

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LOS GENES DE ADHESIÓN CELULAR EN EL
DESARROLLO DE GLOMERULOPATÍAS PRIMARIAS**

SARA MARCOS GONZÁLEZ

SANTANDER, mayo 2024



INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS DOCTORAL

D. José Javier Gómez Román, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Certifica como Director y Tutor que la Tesis Doctoral que lleva por título:

PAPEL DE LOS GENES DE ADHESIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE GLOMERULOPATÍAS PRIMARIAS

realizada por Sara Marcos González, reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentada y defendida ante un tribunal con el fin de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente.

Fdo. José Javier Gómez Román

En Santander, a 21 de mayo de 2024.



INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS DOCTORAL

D. Javier Freire Salinas, Biólogo Molecular en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Certifica como Director de la Tesis Doctoral que lleva por título:

PAPEL DE LOS GENES DE ADHESIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE GLOMERULOPATÍAS PRIMARIAS

realizada por Sara Marcos González, reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentada y defendida ante un tribunal con el fin de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente.

Fdo. Javier Freire Salinas

En Santander, a 21 de mayo de 2024.

Al Dr. José Javier Gómez-Román, director y tutor de esta tesis, por el esfuerzo y confianza que ha depositado en mí para la realización de este trabajo. Gracias por transmitirme con tanto entusiasmo tus conocimientos y consejos.

Al Dr. Javier Freire, codirector de esta tesis, por haber permitido que me enfrente a este reto de autosuperación y aprendizaje.

A la Dra. Ainara Azueta, por su aliento y motivación al inicio de mi tesis. Su apoyo fue fundamental para que comenzara este camino.

Al Dr. Ignacio Varela, por su dedicación y disponibilidad, por su trabajo en el análisis bioinformático y por todas las dudas resueltas que surgieron en este recorrido.

Al Dr. Emilio Rodrigo Calabia, por su valiosa ayuda e impulso en la publicación de nuestro artículo, sin el que esta tesis no vería la luz. Su compromiso y apoyo han sido invaluable.

A Claudia González Rico, por su paciencia, apoyo inquebrantable y sus habilidades en el análisis estadístico que han sido fundamentales en este viaje académico. Gracias por alentarme a seguir adelante con la tesis y por estar a mi lado en cada paso del tortuoso camino.

A la Dra. Alicia León del Castillo por ser un ejemplo a seguir y su ayuda en mi descubrimiento de *Flanklin*, que tanto allanó mi camino.

A la Dra. Patricia Escudero, recientemente titulada, cuya tesis incentivó la redacción de la mía.

A mis compañeros de especialidad, pasados y presentes, que tanto cariño me han demostrado y que en todo momento me han escuchado. En especial, a mi amigo y compañero Remi Mazorra porque siempre ha estado ahí, y este mundo de color lo descubrí junto a él.

A mis amigos/as, que me recordaron que la vida no se trata solo de libros y tareas. Por su apoyo emocional y sus ánimos constantes durante los momentos más desafiantes de mi tesis.

A mi padre, por quien siento gran admiración, siempre ha sido mi modelo a seguir; a mi madre, por transmitirme el valor de la perseverancia; y a mi hermano, por haberme enseñado el inconformismo para conseguir mis objetivos.

En general a mi familia, por ser, estar y permitirme ser como soy, por darme un propósito y los medios para poder llevarlo a cabo.

Y, por último, pero no menos importante, a Hjul, que tecleó alguna que otra letra mientras escribía este manuscrito.

*Aprender es cosa de dos:
de quien ofrece y de quien acepta.*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Estructura del riñón.....	25
1.2. Adhesión celular	27
1.3. Glomerulonefritis	31
1.3.1. Nefropatía IgA.....	32
1.3.2. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria.....	36
1.3.3. Glomerulonefritis membranoproliferativa.....	42
1.4. Moléculas de adhesión y glomerulonefritis	46
1.5. Tipos de mutaciones	47
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
2.1. Justificación e Hipótesis	51
2.2. Objetivos.....	52
2.2.1. Objetivo general	52
2.2.2. Objetivos específicos	52
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Diseño del estudio	55
3.2. Ámbito de estudio	55
3.3. Población de estudio	55
3.4. Muestras.....	56
3.5. Extracción, cuantificación y homogeneización de ADN	57
3.6. Identificación y anotación de genes de moléculas de adhesión celular	59
3.7. Construcción de librerías y secuenciación masiva	60
3.8. Análisis bioinformático	62

3.9. Análisis de variantes	64
3.10. Análisis estadístico	64
3.11. Consideraciones éticas	65
4. RESULTADOS.....	67
4.1. Características de la población de estudio.....	69
4.2. Análisis variables clínicas.....	70
4.3. Análisis mutacional.....	70
4.4. Nefropatía IgA	80
4.4.1. Características clínicas y patológicas.....	80
4.4.2. Análisis mutacional.....	82
4.5. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria	87
4.5.1. Características clínicas y patológicas.....	87
4.5.2. Análisis mutacional.....	89
4.6. Glomerulonefritis membranoproliferativa	95
4.6.1. Características clínicas y patológicas.....	95
4.6.2. Análisis mutacional.....	97
5. DISCUSIÓN	103
5.1. Discusión de la metodología	105
5.1.1. Fortaleza del estudio	105
5.1.2. Limitaciones del estudio	105
5.1.3. Sesgos	106
5.2. Discusión de los resultados	106
5.2.1. Características poblacionales	106
5.2.2. Estudios mutacionales.....	107
5.2.3. GN IgA y moléculas de adhesión	110

5.2.4.	GEFS y moléculas de adhesión	113
5.2.5.	GNMP y moléculas de adhesión	116
6.	CONCLUSIONES.....	119
7.	BIBLIOGRAFÍA	123
8.	MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	135
8.1.	Anotación de los 29 genes estudiados y distinción entre genes nefropáticos y fenocopia.....	137
8.2.	Transcritos utilizados para el alineamiento	145
9.	ANEXOS.....	147
9.1.	Certificado aprobación del CEIC y consentimiento informado	149
9.2.	Comunicaciones a congresos	154
9.3.	Certificado de formación transversal de la Escuela de Doctorado	157
9.4.	Artículo publicado	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del glomérulo	26
Figura 2. Regulación de moléculas de adhesión celular.....	31
Figura 3. Clasificación de Hass de Glomerulopatía IgA	34
Figura 4. Porcentaje de genes nefropáticos y de fenocopia	60
Figura 5. Algoritmo de flujo de muestras y controles de calidad.....	63
Figura 6. Filtración y clasificación de variantes	71
Figura 7. Comparativa de la media de SNV en las glomerulopatías y el grupo control .	72
Figura 8. Porcentaje de pacientes con mutaciones totales, por gen estudiado	73
Figura 9. Porcentaje de mutaciones no silenciosas por gen	74
Figura 10. Patrones mutacionales. Mutaciones LP, P y VUS	76
Figura 11. Detección de mutaciones LP y P.....	77
Figura 12. Distribución global de mutaciones LP, P y VUS por estadios de ERC	79
Figura 13. Caso GN IgA. HE y PAS. IF IgA	81
Figura 14. Mutaciones no silenciosas por gen, en pacientes GN IgA.....	82
Figura 15. Frecuencia de mutaciones LP, P y VUS en GN IgA y grupo control	83
Figura 16. Distribución de mutaciones en GN IgA por nivel de proteinuria	85
Figura 17. Distribución de mutaciones en GN IgA por valores de creatinina	85
Figura 18. Distribución de mutaciones en GN IgA por estadios de ERC.....	86
Figura 19. Caso GEFS. HE, PAS y Plata	88
Figura 20. Caso GEFS variante tip. PAS. IF IgM.....	89
Figura 21. Mutaciones no silenciosas por gen, en pacientes GEFS.....	89
Figura 22. Frecuencia de mutaciones LP, P y VUS en GEFS y grupo control	90
Figura 23. Media de mutaciones según variantes morfológicas de GEFS.....	92
Figura 24. Distribución de las mutaciones según variantes morfológicas de GEFS	92
Figura 25. Distribución de mutaciones en GEFS por nivel de proteinuria	93
Figura 26. Distribución de mutaciones en GEFS por valores de creatinina	93
Figura 27. Distribución de mutaciones en GEFS por estadios de ERC.....	94
Figura 28. Caso GnC3. HE y Plata. IF C3.....	96
Figura 29. Mutaciones no silenciosas por gen, en pacientes GNMP	97

Figura 30. Frecuencia de mutaciones LP, P y VUS en GNMP y grupo control.....	98
Figura 31. Media de mutaciones en GNMP y GnC3	99
Figura 32. Distribución de las mutaciones según subtipo de GNMP	100
Figura 33. Distribución de mutaciones en GNMP por nivel de proteinuria	101
Figura 34. Distribución de mutaciones en GNMP por valores de creatinina	101
Figura 35. Distribución de mutaciones en GNMP por estadios de ERC	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales moléculas de adhesión, distribución en riñón normal y función biológica	30
Tabla 2. Clasificación de Hass de GN IgA	34
Tabla 3. Tratamiento de la GN IgA según las Guías KDIGO	35
Tabla 4. Variantes histopatológicas de GEFS según la clasificación de Columbia.....	41
Tabla 5. Papel de las principales moléculas de adhesión en GN.....	47
Tabla 6. Grupo control.....	56
Tabla 7. Características generales de la población de <i>casos</i>	69
Tabla 8. Mutaciones no reportadas, no Reference SNP (rs) Report	78
Tabla 9. Características clínicas pacientes GN IgA.....	80
Tabla 10. Características histopatológicas de las biopsias GN IgA.....	81
Tabla 11. Características clínicas pacientes GEFS.....	87
Tabla 12. Características histopatológicas GEFS	88
Tabla 13. Características clínicas pacientes GNMP	95
Tabla 14. Características histopatológicas GNMP	96

ABREVIATURAS

ACMG	Colegio Americano de Genética Médica (<i>The American College of Medical Genetics and Genomics</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AQP-1	Acuaporina 1
ARN	Ácido ribonucleico
BFG	Barrera de filtración glomerular
BRA	Bloqueantes de receptores de angiotensina
DE	Desviación estándar
CNV	<i>Copy number variation</i>
C3NeF	Factor nefrítico C3
DE	Desviación estándar
DGV	Database of Genomic Variants
EDD	Enfermedad por depósitos densos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
eGFR	Filtración glomerular estimada
EPI	Enfermedad pulmonar intersticial
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCA	Enfermedad renal crónica avanzada
ERCT	Enfermedad renal terminal
FFIP	Fijado en formol e incluido en parafina
FH	Factor H
FRA	Fracaso renal agudo

Gd-IgA1	IgA1 deficiente en galactosa
GN	Glomerulonefritis
GnC3	Glomerulopatía C3
GNMP	Glomerulonefritis membranoproliferativa
GEFS	Glomeruloesclerosis focal y segmentaria
GEFSp	Glomeruloesclerosis focal y segmentaria primaria
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (<i>genome-wide association study</i>)
HTA	Hipertensión arterial
IC	Intervalo de confianza
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina
IF	Inmunofluorescencia
IR	Insuficiencia renal
IRA	Insuficiencia renal aguda
IS	Inmunosupresor
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LFA	<i>Leukocyte-function-associated antigen</i>
LPA	Ácido lipofosfatídico
MBG	Membrana basal glomerular
ME	Microscopía electrónica
MEC	Matriz extracelular
miARN	microARN

MNV	<i>Multi-Nucleotide Variant</i>
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NOS	No especificada
NTA	Necrosis tubular aguda
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PA	Presión arterial
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PR	Razón de prevalencias
SNCR	Síndrome nefrótico corticorresistente
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SNV	Variante de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Variant</i>)
iSRAA	Inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona
TFG	Tasa de filtración glomerular
TR	Trasplante renal
VAF	Frecuencia alélica de una variante (<i>Variant allele frequency</i>)
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VHC	Virus de la Hepatitis C
VLA	<i>Very late activation antigen</i>
VUS	Variante de significado clínico incierto

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA DEL RIÑÓN

Nefrona

La nefrona es la unidad funcional de riñón, procedente del blastema metanéfrico. Cada riñón posee aproximadamente 2 millones de nefronas, a su vez, cada nefrona contiene un glomérulo y un túbulo (1).

Glomérulo

El corpúsculo renal alberga el mecanismo de filtración del riñón, compuesto por un ovillo capilar glomerular y las capas epiteliales visceral y parietal de la cápsula de Bowman circundante. De este modo, el glomérulo se constituye por una red interconectada de capilares revestidos por un endotelio fenestrado que posee dos envolturas epiteliales. El epitelio visceral se incorpora a la pared capilar y se convierte en parte intrínseca de la misma, quedando separado de las células endoteliales por una membrana basal. Por otro lado, el epitelio parietal, localizado en la cápsula de Bowman, reviste el espacio urinario, que es la cavidad donde se recolecta inicialmente el filtrado del plasma. El aparato de filtración tiene tres componentes (1):

1. Endotelio de los capilares glomerulares con numerosos poros de aproximadamente 70 a 90 nm de diámetro. Las células endoteliales de los capilares glomerulares poseen una gran cantidad de canales acuosos de acuaporina 1 (AQP-1) que permiten el paso rápido del agua a través del epitelio.
2. Membrana basal glomerular (MBG), es el componente principal de la barrera de filtración. Se trata de una lámina basal gruesa que es el producto conjunto del endotelio y los podocitos, las células de la capa visceral de la cápsula de Bowman. La MBG contiene colágeno de tipo IV, sialoglucoproteínas y otras glucoproteínas no colágenas (laminina y fibronectina, entre otras), así como proteoglicanos y glucosaminoglicanos.
3. Hoja visceral de la cápsula de Bowman, está compuesta por células epiteliales viscerales, también conocidas como podocitos. Estas células proyectan extensiones que rodean los capilares glomerulares, dando lugar a numerosas extensiones secundarias y terciarias, conocidas como pedicelos. Los espacios

interdigitados entre los pedicelos, denominados ranuras de filtración, facilitan la entrada del ultrafiltrado sanguíneo en el espacio de Bowman. Un componente adicional es la existencia de la membrana de la ranura de filtración que se extiende de un borde a otro de las ranuras.

El conjunto del ovillo glomerular se apoya en las células mesangiales ubicadas entre los capilares. Al igual que la membrana basal, la matriz mesangial forma una red en la que se dispersan las células mesangiales. Estas células, de origen mesenquimal, tienen la capacidad de contraerse, fagocitar, proliferar, depositar matriz y colágeno, y secretar varios mediadores biológicamente activos (2).

Por lo tanto, la ultrafiltración en el glomérulo se realiza a través de la capa endotelial fenestrada, la MBG y los podocitos.

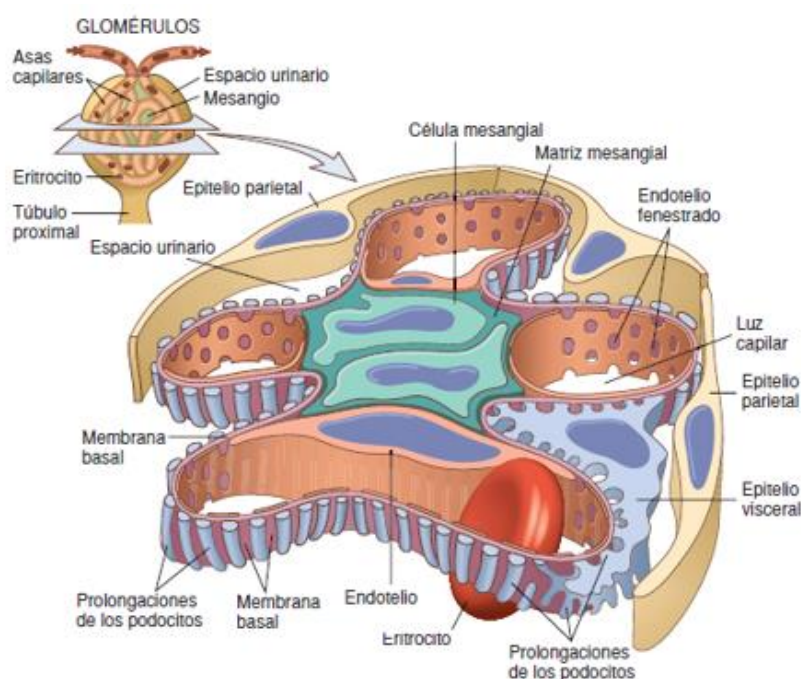


Figura 1. Representación esquemática del glomérulo (Adaptada de Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease, 9th edition)

La filtración glomerular normal se caracteriza principalmente por su alta permeabilidad al agua y a solutos de pequeño tamaño, gracias a la naturaleza fenestrada del endotelio, y su impermeabilidad a proteínas de tamaño similar o superior a la albúmina. Esta última propiedad, conocida como función de barrera glomerular, discrimina entre diferentes

moléculas proteicas en función de su tamaño (a mayor tamaño, menor permeabilidad) y carga (las más catiónicas son más permeables). Esta función de barrera, dependiente del tamaño y carga eléctrica, se debe a la complejidad estructural de la pared capilar, los poros de colágeno y la estructura cargada de la MBG, así como a las numerosas regiones aniónicas presentes en la pared, incluyendo los proteoglicanos ácidos de la MBG y las sialoglicoproteínas de las capas celulares epitelial y endotelial.

El podocito juega un papel crucial en el mantenimiento de la función de barrera glomerular. Su diafragma poroso proporciona una barrera de difusión distal selectiva por tamaño para la filtración de proteínas, y es la principal responsable de la síntesis de los componentes de la MBG. Las proteínas situadas en el diafragma poroso regulan la permeabilidad glomerular.

1.2. ADHESIÓN CELULAR

Diversas moléculas de adhesión celular se manifiestan en la superficie de las células, facilitando la unión con la matriz extracelular (MEC), así como la adhesión intercelular. Dichas moléculas se agrupan principalmente en cuatro familias: Integrinas, Cadherinas, IgCAM (moléculas de adhesión pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas) y Selectinas. Todas son proteínas transmembrana compuestas por tres dominios: un dominio extracelular que se une al ligando, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que se asocia con elementos del citoesqueleto mediante proteínas de acoplamiento o anclaje y diferentes proteinquinas.

La adhesión celular es esencial en la comunicación y regulación celular, siendo imprescindible para el desarrollo y preservación de los tejidos. Las moléculas de adhesión no sólo median los contactos con la MEC o las células adyacentes, sino que también regulan aspectos importantes del comportamiento y función celular (3).

El estado de la adhesión celular, que involucra las interacciones célula-célula y célula-MEC, es determinante para una amplia variedad de respuestas biológicas celulares (4). Son numerosos los trabajos en los que se describe la importancia para la supervivencia de la célula, del proceso de adhesión de ésta a diferentes componentes de la MEC, así

como la unión de factores de crecimiento solubles y citoquinas, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal growth factor*), a sus correspondientes receptores celulares. Asimismo, estudios recientes han demostrado que las interacciones célula-célula también juegan un papel importante en dicho proceso de supervivencia.

En 1993 Meredith y colaboradores (5) observaron en fibroblastos que la adhesión celular era necesaria para su supervivencia, y en 1994 Frisch y colaboradores (6) acuñaron el término “anoikis” para describir la inducción de apoptosis tras la pérdida de adhesión. Esta forma de apoptosis ha sido demostrada en numerosos tipos celulares adherentes como fibroblastos, células endoteliales, epiteliales mamarias, de los bronquios, de riñón, intestinales, próstata, queratinocitos, neuronales, tiroideas y pancreáticas. El programa de anoikis resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasis de tejidos, por lo que se deduce que una inducción/inhibición aberrante del proceso de anoikis puede ser la responsable de varios procesos patogénicos.

Moléculas de adhesión intercelular

La adhesión intercelular crea el anclaje físico que permite el desarrollo de los tejidos, jugando un papel fundamental en el control homeostático. Además, dentro de las células, la activación de múltiples vías de transducción de señales se inicia a través de los receptores de adhesión intercelular (4). Por lo tanto, es razonable considerar que la desregulación de estas adhesiones puede contribuir a la patogénesis de las enfermedades (4,7).

En consecuencia, la adhesión intercelular es un proceso complejo que se regula durante el desarrollo normal del organismo y su fisiología (3).

