCTCTC

3.3.2.2.4. Gen *INF2*Tabla 3.4. Cebadores para PCR y secuenciación de *INF2*.

<b><i>INF2</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3</b>	
<b><u>5'UTR/</u></b> <b><u>exón 1</u></b>	AACTgAgACCCgAgggAAgTg	<b><u>Exones</u></b> <b><u>13, 14</u></b>	gCCCTgTCCTgTgATCCTT
	CCTgAAgCCTCATAACCaggTC		TggCCTCTACgCCTCTACAC
<b><u>Exones</u></b> <b><u>2, 3</u></b>	ATgggAAgggTgCATTg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>15</u></b>	AgTgggAACAgggTCATCC
	ATgCAgCATgggATgCAC		gTCCCAAAAgggAAgTgTTC
<b><u>Exón 4</u></b>	gCagAAgTgAAATggggAAg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>16</u></b>	CgTgCagCCTCagAgTACAg
	ATCTggAggTgCTgCTTAgg		CTCgCCCagCTCACTCTATC
<b><u>Exón 5</u></b>	CgCTATCCCTggCTATgTg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>17</u></b>	CCTgCTCCTTgTCagAgACC
	CCTggAgTCTCACCCCAAag		gACCCACTCTAgCCagACA
<b><u>Exón 6</u></b>	gTgggAATAgAgggggTg	<b><u>Exones</u></b> <b><u>18, 19</u></b>	gCagAggCACCTTTCgTC
	gCgAAACTTTCaggATgCTC		AggCACAgggTAgggACAg
<b><u>Exón 7</u></b>	gTTTTTCCTgCCTCTTCC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>20</u></b>	TAgACAgCggAATggAggAg
	gCgCACACAagTTCCATg		CCAgCgATgTCCTAACCCAC
<b><u>Exones</u></b> <b><u>8, 9</u></b>	CCaggCaggACATCCTTTAg	<b><u>Exón</u></b> <b><u>21</u></b>	ggTgTTggCATggCTgTC
	gTCagAAggCTCaggTgg		TAgTgTCCCggAggggTg
<b><u>Exones</u></b> <b><u>10, 11</u></b>	CCATgACTACgTgggAAAC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>22</u></b>	TgTTgCCCaggCTggAgTgC
	gCTCCCTATTCCTgCTCTCC		gCTTATTAACCAgACAgCgTggTg
<b><u>Exón 12</u></b>	AgTgCCCCTCTggCagggAC	<b><u>3'UTR</u></b>	ggTggggACgTTTgTggCag
	CAGCagggTggTTTCCggAg		CCACCTggCACTgTggTggC

3.3.2.2.5. Gen *ITGA3*Tabla 3.5. Cebadores para PCR y secuenciación de *ITGA3*.

<b><i>ITGA3</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>	
<b><i>5'UTR/</i></b> <b><i>exón 1</i></b>	ggAAAAAAAgAgTgCgTgCC	<b><i>Exones</i></b> <b><i>11, 12</i></b>	CCATCCTTgCAGCAATCCTA
	CCTCCACTCACTCAggTCCCAg		gAATgAACAAAgggCgAAgA
<b><i>Exones</i></b> <b><i>2, 3</i></b>	CTATTggCCTTCTTggACCG	<b><i>Exones</i></b> <b><i>13,14,</i></b> <b><i>15</i></b>	CgATCACTggggTCTgAgAg
	TTgACTCTggCTTgTggAggg		CATCTCgCTgCCACACCTgC
<b><i>Exón 4</i></b>	TCTgAAgCATAgTAAACgTggT	<b><i>Exones</i></b> <b><i>16,</i></b> <b><i>17,18</i></b>	gggTggTTTACAggTCTgg
	CCCTTTATCCTTATTTAgCACCAA		gCTTCTgAACATCTgTCCCTTT
<b><i>Exón 5</i></b>	gCCATTTgTTTgTTgCCTgT	<b><i>Exones</i></b> <b><i>19,</i></b> <b><i>20,21</i></b>	CTCagACAACCTCTAACAAACAgC
	ACCCAACTgTgATTCCCTgA		CTCTgTCACTTACAAAATgCCTgg
<b><i>Exón 6</i></b>	ggAgATCATTggAATgTgCag	<b><i>Exón</i></b> <b><i>22</i></b>	ACAgCCATCACTTCCAAAggg
	AATgAACCCAAggCAACTgT		TAACAgAACggCggTTggTg
<b><i>Exón 7</i></b>	CAGgCTgAgACCTTTCAAACA	<b><i>Exón</i></b> <b><i>23</i></b>	CCTTATggTggACTTggAgggAg
	TgCagTAACCgAACTACTACTgAC		CAACCACAgTgTTTgTTTggg
<b><i>Exones</i></b> <b><i>8, 9, 10</i></b>	ggAgACTTCCATTgAAAACC	<b><i>Exones</i></b> <b><i>24, 25/</i></b> <b><i>3'UTR</i></b>	TTTTCTCCACTgAACCTgg
	AgAgTCCCTCCAACCTCATTgT		gCTgTCATAgAgCATCCTTggg

3.3.2.2.6. Gen *FN1*Tabla 3.6. Cebadores para PCR y secuenciación de *FN1*.

<b><i>FN1</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>	
<b>5'UTR/ exón 1</b>	TTCTTggAggCgACAACCC	<b>Exón 26</b>	TgATTTTACCTTTCCA <sub>g</sub> CTACTT C <sub>g</sub>
	CAACTTTggTCggCTTTAggg		gCTCTTAgCTCCTCCTACTTgAg AATT
<b>Exón 2</b>	ggAAAAggAgAAATgCAAATgTAAC	<b>Exón 27</b>	TCAAATAgTCCTgggCgTgC
	CTTACTAATgCAAATTTAACAATT ACCACT		gCTACTggATAgTCATACTgCCA ACA
<b>Exón 3</b>	ACTAgAAAAgCTTgTACCTAAgTgAg gC	<b>Exón 28</b>	CgTTAATTTCCCTACACCTTC C
	TTTTggCATCATTTTACACAATCTC T		gAgCTgATgACAgACAACAgCAA
<b>Exón 4</b>	ACCTAAgTACCTACCATgggTggAA	<b>Exón 29</b>	CACAATTTgAATgggCTCTg
	CATCCCAgCTCTTgCTCAgC		TgggCTTTCaggTTATCCAC
<b>Exón 5</b>	ACAgggAgCTTgCACAATTCA	<b>Exón 30</b>	gCTCTAAACCCCTCACACTCTg AA
	CAgAAAAAATACCTggCTTAATCT TTAA		gAATAAgTAAAAgCTggTgTCAC CC
<b>Exón 6</b>	ATTgACCACTTgCgACTCTCg	<b>Exón 31</b>	AATATgTACCAGACCTAgAgAgg AggACT
	TTgACCTgCTTCCCATTTTC		TCgAACTCCTAACCTCAAgTgA TCT
<b>Exón 7</b>	AgATCCTgAAgATCCTgACTgC	<b>Exón 32</b>	ACTCTAgACgCCACTTgAggACT T
	GggTggTAAgATTACAggCTTC		gggCATTCAgACACCCAAgA
<b>Exón 8</b>	ggAgATAAAgCATCTCTgTTTACTgA CA	<b>Exón 33</b>	TgCAAAACTgCTTTgCATgTT
	TgAAAATgAgTTTTTCTCACTTCTgT g		TAAAgCCgCTgCTCCCAT
<b>Exón 9</b>	TTggAAAgCTCAGCggTAATC	<b>Exón 34</b>	TTTTCTTTTCCCCATTTC
	gACAACCCACAAgggCTTCA		CCACCTTAgAAACTgTgTTAgAg ATgA
<b>Exón 10</b>	TTAgACCTggTgATCATTTATCAAgT g	<b>Exón 35</b>	CTTgggTTTCAgTTgAggACg
	CCTTTCTgTACCTTTTgCCATCTC		CAGCTTCCCAAATgCTTgg

<b><i>FN1</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>	
<b><u>Exón</u></b> <b><u>11</u></b>	TTTgAgAAgCATACTTTTTCTTT CAT	<b><u>Exón</u></b> <b><u>36</u></b>	CATggATgAgCCAAGCagg
	CCATCCCCCTgTgCAAAC		CgTAgAACAgTTAATAAGCCCgT TTAC
<b><u>Exón</u></b> <b><u>12</u></b>	AgCACCCCTgAAATTAATTCgTAGT TA	<b><u>Exones</u></b> <b><u>37, 38</u></b>	AATTgCaggCTAgCTTgAgAATT C
	TAACTACgAATTTAATTTCAgggTg CT		gTgggAgTTTgCTAAggACTTCAT
<b><u>Exón</u></b> <b><u>13</u></b>	GTACACAgTTTTAAgTTgAAgTgAgT gAATATT	<b><u>Exón</u></b> <b><u>39</u></b>	ACCgACTTCCACTTgACTAgCTg
	TgggAAAAAAAgAAACCATCagA		TgCATCAAAACATggAgAACCTT
<b><u>Exones</u></b> <b><u>14, 15</u></b>	TTACCTTCTAgTCgCTTTTCCTAT g	<b><u>Exón</u></b> <b><u>40</u></b>	TCCTggAgCTTAATgCgCTTT
	CCCTCCCTgCTgATgTCATT		TTCTgTgCTgCCCCATgAg
<b><u>Exones</u></b> <b><u>16, 17</u></b>	AAACAgTgCATCTTACTTTTgCTCA T	<b><u>Exón</u></b> <b><u>41</u></b>	AgCCCgTgTCATTCCCTCACT
	gACAAAACAACCCTCCTTCagg		gCCCATCTCTggTgTACAgCA
<b><u>Exón</u></b> <b><u>18</u></b>	TggCTTCTTAAAAgTAATCTTCagC A	<b><u>Exón</u></b> <b><u>42</u></b>	AgCCCgTgTCATTCCCTCACT
	CaggCTgCAAgTgAgggTg		gCCCATCTCTggTgTACAgCA
<b><u>Exón</u></b> <b><u>19</u></b>	CTTAgACATTCAATCAAgTTTCagg ACT	<b><u>Exón</u></b> <b><u>43</u></b>	TACAgTCATTgATTTTCTTCTT ATggT
	CATgAAgAATAgAgAATgTAAATAT AgTTAAgAAAA		TgCATggAACTTgAggAgACAA
<b><u>Exón</u></b> <b><u>20</u></b>	TTACCTTCTAgTCgCTTTTCCTAT g	<b><u>Exón</u></b> <b><u>44</u></b>	gTgACACgTCCCAgTTCACCT
	CCCTCCCTgCTgATgTCATT		CAgCCTgATAATgAAAgtgAgAA Tg
<b><u>Exón</u></b> <b><u>21</u></b>	CTTggTTAAACTgAggTTCTCCATA AA	<b><u>Exón</u></b> <b><u>45</u></b>	AACCACCCCTAgATCAAATC
	CACAAggACAgCTCAgggCT		CaggAgCCCACCCCTTATC
<b><u>Exones</u></b> <b><u>22, 23</u></b>	AATCATAgCCTCACAgCAgTAACAg T	<b><u>Exón</u></b> <b><u>46</u></b>	TgCCAgTgCATATgATgTg
	TTCTAAAATCTTTgTCTTgggAAggT		TgggCAATAggAgATgTTC
<b><u>Exón</u></b> <b><u>24</u></b>	AgTCCTgCATTCCgCCC	<b><u>Exón</u></b> <b><u>47</u></b>	CTgTCATgAgTCCCCACCTC
	AATCCCCACTCTTATTggAAgTgT		gATCTTggCagAgAgACATgC
<b><u>Exón</u></b> <b><u>25</u></b>	TTCCTTTTgCCTCCCCCTC		
	TTCCCCATgAAACATCCAT		

3.3.2.2.7. Gen *NEPH1*Tabla 3.7. Cebadores para PCR y secuenciación de *NEPH1*.

<b><i>NEPH1</i></b>			
<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>		<b>Cebadores en sentido 5'→3'</b>	
<b><i>5'UTR/ Exón 1</i></b>	ggAAAAAAgAgTgCgTgCC	<b><i>Exón 8</i></b>	CCATCCTgCAGCAATCCTA
	CCTCCACTCACTCAggTCCCAg		gAATgAACAAAaggCgAAgA
<b><i>Exón 2</i></b>	CTATTggCCTTCTTggACCg	<b><i>Exón 9</i></b>	CgATCACTggggTCTgAgAg
	TTgACTCTggCTTgTggAggg		CATCTCgCTgCCACACCTgC
<b><i>Exón 3</i></b>	TCTgAAgCATAgTAAAAcGtggT	<b><i>Exón 10</i></b>	gggTggTTTACAggTCTgg
	CCCTTTATCCTTATTTAgCACCAA		gCTTCTgAACATCTgTCCCTTT
<b><i>Exón 4</i></b>	gCCATTTgTTTgTTgCCTgT	<b><i>Exón 11</i></b>	CTCAgACAACCTCTAACAAACAgC
	ACCCAAGTgTgATTCCCTgA		CTCTgTCACTTACAAAATgCCTgg
<b><i>Exón 5</i></b>	ggAgATCATTggAATgTgCAg	<b><i>Exón 12</i></b>	ACAgCCATCACTTCCAAAagg
	AATgAACCCAAaggCAACTgT		TAACAgAACggCggTTggTg

3.3.2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Con el fin de confirmar que se había realizado la amplificación correcta de los distintos fragmentos, los productos de esta reacción de PCR se separaron por medio de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (p/v). Para ello se necesitó agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y un tampón de electroforesis a una concentración 1X denominado EDTA-Ácido Bórico-Tris (TBE del inglés *Tris-Boric Acid-EDTA*). Éste está compuesto por: tris(hidroximetil)aminometano 50 mM (Roche, Basilea, Suiza), ácido bórico 40 mM (J.T.Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) y EDTA 0,636 mM (AcBiochem, Malvern, *Pennsylvania, USA*). Se añadió la agarosa al TBE y se disolvió con ayuda de calor. A continuación se le

incorporó el bromuro de etidio (BrEt), a una concentración final de 62,5 ng/mL, para poder ver con posterioridad los ácidos nucleicos en un transiluminador por medio de la radiación ultravioleta (UV). La disolución se dejó gelificar en la cubeta apropiada durante unos 30 minutos.

Para cargar los pocillos del gel, 5 µl del productos de PCR se mezclaron con 2 µl de un tampón de carga con la siguiente composición: sacarosa 400 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y naranja de acridina 2,5 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para conocer el tamaño del producto amplificado uso un marcador de peso molecular comercial, el Hyperladder II (con un rango de 50-2000 pb) (Bioline, London, United Kingdom). El gel cargado se corrió a 120 voltios y 100 mA durante 1 hora. Tras este tiempo se visualizó en el transiluminador de luz ultravioleta con cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD del inglés *charge-coupled device*)(EC3 Imagin System, UVP, Upland California, USA).

#### 3.3.2.4 Purificación enzimática del producto de PCR

Los fragmentos de PCR fueron purificados por medio de la digestión con 1 µl *Exonucleasa I (Exo I)* y 2 µl de *Fosfatasa Alcalina de Camarón* (SAP del inglés *Shrimp Alkaline Phosphatase*), (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). La exonucleasa actúa degradando ADN de cadena sencilla en dirección 3' a 5'. Por su parte, la fosfatasa elimina el fosfato del extremo 5' del ADN.

La mezcla fue sometida al siguiente programa en el termociclador:

- Primer paso: un ciclo durante 15 minutos a 37 °C para que se produzca la activación de las enzimas y el proceso de degradación.
- Segundo paso: un ciclo durante 15 minutos a 80°C para la inactivación de las enzimas.

### 3.3.2.5. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación directa de los fragmentos de la PCR se realizó usando un paquete comercial de secuencia, el *BigDye*® *Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Warrington, UK) siguiendo el protocolo recomendado por la compañía.

Las condiciones para la reacción de secuenciación fueron las siguientes:

<i>Programa de PCR</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min, s)</i>	<i>Número de ciclos</i>
<b>Desnaturalización inicial</b>	96	4 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	15 s	
<b>Hibridación del cebador con el ADN</b>	50	10 s	30
<b>Elongación cebadores</b>	60	3 min	
<b>ççElongación final</b>	60	10 min	1
<b>Almacenamiento</b>	4	∞	

Los cebadores utilizados para realizar la secuenciación de los distintos genes fueron los mismos que los empleados en la reacción de amplificación por PCR y que se recogen en las Tablas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7.

### 3.3.2.6. Purificación de la reacción de secuencia

Las reacciones de secuencia fueron precipitadas por el método EDTA y Etanol para placas de 96 pocillos. Para ello se mezclan 5µL de reacción de secuencia con 2,5 µL de EDTA 125 mM de pH 8 con 30 µL de etanol al 100%. Agitamos la placa durante unos 15 segundos y dejamos incubar a temperatura ambiente al menos 15 minutos para precipitar los fragmentos de secuencia.

A continuación se centrifuga a 3000 x g durante 30 minutos y se retira el sobrenadante mediante una rápida centrifugación a 3000 x g



invirtiendo la placa. Posteriormente se añaden a cada muestra 30 µl de etanol al 70% y se centrifuga durante 15 minutos a 3000 x g. Para retirar el sobrenadante repetimos el procedimiento anterior. Seguidamente dejamos secar la placa a temperatura ambiente en oscuridad al menos durante dos horas o en una estufa a 37°C durante 1 hora para eliminar los restos de etanol. Finalmente las muestras se resuspenden en 10 µl de formamida (Applied Biosystems, Warrington, UK).

#### **3.3.2.7. Análisis de las secuencias**

Las muestras fueron analizadas en el Secuenciador Automático *ABI3130xl* (Applied Biosystems, Warrington, UK) y analizadas con el paquete informático *Sequencing Analysis v5.2*. (Applied Biosystems, Warrington, UK).

#### **3.3.2.8. Análisis de cosegregación**

En los pacientes en los que se encontró un cambio potencialmente patogénico se procedió a secuenciar el exón correspondiente en todos los miembros de la familia de los que se disponía, tanto afectados como sanos, para comprobar si el cambio cosegregaba con la enfermedad, es decir, estaba ausente en los individuos sanos y presente en los afectados.

### **3.3.3. Caracterización de mutaciones**

- **MATRICES DE SUSTITUCIÓN:**

- **Matriz de BLOSUM62:**

La matriz de sustitución de bloque de aminoácidos o matriz de BLOSUM (del inglés *BLOcks of amino acid SUBstitution Matrix*) se emplea para conocer si un cambio puede ser potencialmente patogénico. Éstas se

construyen a partir de bloques de alineamientos múltiples locales de proteínas relacionadas. La matriz BLOSUM62 indica que las secuencias utilizadas para generar esta matriz tenían un máximo del 62% de similitud. Las variantes más importantes en los valores de una matriz se deben al peso que se otorga a las características de los aminoácidos implicados, es decir, su fisicoquímica (hidrofobicidad, cargas, peso molecular, etc.), número y tipo de codones que los codifican, o la frecuencia con que estos son reemplazados en una alineación dada.

Un resultado positivo en la matriz indica que el cambio se encontró con más frecuencia de la esperada, y por tanto es posible que tenga menos trascendencia, mientras que un resultado negativo indica que el cambio se encontró con menos frecuencia de la esperada, y que por lo tanto hay más posibilidades de que tenga una repercusión biológica (Figura 3.1)<sup>117,118</sup>.

A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0
R	-1	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	6	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	1	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	1	0	0	-3	5	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4	2	-3	1	0	-3	-2	-1	-3	-1	3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	-2	2	0	-3	-2	-1	-2	-1	1
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5	0	-2	-1	-1	-1	-1	1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6	-4	-2	-2	1	3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7	-1	-1	-4	-3	-2
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4	1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11	2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Figura 3.1. Matriz BLOSUM62.

- **Matriz de Miller and Kumer:**

Esta matriz recoge las frecuencias relativas de los cambios aminoacídicos observados entre especies y las frecuencias presentes en pacientes con la enfermedad. Con ambos datos nos indica la frecuencia con la que ocurre ese cambio aminoacídico.

La matriz está recogida en el artículo titulado "*Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation*" publicado por MP Miller y Sudhir Kumar<sup>119</sup>.

- **PROGRAMA PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2):**

Esta herramienta permite predecir el posible efecto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de proteínas humanas mediante estudios comparativos de evolución y físicos <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/><sup>120</sup>.

### 3.3.4. Estudios de conservación aminoacídica

Para realizar este tipo de estudios recurrimos al uso del programa informático ClustalW2, el cual nos permite realizar un alineamiento de múltiples secuencias (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). En nuestro caso se pretendía ver la conservación aminoacídica de la proteína INF2 en 5 especies (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Pan troglodytes* y *Monodelphis domestica*). Las referencias de las secuencias proteicas (extraídas de la base de datos ENSEMBL, (<http://www.ensembl.org/>) que se emplearon para realizar el alineamiento fueron las siguientes:

- *Homo sapiens* (hombre): ENSP00000376410.
- *Mus musculus* (ratón): ENSMUSP00000098591.

- *Rattus norvegicus* (rata): ENSRNOP00000018225.
- *Pan troglodytes* (chimpancé): ENSPTRP00000056851.
- *Monodelphis domestica* (marsupial): ENSMODP00000017086.
- *Danio rerio* (pez cebra): ENSDARP00000004843.

Para hacer el estudio de conservación de ITGA3 las referencias de las secuencias proteicas que se usaron fueron extraídas de la misma base de datos:

- *Homo sapiens* (hombre): ENSP00000007722.
- *Mus musculus* (ratón): ENSMUSP00000001548.
- *Pan troglodytes* (chimpancé): ENSPTRP00000015942.
- *Monodelphis domestica* (marsupial): ENSMODP00000015148.
- *Danio rerio* (pez cebra): ENSDARP000000096662.

### 3.3.5. Análisis estructural de la mutación L245P

El análisis del dominio DID de la proteína INF2, así como la construcción de secuencias aminoacídicas, fue realizado usando el programa PyMOL. Este programa permite visualizar y modelar moléculas en 3D (<http://www.pymol.org/>).

### 3.3.6. Determinación de motivos y dominios proteicos

Para determinar las regiones donde se localizaban los motivos o dominios en cada una de las proteínas estudiadas se usó la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (<http://expasy.org/sprot/>).

---

## **IV. RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Genotipo

#### 4.1.1. Estudio mutacional de los genes responsables de la GEFS-AD

##### 4.1.1.1. Cambios nucleotídicos en *ACTN4*

En la Tabla 4.1. están recogidas las variaciones nucleotídicas que se detectaron mediante la secuenciación del gen *ACTN4*, así como los cambios aminoacídicos generados por estas variaciones en algunos exones.

**Tabla 4.1. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *ACTN4*.**  
C= cambio aminoacídico conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Homocigoto o heterocigoto	Tipo de cambio	Frecuencia
INTRÓN 1	g. 282	C>T	-	heterocigoto	-	6/20
INTRÓN 2	g. 53057	G>C	-	heterocigoto	-	2/20
				homocigoto		4/20
	g. 53218	G>A	-	heterocigoto	-	5/20
EXÓN 5	g. 58410 c. 596 p. 179	A>G	P179P	heterocigoto	C	3/20
				homocigoto		2/20
INTRÓN 5	g. 58420	T>C	-	heterocigoto	-	6/20
INTRÓN 12	g. 74066	T>C	-	heterocigoto	-	3/20
				homocigoto		1/20

En el caso del gen para la  $\alpha$ -actinina 4 ninguno de los cambios que se observaron tenían carácter patogénico.

#### 4.1.1.2. Cambios nucleotídicos en *TRPC6*

En la Tabla 4.2. están recogidas las variaciones nucleotídicas que se detectaron mediante la secuenciación del gen *TRPC6*, así como los cambios aminoacídicos generados por estas variaciones en algunos exones.

**Tabla 4.2. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *TRPC6*.** C= cambio aminoacídico conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo, pb= pares de bases.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Homocigoto o heterocigoto	Tipo de cambio	Frecuencia
5'UTR	g. 65	T>A	-	heterocigoto	-	3/20
	g. 172	G>C	-	heterocigoto	-	1/20
	g. 208	T>C	-	heterocigoto	-	3/20
EXÓN 1	g. 468 c. 468 p.15	T>C	P15S	heterocigoto	NC	1/20
INTRÓN 1	g. 79045	G>C		heterocigoto	-	4/20
	g. 79171	G>A		heterocigoto	-	4/20
EXÓN 4	g. 94910 c. 1836 p. 404	T>C	A404V	heterocigoto	C	3/20
INTRÓN 5	g. 100996	G>C	-	heterocigoto	-	5/20
INTRÓN 7	g. 110483	T>C	-	heterocigoto	-	4/20
INTRÓN 10	g. 128690	T>C	-	heterocigoto	-	6/20
EXÓN 11	g. 128872 c. 2955 p. 863	T>C	F863F	heterocigoto	C	5/20
INTRÓN 12	g. 130801	Del 4 pb	-	heterocigoto	-	5/20



En el estudio de este gen se detectó un cambio aminoacídico no conservativo, **P15S**, en el exón 1 del caso índice (II:4) de la familia I (CHUS\_GEFS-I) (Figura 4.1.A).

La presencia de una variación nucleotídica que implicaba el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en uno de los alelos del paciente provocaba que el aminoácido original, una prolina, un aminoácido neutro e hidrofóbico, fuese sustituido por una serina, un aminoácido neutro y polar (Figura 4.1.B).

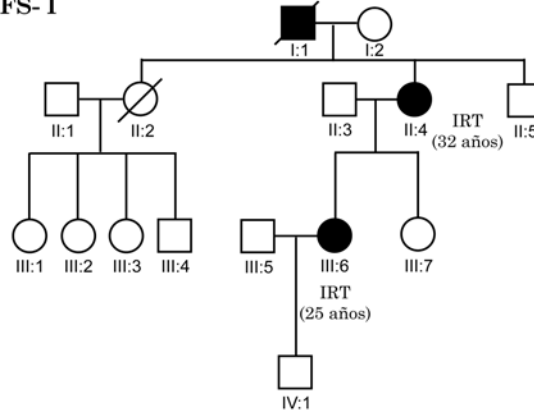
Según la matriz BLOSUM62 este cambio tiene un valor de -1, es decir, que cabe la posibilidad de que tenga una repercusión biológica. La matriz de Kumar y Miller nos indicó que es un cambio que ocurre con frecuencia con lo que la probabilidad de que sea patogénico es menor. La introducción del cambio en el programa PolyPhen no proporcionó información.

Aunque estos datos no sugerían que el cambio P15S fuese patogénico realizamos de igual modo el estudio de cosegregación en los individuos afectados y no afectados de la familia I de los que se disponía muestra de ADN (II:3, II:4, III:6, III:7).

El análisis resultó negativo ya que de los dos individuos afectados presentes en la familia sólo el paciente II:4 presentaba el cambio (Figura 4.1.C).

A

CHUS\_GEFS- I



Clave:



No afecto



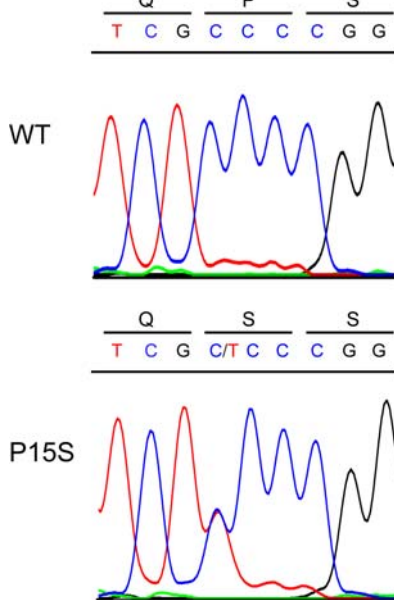
Afecto



Fallecido

? Estado desconocido

B



C

PRESENCIA DEL CAMBIO P15S	II:4
AUSENCIA DEL CAMBIO P15S	II:3, III:6, III:7
COSEGREGACIÓN	NEGATIVA

Figura 4.1. Estudio de cosegregación del cambio P15S en el gen *TRPC6* de la familia IV. A: Árbol genealógico de la familia con la edad de IRT para aquellos pacientes en los que se dispone del dato. B: Electroferograma normal y mutado del cambio P15S. C: Relación de individuos estudiados con y sin mutación. IRT= insuficiencia renal terminal, WT= forma salvaje.

#### 4.1.1.3. Cambios nucleotídicos en *CD2AP*

En la Tabla 4.3. están recogidas las variaciones nucleotídicas que se detectaron mediante la secuenciación del gen *CD2AP*, así como los cambios aminoacídicos generados por estas variaciones en algunos exones.