Moléculas de adhesión célula-matriz

Dentro de los tejidos, es fundamental que las células se adhieran correctamente no solo entre sí, sino también a los componentes de la MEC que las rodea (4), siendo estas interacciones, entre las células y la MEC circundante, cruciales para la supervivencia celular normal.

Moléculas de adhesión en el riñón

El riñón humano normal expresa moléculas de adhesión que son parte de la superfamilia de las IgCAM e Integrinas (Tabla 1) (8). Las células endoteliales de los capilares glomerulares, peritubulares y vasos de mediano calibre manifiestan la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) e ICAM-2. La molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) se encuentra intensamente expresada en el epitelio parietal de la cápsula de Bowman y en menor medida en el epitelio del túbulo proximal. Las integrinas $\beta 1$ (CD29) o los antígenos de activación muy tardía (VLA, *very late activation antigen*) como VLA-2, VLA-3 y VLA-5, que interactúan con proteínas extracelulares como el colágeno, la laminina y la fibronectina, se expresan en los capilares glomerulares. Tanto la célula epitelial parietal como la visceral expresan VLA-1 y VLA-3. Estas moléculas junto con VLA-2 y VLA-6, se localizan en el epitelio tubular. Además, VLA-1, VLA-3 y VLA-5 se hallan en la célula mesangial (9). VLA-4 y la $\beta 2$ integrina *leucocyte-function-associated antigen* (LFA)-1 (CD18/CD11a) se encuentran en los macrófagos residentes en el mesangio (10). El riñón normal no expresa selectinas (11). El papel de las moléculas de adhesión en las glomerulonefritis está demostrado in vitro e in vivo en modelos experimentales (8).

Tabla 1. Principales moléculas de adhesión, distribución en riñón normal y función biológica

<i>Molécula de adhesión</i>	<i>Riñón normal</i>	<i>Función biológica</i>
Inmunoglobulinas-like		
ICAM-1	Endotelio	Adhesión, adhesión inmune
ICAM-2	Endotelio	Adhesión, adhesión inmune
VCAM-1	Epitelio parietal	Adhesión leucocito/endotelio
Integrinas β1		
VLA-1	Epitelio parietal, visceral	Adhesión matriz extracelular
VLA-2	Epitelio tubular	
VLA-3	Epitelio parietal, visceral	
VLA-4	Macrófagos residentes	
VLA-5 (ITGA5)	Mesangio	
VLA-6	Epitelio tubular	
Integrinas β2		
LFA-1	Macrófagos residentes	Adhesión, trans migración
Mac-1		Adhesión leucocito/endotelio

ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM: molécula de adhesión vascular; VLA: very late activation (activación muy tardía); LFA: leucocyte function associated (asociado a la función leucocitaria); Mac: macrófago (receptor del complemento 3), PMN: polimorfonucleares.

El papel de los microARN

Los microARN son fragmentos cortos de ARN, aproximadamente 22 nucleótidos, no codificantes y que participan en la regulación de la expresión génica. Constituyen una clase de moléculas reguladoras con capacidad para modular los niveles de expresión de proteínas de adhesión celular (3).

Estos microARN fueron descubiertos en 1993 en el nematodo *Caenorhabditis elegans* por Lee y colaboradores (12). Este hallazgo transformó en gran medida la comprensión de la regulación genética, lo que llevó a múltiples investigaciones en este campo y a la descripción de miles de microARN nuevos y procesos celulares en los que participan.

Los microARN desempeñan papeles críticos en el mantenimiento de la homeostasis renal. La inactivación específica de Dicer¹ en los podocitos produce proteinuria,

¹ Dicer es una enzima que genera microRNA.

glomeruloesclerosis e insuficiencia renal (IR), lo que indica que los microARN son esenciales para la homeostasis de los podocitos (13).

Se ha demostrado que tres familias de microARN, miR-21, miR-200 y miR-29, modulan la fibrosis renal al promover la proliferación de fibroblastos, inhibir la transición epitelio-mesénquima y prevenir la deposición y remodelación de la MEC (14).

Por otra parte, ciertos microARN presentan la capacidad de regular moléculas que supervisan los eventos biológicos celulares fundamentales en la adhesión celular. Existiendo, por tanto, conexión entre la desregulación de los microARN y la patogénesis de varias enfermedades.

La evidencia actual sugiere que la capacidad de ciertos microARN, en particular miR-17, miR-29, miR-31, miR-124 y miR-200, para regular múltiples componentes moleculares de la maquinaria de adhesión celular dota a estos microARN de la capacidad de funcionar como moduladores claves de los procesos asociados a la adhesión (3).

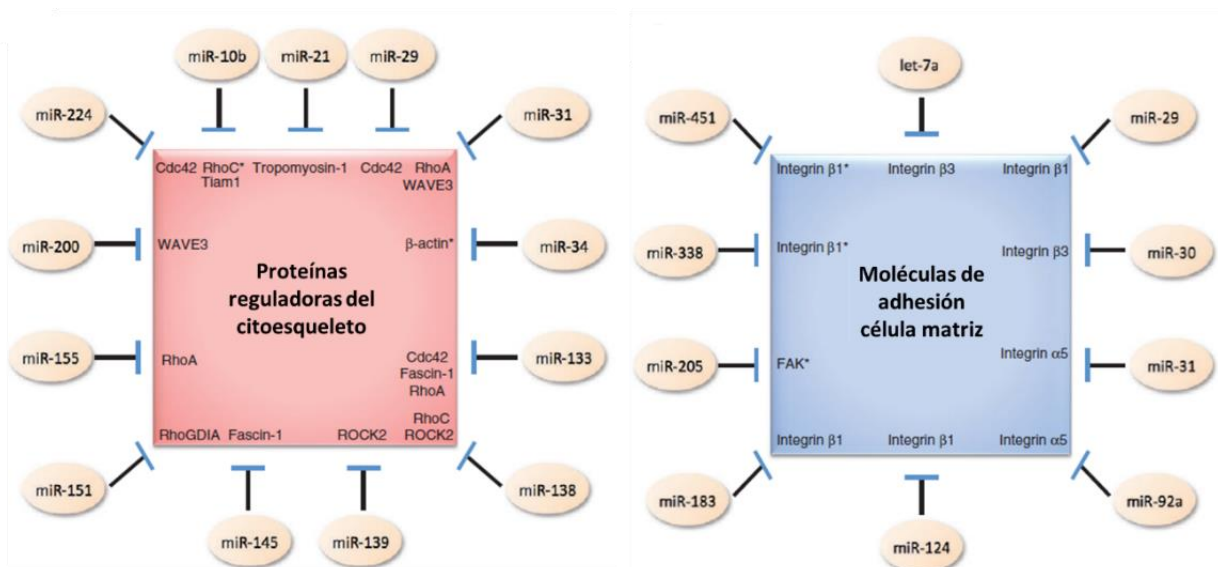


Figura 2. Regulación de moléculas de adhesión celular (Adaptada de Valastyan & Weinberg, 2011)

1.3. GLOMERULONEFRITIS

El término glomerulonefritis (GN) se emplea para referirse a las enfermedades que afectan a la estructura y función del glomérulo, aunque posteriormente pueden resultar afectadas las demás estructuras de la nefrona (15).

Se trata de una enfermedad renal con diversas causas y manifestaciones clínicas. Muchas de esas enfermedades se caracterizan por la inflamación de los glomérulos, de ahí su nombre, pero no todas tienen un componente inflamatorio.

El médico británico Richard Bright, conocido por sus numerosas contribuciones a la medicina, presentó en 1827 la caracterización de la GN. Este término fue propuesto por Edwin Klebs en 1875 y se ha usado como equivalente a la “enfermedad de Bright” desde que F. Volhard y T. Fahr lo incorporaron en su clasificación de las patologías renales en 1914.

Los glomérulos pueden ser dañados por una variedad de factores y durante el transcurso de muchas enfermedades sistémicas, por lo tanto, la lesión glomerular es provocada por diversas causas, lo que resulta en daño y proliferación de los diferentes tipos de células glomerulares. Dependiendo de la célula afectada, encontramos distintos patrones de proliferación. Y diferentes etiologías, pueden dar patrones similares.

1.3.1. Nefropatía IgA

La Nefropatía por IgA (GN IgA) es la forma de GN más frecuente, y se considera una de las causas principales de la enfermedad renal terminal (ERCT) (16,17). Se puede presentar a cualquier edad, existiendo un pico en la segunda y tercera década de la vida, afectando más a varones en una razón 2-3:1 (18).

a. Información clínica

Presenta una gama de síntomas clínicos que van desde la hematuria microscópica asintomática hasta un curso más severo, que incluye proteinuria persistente y un rápido deterioro de la función renal (16). La manifestación clínica dependerá de la edad del individuo. En más del 75% de los casos pediátricos, se observa hematuria macroscópica después de un episodio reciente de infección respiratoria o gastrointestinal. En el caso de los adultos, la presentación habitual incluye proteinuria, hematuria microscópica o hipertensión arterial (HTA), ya sea individualmente o en combinación.

El síndrome nefrótico y la GN de progresión rápida se observan en menos del 10% de los casos. Aunque es raro, algunos casos comienzan con HTA maligna. También es poco común que se presente con insuficiencia renal aguda (IRA), con o sin oliguria; esto

generalmente se debe a la presencia de semilunas o a la hematuria glomerular que resulta en obstrucción o daño tubular (19).

b. Patogenia

La patogénesis de la GN IgA es un tema de investigación en curso. Se ha demostrado que tanto la susceptibilidad genética como los factores de riesgo ambientales influyen en su desarrollo (17,20). Aunque no se considera una enfermedad hereditaria mendeliana, presenta un fuerte componente genético con una heredabilidad estimada del 40 al 50% (21). Los estudios genéticos de la GN IgA se han basado en dos enfoques fundamentales: estudios de vinculación basados en la GN IgA familiar y estudios de asociación de casos y controles basados en la GN IgA esporádica. Los estudios de asociación de casos y controles se pueden dividir en dos categorías: estudios de asociación de genes candidatos y estudios de asociación del genoma completo (GWAS) (17). La evidencia actual favorece una etiología multifactorial que involucraría varios pasos.

En 2011, Suzuki y colaboradores (22) plantearon la hipótesis de que la patogénesis de la GN IgA se basa en cuatro factores: primero, la aparición de un proceso anormal de glicosilación de IgA1 que conduce a una IgA1 deficiente en galactosa (Gd-IgA1); segundo, la formación de anticuerpos antiglicano contra Gd-IgA1; tercero, la formación de complejos inmunes circulantes nefrogénicos; cuarto, el depósito de estos complejos en el mesangio de los glomérulos, lo que conduce a una lesión renal con expresión clínica variable. Sin embargo, la patogénesis exacta no está muy clara. Muchos estudios también han demostrado una predisposición genética a la GN IgA (23).

A medida que se ha ido comprendiendo mejor la patogénesis de la GN IgA, se ha considerado que la glicosilación anormal de IgA1 es el mecanismo patogénico más relevante. Por lo tanto, en la patogénesis, el primer acontecimiento es el depósito mesangial de Gd-IgA1 (24).

c. Anatomía patológica

El examen histológico muestra lesiones variables, sin embargo, lo más común es un aumento de la matriz y de la celularidad mesangial. También se pueden observar focos de necrosis, semilunas y esclerosis segmentaria (es decir, que afecta sólo a una parte de un glomérulo) (18). Los hallazgos de inmunofluorescencia (IF) son los que definen la

enfermedad, siendo la característica patológica la acumulación de un complejo inmune dominado por IgA en el área mesangial (17).

Se han descrito varios sistemas para clasificar las lesiones microscópicas, sin embargo, hasta el momento no hay una clasificación universalmente aceptada. La más usada es la de Hass (Tabla 2) y la clasificación de Oxford (Score MEST):

I	Mesangio-proliferativa mínima
II	Esclerosante focal
III	Proliferativa focal
IV	Proliferativa difusa
V	Esclerosante crónica

Tabla 2. Clasificación de Hass de GN IgA

- Hiper celularidad mesangial: presencia de hiper celularidad mesangial en menos o más del 50% de los glomérulos (M0/M1).
- Hiper celularidad endocapilar: ausencia de hiper celularidad, o presente en pared o en el interior del capilar glomerular que provoca estrechamiento de la luz (E0/E1).
- Glomeruloesclerosis segmentaria: ausencia o presencia de esclerosis en cualquier parte del penacho glomerular en al menos un glomérulo de la muestra (S0/S1).
- Atrofia tubular/fibrosis intersticial: porcentaje de área cortical afecta por atrofia tubular o fibrosis intersticial T0 (0-25%), T1 (26-50%), T2 (> 50%).

A este Score MEST, se propuso añadir la presencia de semilunas (en inglés *crescents*), denominándose MEST-C (25); C0, no semilunas, C1 semilunas celulares y fibrocelulares en < 25% de los glomérulos y C2 > 25% de los glomérulos con semilunas.

d. Inmunofluorescencia

Se observa depósito mesangial de IgA, que suele contener C3 y menores cantidades de IgG o IgM, lo que es característico y determinante de la enfermedad.

e. Tratamiento

A pesar de los avances progresivos en la comprensión de la patogénesis de la GN IgA, todavía no existe un tratamiento específico para alterar la producción de complejos inmunes IgA patógenos o prevenir su depósito mesangial. Por lo tanto, muchas de las estrategias de tratamiento actuales son genéricas para otras formas de enfermedades

glomerulares crónicas, es decir, bloqueo renina-angiotensina, reducción de la proteinuria y control de la presión arterial (PA) (26).

Varios grupos de expertos han dado recomendaciones según los estudios disponibles, que se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamiento de la GN IgA según las Guías KDIGO

Recomendación
- IECA o BRA si proteinuria > 1g/d. Incrementar dosis según PA
Sugerencias
Proteinuria
- IECA o BRA si proteinuria 0,5-1 g/d
- Corticoides (6 meses) si proteinuria > g/d después de 3-6 meses de terapia con IECA/BRA y eGFR > 50 ml/min
- Aceite de pescado si proteinuria > 1g/d después de 3-6 meses de terapia apropiada
Presión arterial (diana)
- < 130/80 mmHg si proteinuria < 1 g/d
- < 125/75 mmHg si proteinuria > 1 g/d
IR rápidamente progresiva
- Corticoides y ciclofosfamida (o azatioprina) si GN extracapilar con semilunas (> 50%) y rápido deterioro de la función renal
- Tratamiento de soporte si NTA o cilindros hemáticos en la biopsia
Tratamiento sin beneficio probado
- Inmunosupresores con eGFR < 30 ml/min a menos que presenten semilunas y rápido deterioro de la función renal
- Microfenolato
- Agentes antiplaquetarios
- Amigdalectomía

IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina; BRA: Bloqueantes de receptores de angiotensina; PA: Presión arterial; eGFR: Filtración glomerular estimada; IR: Insuficiencia renal; NTA: Necrosis tubular aguda.

Inicialmente, existen dos aproximaciones terapéuticas (18):

1. Intervenciones generales no específicas, para ralentizar el deterioro de la función renal. Estas se hacen en los pacientes que tienen riesgo de progresión.

2. Tratamiento con corticoides u otros inmunosupresores dirigidos específicamente a los mecanismos patogénicos implicados. Estas medidas se hacen en pacientes seleccionados.

1.3.2. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria

La glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) es una entidad clinicopatológica caracterizada por proteinuria, con o sin características de síndrome nefrótico (27). No es una enfermedad sino un patrón morfológico, caracterizado por una esclerosis que afecta parte del ovillo de algunos glomérulos (lesión segmentaria y focal) y por una fusión de extensión variable de los pedicelos (28).

Este patrón histológico es el resultado de diversos procesos patogénicos que comparten, como mecanismo, la lesión de los podocitos, que a su vez conduce a la pérdida de selectividad de la barrera de filtración glomerular (BFG) y proteinuria (29,30).

a. Información clínica

La característica común a todas las formas de GEFS es la proteinuria, que puede aparecer como dato aislado, asociada a microhematuria, HTA o reducción del filtrado glomerular, en forma de síndrome nefrótico o de una combinación de todas ellas (28).

Las variantes idiopáticas de la GEFS, así como las que son consecuencia de mutaciones, infecciones virales o toxicidad medicamentosa, tienden a manifestarse como síndrome nefrótico. Sin embargo, en ciertos casos, la proteinuria puede ser de menor grado y la falta de síndrome nefrótico no descarta estas causas. Se estima que alrededor del 50% de los casos muestran microhematuria. La HTA es un hallazgo relativamente frecuente (25-50% de los casos) en los pacientes adultos, más común que en los niños, y generalmente se asocia con una disminución de la filtración glomerular.

b. Patogenia

De acuerdo con los mecanismos fisiopatológicos actualmente conocidos, se pueden distinguir las formas primarias (GEFSp), secundarias, hereditarias y las de etiología desconocida de la GEFS.

- Las GEFSp tienen un origen inmunológico. Son provocadas por uno o varios factores circulantes aún no identificados que son tóxicos para el podocito. La

mayoría de estos casos responden al tratamiento inmunosupresor (IS) y la mitad de los que se someten a un trasplante renal (TR) experimentan una recaída.

- Las formas secundarias son “postadaptativas” a una disminución en el número de nefronas funcionales o son causadas por la toxicidad directa de medicamentos o infecciones virales en el podocito (31).

- Las formas hereditarias surgen de mutaciones en más de 60 genes que codifican proteínas que juegan un papel crucial en la estructura y función de la BFG (32). Estas formas se vuelven más prevalentes como causa de síndrome nefrótico corticorresistente (SNCR) a medida que aumenta la edad. El fenotipo puede variar considerablemente dependiendo del gen mutado, y es posible que algunos genes, que se conocen por estar asociados a síndromes específicos, se manifiesten únicamente como una afectación renal (32). Después de un TR, no se producen recaídas.

- En ciertos casos, ninguna de las causas mencionadas se encuentra presente y se habla de GEFS de etiología desconocida. La presentación clínica de estos casos es similar a la de las formas secundarias. Podría tratarse de formas secundarias cuya causa no se ha detectado o de formas hereditarias que no han sido diagnosticadas (33).

Así, desgranando cada uno de los componentes de esta entidad, comenzamos por la glomeruloesclerosis: Los podocitos anclados a la MBG subyacente presentan una exposición continua al flujo del filtrado primario, aumentando su propensión al desprendimiento y pérdida en la orina. Los podocitos son células con diferenciación terminal incapaces de proliferar para compensar las células perdidas, y a su vez, la capacidad de los podocitos colindantes para hipertrofiarse y cubrir áreas desnudas de la MBG es limitada. El estrés causado por el proceso de hipertrofia y extensión sobre áreas desnudas de la MBG debilita la unión de los podocitos restantes a ésta, provocando que se desprendan. De esta manera, el desprendimiento de podocitos y la denudación de la MBG se convierten en procesos que persisten en sí mismos. La MBG tiende a protruir en estas áreas desnudas porque los podocitos ya no se oponen a la presión hidrostática capilar intraglomerular, por lo que se producen uniones sinequiales con las células epiteliales parietales y la cápsula de Bowman. Cuando la pérdida de podocitos ha

alcanzado un punto crítico, el asa capilar colapsa y se acumula la MEC, creando así la obliteración segmentaria característica del penacho capilar glomerular (34).

El término focal indica un compromiso heterogéneo de los glomérulos en la corteza renal. No obstante, el análisis morfológico seriado en las diversas formas de GEFS muestra que las lesiones escleróticas afectan a la gran mayoría de los glomérulos (35), lo que revela que la GEFS no es tan focal como su nombre indica.

El patrón segmentario revela que afecta a una porción del penacho glomerular, característico de la lesión de GEFS, y debe distinguirse de la glomeruloesclerosis global focal inespecífica (que afecta a todo el penacho glomerular) observada en el envejecimiento y la nefropatía hipertensiva (36).

c. Anatomía patológica

La lesión característica es una esclerosis que afecta a parte del ovillo glomerular (segmentaria) de algunos glomérulos (focal). Se asocia a un colapso de las asas capilares, con aumento de la matriz mesangial y condensación en el polo vascular, perihiliar y a una lesión focal de hialinosis (28). La afección es mayor en glomérulos yuxtamedulares, por ello, biopsias excesivamente superficiales pueden llevar a la clasificación errónea de nefropatía por cambios mínimos. Las áreas de esclerosis son característicamente PAS (*Periodic Acid-Schiff*) positivas y tiñen intensamente con plata metenamina. En tinciones de hematoxilina y PAS, se aprecian zonas de contenido amorfo y desestructurado con colapso de las luces capilares. Los podocitos circundantes pueden tener aspecto hipertrófico o hiperplásico. En algunas ocasiones, el contenido tiene un aspecto hialino, eosinofílico y tiñe intensamente con el PAS, pero no con la plata. Se considera que, en estos casos, los depósitos están conformados por acúmulos de proteínas plasmáticas extravasadas al espacio urinario. Se describen estas lesiones como hialinosis en lugar de esclerosis. En una misma biopsia pueden apreciarse lesiones de ambos tipos.