**Tabla 4.3. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *CD2AP*.**  
C= cambio aminoacídico conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Homocigoto o heterocigoto	Tipo de cambio	Frecuencia
INTRÓN 3	g. 56047	C>T	-	heterocigoto	-	2/70
EXÓN 4	g.66907 c. 865 p.137	G>A	I137V	heterocigoto	C	1/70
INTRÓN 4	g. 76833	A>G	-	heterocigoto	-	11/70
				homocigoto	-	6/70
EXÓN 6	g. 96430 c. 1152 p. 232	T>C	S232S	heterocigoto	C	2/70
EXÓN 12	g. 118084 c. 1120 p. 374	A>G	T374A	heterocigoto	NC	1/70
INTRÓN 12	g. 118274	T>G	-	heterocigoto	-	3/70
INTRÓN 15	g. 130248	G>T	-	heterocigoto	-	1/70

En el análisis por secuenciación de *CD2AP* se detectaron 2 cambios en la secuencia de la proteína que debemos resaltar, I137V y T374A. En el exón 4 de un individuo del grupo control se descubrió el cambio de un adenina (A) por una guanina (G) en heterocigosis. Esta variación provocaba la sustitución de una isoleucina (I) por una valina (V) en la posición 137 de la proteína. El hecho de que este cambio fuese conservativo y se localizase en un individuo sano provocó que se descartase como objeto de estudio.

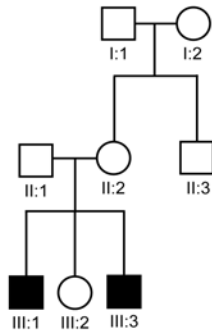
En el exón 12 del caso índice de la familia VI (Figura 4.2.A) se observó el cambio de una G por una A que daba lugar a una variación aminoacídica no conservativa, **T374A**, la treonina original (aminoácido neutro y polar) era sustituida por una valina (aminoácido neutro e hidrofóbico) en la posición 374 de la proteína (Figura 4.2.B).

Según la matriz BLOSUM62 este cambio tiene un valor de 0, es decir, que el cambio tiene pocas posibilidades de ser patogénico. La matriz de Kumar y Miller nos indicó que es un cambio que ocurre con una frecuencia media. La introducción del cambio en el programa PolyPhen indicó que era benigno (*score*: 0.000, sensibilidad: 1.00, especificidad: 0.00).

A pesar de los datos proporcionados por las matrices y el programa PolyPhen se realizó un análisis de la secuencia del exón 12 en los individuos de la familia VI de los que se disponía de muestra (I:1, II:2, III:1, III:2).

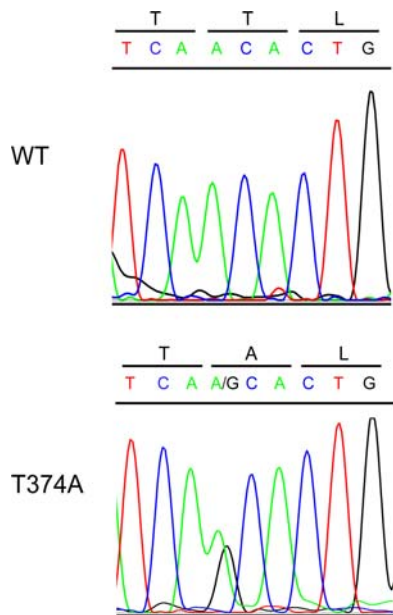
Se vio que el cambio estaba presente en heterocigosis tanto en los individuos afectados como en los sanos de la familia. El estudio nos reveló que esta variación era heredada por vía materna (II:2) y que no era responsable de la patología ya que los otros dos individuos que presentaban el cambio carecían de síntomas clínicos (I:1, II:2) (Figura 4.2.C).

**A** CHUS\_GEFS-VI



Clave:  No afecto     Afecto     Fallecido    ? Estado desconocido

**B**



**C**

PRESENCIA DEL CAMBIO T374A	I:1, II:2, III:1, III:2
AUSENCIA DEL CAMBIO T374A	-

**Figura 4.2. Estudio del cambio T374A en el gen CD2AP de la familia VI.** A: Árbol genealógico de la familia con la edad de IRT para aquellos pacientes en los que se dispone del dato. B: Electroferograma normal y mutado del cambio T374A. C: Relación de individuos estudiados con y sin mutación. *IRT*= insuficiencia renal terminal, *WT*= forma salvaje.

#### 4.1.1.4. Cambios nucleotídicos en *INF2*

En la Tabla 4.4. están recogidas las variaciones nucleotídicas que se detectaron mediante la secuenciación del gen *INF2*, así como los cambios aminoacídicos generados por estas variaciones en algunos exones.

**Tabla 4.4. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *INF2*. C= cambio aminoacídico conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo.**

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Homocigoto o heterocigoto	Tipo de cambio	Frecuencia
EXÓN 6	g.17034 c. 846 p.245	C>T	L245P	heterocigoto	C	1/20
EXÓN 6	g.17108 c.892 p.259	A>G	L260L	heterocigoto	C	1/20
INTRÓN 6	g.17187	T>C	-	heterocigoto	-	3/20
EXÓN 7	g.18112	A>G	-	heterocigoto		3/20
INTRÓN 14	g.22010	Delección del A	-	heterocigoto	-	3/20
				homocigoto	-	6/20
INTRÓN 16	g.22743	C>T	-	heterocigoto	-	2/20
				homocigoto		4/20
INTRÓN 16	g.22856	C>G	-	heterocigoto	-	3/20
				homocigoto		4/20

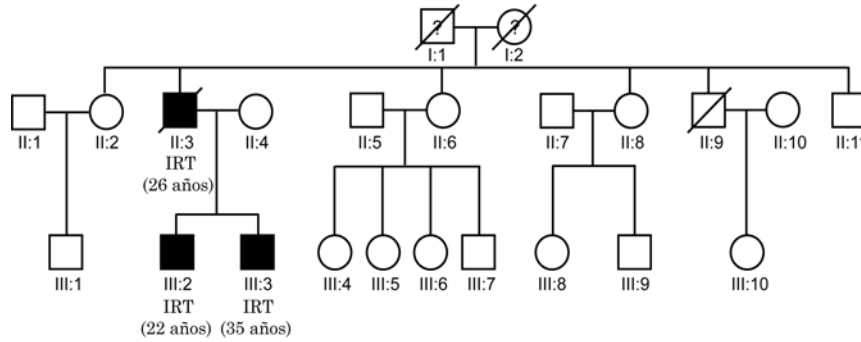
En el estudio por secuenciación directa de este gen se detectó la presencia en el exón 6 del caso índice (III:3) la familia II (CHUS\_GEFS-IV) (Figura 4.3.A) una variación de una T por una C que daba lugar a un cambio aminoacídico conservativo, **L245P**. Este cambio nucleotídico producía la sustitución de una leucina (aminoácido neutro e hidrofóbico) por una prolina (aminoácido neutro y hidrofóbico) en la posición 245 de la proteína. Esta variación se produce entre dos aminoácidos con una estructura muy distinta lo que hace pensar que pueda ser un cambio patogénico (Figura 4.3.B).

Según la matriz BLOSUM62 este cambio tiene un valor de -3, es decir, que tiene una alta posibilidad de ser patogénico. La matriz de Kumar y Miller nos indicó que es un cambio que ocurre con poca frecuencia y que cuando se da es altamente patogénico. La introducción de la variación en el programa PolyPhen ha indicado que se trata de un cambio altamente patogénico (probabilidad de ser un cambio patogénico= 97.9 %, sensibilidad = 0.67; especificidad = 0.94).

El análisis de cosegregación se realizó usando las muestras de los individuos de la familia IV de las que se disponía (II:4, II:8, III:2, III:3). Se observó la presencia de mutación en los pacientes III:2 y III:3 y su ausencia en los individuos II:4 y II:8. A pesar de no disponer de muestra de ADN del individuo II:3 se puede afirmar que el estudio de cosegregación es positivo, ya que se ve que el cambio viene por la línea paterna que es la que muestra la afectación renal (Figura 4.3.C).

A

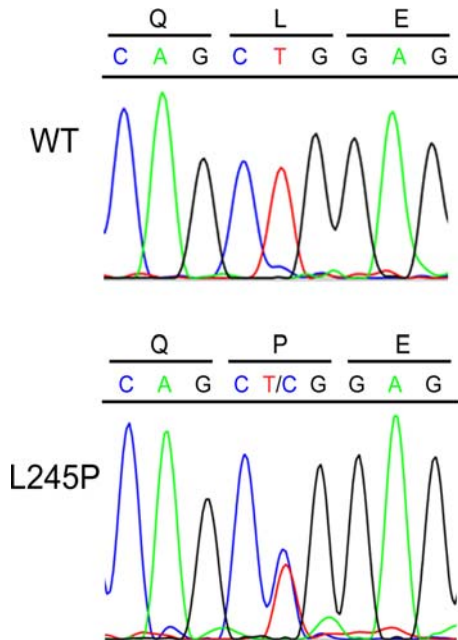
CHUS\_GEFS-II



Clave:



B



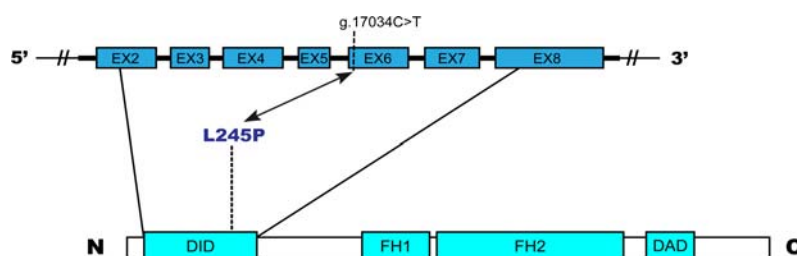
C

PRESENCIA DEL CAMBIO L245P	III:2, III:3
AUSENCIA DEL CAMBIO L245P	II:4, II:8
COSEGREGACIÓN	POSITIVA

**Figura 4.3. Estudio de cosegregación del cambio L245P en el gen *INF2* de la familia II.** A: Árbol genealógico de la familia con la edad de IRT para aquellos pacientes en los que se dispone del dato. B: Electroferograma normal y mutado del cambio L245P. C: Relación de individuos estudiados con y sin mutación. *IRT*= insuficiencia renal terminal, *WT*= forma salvaje.



Tras ver que el estudio de cosegregación era positivo, se determinó la posición en la secuencia proteica de INF2 del cambio L245P. Se vio que éste se localizaba dentro del dominio DID que se sitúa en el extremo N-terminal de la proteína (Figura 4.4.).



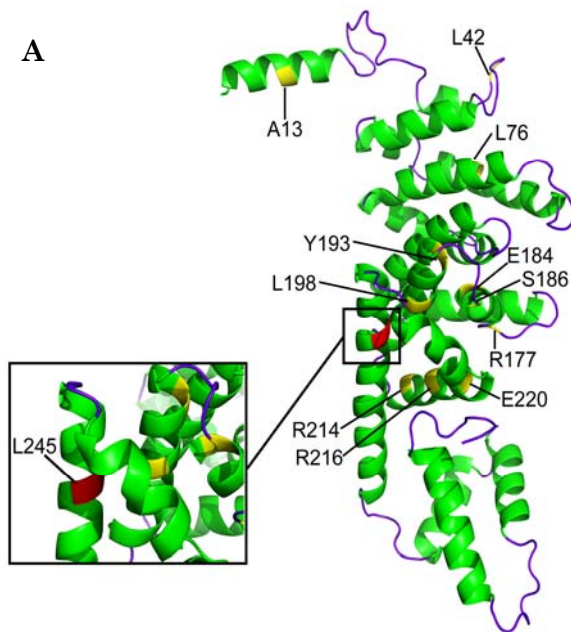
**Figura 4.4. Representación gráfica del cambio L245P en la proteína y el gen *INF2*.** En la imagen se muestra la estructura del gen y la proteína INF2 donde se marca la posición del cambio nucleotídico C>T en el exón 6 (g.17034) y de la mutación L245P en el dominio DID situado en el extremo N-terminal. *EX*= exón, *DID*= dominio inhibidor diaphanous, *FH1*: dominio homólogo a formina 1, *FH2*: dominio homólogo a formina 2, *DAD*: dominio autoregulador diaphanous.

El alineamiento de parte de la secuencia aminoacídica del dominio DID de INF2 en diferentes organismos nos ha ayudado a predecir si el cambio L245P es patogénico o no. Esta capacidad se debe en gran medida a la conservación de dicho aminoácido a lo largo de la evolución en distintas especies. Dicho estudio ha mostrado que la leucina es un residuo altamente conservado en esa posición.

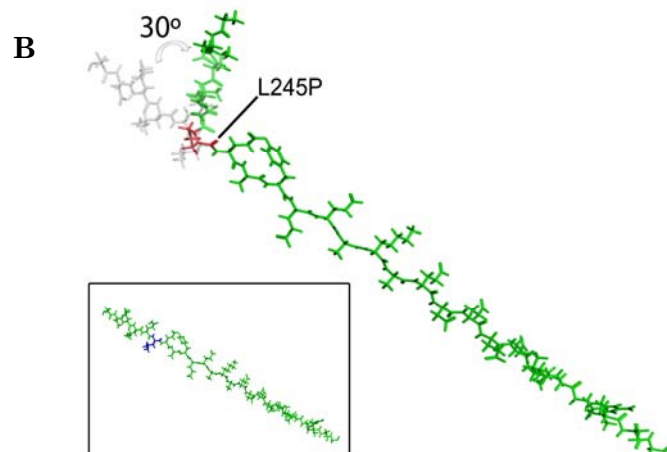
	<b>L245P</b>
<i>Humano</i>	// EDADLLIQ <b>L</b> EAFEEAKA //
<i>Chimpancé</i>	// EDADLLIQ <b>L</b> EAFEEAKA //
<i>Ratón</i>	// EDADLLIQ <b>L</b> EAFEEAKA //
<i>Rata</i>	// EDADLLIQ <b>L</b> EAFEEAKA //
<i>Marsupial</i>	// EDLDLLIQ <b>C</b> ETFEAKS //
<i>Pez cebra</i>	// DDEDLLIQ <b>C</b> EAFEEAMA //

**Figura 4.5. Estudio de conservación evolutiva de parte de la secuencia aminoacídica del dominio DID donde se encuentra el cambio L245P.** En el estudio se han incluido 5 especies: *Homo sapiens* (humano), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Mus musculus* (ratón), *Rattus norvegicus* (rata), *Monodelphis domestica* (marsupial) y *Danio rerio* (pez cebra). Para su realización se ha utilizado el programa ClustalW2.