Los glomérulos sin lesiones suelen tener un aspecto normal, pero en casos secundarios a respuestas adaptativas o hiperfiltración pueden mostrar aumento de volumen e hipertrofia o, por el contrario, en casos secundarios a arteriolo-nefroangioesclerosis, pueden presentar signos indirectos de isquemia. Por otra parte, la pérdida de podocitos

puede causar una desestructuración de la arquitectura del ovillo glomerular y dar lugar a una imagen de falso incremento en la celularidad mesangial.

Es común observar en el intersticio áreas de atrofia tubular, fibrosis intersticial e infiltración inflamatoria. En los túbulos, al igual que en otras causas del síndrome nefrótico, es habitual la presencia de gotas de reabsorción PAS positivas. A menudo se detecta cierto grado de fibrosis de la íntima arterial y arterioloesclerosis hialina, especialmente en pacientes adultos.

La clasificación de Columbia subdivide la lesión de la GEFS (37,38), independientemente de la etiología subyacente o la patogenia, en cinco variantes morfológicas (Tabla 4): variante no especificada (NOS), perihiliar, celular, tip y colapsante. Estas clases histológicas no tienen correlación ni con los mecanismos fisiopatológicos ni con la respuesta al tratamiento. Tampoco tienen un valor pronóstico.

La variante NOS es la más frecuente, se presenta en igual medida en formas primarias y secundarias, y por definición, se deben excluir las otras cuatro variantes. Se pueden observar lesiones hialinas, hiper celularidad mesangial, hipertrofia-hiperplasia de podocitos o glomerulomegalia.

Para el diagnóstico de la variante perihiliar, es necesario descartar las variantes hiper celular y colapsante. Por lo tanto, si existen numerosos glomérulos con lesiones perihiliares, pero al menos uno presenta una lesión hiper celular o colapsante, el diagnóstico será el de éstas últimas respectivamente. La presencia de un glomérulo con “tip lesion” no excluye esta categoría.

En cuanto a la variante tip, primero, es importante aclarar que el extremo del penacho glomerular adyacente al origen del túbulo proximal se denomina extremo “tip”, o en español, extremo “de la punta”. Para diagnosticar esta lesión, es necesario eliminar la posibilidad de la variante colapsante, es decir, si existe al menos un glomérulo con las características de esta última, la variante tip queda descartada. Además, si hay lesiones en localización perihiliar, también excluye la variante tip, considerando que las lesiones en la tip son de naturaleza periférica.

Para el diagnóstico de la variante celular, es imprescindible descartar tanto la variante tip como la variante colapsante. Por lo tanto, si hay al menos un glomérulo con lesión tip o con rasgos de colapsante, esta variante queda excluida. Se caracteriza por la presencia de al menos un glomérulo con hiper celularidad endocapilar que afecta al menos el 25% del ovillo y obstruye las luces capilares, y puede afectar cualquier segmento, ya sea perihiliar o periférico. Las células endocapilares pueden incluir células endoteliales y macrófagos, además, se pueden identificar polimorfonucleares y linfocitos, así como cariorrexis, depósitos hialinos y apoptosis. En ocasiones, puede haber fibrina, pero no debe identificarse ruptura de la MBG (en estos casos, se debe sospechar una GN necrotizante). Puede haber hipertrofia/hiperplasia de podocitos y sinequias a la cápsula de Bowman.

La variante colapsante, que excluye todas las demás variantes, se define por la afectación de al menos un glomérulo con colapso capilar y evidente hipertrofia e hiperplasia de podocitos. Las paredes capilares muestran retracción y colapso. Las lesiones pueden ser segmentarias o globales y afectar segmentos periféricos o perihiliares. El número de glomérulos afectados puede variar mucho. Es raro encontrar sinequias a la cápsula de Bowman y lesiones hialinas. En otros glomérulos pueden encontrarse lesiones de cualquier categoría: esclerosis, hiper celularidad endocapilar, lesión tip o lesiones esclerosantes globales.

d. Inmunofluorescencia

En las lesiones segmentarias es común encontrar depósitos de IgM y C3. Si se detectan depósitos mesangiales extensos de IgM en áreas sin esclerosis debería sugerir el diagnóstico de GN proliferativa mesangial IgM, en lugar de una GEFS. Así, en los glomérulos que no presentan lesiones y en las partes del ovillo glomerular que no muestran signos de esclerosis o hialinosis, no se observan depósitos de inmunoglobulinas o complemento.

Tabla 4. Variantes histopatológicas de GEFS según la clasificación de Columbia

Variante	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Clásica o NOS	Al menos un glomérulo con aumento segmentario de la matriz obliterando la luz capilar. Puede haber colapso segmentario de la pared capilar glomerular sin hiperplasia podocitaria.	Perihiliar Celular Tip Colapsante
Perihiliar	Al menos un glomérulo con lesiones de hialinosis perihiliar, con o sin esclerosis. > 50% de los glomérulos con lesiones segmentarias deben tener esclerosis o hialinosis perihiliar.	Celular Tip Colapsante
Celular	Al menos un glomérulo con hiper celularidad segmentaria endocapilar ocluyendo la luz, con o sin células espumosas o cariorrexis, comprometiendo por lo menos el 25% del ovillo.	Tip Colapsante
Tip	Al menos una lesión segmentaria del ovillo, que compromete el dominio tubular (Tip) (inicio del túbulo proximal). El polo tubular debe estar identificado en la lesión. Debe haber una adhesión o confluencia de podocitos junto a células parietales o tubulares en la luz. La lesión puede ser celular (< 50% ovillo) o esclerosante (< 25% ovillo).	Colapsante y cualquier tipo de esclerosis perihiliar
Colapsante	Al menos un glomérulo con colapso capilar segmentario o global, rodeado de podocitos hipertróficos e hiperplásicos.	Ninguno

e. Tratamiento

En las formas primarias de la enfermedad el tratamiento inicial recomendado son los corticoides. Sin embargo, en las formas secundarias el enfoque terapéutico se dirige, siempre que sea factible, a tratar la causa subyacente. En estas situaciones, los corticoides y los anticalcineurínicos generalmente no se recomiendan.

Las formas genéticas no muestran respuesta a los IS, sin embargo, en la mayoría de los casos, la proteinuria disminuye con el uso de inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (iSRAA). Esto se ha observado especialmente en pacientes que presentan mutaciones en los genes *COL4* (39).

Por otro lado, los pacientes que poseen mutaciones en el gen *EMP2* o en genes que codifican para proteínas que interactúan con las Rho-GTPasas, muestran una remisión parcial al ser tratados con corticoides. Además, se ha observado que pacientes con ciertas mutaciones, como por ejemplo en el gen *WT1* (40), pueden mostrar una respuesta parcial a los anticalcineurínicos. Finalmente, es importante mencionar que los pacientes con mutaciones en el gen *COQ8B/ADCK4* deben recibir suplementación temprana con Coenzima Q10 (41).

1.3.3. Glomerulonefritis membranoproliferativa

La GN mesangiocapilar, también conocida como GN membranoproliferativa (GNMP), incluye un conjunto de enfermedades glomerulares infrecuentes que presentan una lesión histológica distintiva y pueden surgir de una variedad de mecanismos patogénicos. El patrón glomerular típico se manifiesta por una hiper celularidad mesangial, un engrosamiento de la MBG y una interposición mesangial en la pared capilar, lo que a menudo da al glomérulo una apariencia lobulada. Estas modificaciones observadas en la microscopía óptica son el resultado de la acumulación de inmunoglobulinas, factores del complemento o ambos, en la pared capilar y en el mesangio (42).

a. Información clínica

Los individuos con GNMP pueden exhibir una amplia gama de síntomas y signos que van desde la microhematuria aislada, con o sin proteinuria, hasta la aparición de síndrome nefrótico, sin que haya una correlación directa entre la forma patológica y la presentación clínica. Solo en la enfermedad de depósitos densos (EDD) se han reportado asociaciones con lipodistrofia parcial y cambios oculares en forma de retinopatía, con la presencia de drusas, neovascularización y degeneración macular. Aunque se pueden ver formas de progresión rápida, la trayectoria común es la progresión lenta de la enfermedad renal (42).

b. Patogenia

La clasificación reciente basada en IF distingue entre GNMP mediada por complejos inmunes, con depósitos glomerulares de IgG y C3, y glomerulopatías C3 (GnC3), con depósitos predominantes de C3 (43), con implicaciones etiológicas y terapéuticas (44).

1. GNMP mediada por inmunocomplejos: se caracteriza por el depósito de inmunocomplejos y elementos del complemento.

La GNMP mediada por complejos inmunes se origina por la presencia de una antigenemia persistente que provoca la formación de complejos antígeno-anticuerpo circulantes. Estos complejos desencadenan la activación de la vía clásica del complemento y el depósito de varios de sus factores junto con inmunoglobulinas en la MBG y el mesangio, siguiendo el patrón característico de GNMP. Varias enfermedades podrían inducir este efecto: GNMP asociada a VHC (virus de la Hepatitis C) y otras infecciones virales, disproteinemias y enfermedades autoinmunes.

2. GNMP mediada por complemento: se caracteriza por el depósito de componentes del complemento en ausencia de inmunocomplejos.

La GNMP mediada por complemento es menos común que la mediada por inmunocomplejos y resulta de la desregulación y continua activación de la vía alternativa del complemento. Esta GN se produce por el depósito de complemento en el mesangio y a lo largo de la pared capilar. La IF del riñón identifica la presencia predominante de C3, con ausencia o mínima presencia de inmunoglobulinas. Por ello ha recibido el nombre de GnC3.

Según el patrón mostrado en la ME (microscopía electrónica), dentro de este tipo de GN se distinguen dos entidades: EDD, en la que hay una transformación densa característica de la MBG (45) y GnC3 propiamente dicha. En la primera, los depósitos se localizan intramembrana, y en la segunda, se localizan subendoteliales y en el mesangio, con pocos depósitos subepiteliales.

Se ha sugerido que estas variaciones morfológicas podrían representar simplemente distintos niveles o etapas en la desregulación de la vía alternativa del complemento o del complejo de ataque a la membrana, y que podríamos estar viendo un espectro de la misma enfermedad. De hecho, se han identificado mutaciones genéticas comunes en los componentes reguladores de la vía alternativa del complemento o anticuerpos frente a ellos en ambos tipos.

Por lo tanto, se han implicado mutaciones en proteínas que controlan la actividad y el ensamblaje de la C3 convertasa y la degradación de C3b, como el factor H (FH), I y B, y la proteína 5 relacionada con el FH. También se han asociado ciertos polimorfismos genéticos de los factores H y B, la proteína cofactor de membrana y C3 a la GnC3. En aproximadamente el 71% de los pacientes se han detectado anomalías adquiridas o hereditarias (mutaciones) de la vía alternativa del complemento, siendo la anomalía más común la presencia del factor nefrítico C3 (C3NeF). C3NeF es un autoanticuerpo que estabiliza la actividad de la convertasa C3, haciéndola resistente a los efectos de degradación del FH, aumentando así la vida media de la convertasa C3 y promoviendo la amplificación de la vía alterativa del complemento (46).

A pesar de los numerosos factores genéticos descritos hasta la fecha, la GNMP asociada a alteraciones en el complemento a menudo se desarrolla en etapas avanzadas de la vida, lo que sugiere la intervención de otros factores ambientales. Por otro lado, la GNMP no se desarrolla en todos los miembros afectados de familias de “alto riesgo” genético.

c. Anatomía patológica

En la GNMP el daño renal inicial se produce por la acumulación de inmunoglobulinas, elementos del complemento, o ambos, en el mesangio y en el endotelio capilar. Este depósito desencadena la llegada de células inflamatorias y el consiguiente daño inflamatorio (celular o proliferativo).

En una etapa posterior de reparación, se formará una nueva matriz mesangial (expansión mesangial) y una nueva MBG que, en conjunto, proporciona la imagen de expansión mesangial y doble contorno de la MBG.

Las alteraciones mesangiales varían entre los pacientes, aunque suelen ser uniformes entre los glomérulos de una biopsia. En ocasiones, el componente exudativo es tan significativo que puede sugerir una GN postinfecciosa.

La presencia de “trombos hialinos” en el interior de las luces capilares obliga a descartar la crioglobulinemia o Lupus Eritematoso Sistémico (LES), responsable del patrón histológico membranoproliferativo. Los trombos hialinos no son verdaderos trombos, sino agregados de inmunocomplejos que llenan las luces capilares.

d. Inmunofluorescencia

La IF permite determinar si el daño renal en la GNMP ha sido provocado por inmunocomplejos o por una alteración en la vía alternativa del complemento. De manera general, en el primer caso se encuentran depósitos de inmunoglobulinas y factores del complemento de la vía clásica, mientras que en el segundo caso son característicos depósitos de C3, principalmente. Por ejemplo, la GNMP asociada a gammapatía monoclonal presenta inmunoglobulinas con restricción a cadenas ligeras lambda o kappa. La GNMP asociada a la infección por el VHC muestra típicamente IgM, IgG, C3, kappa y lambda. En las formas asociadas a enfermedades autoinmunes, se observan frecuentemente inmunoglobulinas y proteínas del complemento como IgG, IgM, IgA, C1q, C3, kappa y lambda. La GNMP mediada por complemento se caracteriza por depósitos de C3 en el mesangio y en la pared capilar, sin marcados depósitos de inmunoglobulinas.

e. Tratamiento

El tratamiento de las GNMP estará condicionado por la enfermedad subyacente. Por ello, es fundamental realizar una evaluación profunda para establecer el diagnóstico etiológico que guiará la actitud terapéutica (42).

En relación con la GNMP idiopática, hay poca evidencia sobre su tratamiento y los escasos estudios controlados se han llevado a cabo en niños. El tratamiento se determina en función de la gravedad del daño renal. Los pacientes con función renal preservada y proteinuria no nefrótica pueden ser tratados con iSRAA para controlar la PA y la proteinuria. Las guías clínicas aconsejan la terapia IS en pacientes con IR progresiva, síndrome nefrótico persistente o daño histológico grave (proliferación extracapilar difusa). Se sugiere un ciclo de tratamiento con esteroides para los casos que muestren síndrome nefrótico persistente o deterioro de la función renal. En los casos que no respondan, basándose en estudios observacionales, se considera añadir un segundo medicamento IS, micofenolato sódico en caso de deterioro de la función renal o tacrolimus en síndrome nefrótico con función renal conservada (46). En las formas rápidamente progresivas con presencia de proliferación extracapilar en la biopsia, se sigue recomendando el régimen de esteroides y ciclofosfamida o esteroides y rituximab. Finalmente, el tratamiento antiagregante, que se investigó en varios ensayos clínicos,

demostró ser beneficioso en la ralentización de la progresión de la IR y la reducción inicial de la proteinuria, pero la tasa de eventos hemorrágicos fue alta y no se confirmaron los efectos beneficiosos en el seguimiento a largo plazo (42).

1.4. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y GLOMERULONEFRITIS

Las moléculas de adhesión, fundamentales en procesos biológicos como la diferenciación celular, la hemostasia, la inflamación y la inmunidad, muestran patrones de expresión alterados en patología glomerular (tabla 5). En enfermedades renales como la vasculitis y la GN lúpica, durante las fases activas, se observa un incremento en las selectinas E y P, ICAM-1 y VCAM-1; mientras que las integrinas y las Ig-like desempeñan un papel crucial en la inflamación observada en las GN proliferativas.

Los análisis inmunohistoquímicos han revelado una expresión elevada de ICAM-1 en el glomérulo en las GN proliferativas, en comparación con el riñón normal. Esta sobreexpresión es particularmente notable en las GN rápidamente progresivas por anticuerpos anti-MBG y por inmunocomplejos, y en las vasculitis (8,47).

En cuanto a VCAM-1, se encuentra anormalmente expresada en las células endoteliales de los capilares glomerulares en diversas enfermedades, incluyendo la crioglobulinemia, el LES y las vasculitis. Además, VCAM-1 se expresa en las células mesangiales en las GN proliferativas con proliferación extracapilar y se sobreexpresa en el túbulo proximal en las mismas.

La integrina $\beta 1$ VLA-5 se sobreexpresa en el mesangio en la GNMP y GN IgA, lo que sugiere interacciones de la célula mesangial con las proteínas de matriz.

Finalmente, aunque la expresión de las selectinas en las GN humanas es menos conocida, se ha observado la inducción de la expresión de selectina-E y selectina-P en los capilares glomerulares en algunas GN proliferativas, incluyendo la GN lúpica. La selectina-E también se detecta en los capilares glomerulares en la GN causada por anticuerpos contra la MBG.

Estas ideas resaltan la importancia de las moléculas de adhesión en la fisiopatología y el curso clínico de la GN, así como su potencial como dianas terapéuticas y marcadores de enfermedad.

Tabla 5. Papel de las principales moléculas de adhesión en GN

Molécula de adhesión	GN
Inmunoglobulinas-like	
	GN RP por anticuerpos anti-MBG
ICAM-1	GN RP por inmunocomplejos. GN proliferativas (LES, crioglobulinemia, GN IgA)
	GN RP asociadas a ANCA
VCAM-1	GN RP
	GN lúpica, crioglobulinemia
Integrinas $\beta 1$	
VLA-3	Nefropatía membranosa
VLA-4	GN RP. GN lúpica, crioglobulinemia
VLA-5 (ITGA5)	GNMP, GN IgA
Integrinas $\beta 2$	
LFA-1	GN RP por anticuerpos anti-MBG
	GN proliferativas (LES, crioglobulinemia, GN IgA)
Mac-1	GN RP por anticuerpos anti-MBG
Selectinas	
Selectina-E	GN RP por anticuerpos anti-MBG
Selectina-P	GN proliferativas (LES, GN IgA)

ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM: molécula de adhesión vascular; VLA: very late activation (activación muy tardía); LFA: leucocyte function associated (asociada a la función leucocitaria); Mac: macrófago (receptor del complemento 3); RP: rápidamente progresiva; MBG: membrana basal glomerular; ANCA: anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos.

1.5. TIPOS DE MUTACIONES

Las mutaciones son cambios en la secuencia de ADN (Ácido desoxirribonucleico) de un organismo. Estos cambios pueden tener un impacto significativo en la función de los genes y las proteínas que codifican. En el contexto de las moléculas de adhesión en glomerulopatías, las mutaciones pueden afectar la forma en que estas moléculas interactúan y funcionan, pudiendo tener implicaciones en el desarrollo de la enfermedad.

Los tipos de mutaciones se pueden describir atendiendo al mecanismo de alteración que se produce en el ADN o por el efecto en la expresión.

Mecanismo de alteración

Mutaciones Puntuales (SNV “*Single nucleotide variant*” o MNV “*multi- nucleotide variant*”): Son el tipo más común de mutación y ocurren cuando una sola base o un pequeño número de ellas se altera.

Inserciones y Deleciones (*Indels*): Las inserciones se producen cuando se añaden uno o más pares de bases al ADN, y las deleciones cuando se elimina uno o más pares de bases. Estas mutaciones pueden causar un desplazamiento en la pauta de lectura, que cambia la forma en que se lee el ADN, lo que puede tener un gran impacto en la proteína resultante.

Efecto de la mutación

Mutaciones Silenciosas: No provocan un cambio en la proteína producida, ya que el codón que se genera de novo transcribe para el mismo aminoácido.

Mutaciones *Missense* (cambio de sentido): El cambio resulta en la transcripción de un aminoácido diferente. Esto puede resultar en una proteína con una función alterada o reducida.

Mutaciones *Nonsense* (sin sentido): Mutaciones que resultan en un codón de parada prematuro. Esto puede llevar a la producción de una proteína truncada que a menudo no es funcional.