Haciendo uso del programa PyMOL realizamos una manipulación del modelo del dominio DID. Siguiendo lo que previamente había realizado Brown *et al*<sup>80</sup>, identificamos el residuo en la proteína mDia1 que se correspondía con nuestra mutación en INF2. La mutación L245P se localizaba dentro de la décimo cuarta  $\alpha$ -hélice del dominio DID (Figura 4.6.A).



**Figura 4.6. Alteración de la conformación estructural 3D del dominio DID por la mutación L245P.** A. Visión del dominio DID de mDia1 (del inglés *Diaphanous-related formin-1*) mostrando las posiciones de las mutaciones descritas previamente en la literatura (amarillo) y de la mutación L245P (rojo). B. Modelado de la estructura primaria del dominio DID en presencia y en ausencia de la mutación L245P: cuando la leucina es sustituida por la prolina (rojo) la secuencia aminoacídica con la mutación (verde) forma un ángulo de  $30^\circ$  con respecto a la forma salvaje (gris).



Para determinar el impacto de este cambio diseñamos, en el mismo programa, la estructura primaria de la secuencia aminoacídica de esa cadena  $\alpha$  en presencia y en ausencia de la mutación. Pudimos ver que el cambio de la leucina por la prolina generaba una alteración de la estructura de la hélice ya que obligaba a la formación de un ángulo de  $30^\circ$  en el punto de inserción de la prolina (Figura 4.6.B).

#### 4.1.2. Estudio mutacional de los genes candidatos seleccionados para la GEFS-AD

##### 4.1.2.1. Cambios nucleotídicos en *ITGA3*

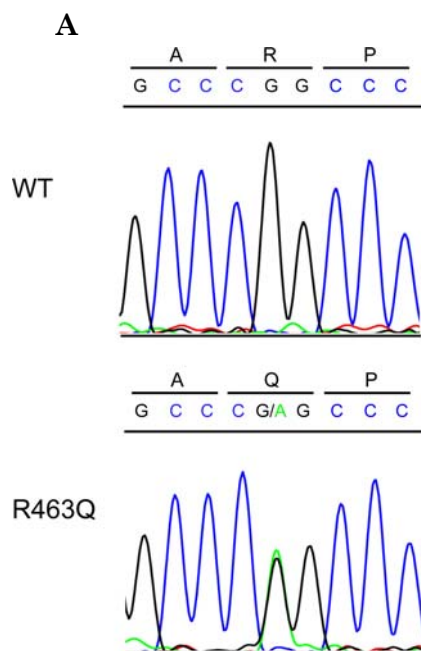
En la Tabla 4.5. están recogidas las variaciones nucleotídicas que se detectaron mediante la secuenciación del gen *ITGA3*, así como los cambios aminoacídicos generados por estas variaciones en algunos exones.

**Tabla 4.5. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *ITGA3*.**

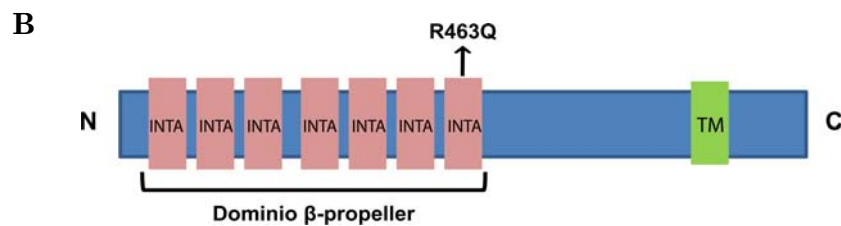
*C* = cambio aminoacídico conservativo, *NC*= cambio aminoacídico no conservativo.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Homocigoto o heterocigoto	Tipo de cambio	Frecuencia
EXÓN 7	g. 16356 c. 1460 p. 332	T>C	F332F	heterocigoto	C	5/70
EXÓN 8	g. 18323 c. 1694 p. 410	C>T	L410L	heterocigoto	C	6/70
EXÓN 10	g. 18787 c. 1852 p. 463	A>G	R463Q	heterocigoto	NC	1/70
EXÓN 10	g. 18819 c. 1884 p. 474	A>C	A474A	heterocigoto	C	1/70
INTRÓN 10	g. 18878	T>C	-	heterocigoto	-	1/70
				homocigoto	-	2/70
EXÓN 15	g. 21431 c. 2510 p. 682	T>C	A682A	heterocigoto	C	1/70
EXÓN 17	g. 22395 c. 2618 p. 719	A>G	A719T	heterocigoto	C	6/70

En el estudio por secuenciación directa de este gen se detectó la presencia en el exón 10 de un paciente con GEFS esporádica el cambio de una guanina por una adenina que provocaba el cambio aminoacídico **R463Q** en heterocigosis. En este caso se producía la sustitución de la arginina, un aminoácido básico, por la glutamina, un aminoácido neutro y polar (Figura 4.7.A).



**Figura 4.7. Análisis del cambio R463Q en el gen ITGA3.** A: Electroferograma normal y mutado del cambio L245P. C: Relación de individuos estudiados con y sin mutación. B. Estructura de la integrina  $\alpha$  donde aparece representado el cambio aminoacídico R463Q. WT= forma salvaje, TM= transmembrana, INTA= dominio alfa-integrina.



Según la matriz BLOSUM62 este cambio tiene un valor de 1, es decir, que no parece tener muchas probabilidades de ser patogénico. La matriz de Kumar y Miller nos indicó que el cambio no ocurre frecuentemente y que no se suele detectar en pacientes. La introducción de la variación en el programa PolyPhen ha indicado que se trata de un cambio probablemente patogénico (score= 1.000, sensibilidad = 0.00, especificidad = 1.00).

Al tratarse de un caso esporádico no se pudo realizar el estudio de cosegregación. El cambio se localiza en el séptimo dominio  $\alpha$ -integrina de la región extracelular de la proteína, que se incluye dentro de la región que se va a plegar dando lugar a una estructura en  $\beta$ -propeller (Figura 4.7.B). El estudio de conservación aminoacídica entre distintas especies mostró que el aminoácido arginina de la posición 463 se encontraba altamente conservado (Figura 4.8.).



**Figura 4.8. Estudio de conservación evolutiva de parte de la secuencia aminoacídica donde se encuentra el cambio L245P en ITGA3.** En el estudio se han incluido 4 especies: *Homo sapiens* (humano), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Mus musculus* (ratón), *Monodelphis domestica* (marsupial) y *Danio rerio* (pez cebra). Para su realización se ha utilizado el programa ClustalW2.

Por otra parte, en el exón 17 se detectó el cambio de una alanina por una treonina. Al tratarse de un cambio conservativo que observamos tanto en el grupo de pacientes como en el de controles fue descartado como causa de la patología.

#### 4.1.2.2. Cambios nucleotídicos en *FN1*

En la Tabla 4.6. están recogidas las variaciones nucleotídicas que se detectaron mediante la secuenciación del gen *FN1*, así como los cambios aminoacídicos generados por estas variaciones en algunos exones.

**Tabla 4.6. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *FN1*.**  
C= cambio aminoacídico conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Homocigoto o heterocigoto	Tipo de cambio	Frecuencia
EXÓN 3	g.2708 c.748 p.126	T>C	I126I	heterocigoto	C	5/20
EXÓN 17	g.27885 c.2812 p.815	A>T	P815P	heterocigoto	C	4/20
INTRÓN 17	g.27973	G>C	-	heterocigoto	-	6/20
				homocigoto		2/20
EXÓN 20	g.31538 c.3481 p.1017	C>A	G1017G	heterocigoto	C	7/20
				homocigoto		2/20
EXÓN 20	g.31583 c.3526 p.1052	C>A	P1052P	heterocigoto	C	7/20
				homocigoto		2/20
INTRÓN 20	g.31697	A>G	-	heterocigoto	-	7/20
				homocigoto		2/20
INTRÓN 26	g.44448	C>G	-	heterocigoto	-	2/20
EXÓN 29	g.51205 c.5095 p.1574	G>A	E1574E	heterocigoto	C	1/20
INTRÓN 43	g.68236	A>G	-	heterocigoto	-	2/20
				homocigoto		2/20
INTRÓN 44	g.70576	G>C	-	heterocigoto	-	3/20
EXÓN 45	g.71160 c.7531 p.2387	C>T	Y2387Y	heterocigoto	C	5/20
				homocigoto		1/20

El estudio de este gen no reveló la presencia de ningún cambio proteico que pueda ser origen de la GEFS-AD.

#### 4.1.2.3. Cambios nucleotídicos en *NEPH1*

En la Tabla 4.7. están recogidas las variaciones nucleotídicas que se detectaron mediante la secuenciación del gen *NEPH1*, así como los cambios aminoacídicos generados por estas variaciones en algunos exones.

**Tabla 4.7. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *NEPH1*.**  
C= cambio aminoacídico conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Homocigoto o heterocigoto	Tipo de cambio	Frecuencia
EXÓN 3	g.94572	G>C	P86P	Heterocigoto	C	8/70
	c.849 p.86			Homocigoto		2/70
INTRÓN 3	g.94629	C>A	-	Heterocigoto	-	16/70
				Homocigoto		2/70
INTRÓN 4	g.95047	C>A	-	Heterocigoto	-	18/70
				Homocigoto		2/70
EXÓN 12	g. 101372 c. 1902 p. 437	A>C	P437P	Heterocigoto	C	2/70
3'UTR	g. 101867	A>G	-	homocigoto	-	2/70

El estudio de este gen *NEPH1* no reveló la presencia de ningún cambio proteico que pueda ser origen de la GEFS-AD.

## 4.2. Fenotipo

### Estudio del fenotipo de nuestra cohorte de familias con GEFS-AD

En la Tabla 4.8. se recogen las principales características clínicas de los miembros afectados de las cinco familias (I-V) que han sido diagnosticadas con GEFS-AD y que alguno de sus miembros son controlados en nuestro hospital.

**Tabla 4.8. Fenotipo de los pacientes diagnosticados con GEFS-AD.** HA= hipertensión arterial, PT= post-trasplante, IRT= insuficiencia renal terminal.

Paciente	Edad de diagnóstico	Proteinuria máxima (g/l)	Microhematuria	HA	IRT (edad)	Recurrencia PT
I-1	32	3	No	No	32	No
I-2	19	5	No	No	25	No
II-1	26	4	No	No	26	-
II-2	21	6	No	No	22	No
II-3	28	8	No	No	35	No
III-1	-	-	-	-	54	-
III-2	26	4	-	-	26	No
III-3	34	3	Sí	34	37	No
III-4	32	7	No	31	42	No
III-5	38	0.36	No	No	-	-
III-6	33	4	No	33	No	-
III-7	19	5	No	-	No	-
III-8	19	1.1	Sí	No	-	-
IV-1	37	-	-	-	37	No
IV-2	28	3	No	No	No	-
IV-3	27	3	Sí	No	29	-
V-1	40	3	Sí	40	45	No
V-2	18	-	Sí	18	No	-



En la Tabla 4.9. se describen los principales datos fenotípicos de la familia II de nuestra cohorte en la que se localizó una mutación en el gen *INF2*.

**Tabla 4.9. Fenotipo de los pacientes afectados de la familia CHUS\_GEFS-II con la mutación L245P en el gen *INF2*. ND: dato no disponible, ITR: insuficiencia renal terminal, PT: post-trasplante.**

Paciente	II:3	III:2	III:3
Edad de diagnóstico (años)	26	22	28
Proteinuria máxima (g/l)	ND	7	7.8
Microhematuria	ND	Sí	No
Hipertensión arterial	ND	Sí (21 años)	Sí (28 años)
Respuesta a esteroides	No tratado	No tratado	Resistente
Respuesta a ciclosporina	No tratado	No tratado	No respuesta
Edad de IRT (años)	26	22	35
Trasplante renal	No	Sí	Sí
Recurrencia PT	-	No tras 13 años	No tras 5 años

El análisis de los datos revela que la edad mínima de diagnóstico fue de 18 años (paciente V-2), mientras que la máxima, perteneciente al otro miembro afecto de la misma familia, fue de 40 años (paciente V-1). Esta es la familia en la que se observa una mayor diferencia de tiempo en la presentación de la enfermedad entre unos y otros afectados (22 años). De forma similar podemos ver que en las otras familias también existe gran variedad en cuanto a la edad de presentación de la enfermedad. En la familia I la media de edad de presentación es de 25.5 años (19-32 años), en la II es de 25

años (21-28 años), en la III es de 28.7 años (19-38 años), en la IV es de 30.6 años (27-30 años) y en la V es de 29 años (18-40 años).

En cuanto a los valores de proteinuria máxima alcanzada, todos, excepto los individuos III-5 y III-8, alcanzan una proteinuria en rango nefrótico, es decir, superior a 3 g/l.

La presencia de microhematuria e hipertensión arterial no es un rasgo común en todos los pacientes, incluso dentro de los miembros de la misma familia existen unos que la presentan y otros que no.

La edad a la que se alcanza la IRT también es variable. En el caso de nuestra cohorte se dan tres tipos de casos:

- Presencia de IRT en el momento del diagnóstico: pacientes I-1, II-2, III-2 y IV-1.
- Aparición de IRT tras un corto período de tiempo después del diagnóstico (1-3 años): pacientes II-2, III-3 y IV-3.
- Aparición de la IRT tras 5-10 años después del diagnóstico: pacientes I-2, II-3, III-4 y V-1.

Si analizamos en conjunto los datos de las 5 familias vemos que la media de aparición de la IRT tras el diagnóstico es de 3.1 años. Por último destacar que no se ha observado recurrencia post-trasplante en ninguno de los pacientes de la cohorte diagnosticados con GEFS-AD.

---

## **V. DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

Hasta la fecha el conocimiento sobre la etiología y el desarrollo de la Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria de herencia Autosómica Dominante sigue siendo reducido. Este hecho, sin embargo, no significa que no se tenga una mayor noción de esta patología, sino todo lo contrario. En los últimos 20 años el desarrollo de nuevas metodologías y la mejora de las ya existentes han permitido aclarar múltiples ideas sobre la GEFS. Una de ellas, y quizás la más importante para establecer un punto de partida claro, ha sido la descripción de la GEFS como un patrón histológico que se observa en enfermedades de distinto origen.

A partir de aquí, y en el campo de las formas familiares, dentro de la GEFS se han separado las formas sindrómicas de las no sindrómicas (afectación exclusivamente renal). Dentro de estas últimas se encuentra la GEFS de herencia Autosómica Dominante, la cual ha sido el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

Son tres los genes que se conocen hasta el momento como responsables de la GEFS-AD (*ACTN4*, *TRPC6* e *INF2*), pero éstos solo explican en torno al 20% de los casos descritos de esta patología (37 familias). Esto implica, sin duda, la existencia de uno o más genes cuya mutación desencadena la aparición de la enfermedad. En estas familias se conoce el gen y la mutación, pero todavía no se tiene una idea clara del efecto del cambio en la funcionalidad de la proteína.

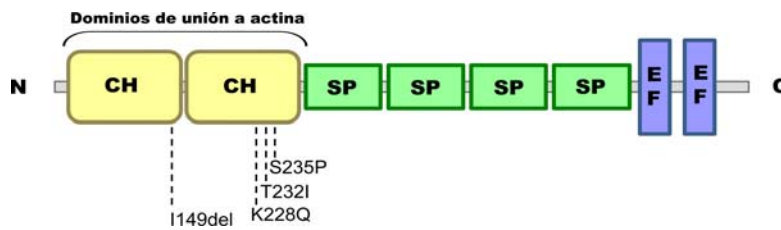
En este estudio se ha intentado establecer si alguno de los genes responsables de la GEFS-AD conocidos hasta el momento (*ACTN4*, *TRPC6*, *INF2*) era la causa de la enfermedad en nuestra cohorte. No se ha detectado ningún cambio patogénico ni en *ACTN4* ni en *TRPC6* que puedan ser responsables de la patología en ninguna de las familias del estudio. Por el

contrario, se ha visto que la secuencia del gen *INF2* mostraba en los pacientes afectos de la familia II una sustitución nucleotídica en el exón 6 de una T por una C. Dicho cambio daba lugar al reemplazo en la posición 245 de la proteína de una leucina por una prolina. La elevada variabilidad estructural entre ambos aminoácidos provoca que sea un cambio altamente patogénico. La introducción de una prolina en esta posición, situada en una hélice  $\alpha$ , provoca que la estructura de este dominio sufra en este punto una torsión de  $30^\circ$  y se altere la estabilidad de la proteína<sup>121,122</sup>.

Además se ha realizado una búsqueda de nuevos posibles genes candidatos responsables de la GEFS-AD. Teniendo en cuenta una serie de criterios, ya citados anteriormente, se han seleccionado tres genes para su estudio, *NEPH1*, *ITGA3* y *FN1*. El análisis por secuenciación directa no ha revelado la presencia de ningún cambio al que se le pueda atribuir el origen de la enfermedad en el caso de *NEPH1* y *FN1*. En *ITGA3* se ha localizado un cambio, R463Q, en un individuo con GEFS esporádica que tiene posibilidades de ser patogénico.

### **5.1. *ACTN4* como gen responsable de la GEFS-AD**

En el caso de la  $\alpha$ -actinina 4 se ha visto que los cambios patogénicos descritos (I149del, K228E, T232I, S235P) provocan un aumento de la afinidad de la actinina por los filamentos de actina. Las 4 mutaciones que se han descrito hasta ahora afectan a residuos aminoacídicos de los dominios CH de la actinina, los cuales son responsables de la unión entre estas dos proteínas (Figura 5.1). A la vista de estos hechos se puede pensar que mutaciones en estos dominios de unión a actina provocan algún tipo de alteración estructural que varía el patrón de afinidad normal entre actina y  $\alpha$ -actinina 4<sup>60,123</sup>.



**Figura 5.1. Estructura de la proteína  $\alpha$ -actinina 4 con las mutaciones responsables de GEFS-AD.** CH: dominio homólogo a calponina, SP: dominio espectrina, EF: motivo de unión a calcio.

Pero como sabemos, esta actinina no solo establece interacciones con los filamentos de actina, sino que también se une a otras proteínas (nefrina,  $\beta$ 1-integrina, etc). Conociendo este dato nos surgen ciertas preguntas, ¿se producen alteraciones de la conexión entre la  $\alpha$ -actinina 4 y estas otras proteínas?, y si es así, ¿cuál es el efecto que causa en la generación de la GEFS-AD?

Respuestas a estas preguntas se han intentado buscar en la realización de estudios *in vitro* y en modelos murinos de los efectos de mutaciones en la  $\alpha$ -actinina 4 tanto en homocigosis como en heterocigosis.

Los primeros estudios se realizaron en ratones que presentan una mutación en heterocigosis de esta proteína con expresión específica en el podocito y que causa un aumento de la afinidad de la actinina por la actina. Dicha mutación genera, en algunos de ellos, un fenotipo similar al de humanos con mutaciones en *ACTN4*. Este estudio desveló un dato muy importante, que los ratones que presentaban la mutación y desarrollaban proteinuria mostraban una reducción de en torno al 70% en la expresión de la nefrina. Este resultado es consistente con el hecho de que se observe una fusión de procesos podocíticos. Este estudio fue el primero en establecer una relación entre la alteración del citoesqueleto de actina y la alteración de la estructura del diafragma de filtración<sup>124</sup>.

En el caso de ratones que carecen de la expresión de  $\alpha$ -actinina 4 (*Actn4*<sup>-/-</sup>) se ha visto que una proporción significativa no supera el período perinatal aunque se desconoce la causa ya que el análisis histológico de embriones y neonatos no muestra ningún tipo de anormalidad. Los que superan el período perinatal desarrollan alteraciones glomerulares con una progresiva pérdida de la morfología podocítica, proteinuria y fallo renal eventual. Los ratones heterocigotos no muestran ninguna evidencia de enfermedad renal al cabo de seis meses. Al contrario que ocurría en el caso anterior, en estos ratones no se observa una disminución significativa de la expresión de nefrina ni de podocina. Según estos resultados parece que la ausencia de expresión de *Actn4* provoca daños podocíticos y GEFS porque causa cambios en el citoesqueleto y no por graves defectos en la estructura del diafragma de filtración. En estos ratones las anormalidades celulares no solo se limitaban al riñón sino que también se encontraban afectados los linfocitos, que mostraban un aumento de la quimiotaxis y de la quimiocinesis.<sup>125</sup> En este caso la ausencia de  $\alpha$ -actinina 4 parece tener un doble efecto, por una parte parece que aumenta la fluidez del citoesqueleto provocando la alteración de la motilidad celular (lo que provocaría en efecto que se ve en los linfocitos) y por otra parte genera cambios en la adhesión celular, ya que provoca cambios en la unión entre podocitos y en la unión de los podocitos a la membrana glomerular basal.

El estudio de tres de las mutaciones de *ACTN4* asociadas a la enfermedad (K228E, T232I, S235P) en una línea celular de podocitos inmortalizados mostraron una alteración en la localización de la  $\alpha$ -actinina 4 mutada, ya que esta se distribuía formando agregados citoplasmáticos.

El desarrollo de ratones heterocigotos y homocigotos para una de las mutaciones asociadas a la enfermedad en humanos, la mutación K228E, mostró que los ratones *Actn4*<sup>K228E/K228E</sup> presentaban niveles normales de expresión del ARN mensajero de *Actn4*, pero por el contrario se observaba



una reducción de un 90% de la expresión de la proteína. En el caso de los heterocigotos *Actn4*<sup>K228E/+</sup> también se observaba una reducción de expresión proteica de en torno a un 50 %. Así mismo en el análisis de expresión de  $\alpha$ -actinina 4 en linfocitos de un paciente con la mutación K228E en heterocigosis se veía que ocurría lo mismo que en los ratones *Actn4*<sup>K228E/+</sup>, es decir, se reducía la expresión de la proteína.

En el estudio histológico de los riñones de estos ratones se vio que los homocigotos para la mutación K228E (*Actn4*<sup>K228E/K228E</sup>) presentaban anomalías en la estructura de los podocitos y pérdida de la localización de la  $\alpha$ -actinina 4 que se distribuye formando agregados citoplasmáticos.

Además se vio que la pérdida de proteínas era significativamente mayor en los ratones homocigotos para el alelo nulo y para la mutación K228E (*Actn4*<sup>-/-</sup> *Actn4*<sup>K228E/K228E</sup>) que para la forma salvaje, y las formas heterocigotas para el alelo nulo y la mutación K228E (*Actn4*<sup>+/+</sup>, *Actn4*<sup>K228E/+</sup>, *Actn4*<sup>+/-</sup>).

Como se ha visto hasta ahora parece que solo los ratones con una mutación en homocigosis en *Actn4* (*Actn4*<sup>-/-</sup> *Actn4*<sup>K228E/K228E</sup>) presentan un fenotipo glomerular, mientras que las formas heterocigotas (*Actn4*<sup>K228E/+</sup>, *Actn4*<sup>+/-</sup>) no muestran ningún rasgo fenotípico de patología renal. Se cree que mutaciones en la  $\alpha$ -actinina 4 provocan una reducción de la actividad normal de la proteína y provoca la formación de agregados proteicos tóxicos. Mientras que la enfermedad observada en los ratones homocigotos *Actn4*<sup>K228E/K228E</sup> refleja principalmente la pérdida de función resultante de la rápida degradación de la  $\alpha$ -actinina 4, los humanos heterocigotos muestran un lento desarrollo del daño podocítico debido a los efectos de la agregación de la proteína.

En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* con un modelo de ratón *knockin* que lleva una mutación en la región de unión a actina en la  $\alpha$ -

actinina 4 (K255E), cercana a una mutación en ACTN4 que causa la enfermedad en humanos, se ha visto que los podocitos de los ratones homocigotos para la mutación (*Actn4*<sup>K255E/K255E</sup>) presentan grandes agregados citoplasmáticos que están asociados con la alteración del citoesqueleto de la actina. La mutación K255E provoca un marcado aumento de la afinidad de unión de la actinina a la actina filamentosa. Esto genera que la localización de la actinina en la célula sea anormal y que el citoesqueleto de actina esté alterado. El aumento de afinidad podría ser debido a un cambio en la estructura conformacional de los lugares de unión a actina que provoca que aumente la unión con la forma mutada pero que no varíe la afinidad con la forma WT<sup>126</sup>.

Los resultados aportados por estos experimentos proporcionan evidencias de que la agregación de la actinina con la actina filamentosa es el resultado del aumento de afinidad entre estas dos proteínas. El cambio generado por la mutación también produce un aumento de la resistencia de la actinina a ser regulada por el Ca<sup>+2</sup>. La falta de sensibilidad al Ca<sup>+2</sup> podría ser debida a una incapacidad de unión a este ion o a un cambio en la conformación de la estructura de la proteína que provoca que el calcio no pueda ejercer su efecto. Al igual que ocurre con esta mutación situada en el dominio de unión a actina, el mismo efecto puede ser generado por el resto de mutaciones descritas que se sitúan en esta región.

En estos estudios también se localizaron en los agregados citoplasmáticos otras proteínas de unión a la actina, muchas de ellas proteínas que se desconocía que interaccionaban también con la  $\alpha$ -actinina 4 (sinaptopodina y cortactina) y muy importantes en los podocitos. Puede ser que una alteración en la localización de estas proteínas contribuya al fenotipo, ya que pueden generar la alteración de rutas de señalización importantes para la reorganización y ensamblaje de la actina.

Se cree que el fenotipo observado en ratones *Actn4*<sup>K255E/K255E</sup>, que es similar al visto en los ratones *Actn4*<sup>-/-</sup>, podría ser el resultado de una disminución de la adhesión de los podocitos debido a la ausencia de la actinina en las adhesiones focales. Parece que al igual que lo que se ha visto en ratones, las mutaciones en heterocigosis en humanos provocan un aumento de afinidad que provoca la formación de agregados y con ello la alteración de la organización estructural del citoesqueleto de actina de los podocitos, resultando en un fenotipo de ganancia de función de aparición más tardía en la vida<sup>127</sup>.

Estudios realizados en podocitos en cultivo generados a partir de ratones *Actn4*<sup>-/-</sup> que carecen de expresión de  $\alpha$ -actinina 4 muestran una menor capacidad de adherencia. La alteración en la capacidad de adhesión parece estar mediada por las integrinas, ya que en los podocitos carentes de *Actn4* se debilitan las interacciones entre el citoesqueleto y las integrinas al alterarse la fosforilación del dominio citoplasmático de la integrina- $\beta$ 1. Este hecho facilita la pérdida de podocitos y puede causar GEFS<sup>128</sup>.

Se sabe que los fosfoinosítidos regulan la afinidad de la  $\alpha$ -actinina por la actina filamentosa. Mutaciones que afecten a los lugares de unión de fosfoinosítidos, que generan disociación entre la actina y la actinina, podrían generar un aumento de afinidad de unión por los mismos que podría provocar la acentuación de la unión entre la  $\alpha$ -actinina 4 y la actina<sup>129</sup>.

Por otra parte, estudios *in vitro* han mostrado que la degradación de la  $\alpha$ -actinina 4 mutada es más rápida en comparación con la  $\alpha$ -actinina 4 normal. Este hecho sin duda también es determinante para el progreso de la GEFS<sup>130</sup>.

Los experimentos realizados hasta el momento muestran que el mutante de la  $\alpha$ -actinina 4 se une a los filamentos de actina de una forma más fuerte que la no mutada. El hallazgo de que las formas mutadas de  $\alpha$ -

actinina 4 que presentan agregados posean una disminución de la vida media sugiere dos posibles modelos para explicar la enfermedad en humanos y simultáneamente en ratones. El primero sería que el desarrollo del daño podocítico podría ser un efecto directo de la agregación de proteínas y de los efectos tóxicos de dicha agregación. La segunda sería que la enfermedad podría ser una enfermedad de pérdida de función. Ambos modelos no se consideran excluyentes, de hecho se cree que ambos mecanismos están implicados en el desarrollo de la enfermedad

Al contrario de lo que ocurre en humanos los ratones con mutaciones en heterocigosis para la *ACTN4* no presentan signos de la enfermedad. Esto podría ser debido a la combinación de la disminución de la expresión de la proteína y a la formación de agregados de la forma mutada que finalmente podrían resultar tóxicos. Se sugiere que la menor longitud de vida de los ratones comparada con la de humanos podría ser la principal explicación para esta diferencia. No todos los humanos portadores de la mutación desarrollan la patología

La enfermedad tanto en ratones como en humanos heterocigotos puede que requiera una segunda mutación o una alteración añadida del tipo de una elevada presión sanguínea, exposición a toxinas renales o enfermedad vascular. En humanos el hecho de la acumulación progresiva de agregados en los podocitos diferenciados los convierte en más susceptibles para sufrir otra mutación. En el caso de los ratones, en los podocitos no solo expresa  $\alpha$ -actinina 4 en el riñón sino que también presentan  $\alpha$ -actinina 1; esto puede ayudar a estabilizar al mutante o producir una mayor redundancia, dándole al glomérulo mayor protección frente a perturbaciones<sup>131</sup>.