Mutaciones *Essential Splice*: Estas mutaciones ocurren en los sitios de empalme del ADN, que son las regiones que ayudan a determinar cómo se ensamblan los exones (las partes codificantes de los genes) durante el proceso de transcripción del ADN al ARN. Las mutaciones en estos sitios pueden llevar a la inclusión o exclusión de ciertos exones, lo que puede alterar significativamente la proteína resultante.

Estos tipos de mutaciones pueden tener un impacto significativo en la función de las moléculas de adhesión en las glomerulopatías. Una mutación *missense* podría alterar la estructura de la molécula de adhesión afectando su capacidad para interactuar con otras moléculas, y una mutación *nonsense* podría resultar en una molécula de adhesión truncada que no puede funcionar correctamente.

2. *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*

2.1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La mayor parte de glomerulopatías conlleva una proliferación celular y/o una pérdida del diálogo intercelular y célula-estroma que está mediado fisiológicamente por moléculas de adhesión celular.

Si bien existen estudios aislados acerca de la expresión anómala de proteínas y miARN en dichas moléculas, no se ha planteado en la literatura un estudio genético de moléculas de adhesión en glomerulopatías primarias sobre material tisular que permita detectar variantes somáticas.

Nuestra hipótesis es que un defecto funcional presente en ciertas moléculas de adhesión celular, causado por mutaciones detectables por métodos de secuenciación masiva, podría contribuir a un genotipo susceptible de desarrollo de GN.

Por otro lado, podría existir un patrón mutacional diferenciador de cada entidad que permitiría clasificarlas en subgrupos definidos clínico-patológicamente con la posibilidad de un diagnóstico precoz.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

Descripción del perfil mutacional en moléculas de adhesión de tres de los tipos más frecuentes de glomerulopatías (GN IgA, GEFS y GNMP), mediante paneles de secuenciación dirigida (NGS, *Next generation sequencing*), utilizando muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFIP).

2.2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1. Recopilar una serie de casos confirmados en biopsia de patología glomerular, englobando GN IgA, GEFS y GNMP.

Objetivo 2. Estudiar los principales genes relacionados con los mecanismos de adhesión célula-célula y célula-matriz, mediante técnicas de secuenciación masiva.

Objetivo 3. Establecer patrones mutacionales comunes y diferenciadores en cada una de las tres entidades por ensayos de asociación estadística.

3. *MATERIALES Y MÉTODOS*

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de casos y controles.

3.2. ÁMBITO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, hospital de tercer nivel en la Comunidad Autónoma de Cantabria. La selección de los pacientes se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica, a partir de la revisión de muestras enviadas desde el Servicio de Nefrología.

3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron 64 pacientes con patología glomerular demostrada con biopsia renal, desde el año 2004 al 2020, que habían acudido al Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, a los que se realizó biopsia renal con posterior envío de las muestras al servicio de Anatomía Patológica para su estudio. A todos los pacientes se les hizo un seguimiento clínico de al menos 3 años.

Como grupo control se seleccionaron un total de 16 pacientes con función renal conservada, obteniendo tejido renal normal correspondiente a cuñas renales de donantes potenciales y nefrectomías radicales (tabla 6).

Se excluyeron del estudio los pacientes con nefropatía diabética o nefropatía hipertensiva. Los pacientes fueron clasificados en estadios de enfermedad renal crónica (ERC) según la clasificación establecida por KDIGO (48): estadio 1, con tasa de filtración glomerular (TFG) normal o alto (≥ 90 ml/min); estadio 2, ERC leve (60-89 ml/min); 3a (45-59 ml/min); 3b (30-44 ml/min); estadio 4, ERC grave (15-29 ml/min); y estadio 5 (<15 ml/min).

Se proporcionan definiciones para los términos de proteinuria subnefrótica, proteinuria en rango nefrótico, y síndrome nefrótico. Durante la evaluación diferencial de los pacientes, se hizo una distinción entre:

1. Síndrome nefrótico, definido como una excreción urinaria de proteínas igual o superior a 3,5 g/24 h y una concentración sérica de albúmina igual o superior a

3,5 g/dl. Este síndrome a menudo viene acompañado de hiperlipidemia, lipiduria y/o edema, aunque no siempre es así.

2. Proteinuria en rango nefrótico, definida como una excreción urinaria de proteínas igual o superior a 3,5 g/24 h, en ausencia de una concentración de albúmina sérica baja.
3. Proteinuria subnefrótica, definida como una excreción urinaria de proteínas que es mayor a 0,2 g/24 h, pero menor a 3,5 g/24 h (34).

Tabla 6. Grupo control

	Cuña renal, donante	Nefrectomías		Total
		Tumoración	Otros	
M	2	1	2	5
V	4	6	1	11
Total	6	10		16

M, mujer; V, varón

3.4. MUESTRAS

Las muestras correspondieron a biopsias por aguja de riñón propio de los pacientes con glomerulopatía primaria, que se recibieron en fresco, de carácter urgente.

La distribución de las glomerulopatías primarias analizadas correspondió a 22 casos de GN IgA, 23 casos de GEFS, y 19 casos de GNMP, suponiendo un total de 64 muestras.

Fase preanalítica. Fijación del material

Una correcta fase preanalítica de fijación tisular puede evitar variabilidad en los análisis moleculares. Se detalla, por tanto, el proceso y los tiempos utilizados en dicha fase para homogeneizar todas las muestras.

Las biopsias fueron sumergidas, en el momento de su llegada al servicio de anatomía patológica, previa visualización del material en microscopio estereoscópico, en formol tamponado al 10% con un tiempo máximo de fijación de 12 horas y un mínimo de 6 horas. Un fragmento se reservó para ME y otro se congeló para el estudio mediante IF.

Las muestras sufrieron el procesamiento habitual de los laboratorios de Anatomía Patológica (deshidratación mediante alcoholes de concentración creciente e inclusión en parafina).

Brevemente, el proceso se llevó a cabo en un procesador tisular automático con los siguientes ciclos:

Una hora y media en alcohol de 70º (un ciclo)

Una hora y media en alcohol de 95º (un ciclo)

Una hora y media en alcohol de 100º (tres ciclos)

Después de la deshidratación tisular, recibieron dos baños sucesivos de aclarado con xilol. Se incluyeron en parafina líquida a 65ºC con enfriamiento posterior, corte en microtomo y tinciones según protocolo para cilindros renales: tres cortes de hematoxilina y eosina, tres con tinción PAS, una técnica de Masson y una tinción plata metenamina.

Diagnóstico de las biopsias

Los cilindros renales fueron diagnosticados por el patólogo responsable del área de nefropatología en la rutina.

Posteriormente, se revisaron los hallazgos histológicos de estas biopsias renales guardadas en el servicio de Anatomía Patológica.

3.5. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y HOMOGENEIZACIÓN DE ADN

Procedente del material parafinado, se realizaron 5 cortes de 3 µm que se recogieron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.

En primer lugar, se llevó a cabo la desparafinación del tejido para lo que se añaden 160 µl de solución de desparafinación (Deparaffinization Solution 8 ml, QIAGEN, Hilden, Alemania) e incubamos a 56ºC durante 5 minutos a 700 rpm.

A continuación, se procedió a la extracción de ADN propiamente dicho, utilizando el kit de preparación de muestras de DNA Cobas® (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) de acuerdo con el protocolo del fabricante:

1. Vórtex de cada tubo con tejido y TLB/PK durante 30 segundos.
2. Incubar a 56°C durante 1 hora.
3. Vórtex del tubo durante 10 segundos.
4. Incubar a 90°C durante 1 hora.
5. Durante esta incubación, preparar el número necesario de tubos con filtros junto con sus tubos de desecho y rotulados con una ID de la muestra en el tapón con filtro. Rotular adicionalmente un tubo Eppendorf de 1,5 ml por cada muestra para recoger el extraído final.
6. Retirar los tubos del termobloque a 90°C y dejar que se enfríen durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Realizarles un pulso de centrifuga de 3 segundos.
8. Añadir 200 µl de DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB) y homogeneizar mediante 3 pipeteos de aspiración/dispensación.
9. Incubar a temperatura ambiente 10 minutos.
10. Añadir 100 µl de Isopropanol y homogeneizar.
11. Transferir todo el líquido del tubo mediante pipeteo al conjunto con filtro más tubo de desecho.
12. Centrifugar a 8000 g (5400 rpm) durante 1 minuto.
13. Retirar y descartar el tubo de desecho y sustituirlo por uno nuevo.
14. Añadir 500 µl de Wash Buffer I al conjunto tubo con filtro más tubo.
15. Centrifugar a 8000 g durante 1 minuto.
16. Descartar el líquido del tubo de desecho manteniéndolo con el mismo tubo con filtro.
17. Añadir 500 µl de Wash Buffer II al conjunto tubo con filtro más tubo.
18. Centrifugar a 8000 g durante 1 minuto.
19. Retirar y descartar el tubo de desecho y sustituirlo por uno nuevo.
20. Centrifugar a 16000 g durante 1 minuto.
21. Retirar y descartar el tubo de desecho y colocar el tubo con filtro en su tubo Eppendorf rotulado.
22. Añadir 50 µl de DNA Elution Buffer (DNA EB) en el centro del filtro, sin tocarlo.
23. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
24. Centrifugar a 8000 g durante 1 minuto para recoger el ADN extraído en el tubo

Eppendorf.

25. Descartar el tubo con filtro.

En el proceso de extracción de ADN de las muestras FFIP se utilizó el kit Uracil-N-Glicosilasa (UNG) AmpErase™ para minimizar la introducción de artefactos que podrían ser malinterpretados como mutaciones. Este kit permite la reconversión de las desaminaciones formólicas, reduciendo así la posibilidad de errores.

Una vez extraído el ADN de las muestras, se lleva a cabo la cuantificación de ácidos nucleicos utilizando el kit de reactivos basados en fluorescencia Qubit® dsDNA BR (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU).

1. Fluoróforo 1 x n⁺¹ µl + Qubit buffer 199 x n⁺¹ µl.
2. 190 µl + 10 µl de standards kit: Volumen final del tubo es 200 µl.
3. 195 µl + 5 µl de ADN de nuestras muestras.

Las muestras con una concentración de al menos 2 ng/µl se consideraron válidas para la secuenciación. Debido a ello, para llegar al total de 64 muestras con ADN de calidad suficiente, se tuvo que realizar extracción y cuantificación a 98 bloques de material fijado en formol e incluido en parafina. A continuación, se homogeneizó la concentración de las muestras diluyendo el ADN.

3.6. IDENTIFICACIÓN Y ANOTACIÓN DE GENES DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

Se identificaron candidatos de genes de moléculas de adhesión celular humanos usando información recopilada de varias fuentes, incluidas bases de datos como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) [*“cell adhesion molecule AND Homo sapiens [humans]”* = 743 genes] y publicaciones de revistas (3). Siendo finalmente seleccionados 29 genes como posibles candidatos a genes de moléculas de adhesión celular humana.

Definición de genes nefropáticos y genes de fenocopia

Se definieron genes nefropáticos versus genes de fenocopia (Tabla complementaria 1) sobre la base *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM; <https://www.omim.org>, consultado el 4 de marzo de 2022). De acuerdo con ello, los genes identificados en

OMIM como causantes de “síndrome nefrótico” o "nefropatía" se consideraron "genes nefropáticos" y, por el contrario, los genes identificados en OMIM como causantes de un trastorno sindrómico no relacionados con nefropatía se consideraron "genes de fenocopia". La literatura publicada recientemente que indica un papel patógeno causal para un gen en una nefropatía también se consideró para la clasificación de nefropático versus fenocopia, aun cuando no se informa en OMIM (32,49).

De los 29 genes seleccionados: *ACTB*, *ARHGDIA*, *CDC42*, *CDH1*, *COL1A2*, *ELN*, *FN1*, *FSCN1*, *ICAM1*, *ITGA5*, *ITGB1*, *ITGB3*, *LAMC1*, *LPAR1*, *LPAR2*, *LPAR3*, *LPAR4*, *LPAR5*, *LPAR6*, *PTK2*, *RHOA*, *RHOC*, *ROCK2*, *SELE*, *TNC*, *TPM1*, *TRAM1*, *VCAM1*, y *WASF3*, el 14% se definen como genes nefropáticos, estando incluidos *ARHGDIA*, *FN1*, *SELE* y *TNC*. El 86% restante se consideran genes de fenocopia (Figura 4).

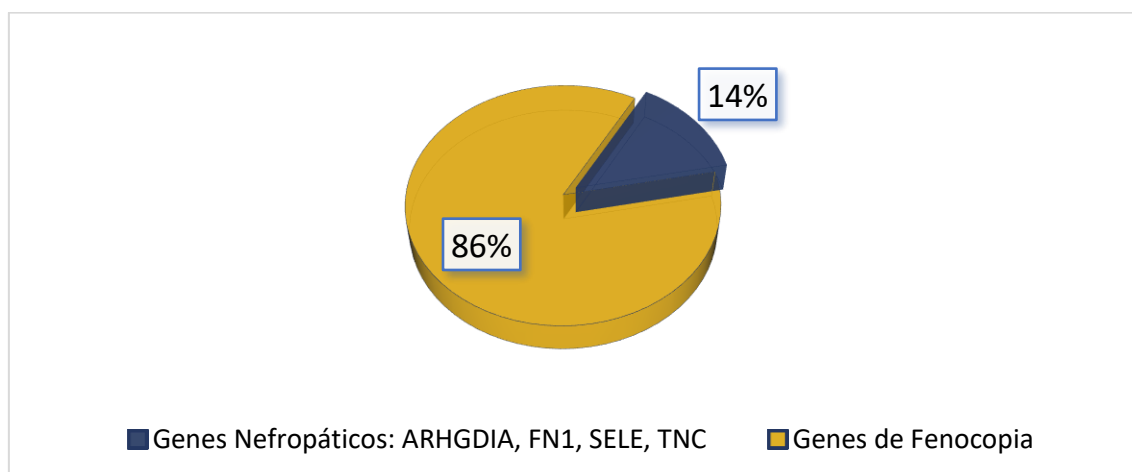


Figura 4. Porcentaje de genes nefropáticos y de fenocopia

3.7. CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN MASIVA

Las técnicas de secuenciación masiva NGS son capaces de procesar millones de fragmentos de muestras en paralelo, siendo un proceso de secuenciación rápido a un precio reducido, respecto a la secuenciación tipo Sanger. Además, presentan la ventaja de detectar variaciones genómicas en un único análisis.

La NGS consta de los siguientes pasos:

- Selección de dianas a secuenciar y amplificación, en paralelo.
- Marcado molecular de cada paciente.
- Inmovilización de los fragmentos de ADN molde en una superficie sólida, obteniendo

un gran número de copias idénticas de cada ADN molde.

- Secuenciación de los fragmentos de ADN, con ciclos consecutivos de adición de nucleótidos.
- Procesado de los datos obtenidos y llamada de variantes.

Diseño del panel de secuenciación masiva

Se diseñó un panel customizado de secuenciación masiva para el ADN extraído de material FFIP, con la tecnología Ampliseq de Thermo, referente para la secuenciación en material FFIP.

Debido a la naturaleza del material utilizado, FFIP, se llevó a cabo la amplificación por PCR, en lugar de realizarlo mediante captura de híbridos, como es habitual, por la calidad de dicho material.

Se realizó un diseño con cobertura completa exónica +/- 15 bases de intrones, para los posibles *splicing*, dejando las zonas de control UTR sin secuenciar, de los siguientes genes: *ACTB*, *ARHGDI*, *CDC42*, *CDH1*, *COL1A2*, *ELN*, *FN1*, *FSCN1*, *ICAM1*, *ITGA5*, *ITGB1*, *ITGB3*, *LAMC1*, *LPAR1*, *LPAR2*, *LPAR3*, *LPAR4*, *LPAR5*, *LPAR6*, *PTK2*, *RHOA*, *RHOC*, *ROCK2*, *SELE*, *TNC*, *TPM1*, *TRAM1*, *VCAM1*, y *WASF3*.

Todo ello, se llevó a cabo a través de la plataforma bioinformática *Ion AmpliSeq On-Demand Panels for Targeted Sequencing* que formula los primers necesarios para la amplificación de la región de interés.

Construcción de librerías

Se automatizó la construcción de la librería de secuenciación dirigida mediante el kit Ion AmpliSeq para Ion Chef DL8 (Thermo Fisher Scientific).

Siguiendo los parámetros de la casa comercial, se cargó la placa 1 con 15 µl de ADN diluido en la primera columna (8 pacientes), y 150 µl del pool de primers. Se programaron 31 ciclos de 4 minutos, a lo largo de los cuales se llevó a cabo la PCR obteniendo una librería.

Secuenciación

Tras el procesamiento de 32 muestras amplificadas (4 librerías), se llevó a cabo la cuantificación mediante Qubit® dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific), homogeneización

de las concentraciones, y secuenciación empleando la plataforma Ion S5 (Thermo Fisher). Se utilizó un chip 520, con 5 millones de lecturas finales: 32 muestras a determinar cobertura 100x y un total de 971 primers (97100 x 32). Se ejecutaron 400 ciclos de secuenciación. Este proceso se reprodujo para obtener las 64 muestras totales.

El procesamiento de las muestras control se realizó de la misma forma y con los mismos parámetros.

Selección de datos de secuenciación

Solo los casos con una cobertura mayor o igual a 160 lecturas fueron seleccionados para el análisis. En aquellos pacientes donde la librería presentó una profundidad inferior a 160 lecturas, fue repetido todo el proceso de secuenciación (Figura 5).

3.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Una vez obtenidos los archivos FASTQ resultantes de la secuenciación, se procedió a su análisis aplicando un protocolo bioinformático normalizado para la identificación de variantes. El proceso incluyó análisis y anotación de éstas.

Los archivos de secuenciación originales FASTQ se alinearon frente al genoma humano de referencia (hg19) usando BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Posteriormente, se empleó picardtools (<https://broadinstitute.github.io/picard/>) y samtools (<http://www.htslib.org/>) para ordenar y filtrar los alineamientos (en tabla complementaria 2 se informa de los transcritos utilizados para el alineamiento). Para identificar las mutaciones, se utilizó UnifiedGenotyper (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360036365812-HaplotypeCaller>). La herramienta vcftools (<http://vcftools.sourceforge.net/>) se empleó para el filtrado de las mutaciones en la región de interés. Se utilizaron scripts personalizados escritos en Perl, a partir de los listados de mutaciones se generaron los archivos PED y MAP para realizar los estudios de asociación. Para los estudios de asociación se empleó la herramienta Plink (<https://www.cog-genomics.org/plink/1.9/>) con los valores por defecto sin tener en cuenta las diferencias de género y realizando ajuste multitest.

Por último, la anotación funcional de cada mutación se llevó a cabo utilizando scripts personalizados utilizando como referencia la versión 75 de la base de datos de Ensembl.

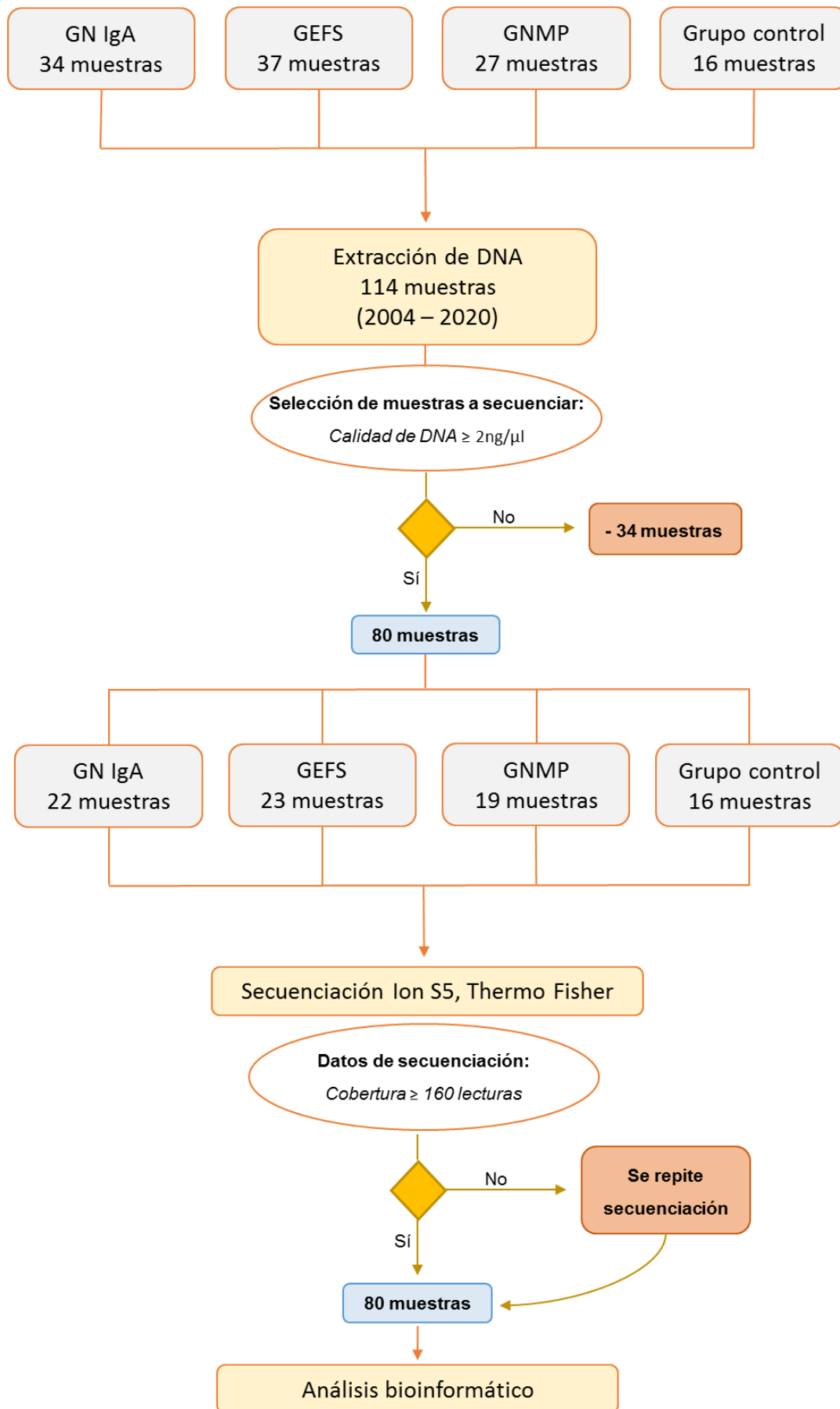


Figura 5. Algoritmo de flujo de muestras y controles de calidad

3.9. ANÁLISIS DE VARIANTES

Se analizaron los hallazgos del análisis bioinformático para detectar variantes genéticas y patrones asociados. Todas las alteraciones identificadas se categorizaron de acuerdo con las pautas del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) (50,51), utilizando herramientas automatizadas de variantes genéticas, *Franklin* (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, última consulta el 15 de abril de 2024) y *VarSome* (<https://varsome.com/>, última consulta el 15 de abril de 2024). Las variantes detectables en un análisis genético se clasifican en 5 niveles: benigna (clase 1), probablemente benigna (clase 2), variante de significado clínico incierto (VUS) (clase 3), variante probablemente patogénica (clase 4) y variante patogénica (clase 5).

Las variantes detectadas fueron cotejadas con datos de *1000 Genomes* [www.1000genomes.org], *The Genome Aggregation Database* (gnomAD) [<https://gnomad.broadinstitute.org/>], *Database of Genomic Variants* (DGV) [<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>], y ClinVar [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>], y analizadas en comparación con las variantes detectadas en los 16 controles seleccionados con función renal preservada.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada variable fue estudiada para evaluar su distribución paramétrica o no paramétrica con la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron con la media y desviación estándar (DE), mientras que en las variables categóricas se calcularon frecuencias absolutas y porcentajes. Para detectar las diferencias entre variables cuantitativas se utilizó la t de Student y la prueba de ANOVA, en el caso de que las variables siguieran una distribución paramétrica; y la prueba de Wilcoxon y Kruskal-Wallis, en el caso de distribuciones no paramétricas. Considerando una comparación múltiple con la corrección de Bonferroni en las variables con más de dos categorías. En el caso de variables cualitativas, se empleó la prueba chi cuadrado, y el test exacto de Fisher cuando los efectivos esperados fueron menor de 5. En el análisis estadístico de asociación se estableció la razón de prevalencias (PR) con sus intervalos de confianza (IC) al 95%.

En todas las pruebas estadísticas se consideró un valor de $p < 0,05$ estadísticamente significativo. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico STATA 16 SE (52).

3.11. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos del estudio se han llevado a cabo conforme a la legislación vigente, los principios de la Declaración de Helsinki y las guías de buena práctica clínica. Se solicitó la aprobación del proyecto por parte del Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria (Código interno: 2019.206; aprobado el 4 de octubre de 2019) (Anexo I).

Todos los sujetos incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado por escrito previo a su inclusión en el mismo (Anexo I).

Los datos recogidos y derivados de la realización del estudio fueron anonimizados y tratados de un modo confidencial con arreglo según la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales, mediante un código de registro.

4. *RESULTADOS*

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las principales características de los pacientes se muestran en la Tabla 7. Brevemente, la edad media fue de $49,59 \pm 19,58$ años [1-82], el 29,69% (19/64) eran mujeres y el 68,75% padecía HTA. El filtrado glomerular medio estimado fue de $54,81 \pm 31,74$ ml/min [3-110], la proteinuria media fue de $5,46 \pm 8,24$ g/día [0,2-54], teniendo el 42,19% (27/64) proteinuria en rango nefrótico.

Tabla 7. Características generales de la población de casos

	Población de estudio (n=64)
Sexo: Hombres / Mujeres, n (%)	45 / 19 (70,31 / 29,69)
Edad (años), media (DE)	49,59 (19,58)
Glomerulopatía, n (%)	
GN IgA	22 (34,38)
GEFS	23 (35,94)
GNMP	19 (29,69)
Clínica, media (DE)	
Proteinuria (g/día)	5,46 (8,24)
Creatinina (mg/dl)	2,44 (2,53)
TFG (ml/min)	54,81 (31,74)
HTA, n (%)	44 (68,75)
Estadio de la ERC, n (%)	
1	14 (21,88)
2	14 (21,88)
3a	5 (7,81)
3b	14 (21,88)
4	8 (12,5)
5	8 (12,5)
Tratamiento, n (%)	
Diálisis	6 (9,38)
TR	13 (20,31)

DE: Desviación estándar. TFG: Tasa de filtración glomerular. ERC: Enfermedad renal crónica. TR: Trasplante renal

4.2. ANÁLISIS VARIABLES CLÍNICAS

En el análisis estadístico de las variables clínicas se observa que la edad media es significativamente menor en GN IgA frente a GEFS y GNMP ($p = 0,0137$), no encontrando diferencias significativas en la distribución del estadio de la ERC entre las distintas glomerulopatías, ni en características como el sexo, HTA, niveles medios de proteinuria, creatinina, ni filtrado glomerular.

4.3. ANÁLISIS MUTACIONAL

En la Figura 6 se muestra el flujo de trabajo de filtración y clasificación de los datos de variantes. Un total de 371 variantes pasaron el control de calidad, entre las cuales 94 variantes se filtraron centrándose en sustituciones no sinónimas, cambios de marco de lectura, cambios en los sitios de corte y empalme, y pequeñas inserciones y deleciones (*indels*).

Dentro de las variantes encontradas, se estableció el identificador (rs) en el caso de polimorfismo de nucleótido único (SNP) conocido, la base de referencia y la mutante; la anotación funcional, el gen, y los cambios a nivel del ARN y de la proteína. Se identificó el genotipo de cada individuo para esa variante, que se representó como 0/1 y 1/0 para heterocigotos, 0/0 homocigotos para el alelo 1, y 1/1 homocigotos para el alelo 2.

Los datos de secuenciación crudos, sin procesar, están disponibles en el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA): <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/search?query=PRJEB53199> (consultado el 31 de mayo de 2022).

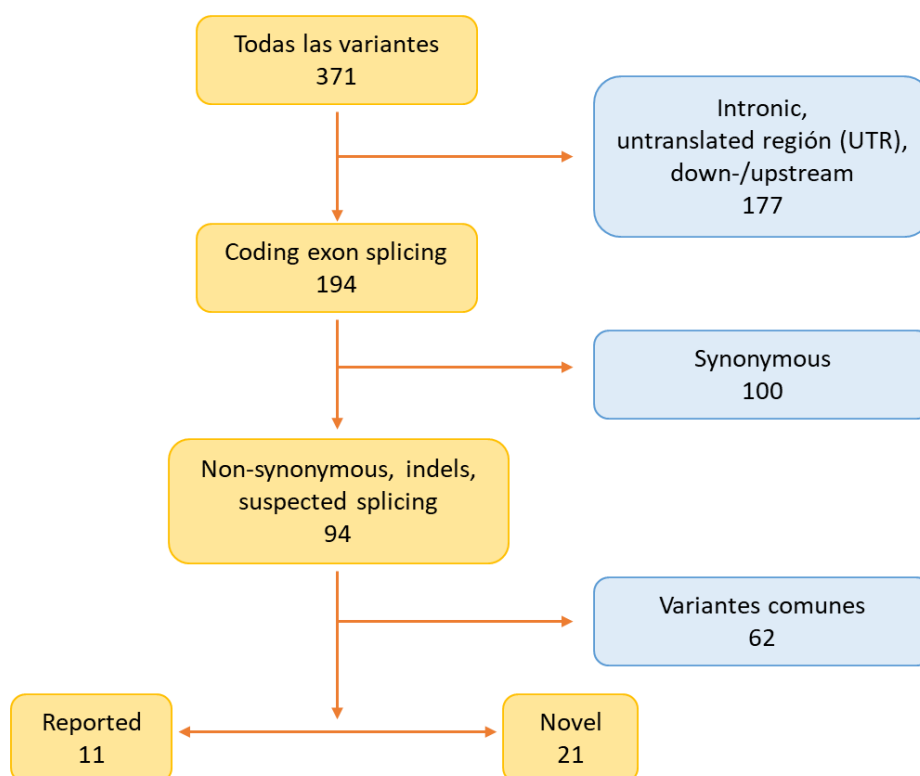


Figura 6. Filtración y clasificación de variantes

Presencia de mutaciones por gen

De los veintinueve genes analizados: *ACTB*, *ARHGDI*A, *CDC42*, *CDH1*, *COL1A2*, *ELN*, *FN1*, *FSCN1*, *ICAM1*, *ITGA5*, *ITGB1*, *ITGB3*, *LAMC1*, *LPAR1*, *LPAR2*, *LPAR3*, *LPAR4*, *LPAR5*, *LPAR6*, *PTK2*, *RHOA*, *RHOC*, *ROCK2*, *SELE*, *TNC*, *TPM1*, *TRAM1*, *VCAM1*, y *WASF3*, se encontraron variantes en todos ellos excepto en el gen *RHOA* (Figura 8).

Del total de variantes, se observa que los genes afectados en todos los pacientes han sido *CDH1*, *COL1A2*, *FN1*, *ITGA5*, *ITGB1*, *LPAR2*, *PTK2*, *TNC*, *TPM1*, *TRAM1*, y *VCAM1*; mientras que en el grupo control los genes afectados, en todos los componentes de dicho grupo, han sido *FN1*, *ITGA5*, *ITGB1*, *LPAR2*, *PTK2*, *ROCK2*, *TNC*, *TPM1*, *TRAM1*, y *VCAM1*, aunque se advirtió que gran parte se corresponden a mutaciones silenciosas y polimorfismos.

Se lleva a cabo un análisis de asociación a nivel de gen con el objetivo de identificar diferencias en la distribución de pacientes con mutaciones genéticas entre los distintos grupos de estudio, incluyendo tanto a los pacientes con GN como al grupo control. Los

resultados indican que no hay ningún gen que muestre diferencias significativas entre los distintos grupos.

Mutaciones no silenciosas por gen

El total de variantes encontradas fue de 200 en GN IgA, 203 en GEFS, 177 en GNMP y 105 en el grupo control. La media de las variantes acumuladas fue mayor en pacientes

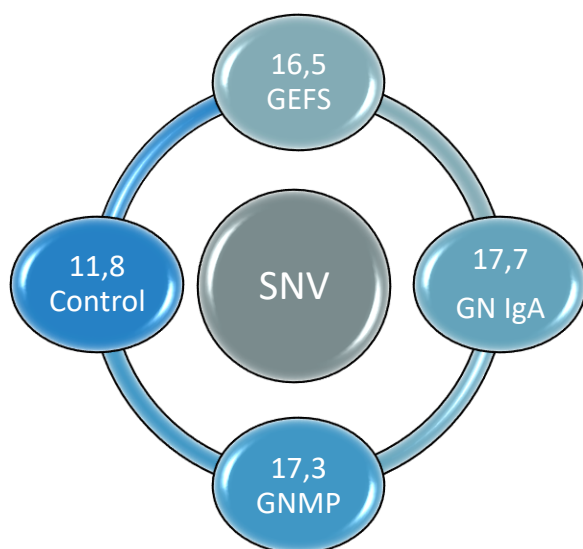


Figura 7. Comparativa de la media de SNV en las glomerulopatías y el grupo control

con glomerulopatías que en el grupo control (Figura 7), observando 17,7 SNV en GN IgA; 16,5 SNV en GEFS; 17,3 SNV en GNMP; frente a 11,8 SNV en el grupo control.

Se observaron mutaciones no silenciosas en los genes FN1 y TNC en todos los pacientes, tanto en las tres glomerulopatías estudiadas, como en el grupo control (Figura 9).

Se han identificado diferencias en el número de mutaciones presentes en el grupo de pacientes con glomerulopatías, independiente del tipo, frente al grupo control, obteniendo de forma estadísticamente significativa un mayor número de mutaciones en el grupo de pacientes ($p < 0,0001$). En el análisis de los diferentes grupos, 2 a 2, teniendo en cuenta el tipo específico de glomerulopatía, se detectan diferencias significativas en el número de mutaciones de cada una frente al grupo control ($p < 0,0001$), pero no entre las glomerulopatías entre sí.

Específicamente, en el gen *PTK2*, la diferencia en el número de mutaciones no silenciosas es significativo ($p = 0,0346$) entre GNMP y GEFS.

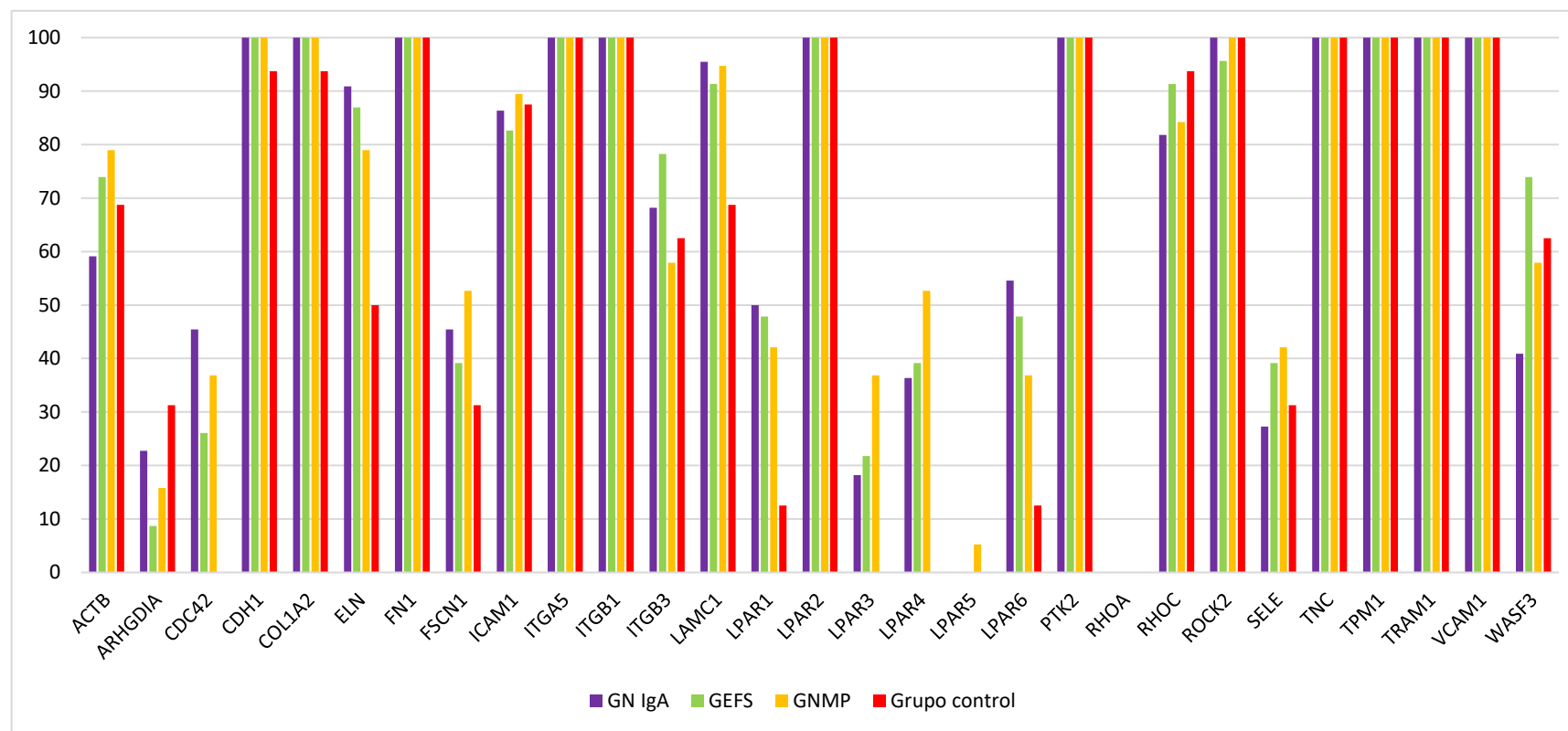


Figura 8. Porcentaje de pacientes con mutaciones totales, por gen estudiado

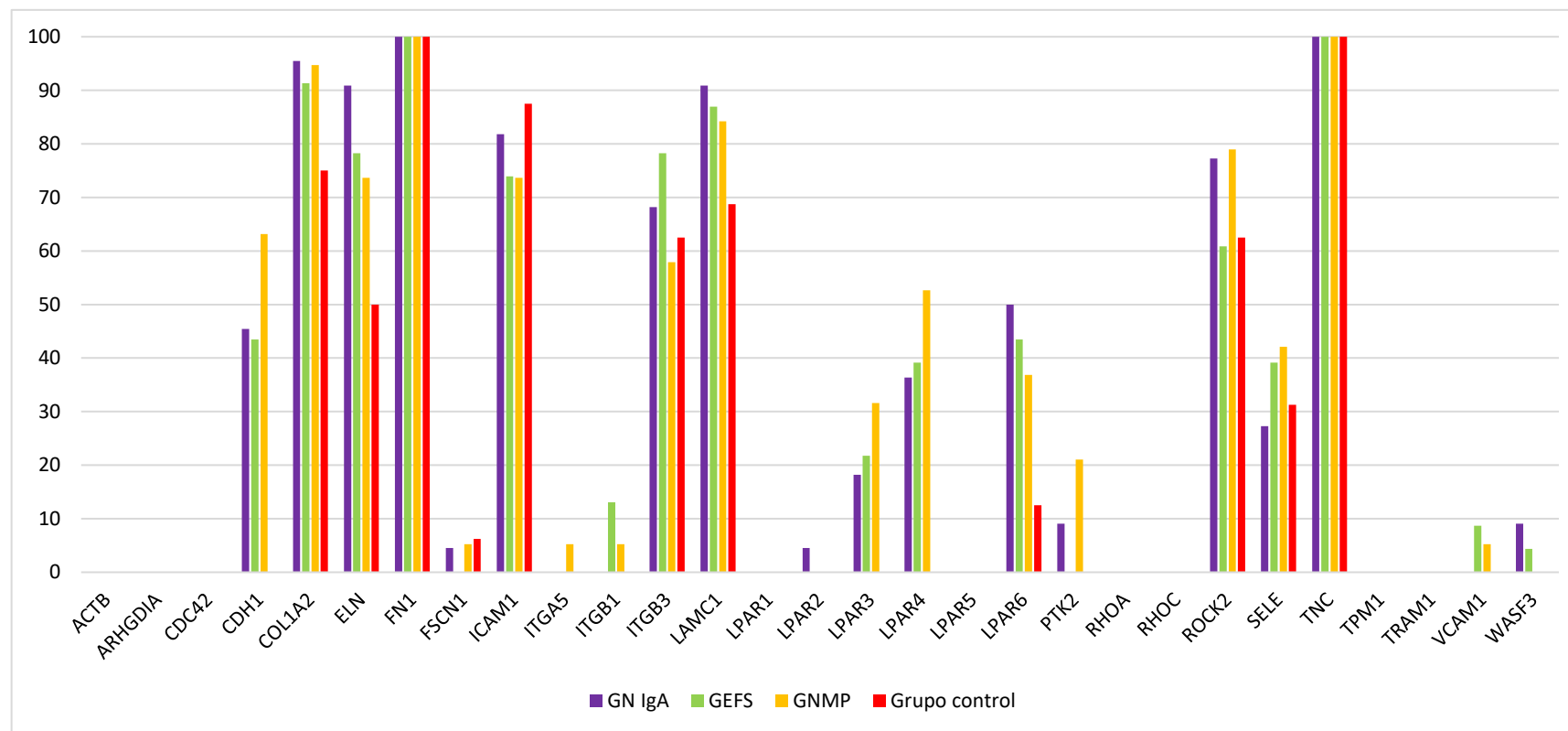


Figura 9. Porcentaje de mutaciones no silenciosas por gen

Mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido

Poniendo el foco en las mutaciones de clase 3 (variante de significado incierto), clase 4 (variante probablemente patogénica) y clase 5 (variante patogénica), se identificaron algunas mutaciones con mayor asociación a glomerulopatías concretas, mientras que existen otras que se observan indistintamente en las tres entidades. Este hallazgo sugiere patrones comunes y específicos de mutaciones asociados con cada tipo de glomerulopatía. En la Figura 10, se muestra la distribución de las mutaciones asociados a cada subtipo patológico. Se observan diferencias en el número de mutaciones en el conjunto de pacientes en comparación con el grupo control ($p < 0,0001$). Aunque no se encuentran diferencias significativas entre las distintas glomerulopatías, sí se aprecian cuando se comparan individualmente con el grupo control ($p < 0,0001$).