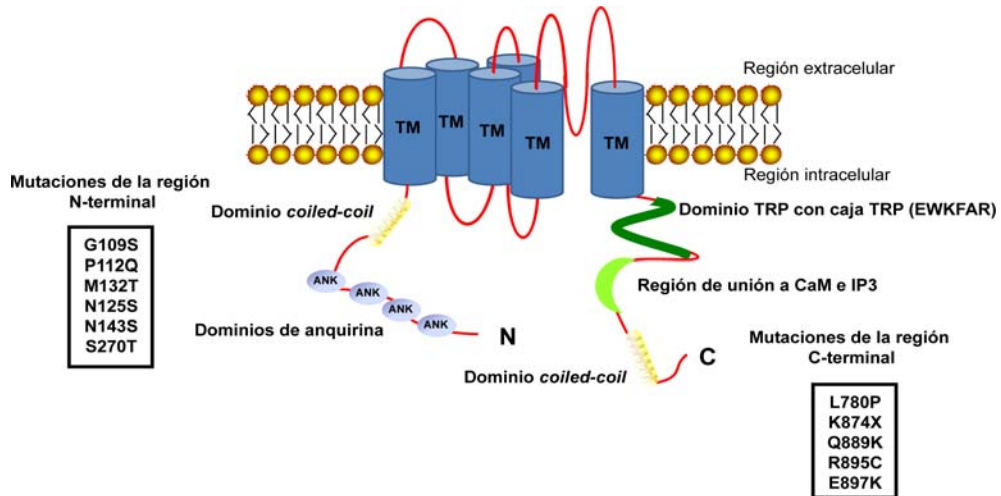
Los resultados de los estudios realizados hasta el momento muestran que las mutaciones en *ACTN4* que causan GEFS en humanos son del tipo de las que generan una ganancia de función de la proteína, es decir, aumentan la afinidad de unión entre la actinina y los filamentos de actina. Este hecho

provoca que se tiendan a formar agregados de actina y actinina citoplasmáticos. Estos agregados generan que la  $\alpha$ -actinina 4 pierda su localización normal dentro del podocito lo que provoca que no pueda generar sus funciones habituales, es decir, las mutaciones provocan una pérdida de la función normal de la proteína. Éste parece ser el origen del desarrollo de la GEFS-AD en pacientes con mutaciones en *ACTN4*.

## **5.2. *TRPC6* como gen responsable de la GEFS-AD**

El gen *TRPC6* se ha asociado con 11 casos de GEFS-AD familiar, siendo una mutación distinta responsable de cada uno de ellos (G109S, P112Q, N125S, M132T, N134S, S270T, L780P, K874Stop, Q889K, R895C, E897K). Estudios *in vitro* muestran que algunas de estas mutaciones provocan un aumento en la amplitud de la corriente de  $\text{Ca}^{+2}$ , es decir, son mutaciones que provocan una ganancia de función de la proteína<sup>64,65,132-134</sup>.

Todas las mutaciones descritas hasta el momento en este gen se localizan en las regiones intracitoplasmáticas del canal y muchas se sitúan en los distintos dominios que componen dichas regiones. Cinco de las mutaciones descritas se sitúan en los dos primeros dominios de ANK situados en el extremo N-terminal de la proteína, los cuales están implicados en la formación de tetrámeros homoméricos o heteroméricos de *TRPC6*<sup>70</sup>. Estas mutaciones podrían provocar alteraciones en la interacción de las distintas subunidades *TRPC* o que el canal no se ensamblase correctamente en la membrana plasmática afectando de este modo a la funcionalidad del canal. Alteraciones en *TRPC6* pueden conducir a la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  lo que puede generar la aparición de enfermedades como la GEFS (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Estructura del canal TRPC6 con las mutaciones responsables de GEFS-AD. ANK: dominio de anquirina, TM: dominio transmembrana.

Los canales TRPC6 se activan directamente por medio de la acción del segundo mensajero DAG, el cual es generado a partir de  $\text{PIP}_2$  por las enzimas PLC. La entrada de calcio por el canal se produce cuando alguna señal provoca la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de almacenes intracelulares del retículo endoplasmático (RE). Los canales TRPC6 están sujetos a una compleja regulación por medio del  $\text{Ca}^{+2}$  a ambos lados de la membrana plasmática por medio de la actuación de mecanismos dependientes e independientes de calmodulina. Estos canales también están regulados mediante la fosforilación llevada a cabo por serina-treonina quinasas como PKC (que parece contribuir a la inactivación del canal) o PKG (proteína quinasa dependiente de GMPc). Fyn, un miembro de la familia de proteínas tirosina quinasas Src por el contrario aumenta la actividad del canal al igual que la CaM-quinasa II (quinasa dependiente de calmodulina II).<sup>73,135-137.</sup>

TRPC6 funciona como un integrador de múltiples señales (como pueden ser factores de crecimiento) que provocan la activación de PLC. Ésta

cataliza la hidrólisis de  $\text{PIP}_2$  para dar lugar al DAG e  $\text{IP}_3$ . El DAG está implicado en la activación de los canales TRPC y el  $\text{IP}_3$  se une a su receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y provoca la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de los almacenes intracelulares. El subgrupo de canales TRPC3, 6 y 7 están directamente activados por DAG, cuya acción es independiente de PKC y está mediada por el dominio N-terminal de TRPC6<sup>138</sup>.

La disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  del interior del RE de algún modo provoca la entrada de calcio a través de la membrana plasmática celular<sup>139</sup>.

La actividad de TRPC6 también está sujeta a la regulación por calmodulina y por  $\text{PIP}_3$  (fosfoinosítido 3,4,5 trifosfato), los cuales se unen directamente al canal. En el extremo C-terminal se encuentran lugares de unión para ambas moléculas que están superpuestos y se ha visto que la asociación a TRPC6 de  $\text{PIP}_3$  interfiere en la unión de calmodulina al canal. Las mutaciones en TRPC6 aumentan o disminuyen la capacidad de interferencia del fosfoinosítido en la unión de la CaM.

La activación de TRPC6 tiene lugar por medio de una ruta que estimula la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Un aumento en la actividad de este enzima podría aumentar la corriente de TRPC6 debido a una liberación mediada por  $\text{PIP}_3$  del inhibidor  $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$  desde el canal. Un aumento en la unión de  $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$  podría aumentar la actividad de la PLC y la entrada de calcio mediada por TRPC6. La regulación por CaM parece que aumenta la fosforilación por medio de la CaM-quinasa II<sup>140</sup>.

Se han descrito varios eventos de señalización aguas abajo de TRPC6 como son la activación de Rho y la reorganización del citoesqueleto de actina, la activación de dos factores de transcripción dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$ , NFAT (Factor nuclear de activación de células T) y la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc (CREB). Las proteínas que provocan un aumento de

la corriente en TRPC6 estimulan la transcripción mediada por NFAT. La introducción de mutaciones en el poro que impidan la actividad del canal también provocan el bloqueo de NFAT. La calcineurina es un intermediario crítico entre TRPC6 y la transcripción mediada por NFAT. Células que expresan los canales TRPC6 con las mutaciones P112Q, R895C o E897K se ha visto que posee un aumento de la concentración de calcio intracelular y aumentan la transcripción mediada por calcineurina-NFAT. El aumento de esta ruta de señalización podría estar implicado en la generación de la GEFS<sup>141</sup>.

Uno de los mecanismos para la regulación de la actividad de los canales TRPC6 es su inserción en la membrana plasmática. TRPC6 es translocado a la membrana tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G o receptores tirosina-quinasa. La fosforilación de los canales por PKC, PKG o tirosinas de la familia Src también causan su inserción en la membrana. El transporte de TRPC6 se ha visto que está controlado por la interacción con PLC- $\gamma$ 1 dependiente de la fosforilación de tirosinas generada por una variedad de estímulos. La nefrina se une directamente a TRPC6 e inhibe la interacción TRPC6- PLC- $\gamma$ 1, lo que conduce a la supresión de la expresión del canal en la superficie celular. La alteración de este proceso podría también estar implicada en la generación de GEFS; las mutaciones causantes de GEFS podrían reducir la interacción entre la nefrina y TRPC6 aumentando la expresión en membrana de estos canales y por lo tanto las corrientes de  $\text{Ca}^{+2}$  <sup>142</sup>.

Recientemente se ha demostrado que el AMPc activa el flujo y la corriente de calcio por medio de TRPC6, y que esta acción está mediada por la ruta de señalización PI3K-PKB-MEK-ERK1/2. Se ha visto también que este mecanismo juega un papel clave en la proliferación inducida por glucagón de las células mesangiales renales lo que genera un daño glomerular<sup>143</sup>.



En estudios de enfermedades glomerulares adquiridas se han detectado niveles elevados de expresión de canales TRPC6. En cultivos de podocitos se ha visto que esto provoca una reorganización del citoesqueleto de actina de los podocitos y una alteración en la regulación del  $\text{Ca}^{+2}$ , en este artículo se muestra que estos canales también presentan un papel importante en enfermedades glomerulares de origen no genético<sup>144</sup>. La mutación P112Q provoca un aumento en la expresión de canales TRPC6 en la superficie celular<sup>145</sup>. En modelos de ratón se ha visto que el aumento de expresión de canales TRPC6 no mutados exclusivamente en podocitos es suficiente para generar un fenotipo patológico<sup>146</sup>.

Todas las mutaciones en TRPC6 asociadas hasta la fecha con la GEFS se localizan en los dominios N-terminal o C-terminal intracelulares, y la mayoría están asociadas con un aumento de la actividad del canal en comparación con las formas no mutadas. Esto incluye 6 mutaciones que se localizan dentro o en las proximidades de los dominios de anquirina (G109S, P112Q, N125S, M132T, N134S y S270T). Estas mutaciones podrían alterar la habilidad del canal para oligomerizarse con otras subunidades de TRPC6 o alterar la localización o el nivel de expresión de TRPC6 en la superficie celular. Las mutaciones N-terminales también pueden afectar a las propiedades de apertura de TRPC6, como se ha visto en el caso de N143S y S270T, que aumentan significativamente el tiempo de apertura del canal comparada con la forma WT. La mutación N-terminal que causa un mayor efecto en la función del canal es M132T situada en el segundo dominio de anquirina.

En el extremo C-terminal de TRPC6, la mutación L780P se localiza cerca del dominio TRP, mientras que las otras cuatro (K874Stop, Q889K, R895C y E897K) se localizan hacia la región del dominio *coiled-coil*. La región C-terminal también es importante para el proceso de oligomerización

por lo que las mutaciones de esta región pueden provocar los mismos efectos que las de la región N-terminal<sup>147</sup>.

Como en los podocitos también hay expresión de otros canales TRPC, un debut tardío de la enfermedad podría ser causa de la compensación de la función de TRPC6 por parte de estos canales<sup>148</sup>.

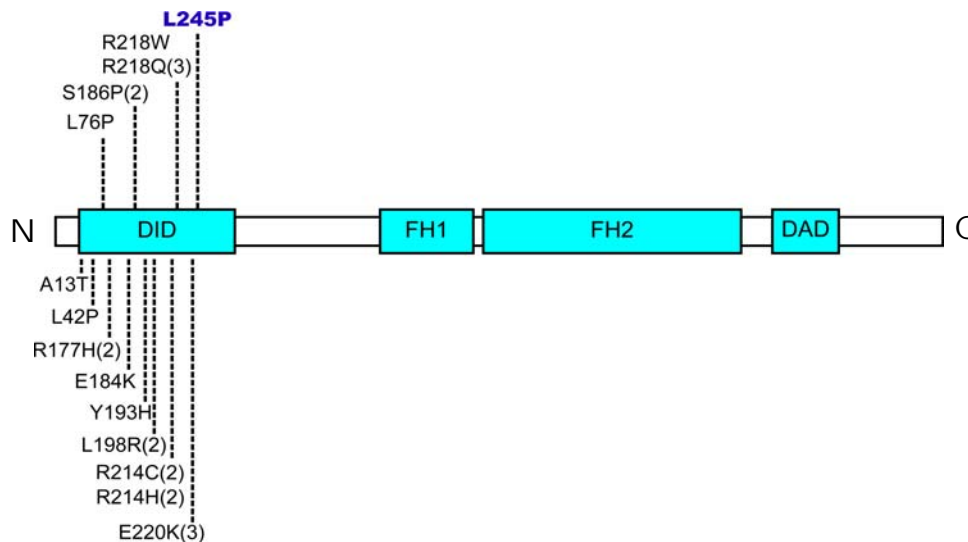
La podocina también se une y regula el canal TRPC6. Mutaciones en el canal pueden alterar esta interacción y generar enfermedades renales<sup>28</sup>.

### **5.3. *INF2* como gen responsable de la GEFS-AD**

*INF2* es, hasta la fecha, el gen responsable de un mayor número de casos de GEFS-AD, en concreto se le atribuye el origen de la enfermedad en 22 familias. En este gen, codificante para la formina invertida 2, se han descrito 14 mutaciones distintas (A13T, L42P, L76P, R177H, E184K, S186P, Y193H, L198R, R214H, R214C, R218Q, R218W, E220K, L245P). De los tres genes sólo en el caso de *INF2* se ha visto que una misma mutación esté presente en más de una familia, así tenemos las mutaciones R177H, S186P, L198R, R214H, R214C y R218W cada una de las cuales está presente en dos familias no relacionadas y la mutación E220K que está presente en tres familias no relacionadas (Figura 5.3.)<sup>80,149,150</sup>.

La lentitud del proceso de nucleación espontánea de los monómeros de actina provoca que sean necesarios factores para acelerar el proceso. Entre estos factores se encuentran las forminas como *INF2*. Al igual que otras proteínas de la familia *INF2* interviene en la polimerización y despolimerización de la actina. Se ha visto que la capacidad de despolimerización de la actina de esta formina reside en la región C-terminal (en el dominio FH2 y el dominio DAD). Esta actividad está regulada por la interacción autoinhibitoria entre los dominios DID y DAD. Cuando estos

dominios interaccionan se inhibe la capacidad de despolimerización de INF2 pero no se ve afectada la actividad de polimerización.