Variantes de significado incierto

Estas variantes no aportan evidencias biológicas para la determinación de su patogenicidad, por lo que su análisis asociativo a las distintas patologías no aportaría un significado clínico.

1. Presentes en las tres glomerulopatías destacamos las mutaciones *CDH1*: c.500 A>G p.(Glu167Gly), *COL1A2*: c.1015 A>C p.(Thr339Pro), y todas las mutaciones en *LPAR3*, *LPAR4* y *LPAR6*.
2. Con mayor asociación a GN IgA se objetivan las mutaciones *COL1A2*: c.2168 A>G p.(Asn723Ser), *ICAM1*: c.625 C>T p.(Leu209Phe), *ICAM1*: c.628 C>T p.(Gln210*), *ITGB3*: c.580 T>C p.(Ser194Pro), *LAMC1*: c.3275 T>C p.(Val1092Ala), y *PTK2*: c.1472 C>T p.(Thr491Ile).
3. Se reporta específicamente en GEFS las mutaciones *ITGB3*: c.2351 C>T p.(Thr784Met), y *WASF3*: c.934 G>C p.(Ala312Pro).
4. Con expresión en GNMP se identifican las mutaciones *PTK2*: c.2266 A>G p.(Met756Val), *TNC*: c.3422 C>G p.(Thr1141Arg), y todas las mutaciones en *ELN*, *FN1* y *SELE*.
5. Se observan mutaciones que se registran dos a dos, *ITGB1*: c.1807 A>T p.(Asn603Tyr) y *LAMC1*: c.148 T>C p.(Cys50Arg) en GEFS y GNMP. Y las mutaciones *LAMC1*: c.3195 G>A p.(Met1065Ile) y *PTK2*: c.2660 G>A p.(Ser887Asn) tanto en GN IgA como en GNMP.

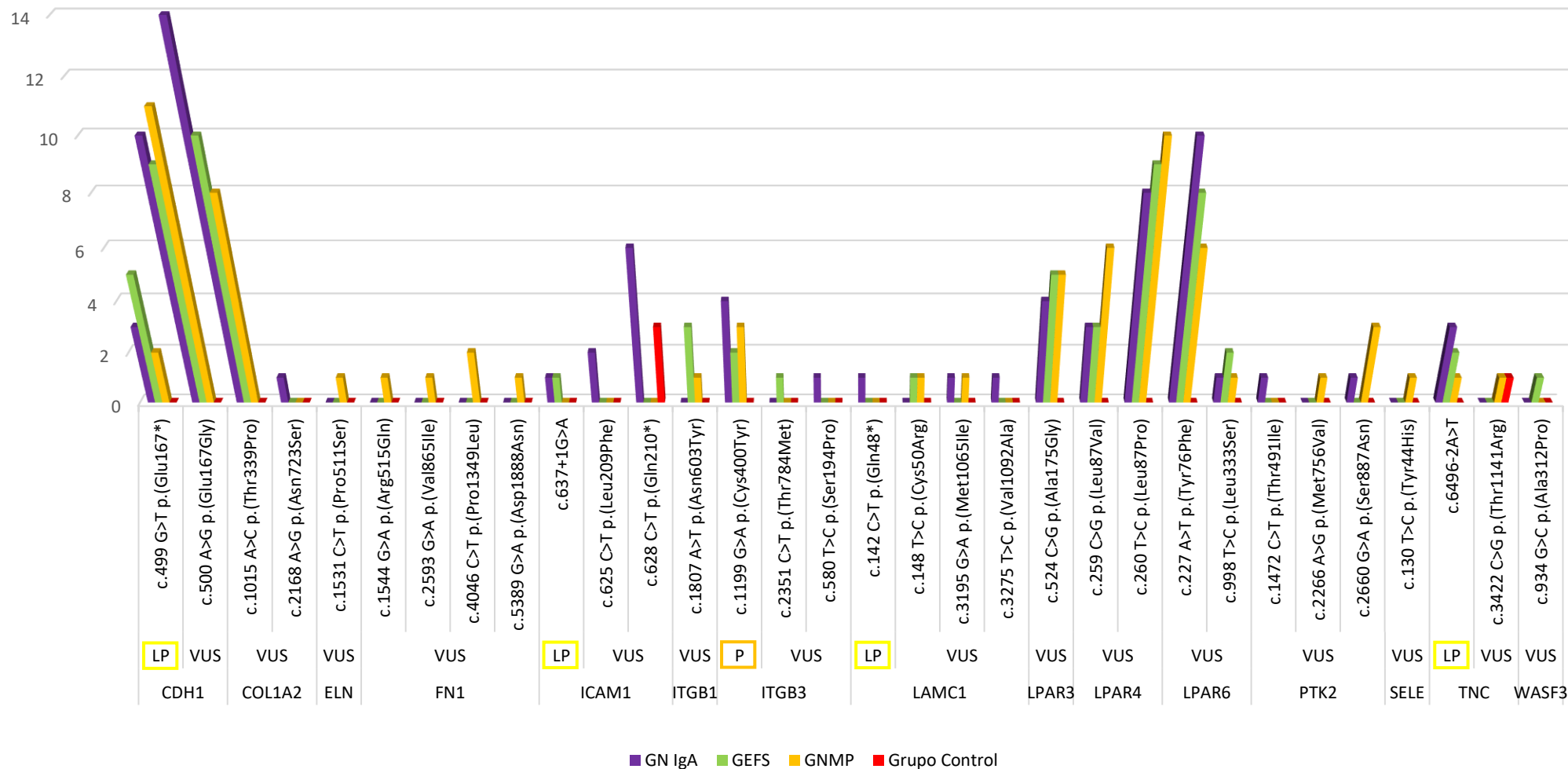


Figura 10. Patrones mutacionales. Mutaciones LP, P y VUS

6. En el grupo control observamos afectación de *ICAM1* en tres casos y *TNC* en uno.

Mutaciones probablemente patogénicas (LP) y patogénicas (P)

En el estudio se encontró que el 36% de los pacientes con glomerulopatías (23 de 64 pacientes) presentan al menos una mutación LP y/o P. En contraste, en el grupo control no se describen tales mutaciones (Figura 11). Este hallazgo es estadísticamente significativo con un valor de $p = 0,0051$. En el análisis estadístico de asociación, la detección de mutaciones con significado clínico patogénico y la presencia de glomerulopatía es significativo con un valor de $p = 0,004$ (PR 1,39; IC 95%: 1,18 a 1,64). Analizando los datos por grupos, se encontró una diferencia significativa en el número de mutaciones entre los cuatro grupos ($p = 0,0239$), y al realizar una comparación múltiple con corrección de Bonferroni, se encontró que la diferencia radica principalmente entre el grupo control y el grupo GN IgA, con un valor de $p = 0,0165$. En el análisis estadístico de asociación, la detección de mutaciones con significado clínico patogénico y la presencia de GN IgA es significativo con un valor de $p = 0,002$ (PR 2,32; IC 95%: 1,51 a 3,56).

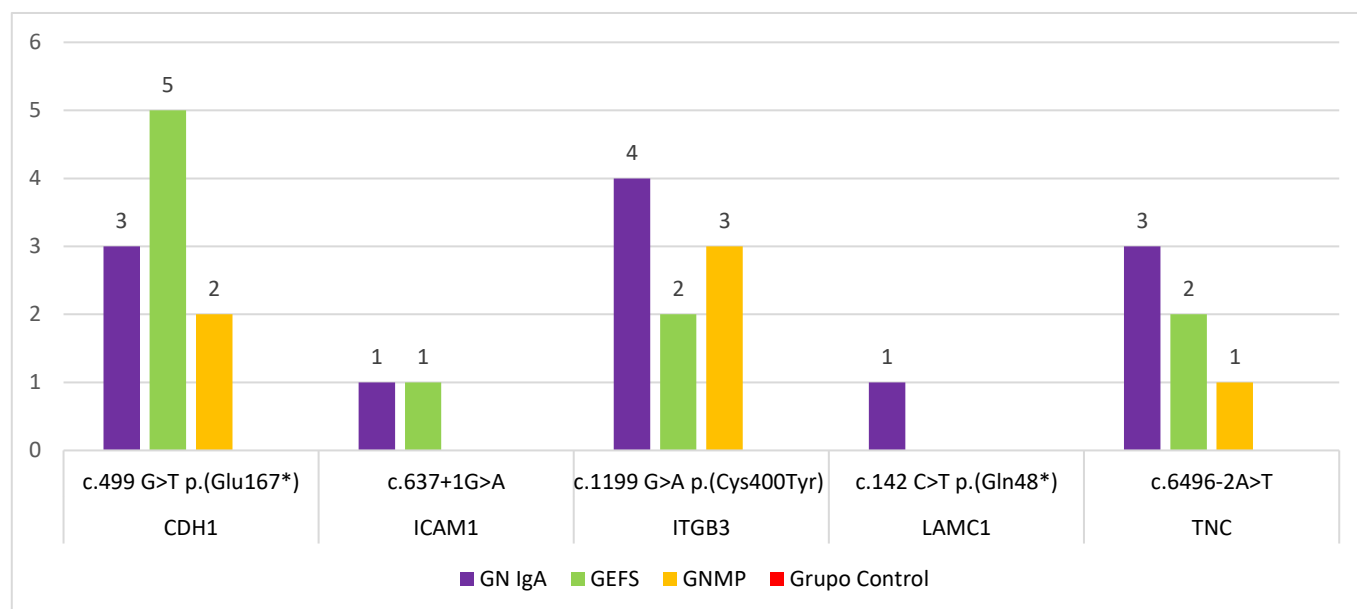


Figura 11. Detección de mutaciones LP y P

Se identifican, en las tres glomerulopatías, una mutación *nonsense* potencialmente patogénica *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167Ter), y una mutación patogénica *missense* *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr). En la GN IgA, se reconoce una mutación *nonsense*

potencialmente patogénica *LAMC1*: c.142 C>T p.(Gln48*). Se registran, además, dos mutaciones que alteran el patrón de *splicing*, potencialmente patogénicas, *ICAM1*: c.637+1G>A, que ha sido observada en un paciente con GN IgA y otro GEFS, y *TNC*: c.6496-2A>T, en las tres glomerulopatías, en tres pacientes GN IgA, dos GEFS, y un paciente con GNMP.

Mutaciones con significado clínico y gravedad de enfermedad

Se ha buscado establecer una relación directa entre dichas mutaciones y las glomerulopatías, considerando el estadio de ERC como un posible sesgo. En la Figura 12, se muestra la distribución acumulada de mutaciones de acuerdo con el estadio de la ERC, definido por la Tasa de Filtración Glomerular (TFG). Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el número de mutaciones y el estadio de la ERC ($p = 0,1521$). De igual manera, no se encontró asociación en las mutaciones probablemente patogénicas y patogénicas ($p = 0,6641$).

Variantes no reportadas

En la tabla 8 se presentan variantes no anotadas en las distintas bases de datos, por lo tanto, sin *Reference SNP (rs) Report* (actualizado a 1 de agosto de 2023).

Tabla 8. Mutaciones no reportadas, no *Reference SNP (rs) Report*

Gen	rs	Transcrito	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Tipo de mutación	Clasificación Franklin ACMG
<i>CDH1</i>	-	ENST00000261769	c.499 G>T	p.Glu167*	<i>Nonsense</i>	LP
	-		c.500 A>G	p.Glu167Gly	<i>Missense</i>	VUS
<i>COL1A2</i>	-	ENST00000297268	c.1015 A>C	p.Thr339Pro	<i>Missense</i>	VUS
<i>ICAM1</i>	-	ENST00000264832	c.625 C>T	p.Leu209Phe	<i>Missense</i>	VUS
	-		c.628 C>T	p.Gln210*	<i>Nonsense</i>	VUS
	-		c.637+1G>A	-	<i>Essential splice</i>	LP
<i>FN1</i>	-	ENST00000336916	c.4046 C>T	p.Pro1349Leu	<i>Missense</i>	VUS
	-		c.5389 G>A	p.Asp1888Asn		VUS
<i>ITGB1</i>	-	ENST00000302278	c.1807 A>T	p.Asn603Tyr	<i>Missense</i>	VUS
<i>ITGB3</i>	-	ENST00000559488	c.580 T>C	p.Ser194Pro	<i>Missense</i>	VUS
<i>LAMC1</i>	-	ENST00000258341	c.142 C>T	p.Gln48*	<i>Nonsense</i>	LP
	-		c.148 T>C	p.Cys50Arg	<i>Missense</i>	VUS
	-		c.3275 T>C	p.Val1092Ala	<i>Missense</i>	VUS
<i>LPAR3</i>	-	ENST00000440886	c.524 C>G	p.Ala175Gly	<i>Missense</i>	VUS
<i>LPAR4</i>	-	ENST00000435339	c.259 C>G	p.Leu87Val	<i>Missense</i>	VUS
	-		c.260 T>C	p.Leu87Pro		VUS
<i>LPAR6</i>	-	ENST00000378434	c.227 A>T	p.Tyr76Phe	<i>Missense</i>	VUS
	-		c.998 T>C	p.Leu333Ser		VUS
<i>PTK2</i>	-	ENST00000522684	c.2660 G>A	p.Ser887Asn	<i>Missense</i>	VUS
<i>TNC</i>	-	ENST00000350763	c.6496-2A>T	-	<i>Essential splice</i>	LP
<i>WASF3</i>	-	ENST00000335327	c.934 G>C	p.Ala312Pro	<i>Missense</i>	VUS

LP: probablemente patogénicas. VUS: variante de significado incierto.

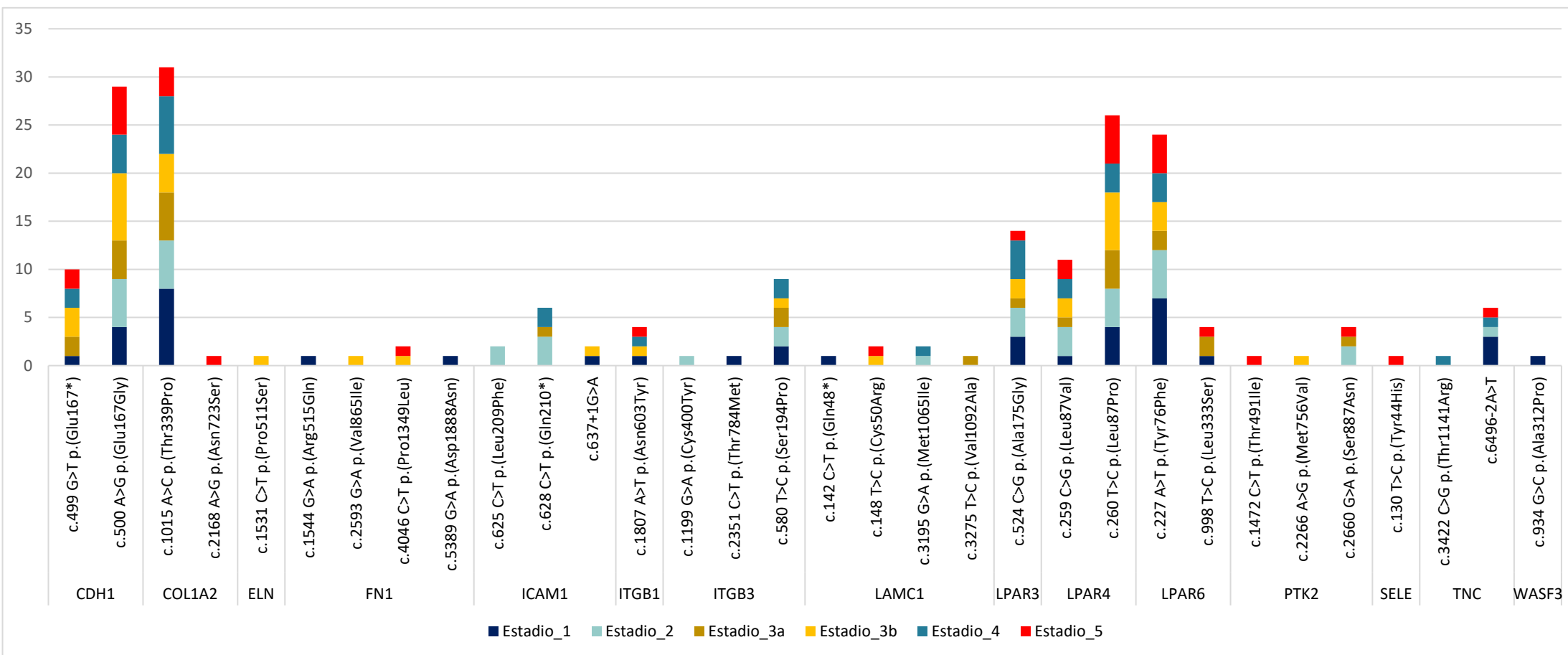


Figura 12. Distribución global de mutaciones LP, P y VUS por estadios de ERC

4.4. NEFROPATÍA IgA

4.4.1. Características clínicas y patológicas

Las características clínicas de los pacientes con GN IgA se encuentran resumidas en la Tabla 9.

De los 22 pacientes con GN IgA, el 64% (14) eran hombres y el 36% (8) mujeres. La media de edad fue de $39,91 \pm 18,28$ años (en un rango de 18-74 años). El 50% padecían HTA. El filtrado glomerular medio estimado fue de $58,09 \pm 34,89$ ml/min, y la proteinuria media fue de $3,26 \pm 3,02$ g/día.

Más de la mitad de los pacientes se categorizaron en estadios iniciales de ERC, estadios 1 y 2, y un 32% con ERCA (enfermedad renal crónica avanzada), que incluye los estadios 4 y 5.

Las características histopatológicas de las biopsias renales de los pacientes con GN IgA se resumen en la Tabla 10. En el 73% de los casos se objetiva hiper celularidad mesangial en más del 50% de los glomérulos (M1), en el 86% hiper celularidad endocapilar (E1), así como glomeruloesclerosis segmentaria (S1) en el 82%, por el contrario, en el 68% de los casos hay ausencia o < 25% de atrofia tubular/fibrosis intersticial (T0), y sólo en un 41% encontramos semilunas (C1/C2) (Figura 13).