**Figura 5.3. Representación gráfica de los cambios descritos en la proteína INF2.** En la imagen se muestra la estructura de la proteína INF2 con las distintas mutaciones descritas hasta el momento, incluida la mutación L245P descrita por primera vez en este trabajo. Todas las mutaciones se sitúan dentro del dominio proteico DID. *DID= diaphanous inhibitory domain, FH1: dominio homólogo a formina 1, FH2: dominio homólogo a formina 2, DAD: diaphanous autoregulatory domain.*

Distintos estudios han permitido ver que INF2 se localiza predominantemente en el RE y que mutaciones que anulan la interacción DID-DAD de INF2 provocan un colapso del retículo debido a una acumulación de filamentos de actina<sup>89</sup>.

Recientemente se ha visto que Cdc42 unido a GTP se une al dominio DID de INF2 y modula la actividad de esta formina. Además se ha descubierto que forminas de la familia mDIA interaccionan con INF2. La interacción del dominio DID de INF2 con el dominio DAD de mDIA actúa limitando la polimerización de la actina mediada por DIA y la transcripción

dependiente de SRF (factor de respuesta al suero) de una forma dependiente de Rho y Cdc42<sup>151</sup>.

Otro de los procesos en los que interviene INF2 es el de transcitosis basolateral-apical, una ruta indirecta de transporte de proteínas, es decir, las proteínas normalmente van primero a la superficie basolateral y después son transportadas en vesículas a la superficie apical. En este proceso es fundamental la actuación de la proteína integral de membrana MAL2. INF2 se une por su región C-terminal a MAL2 y por su dominio DID a Cdc42 y Rac1 (proteínas implicadas en el ensamblaje y organización del citoesqueleto de actina). Cdc42 unida a INF2 regula la dinámica de MAL2 y el proceso de transcitosis a la membrana apical. Además parece que en ensamblaje y desensamblaje de cortos filamentos de actina por esta forma facilita el movimiento de vesículas<sup>90</sup>.

INF2 no solo interacciona por su extremo C-terminal con MAL2, sino también con MAL, un componente de la maquinaria de transporte entre el aparato de Golgi y la superficie apical de células epiteliales polarizadas. MAL media una ruta especial de transporte responsable de transportar Lck (proteína tirosina quinasa específica de leucocitos) a la membrana plasmática de las células T humanas. INF2 es necesaria para la formación de las vesículas transportadoras de Lck, para una distribución subcelular normal de Lck y una correcta formación de las sinapsis inmunológicas. Además el transporte de Lck requiere de la actividad polimerizadora y despolimerizadora de actina de INF2. En este tipo de transporte también es necesaria la unión de Cdc42 y Rac1 al dominio DID de INF2<sup>152</sup>.

Como vemos las mutaciones descritas en DID podrían afectar a múltiples procesos; podrían anular la interacción entre los dominios DID/DAD provocando una desregulación del proceso de polimerización de la actina y un colapso del RE, bloquear la interacción con las forminas del grupo DIA y paralizar los procesos de transporte mediados por MAL y

MAL2. La alteración de estas funciones celulares causadas por mutaciones en DID podría ser el origen del desarrollo de la GEFS-AD.

#### **5.4. *ITGA3*, *FN1* y *NEPH1* como genes candidatos para la GEFS-AD**

Ninguno de los genes seleccionados como candidatos a responsables de la GEFS, *ITGA3*, *FN1* y *NEPH1* presentó ningún cambio al que se le pudiera asociar un carácter claramente patogénico.

El único cambio que se ha detectado, y que fue considerado como probablemente dañino por el programa PolyPhen, se encontró en el gen para la subunidad  $\alpha$  de la integrina 3 en un individuo con una forma de GEFS esporádica. Se trata de un cambio en heterocigosis no conservativo, R463Q, que solo fue detectado en dicho individuo. El estudio de conservación evolutiva mostró que era un residuo altamente conservado entre especies. El cambio se sitúa en el 7º dominio  $\alpha$ -integrina que se pliega junto con los otros seis restantes para formar una estructura  *$\beta$ -propeller*<sup>153,154</sup>.

De hecho se ha visto que este tipo de sustitución aminoacídica, arginina por glutamina, es patogénica en alguna enfermedad como la neuropatía *Charcot-Marie-Tooth* tipo 2A<sup>155</sup>. No podríamos, por lo tanto, descartar por completo que este cambio tenga alguna implicación en la GEFS.

El hecho de que en nuestra cohorte de pacientes estos genes no se pudiesen considerar como responsables de la GEFS en ninguno de los casos no los excluye como posibles genes responsables de la patología. Esto se debe a que un gen, como se ha visto en el caso de *ACTN4*, puede ser responsable de un número muy reducido de casos.

### **5.5. Correlación genotipo-fenotipo en familias con GEFS-AD**

Hasta la fecha se conocen 37 familias diagnosticadas con GEFS-AD en las que se ha encontrado el gen responsable de la patología. De los tres genes asociados a esta enfermedad, el responsable de un menor número de casos es *ACTN4*. En este gen se han identificado 4 mutaciones distintas (I149del, K228E, T232I, S235P) que generan la patología en 4 familias no relacionadas<sup>60,123</sup>. A continuación estaría *TRPC6* causante de la enfermedad en 11 familias distintas, cada una de ellas con una mutación diferente en el gen (G109S, P112Q, N125S, M132T, N134S, S270T, L780P, K874Stop, Q889K, R895C, E897K)<sup>64,65,132-134</sup>. Por último estaría *INF2*, el gen responsable de la patología en un mayor número de familias, un total de 22 familias entre las que se encuentra la familia CHUS\_GEFS-II que hemos descrito previamente en el apartado de Resultados. En este gen se han descrito 14 mutaciones distintas (A13T, L42P, L76P, R177H, E184K, S186P, Y193H, L198R, R214H, R214C, R218Q, R218W, E220K, L245P) y es el único en el que una mutación es responsable de más de un caso de GEFS-AD<sup>80,149,150</sup>.

Una característica que comparten estos tres genes es la de la penetrancia incompleta, es decir, la presencia de la mutación no asegura al 100% que se vaya a desarrollar la enfermedad.

Los rasgos fenotípicos de los miembros de las familias con mutaciones en *ACTN4* y *TRPC6* reiteran los datos que hemos extraído del análisis comparativo del fenotipo de las 22 familias con mutaciones en *INF2*, es decir, la existencia de una gran variabilidad tanto intrafamiliar como interfamiliar. Como se ha mencionado anteriormente, entre los rasgos más variables se encuentran la edad de diagnóstico (5- 72 años), la edad de IRT (14-70), o la presencia de microhematuria e hipertensión. Incluso en familias con la misma mutación se observan estas variaciones.

A pesar de esta gran variabilidad hay ciertos rasgos que son homogéneos para la GEFS-AD, mismo porcentaje de afectación en hombres y mujeres, presencia de la patología en todas las etnias o ausencia de recidiva tras el trasplante. Todos estos rasgos son independientes del gen responsable del origen de la patología.

Otro patrón común que comparten estas familias son los hallazgos histológicos en la biopsia renal: regiones esclerosadas, engrosamiento de la matriz mesangial, sinequias entre los capilares y la cápsula de Bowman, fusión de los procesos podocíticos o daño intersticial. Aunque como decimos estos rasgos son comunes, la presencia de unos u otros dependerá de la fase en la que se encuentre la enfermedad en el momento de la realización de la biopsia.

En los últimos tiempos se han realizado estudios de las biopsias de los pacientes con GEFS-AD con el objetivo de intentar establecer algún rasgo que diferencie a los pacientes en los que se conoce el gen responsable de la patología. En esta línea, Henderson *et al* realizaron un trabajo en el que estudiaron las biopsias de las 4 familias que presentan mutación en el gen de la  $\alpha$ -actinina 4. Compararon dichas biopsias con las de otros pacientes con GEFS de etiología desconocida y con pacientes con GEFS secundaria a otra patología. Este estudio reveló que los pacientes con GEFS causada por mutaciones en *ACTN4* presentaban unas características únicas en la microscopía electrónica y en la de inmunofluorescencia. Una de esas características era la presencia de agregados electrodensos en el citoplasma de los podocitos que están compuestos, al menos en parte, por actina y  $\alpha$ -actinina mutada. Se desconoce cómo se originan dichos agregados, aunque se baraja la hipótesis de que el aumento de afinidad generado por la mutación en la  $\alpha$ -actinina 4 pudiese dar lugar a que la actina unida a la actinina se fuese acumulando lentamente en el citoplasma aumentando el daño glomerular. La otra característica diferencial que se encontró fue el patrón

de tinción irregular granular de la  $\alpha$ -actinina 4 en las paredes de los capilares glomerulares observados por inmunofluorescencia. Este patrón irregular parece ser el resultado de una desorganización del citoesqueleto<sup>156</sup>.

Este patrón histológico no había sido visto hasta el momento ya que en ese trabajo mencionado se ha recurrido al uso de un anticuerpo anti- $\alpha$ -actinina 4. Este hallazgo facilita sin duda el diagnóstico de la enfermedad para los pacientes con GEFS-AD causada por *ACTN4*. Hasta el momento no se conocen estudios similares con las familias con mutaciones en *TRPC6* e *INF2*, pero la posibilidad de identificación de rasgos como estos facilitaría la realización del diagnóstico para las familias con GEFS-AD sin que fuese necesario realizar un estudio mutacional de todos los genes conocidos responsables de la enfermedad.

### **5.6. Perspectivas de futuro**

Una de las dificultades de esta patología, que se está solventando con las mejoras sanitarias, es la realización de un diagnóstico temprano, ya que en muchos casos en el momento en el que comienzan a aparecer los síntomas la enfermedad ya está muy avanzada y la función renal muy deteriorada. Incluso se han descrito casos en los que se llega a detectar la presencia de la enfermedad en un paciente porque este acude a la consulta por dolencias que nada tienen que ver con la GEFS-AD. La dificultad de un diagnóstico temprano junto con la ausencia de un tratamiento eficaz conducen al paciente a una insuficiencia renal que provoca la necesidad de diálisis y/o trasplante en un corto período de tiempo tras el diagnóstico.

Lo que en un primer momento se consideraba una enfermedad de aparición en edad adulta ha ido dejando paso al diagnóstico de casos cada vez en individuos más jóvenes; signos como la aparición de proteinuria se detectan en edades cada vez más tempranas permitiendo un seguimiento



más exhaustivo del paciente con el objetivo de ralentizar el progreso de la enfermedad. Esto puede ser debido por una parte a que la aparición de un posible caso de GEFS con etiología hereditaria en una familia conduce a un estudio de su historia familiar para poder confirmar el diagnóstico y además a realizar un estudio de otros miembros de la familia para poder diagnosticar lo más tempranamente posible la presencia de rasgos de la patología. Por otra parte, la realización de controles rutinarios desde edades tempranas también saca a la luz signos que conducen a ahondar en el estudio de su origen y poder realizar el diagnóstico.

La información que se tiene hasta el momento sobre el origen y progresión de la GEFS-AD todavía hace que queden numerosas cuestiones en el aire. Se desconoce por ejemplo porque a pesar de que las tres proteínas presentan un patrón de expresión amplio el fenotipo asociado con sus mutaciones sólo se manifiesta en el riñón; o por qué las mutaciones se distribuyen dentro de las proteínas en unas regiones muy concretas, en la  $\alpha$ -actinina 4 todas ellas se localizan en el segundo dominio CH, en el canal catiónico se sitúan en los extremos citoplasmáticos y en la formina en el dominio DID.

Futuros estudios deben perseguir la búsqueda de otros genes responsables de la patología, así como el estudio de los efectos generados por las mutaciones en los genes responsables de la GEFS-AD. Sin duda, otro de los objetivos que deben perseguir nuevos trabajos de investigación es la búsqueda de posibles dianas terapéuticas que permitan el tratamiento de la patología y eviten el desarrollo de la IRT.



---

## **VI. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. En nuestra cohorte de 5 familias diagnosticadas con Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria autosómica dominante, ni el gen *ACTN4*, que codifica para la  $\alpha$ -actinina 4, ni el gen *TRPC6*, que codifica para el receptor de potencial transitorio catiónico 6, presentaron ninguna mutación que pueda considerarse responsable de la patología.
2. En el gen *INF2* se detectó en los miembros afectados de una de las familias con Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria autosómica dominante una mutación en el exón 6 que provoca la sustitución de una leucina por una prolina en la posición 245 de la proteína codificada por dicho gen, la formina invertida 2.
3. La mutación L245P afecta a un residuo aminoacídico altamente conservado del dominio DID (*Diaphanous inhibitory domain*) de la formina invertida 2.
4. La sustitución de una leucina por una prolina produce una torsión de la estructura primaria de la proteína que afecta a su plegamiento.
5. La detección de una mutación patogénica en el exón 6 de *INF2* extiende la región de localización de mutaciones, ya que hasta el momento todas las previamente publicadas se encontraban agrupadas en los 4 primeros exones del gen.
6. Nuestra familia con la mutación L245P en el gen *INF2* se caracterizó por una resistencia a las diversas estrategias antiproteínúricas y una ausencia de recidiva después del trasplante renal.
7. El estudio del gen *CD2AP*, de asociación no clara con la Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria, reveló que la mutación

T374A presente en heterocigosis en una familia con herencia recesiva, previamente descrita en la literatura pero no estudiada, no provocaba la enfermedad, ya que se encontraba tanto en individuos sanos como en afectos.

8. De los tres genes seleccionados como candidatos para su estudio, *ITGA3*, *FN1* y *NEPH1*, solo el primero, que codifica para la integrina  $\alpha$  3, mostró la presencia de un cambio (R463Q) en heterocigosis en un paciente con una forma esporádica de la enfermedad.
9. El análisis de los rasgos fenotípicos de nuestra cohorte de familias con Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria autosómica dominante recalcó la presencia de una elevada variabilidad tanto intrafamiliar como interfamiliar coincidente con lo que se ha publicado en la literatura.
10. La correlación entre el fenotipo y el genotipo de las 22 familias con mutación en el gen *INF2* no reveló la presencia de ningún rasgo fenotípico que fuese indicativo para el diagnóstico de la enfermedad causada por este gen.