Tabla 9. Características clínicas pacientes GN IgA

	GN IgA (n=22)
Sexo: Hombres / Mujeres, n (%)	14 / 8 (63,64/36,36)
Edad (años), media (DE)	39,91 (18,28)
Clínica, media (DE)	
Proteinuria (g/día)	3,26 (3,02)
Creatinina (mg/dl)	2,46 (2,28)
TFG (ml/min)	58,09 (34,90)
HTA, n (%)	11 (50)
Estadio de la ERC, n (%)	
1	5 (22,73)

2	7 (31,82)
3a	2 (9,09)
3b	1 (4,55)
4	3 (13,64)
5	4 (18,18)

DE: Desviación estándar. TFG: Tasa de filtración glomerular. ERC: Enfermedad renal crónica.

Tabla 10. Características histopatológicas de las biopsias GN IgA

<i>MEST-C en biopsia</i>	<i>n</i>
M0/M1	6/16
E0/E1	3/19
S0/S1	4/18
T0/T1/T2	15/7/0
C0/C1/C2	13/5/4

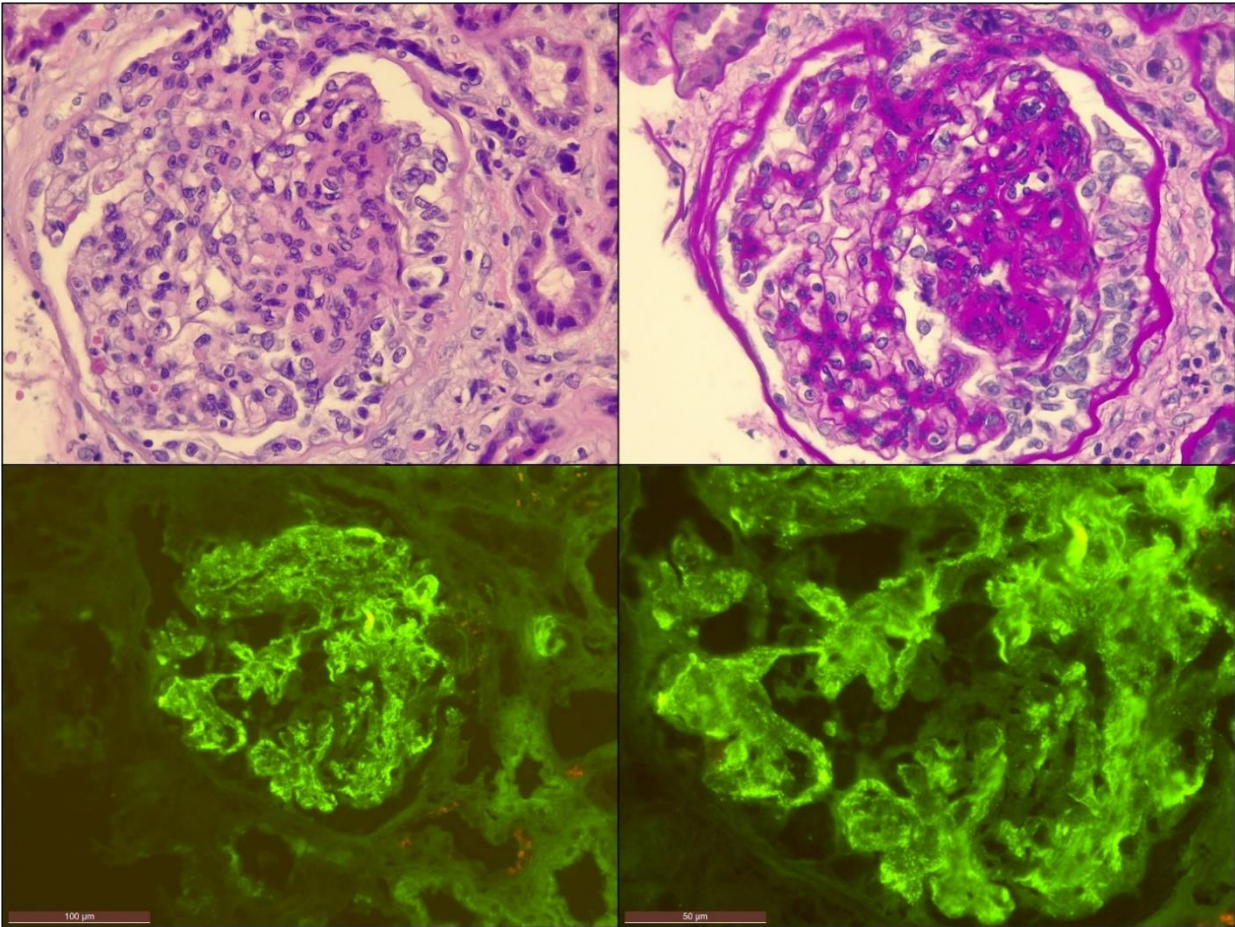


Figura 13. Caso GN IgA. HE y PAS. Se observa esclerosis nodular, expansión mesangial, proliferación endocapilar, y formación de una semiluna. IF IgA mesangial y pericapilar.

4.4.2. Análisis mutacional

De los 29 genes estudiados se encontraron variantes en todos ellos, excepto en los genes RHOA y LPAR5, correspondiendo el 55% a mutaciones silentes. El total de mutaciones no silenciosas, 200 alteraciones genéticas, se resumen en la Figura 14, distribuidas por gen afectado.

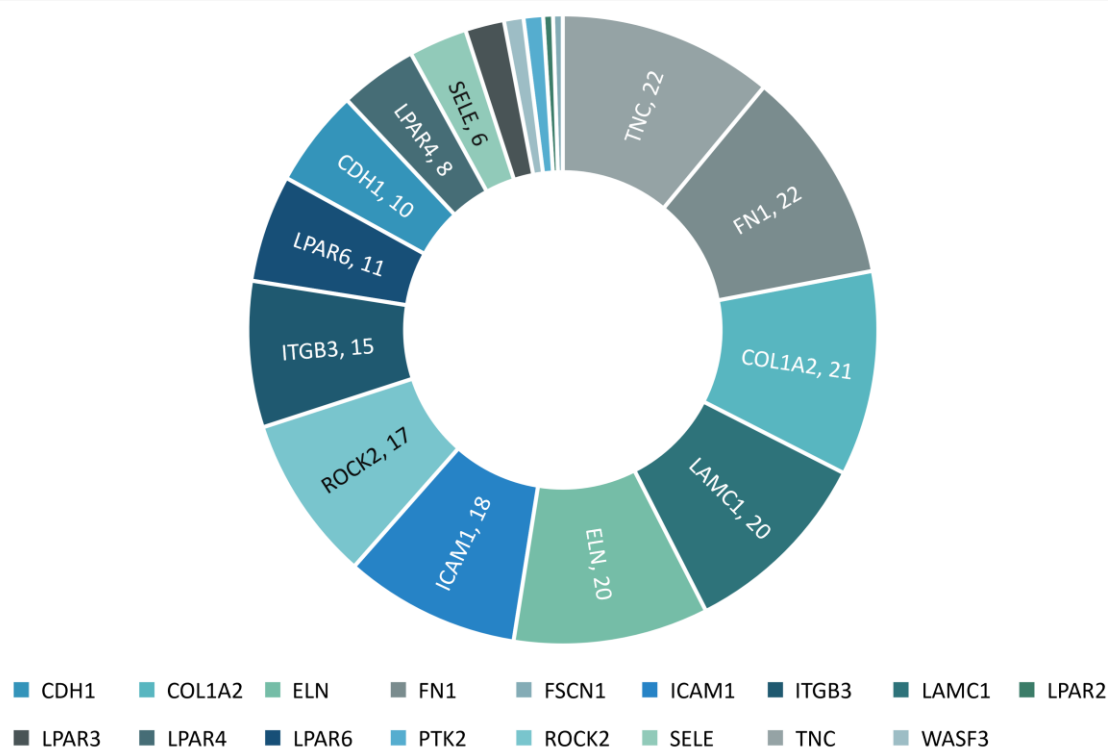


Figura 14. Mutaciones no silenciosas por gen, en pacientes GN IgA

Mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido

Todos los pacientes con GN IgA presentaban mutaciones de tipo patogénica, probablemente patogénica y/o VUS (Figura 15). Se identificaron variantes *missense* con significado incierto en los genes *CDH1*: c.500 A>G p.(Glu167Gly), *COL1A2*: c.1015 A>C p.(Thr339Pro), *COL1A2*: c.2168 A>G p.(Asn723Ser), *ICAM1*: c.625 C>T p.(Leu209Phe), *ITGB3*: c.580 T>C p.(Ser194Pro), *LAMC1*: c.3275 T>C p.(Val1092Ala), *LAMC1*: c.3195 G>A p.(Met1065Ile), *LPAR3*: c.524 C>G p.(Ala175Gly), *LPAR4*: c.259 C>G p.(Leu87Val), *LPAR4*: c.260 T>C p.(Leu87Pro), *LPAR6*: c.227 A>T p.(Tyr76Phe), *LPAR6*: c.998 T>C p.(Leu333Ser), *PTK2*: c.1472 C>T p.(Thr491Ile), y *PTK2*: c.2660 G>A p.(Ser887Asn), y *nonsense* de significado incierto en *ICAM1*: c.628 C>T p.(Gln210*). Además, se describe una mutación patogénica *missense* en el gen *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr), y dos

nonsense potencialmente patogénicas en los genes *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*), y *LAMC1*: c.142 C>T p.(Gln48*). También se registran dos mutaciones que alteran el patrón de *splicing*, potencialmente patogénicas, *ICAM1*: c.637+1G>A, y *TNC*: c.6496-2A>T.

En el grupo control se identificó la mutación *nonsense* de significado incierto *ICAM1*: c.628 C>T p.(Gln210*) en tres individuos. En el transcurso del estudio, un integrante del grupo control con esta mutación fue diagnosticado de GN IgA en otro hospital.

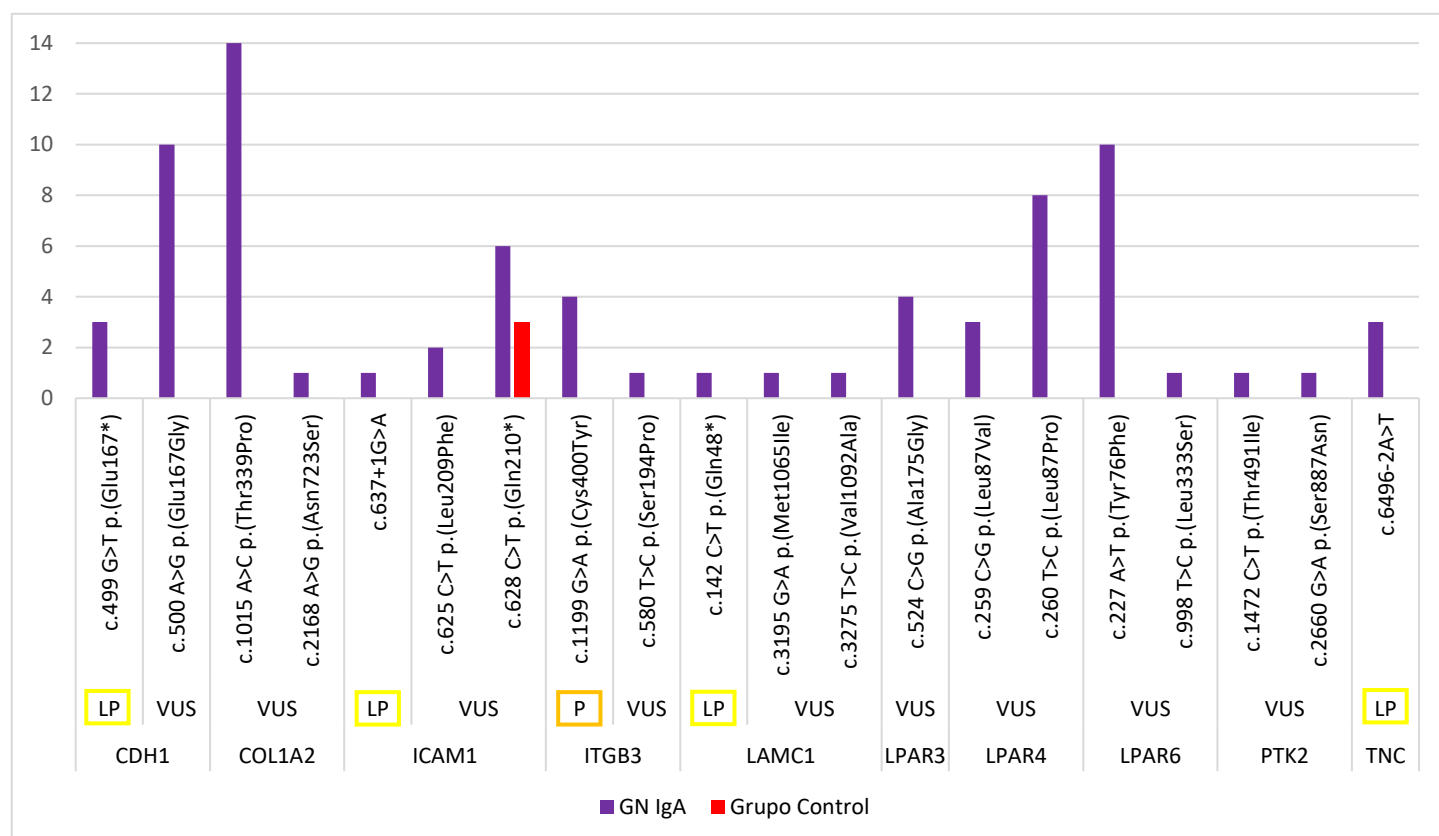


Figura 15. Frecuencia de mutaciones LP, P y VUS en GN IgA y grupo control

Se encontraron diferencias significativas, respecto al grupo control, en el número de mutaciones ($p < 0,0001$), y específicamente en las mutaciones con significado clínico patogénico ($p = 0,0165$). Igualmente, en la asociación de la GN IgA a mutaciones individuales de *CDH1*: c.500 A>G p.(Glu167Gly) ($p = 0,0038$), *LPAR4*: c.260 T>C p.(Leu87Pro) ($p = 0,0108$), *LPAR6*: c.227 A>T p.(Tyr76Phe) ($p = 0,0038$) y *TNC*: c.4241 G>C p.(Arg1414Thr) ($p = 0,0485$).

Cuatro mujeres del grupo de pacientes presentaron la mutación *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr), con una edad media de 39,5 años. La primera de ellas, diagnosticada de artritis reumatoide seropositiva de larga evolución, presentaba una IR crónica con

proteinuria de rango nefrótico y microhematuria, e HTA. En la evolución de su enfermedad requirió de hemodiálisis. La segunda paciente con función renal normal, sin proteinuria ni hematuria. La tercera paciente, con función renal normal y proteinuria controlada con tratamiento con ARAII. Y la cuarta paciente con seguimiento en otro hospital, debutó con proteinuria, sin hipoalbuminemia.

De forma independiente, la mutación *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*), se encontró en tres pacientes, dos hombres y una mujer, con una edad media de 47,3 años. El primer paciente, con seguimiento en otro hospital, presentó fracaso renal agudo (FRA) con hematuria macroscópica en el contexto de amigdalitis; el estudio inmunológico presentó ANA, ANCA, anticuerpos anti MBG negativos e IgA ligeramente elevada. La segunda paciente, debutó con proteinuria y hematuria persistente, actualmente con tratamiento farmacológico. El último paciente fue trasplantado a los dos años de seguimiento, y actualmente presenta una función renal estable, sin hematuria ni proteinuria.

Un paciente varón, de 26 años, presentó tres mutaciones potencialmente patogénicas, las dos que alteran el patrón de *splicing*, *ICAM1*: c.637+1G>A, y *TNC*: c.6496-2A>T, así como la mutación *nonsense* *LAMC1*: c.142 C>T p.(Gln48*). Presentó ERC secundaria a GN IgA, con primer trasplante en 2012 y perdido en 2020 por recidiva de su enfermedad de base. Segundo y actual trasplante en 2021, con función renal estable.

Dos pacientes, presentaron la mutación *TNC*: c.6496-2A>T, un hombre y una mujer, con una edad media de 19,5 años, ambos con estadios iniciales de ERC, y sin tratamiento sustitutivo por función renal normal.

Mutaciones con significado clínico y gravedad de enfermedad

Se buscó una correlación entre estas mutaciones y la gravedad de la enfermedad, medida por el nivel de proteinuria, añadiendo además la alteración de niveles de creatinina. Se observó una tendencia hacia una mayor acumulación de mutaciones en el rango subnefrótico de proteinuria (Figura 16), con significación estadística ($p = 0,0119$). En cuanto a los niveles de creatinina, se encontró un mayor número de mutaciones en pacientes con creatinina alterada (Figura 17), aunque no fue estadísticamente significativo ($p = 0,8268$).