---

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Jarad G, Miner JH. Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18:226-232.
2. Haraldsson B, Jeansson M. Glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18:331-335.
3. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 2007;17:428-437.
4. Miner JH. Renal basement membrane components. *Kidney Int*. 1999;56:2016-2024.
5. Gubler MC. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008 4:24-37.
6. Ho MS, Bose K, Mokkalapati S, Nischt R, Smyth N. Nidogens-Extracellular matrix linker molecules. *Microsc Res Tech*. 2008;71:387-395.
7. Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:2879-2895.
8. Satchell SC, Braet F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296:F947-956.
9. Gagliardini E, Conti S, Benigni A, Remuzzi G, Remuzzi A. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:2081-2089.
10. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*. 1974;60:423-433.
11. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol*. 1990;111:1255-1263.
12. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;1:575-582.

13. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7962-7967.
14. Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, et al. Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol*. 2003;163:2337-2346.
15. Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstadt H, Walz G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *Faseb J*. 2003;17:115-117.
16. Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem*. 2003;278:19266-19271.
17. Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*. 2003;112:209-221.
18. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:918-926.
19. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int*. 2001;59:1003-1012.
20. Garg P, Verma R, Holzman LB. Slit diaphragm junctional complex and regulation of the cytoskeleton. *Nephron Exp Nephrol*. 2007;106:e67-72.
21. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2000;24:349-354.
22. Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, et al. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*. 1998;94:667-677.
23. Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*. 1999;286:312-315.
24. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F785-792.

25. Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283:F734-743.
26. Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol.* 2001;159:2303-2308.
27. Schwarz K, Simons M, Reiser J, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest.* 2001;108:1621-1629.
28. Schermer B, Benzing T. Lipid-protein interactions along the slit diaphragm of podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:473-478.
29. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:1-8.
30. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton).* 2006;11:274-281.
31. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003 83:253-307.
32. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001;305:285-298.
33. Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 2007;213:565-573.
34. Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:804-820.
35. Winder SJ. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:118-124.
36. Bozzi M, Morlacchi S, Bigotti MG, Sciandra F, Brancaccio A. Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol.* 2009;28:179-187.
37. Chang RS, Robertson CR, Deen WM, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall to macromolecules. I. Theoretical considerations. *Biophys J.* 1975;15:861-886.
38. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev.* 2008;88:451-487.

39. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281:F579-596.
40. Nagi AH, Alexander F, Lannigan R. Light and electron microscopical studies of focal glomerular sclerosis. *J Clin Pathol.* 1971;24:846-850.
41. Grishman E, Churg J. Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: an electron microscopic study of glomerular podocytes. *Kidney Int.* 1975;7:111-122.
42. Mandal AK, Chrysant K, Nordquist JA, Kraikitpanitch S, Xoung DT, Lindeman RD. Focal glomerular sclerosis. *South Med J.* 1976;69:997-1001.
43. Chandra M, Mouradian J, Hoyer JR, Lewy JE. Familial nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *J Pediatr.* 1981;98:556-560.
44. Conlon PJ, Lynn K, Winn MP, et al. Spectrum of disease in familial focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1999;56:1863-1871.
45. Cameron JS. Focal segmental glomerulosclerosis in adults. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 6:vi45-51.
46. D'Agati V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003;23:117-134.
47. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis.* 2004;43:368-382.
48. Thomas DB, Franceschini N, Hogan SL, et al. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int.* 2006 69:920-926.
49. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2007 22:350-354.
50. D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008 17:271-281.
51. Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int.* 2010;77:571-580.
52. Nielsen R, Christensen EI. Proteinuria and events beyond the slit. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:813-822.

53. Baines RJ, Brunskill NJ. The molecular interactions between filtered proteins and proximal tubular cells in proteinuria. *Nephron Exp Nephrol.* 2008;110:e67-71.
54. Theilig F. Spread of glomerular to tubulointerstitial disease with a focus on proteinuria. *Ann Anat.* 2010;192:125-132.
55. Kriz W. Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11:1738-1742.
56. Johnson RJ. What mediates progressive glomerulosclerosis? The glomerular endothelium comes of age. *Am J Pathol.* 1997;151:1179-1181.
57. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006;69:2131-2147.
58. Kriz W, Lemley KV. The role of the podocyte in glomerulosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1999;8:489-497.
59. Mathis BJ, Kim SH, Calabrese K, et al. A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13. *Kidney Int.* 1998;53:282-286.
60. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2000;24:251-256.
61. Takada F, Vander Woude DL, Tong HQ, et al. Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1595-1600.
62. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. Clinical and genetic heterogeneity in familial focal segmental glomerulosclerosis. International Collaborative Group for the Study of Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1999;55:1241-1246.
63. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics.* 1999;58:113-120.
64. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science.* 2005;308:1801-1804.

65. Reiser J, Polu KR, Moller CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 2005;37:739-744.
66. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7461-7466.
67. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:387-396.
68. Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2001;2001:re1.
69. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:387-417.
70. Cheng W, Sun C, Zheng J. Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell;*1:802-810.
71. Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, et al. Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *J Biol Chem.* 2006;281:30356-30364.
72. Schaefer M. Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch.* 2005;451:35-42.
73. Dietrich A, Gudermann T. Trpc6. *Handb Exp Pharmacol.* 2007:125-141.
74. Schlondorff JS, Pollak MR. TRPC6 in glomerular health and disease: what we know and what we believe. *Semin Cell Dev Biol.* 2006;17:667-674.
75. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005;2005:re3.
76. Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science.* 2003;300:1298-1300.
77. Wolf G, Stahl RA. CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet.* 2003;362:1746-1748.
78. Bruck S, Huber TB, Ingham RJ, et al. Identification of a novel inhibitory actin-capping protein binding motif in CD2-associated protein. *J Biol Chem.* 2006;281:19196-19203.

79. Lowik MM, Groenen PJ, Pronk I, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation. *Kidney Int.* 2007;72:1198-1203.
80. Brown EJ, Schlondorff JS, Becker DJ, et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2010;42:72-76.
81. Schönichen A GM. Fifteen formins for an actin filament: A molecular view on the regulation of human formins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;152-163.
82. Lew DJ. Formin' actin filament bundles. *Nat Cell Biol.* 2002;4:E29-30.
83. Faix J, Grosse R. Staying in shape with formins. *Dev Cell.* 2006;10:693-706.
84. Young KG, Thurston SF, Copeland S, Smallwood C, Copeland JW. INF1 is a novel microtubule-associated formin. *Mol Biol Cell.* 2008;19:5168-5180.
85. Zigmond SH. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:99-105.
86. Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci.* 2005;30:342-353.
87. Alberts AS. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem.* 2001;276:2824-2830.
88. Chhabra ES, Higgs HN. INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J Biol Chem.* 2006;281:26754-26767.
89. Chhabra ES, Ramabhadran V, Gerber SA, Higgs HN. INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. *J Cell Sci.* 2009;122:1430-1440.
90. Madrid R, Aranda JF, Rodriguez-Fraticelli AE, et al. The formin INF2 regulates basolateral-to-apical transcytosis and lumen formation in association with Cdc42 and MAL2. *Dev Cell.* 2010;18:814-827.

91. Philippe A, Nevo F, Esquivel EL, et al. Nephrin mutations can cause childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:1871-1878.
92. Patrakka J, Ruotsalainen V, Reponen P, et al. Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin. *Transplantation.* 2002;73:394-403.
93. Kestila M, Mannikko M, Holmberg C, et al. Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type maps to the long arm of chromosome 19. *Am J Hum Genet.* 1994;54:757-764.
94. Mannikko M, Kestaila M, Holmberg C, et al. Fine mapping and haplotype analysis of the locus for congenital nephrotic syndrome on chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet.* 1995;57:1377-1383.
95. Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P, et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet.* 1999;64:51-61.
96. Liu L, Done SC, Khoshnoodi J, et al. Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2637-2644.
97. Pollak MR. Expanding the spectrum of NPHS1-associated disease. *Kidney Int.* 2009;76:1221-1223.
98. Godefroid N, Dahan K. Expanding the clinical spectrum of congenital nephrotic syndrome caused by NPHS1 mutations. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:2837-2839.
99. Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, 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.
100. Machuca E, Hummel A, Nevo F, et al. Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int.* 2009;75:727-735.
101. Saleem MA, Ni L, Witherden I, et al. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol.* 2002;161:1459-1466.



102. Huber TB, Simons M, Hartleben B, et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet.* 2003;12:3397-3405.
103. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, et al. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet.* 2006;38:1397-1405.
104. Boyer O, Benoit G, Gribouval O, et al. Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *J Med Genet.* 2010;47:445-452.
105. Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development.* 1996;122:3537-3547.
106. Kreidberg JA. Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:548-553.
107. Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM, Reynolds LE. Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1703-1713.
108. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115:3861-3863.
109. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:397-419.
110. Couchman JR, Beavan LA, McCarthy KJ. Glomerular matrix: synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney Int.* 1994;45:328-335.
111. Strom EH, Banfi G, Krapf R, et al. Glomerulopathy associated with predominant fibronectin deposits: a newly recognized hereditary disease. *Kidney Int.* 1995;48:163-170.
112. Vollmer M, Jung M, Ruschendorf F, et al. The gene for human fibronectin glomerulopathy maps to 1q32, in the region of the regulation of complement activation gene cluster. *Am J Hum Genet.* 1998;63:1724-1731.
113. Castelletti F, Donadelli R, Banterla F, et al. Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:2538-2543.

114. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol.* 2001;21:4829-4836.
115. Bruckner-Tuderman L, von der Mark K, Pihlajaniemi T, Unsicker K. Cell interactions with the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2010;339:1-5.
116. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, et al. Neph1, a component of the kidney slit diaphragm, is tyrosine-phosphorylated by the Src family tyrosine kinase and modulates intracellular signaling by binding to Grb2. *J Biol Chem.* 2008;283:9177-9186.
117. Eddy SR. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? *Nat Biotechnol.* 2004;22:1035-1036.
118. Henikoff S, Henikoff JG. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:10915-10919.
119. Miller MP, Kumar S. Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2319-2328.
120. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7:248-249.
121. Li SC, Goto NK, Williams KA, Deber CM. Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:6676-6681.
122. Pace CN, Scholtz JM. A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys J.* 1998;75:422-427.
123. Weins A, Kenlan P, Herbert S, et al. Mutational and Biological Analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:3694-3701.
124. Michaud JL, Lemieux LI, Dube M, Vanderhyden BC, Robertson SJ, Kennedy CR. Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1200-1211.
125. Kos CH, Le TC, Sinha S, et al. Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest.* 2003;111:1683-1690.

126. Ward SM, Weins A, Pollak MR, Weitz DA. Dynamic viscoelasticity of actin cross-linked with wild-type and disease-causing mutant alpha-actinin-4. *Biophys J*. 2008;95:4915-4923.
127. Weins A, Schlondorff JS, Nakamura F, et al. Disease-associated mutant alpha-actinin-4 reveals a mechanism for regulating its F-actin-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:16080-16085.
128. Dandapani SV, Sugimoto H, Matthews BD, et al. Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem*. 2007;282:467-477.
129. Michaud JL, Hosseini-Abardeh M, Farah K, Kennedy CR. Modulating alpha-actinin-4 dynamics in podocytes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009;66:166-178.
130. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Bijian K, Guillemette J, Kennedy CR. Glomerular epithelial cell injury associated with mutant alpha-actinin-4. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297:F987-995.
131. Yao J, Le TC, Kos CH, et al. Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biol*. 2004;2:e167.
132. Santin S, Ars E, Rossetti S, et al. TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:3089-3096.
133. Heeringa SF, Moller CC, Du J, et al. A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One*. 2009;4:e7771.
134. Zhu B, Chen N, Wang ZH, et al. Identification and functional analysis of a novel TRPC6 mutation associated with late onset familial focal segmental glomerulosclerosis in Chinese patients. *Mutat Res*. 2009;664:84-90.
135. Qin F. Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Handb Exp Pharmacol*. 2007:509-525.
136. Yao X. TRPC, cGMP-dependent protein kinases and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Handb Exp Pharmacol*. 2007:527-540.
137. Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, et al. Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004;279:18887-18894.

138. Ambudkar IS. Trafficking of TRP channels: determinants of channel function. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;541-557.
139. Trebak M, Lemonnier L, Smyth JT, Vazquez G, Putney JW, Jr. Phospholipase C-coupled receptors and activation of TRPC channels. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;593-614.
140. Kwon Y, Hofmann T, Montell C. Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell.* 2007;25:491-503.
141. Schlondorff J, Del Camino D, Carrasquillo R, Lacey V, Pollak MR. TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296:C558-569.
142. Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, et al. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC- $\gamma$ 1 and Nephrin: Effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol Biol Cell.* 2011.[Epub ahead of print].
143. Shen B, Kwan HY, Ma X, et al. Cyclic AMP activates TRPC6 channels via PI3K-PKB-MEK-ERK1/2 signaling pathway. *J Biol Chem.* 2011.[Epub ahead of print].
144. Moller CC, Wei C, Altintas MM, et al. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:29-36.
145. Walz G. Slit or pore? A mutation of the ion channel TRPC6 causes FSGS. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:1777-1779.
146. Krall P, Canales CP, Kairath P, et al. Podocyte-specific overexpression of wild type or mutant *trpc6* in mice is sufficient to cause glomerular disease. *PLoS One* 2010;5:e12859.
147. Dryer SE, Reiser J. TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299:F689-701.
148. Kriz W. TRPC6 - a new podocyte gene involved in focal segmental glomerulosclerosis. *Trends Mol Med.* 2005;11:527-530.
149. Lee HK, Han KH, Jung YH, et al. Variable renal phenotype in a family with an *INF2* mutation. *Pediatr Nephrol.* 2010;26(1):73-6.

150. Boyer O, Benoit G, Gribouval O, et al. Mutations in INF2 Are a Major Cause of Autosomal Dominant Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:239-245.
151. Sun H, Schlondorff JS, Brown EJ, Higgs HN, Pollak MR. Rho activation of mDia formins is modulated by an interaction with inverted formin 2 (INF2). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2933-8.
152. Andrés-Delgado L, Antón O, Madrid R, Byrne J, Alonso M. Formin INF2 regulates MAL-mediated transport of Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *Blood*. 2010;116(26):5919-29
153. Springer TA. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:65-72.
154. Springer TA. Predicted and experimental structures of integrins and beta-propellers. *Curr Opin Struct Biol*. 2002;12:802-813.
155. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 2004;36:449-451.
156. Henderson JM, Alexander MP, Pollak MR. Patients with ACTN4 mutations demonstrate distinctive features of glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:961-968.