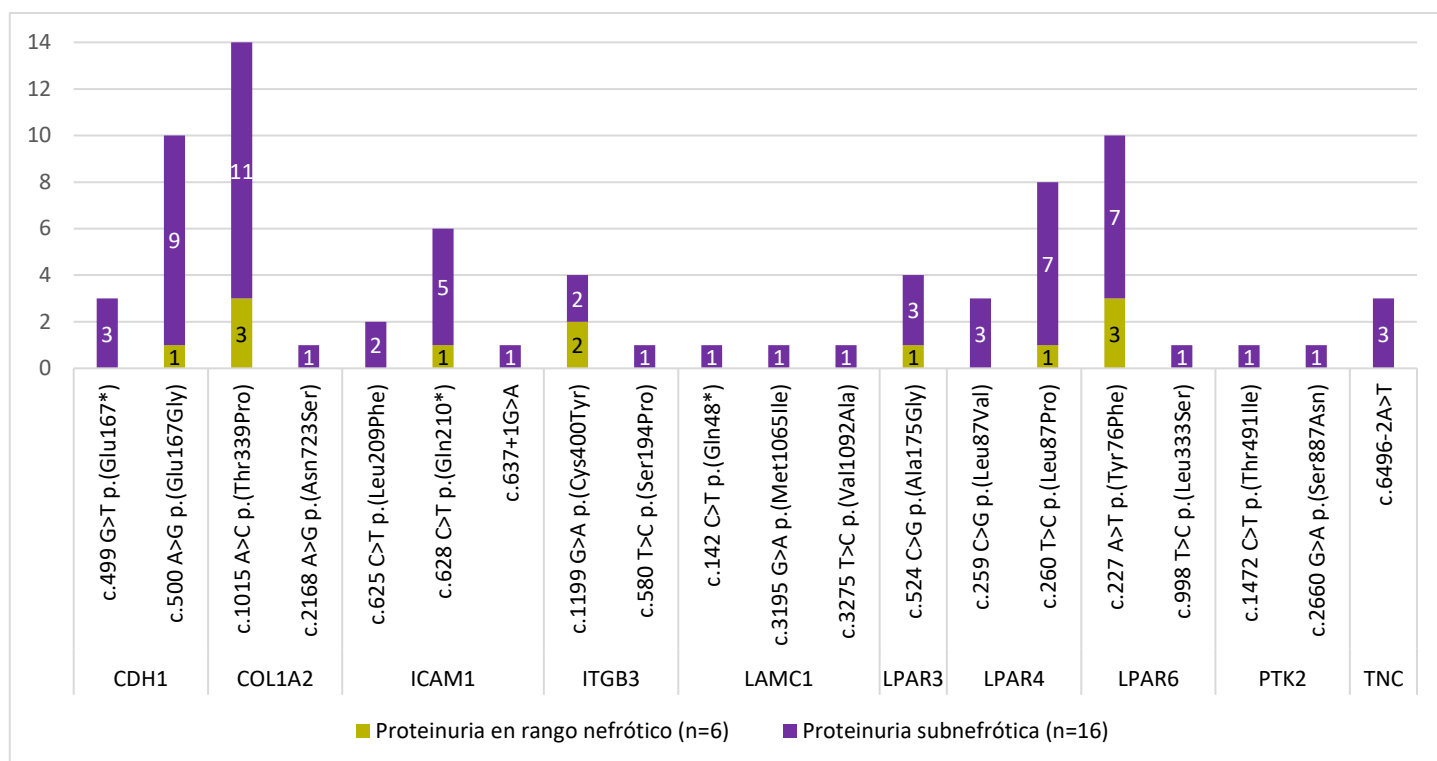


Figura 16. Distribución de mutaciones en GN IgA por nivel de proteinuria

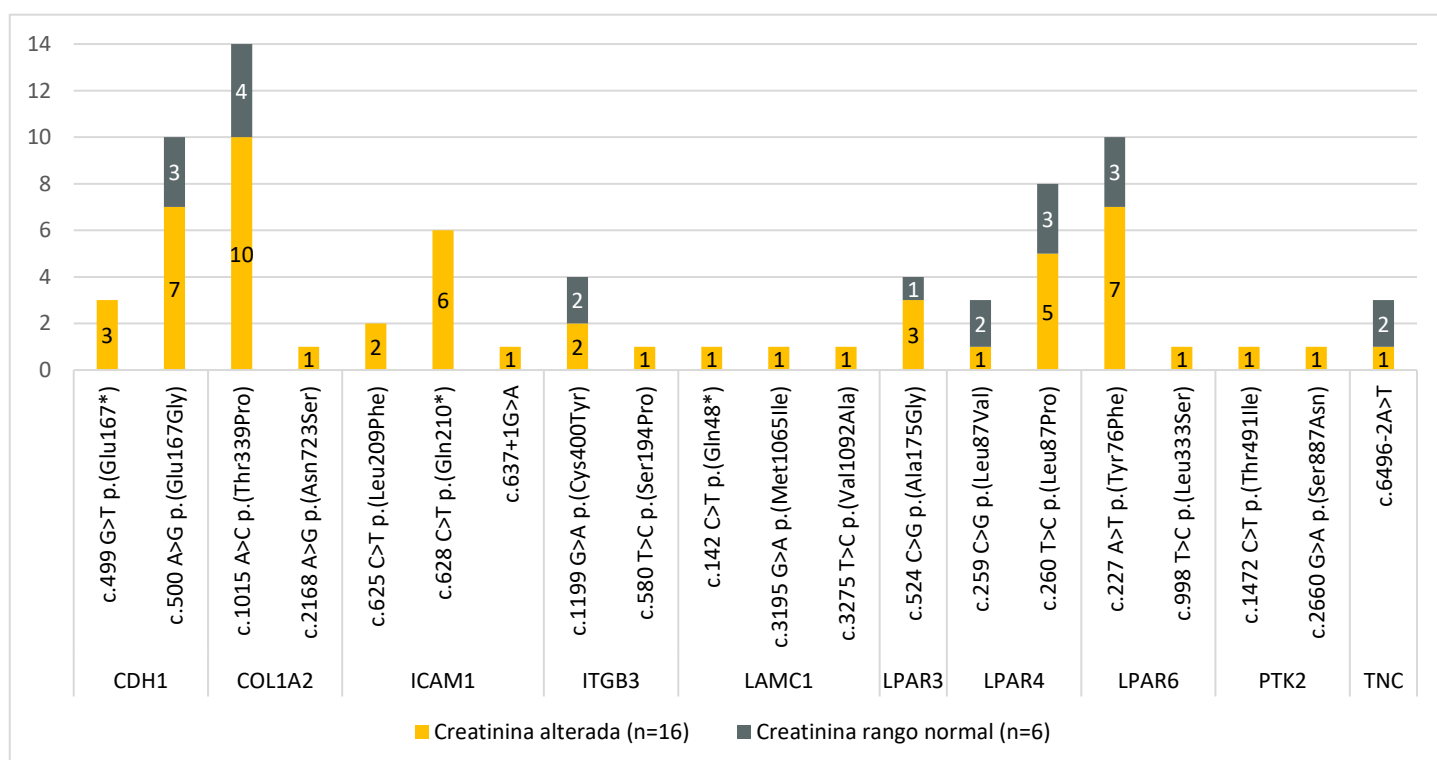


Figura 17. Distribución de mutaciones en GN IgA por valores de creatinina

Además, para correlacionar directamente estas mutaciones con la glomerulopatía, se consideraron los estadios de la ERC. Según el análisis estadístico, el número de mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido no es una variable dependiente del estadio de la ERC ($p = 0,5625$), y lo mismo ocurre con las mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas ($p = 0,6866$). En la Figura 18, se muestra la distribución de mutaciones atendiendo a las etapas de ERC y al tipo de gen en el que se encuentran. Cabe destacar que algunas mutaciones tienen una mayor prevalencia en etapas específicas de la ERC, el gen *CDH1* muestra una mayor frecuencia de mutaciones en estadios avanzados, y en contraste el gen *TNC* tiene una mayor presencia de mutaciones en etapas tempranas (1 y 2).

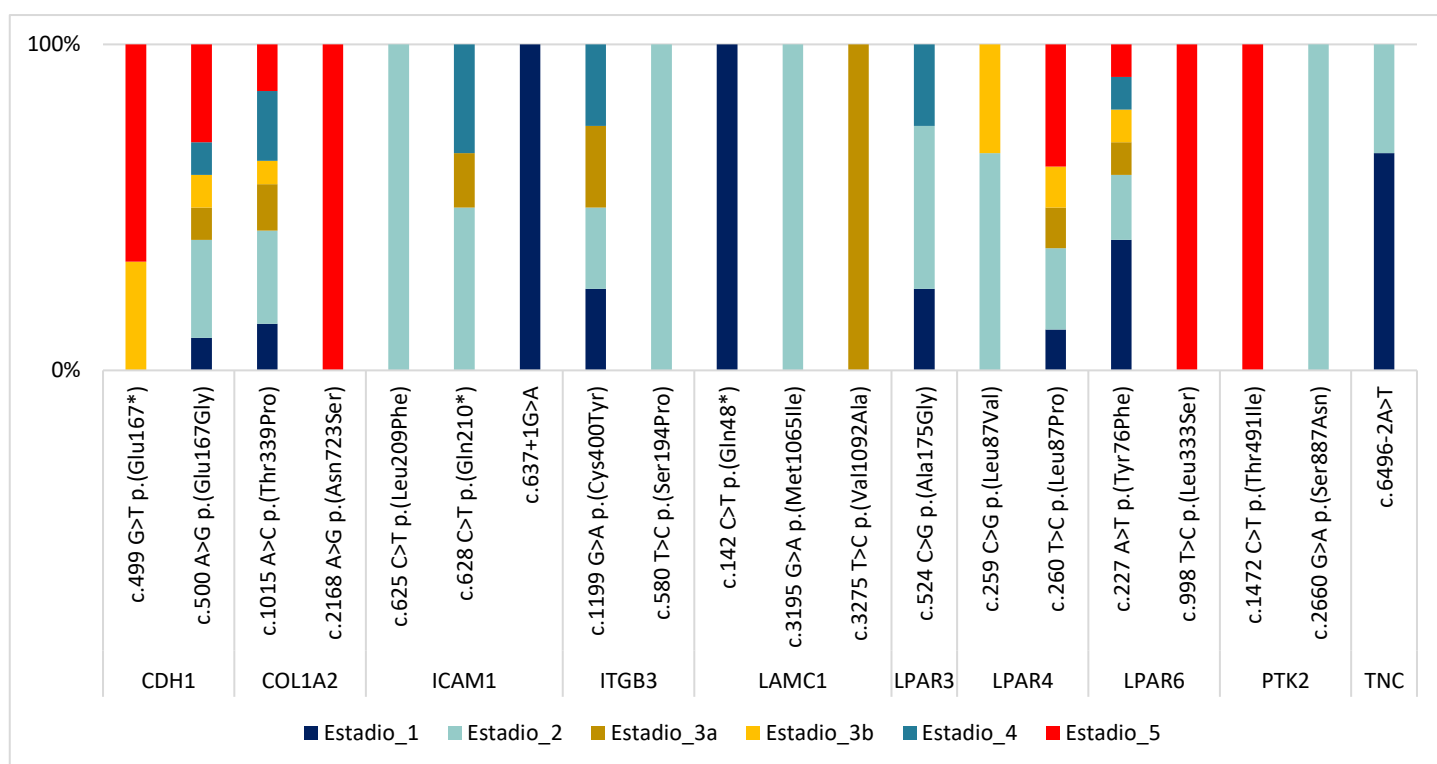


Figura 18. Distribución de mutaciones en GN IgA por estadios de ERC

4.5. GLOMERULOESCLEROSIS FOCAL Y SEGMENTARIA

4.5.1. Características clínicas y patológicas

Las principales características clínicas e histopatológicas de los pacientes con GEFS se resumen en las Tablas 11 y 12.

De los 23 pacientes con GEFS, el 74% (17) eran hombres y el 26% (6) mujeres. La media de edad fue de $53,96 \pm 18,81$ años (en un rango de 18-82 años). El 74% padecían HTA. El filtrado glomerular medio estimado fue de $60,30 \pm 29,95$ ml/min, la proteinuria media fue de $5,71 \pm 6,8$ g/día y el 43% presentó síndrome nefrótico.

La GEFS clásica (NOS) fue la variante morfológica predominante observada en la biopsia (74%, $n = 17$). Se identificó la variante perihiliar en cuatro pacientes (17%), mientras que solo en un paciente se observó la variante celular y variante tip, respectivamente.

En cuanto a los estadios de ERC, un 30% de los pacientes fueron categorizados en estadio 1 y 3b; 18% en estadio 2; 9% en estadio 3a; y 13% en estadio 4. No se detectó ningún paciente en el estadio 5.

Tabla 11. Características clínicas pacientes GEFS

	GEFS (n=23)
Sexo: Hombres / Mujeres, n (%)	17 / 6 (73,91/26,09)
Edad (años), media (DE)	53,96 (18,81)
Clínica, media (DE)	
Proteinuria (g/día)	5,71 (6,8)
Creatinina (mg/dl)	1,66 (0,83)
TFG (ml/min)	60,30 (29,95)
HTA, n (%)	17 (73,91)
Estadio de la ERC, n (%)	
1	7 (30,43)
2	4 (17,39)
3a	2 (8,70)
3b	7 (30,43)

Resultados

4	3 (13,04)
5	0

DE: Desviación estándar. TFG: Tasa de filtración glomerular. ERC: Enfermedad renal crónica.

Tabla 12. Características histopatológicas GEFS

Variantes morfológicas GEFS	n	%
Clásica (NOS)	17	73,91
Perihiliar	4	17,39
Celular	1	4,35
Tip	1	4,35
Colapsante	0	

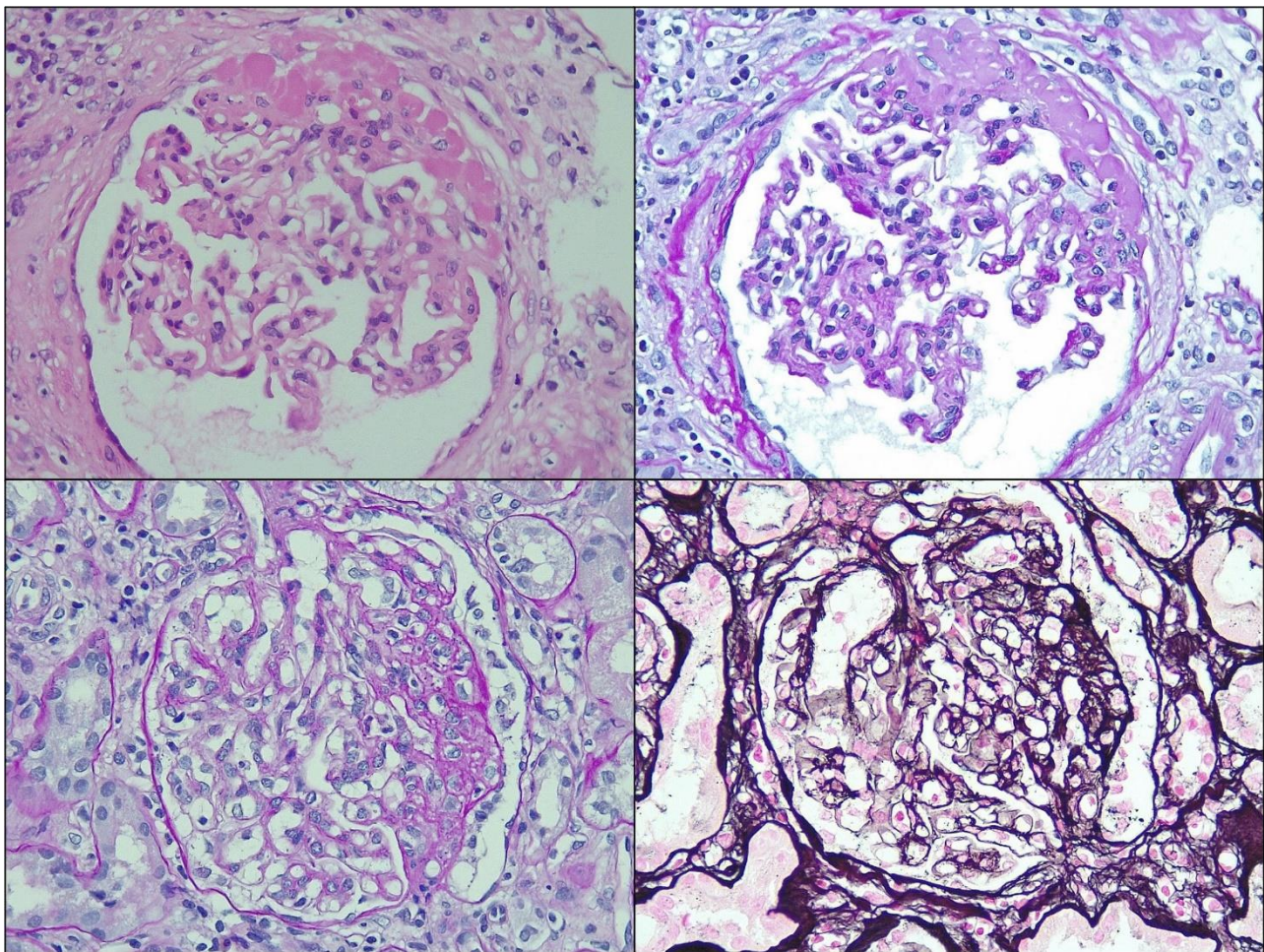


Figura 19. Caso GEFS. HE, PAS y Plata. Lesiones focales y segmentarias

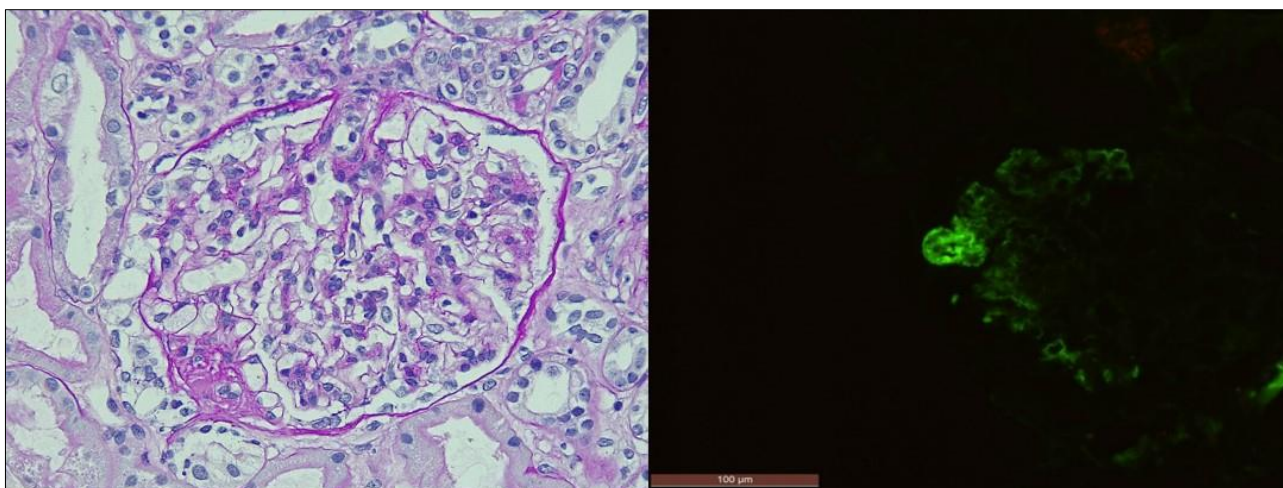


Figura 20. Caso GEFS variante tip. PAS lesión segmentaria en el dominio tubular. IF IgM.

4.5.2. Análisis mutacional

De los 29 genes estudiados se encontraron variantes en todos ellos, excepto en los genes RHOA y LPAR5, siendo el 57% mutaciones silentes. En las mutaciones no silenciosas, un total de 203, destaca la presencia de alteraciones en los genes FN1 y TNC en todos los pacientes con GEFS. Las frecuencias de variantes en los diferentes genes analizados se muestran en la Figura 21.

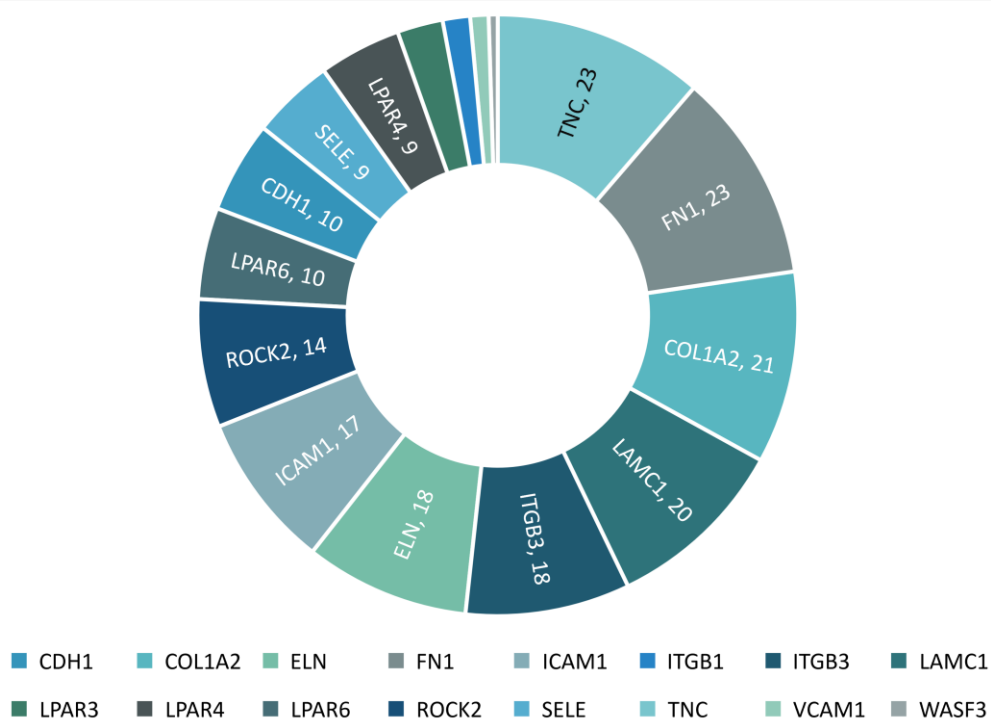


Figura 21. Mutaciones no silenciosas por gen, en pacientes GEFS

Se observaron alteraciones génicas tanto en el grupo de control como en todos los pacientes, aunque el número promedio de SNV fue mayor en los pacientes con GEFS (media de 16,5 SNV) que en el grupo de control (media de 11,8 SNV), siendo estadísticamente significativo ($p < 0,0001$).

Mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido

De los 23 pacientes, el 96% presentaba mutaciones LP, P y/o VUS. Se observó que dos pacientes tenían la variante patogénica *missense* *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr), mientras que cinco pacientes portaban la variante potencialmente patogénica *nonsense* *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*). Se registran, además, dos mutaciones que alteran el patrón de *splicing*, potencialmente patogénicas, *ICAM1*: c.637+1G>A, presente en un paciente, y *TNC*: c.6496-2A>T detectada en dos pacientes (Figura 22). Las variantes *missense* *CDH1*: c.500 A>G p.(Glu167Gly), *COL1A2*: c.1015 A>C p.(Thr339Pro), *ITGB1*: c.1807 A>T p.(Asn603Tyr), *ITGB3*: c.2351 C>T p.(Thr784Met), *LAMC1*: c.148 T>C p.(Cys50Arg), *LPAR3*: c.524 C>G p.(Ala175Gly), *LPAR4*: c.259 C>G p.(Leu87Val), *LPAR4*: c.260 T>C p.(Leu87Pro), *LPAR6*: c.227 A>T p.(Tyr76Phe), *LPAR6*: c.998 T>C p.(Leu333Ser), y *WASF3*: c.934 G>C p.(Ala312Pro), se clasificaron como variantes de

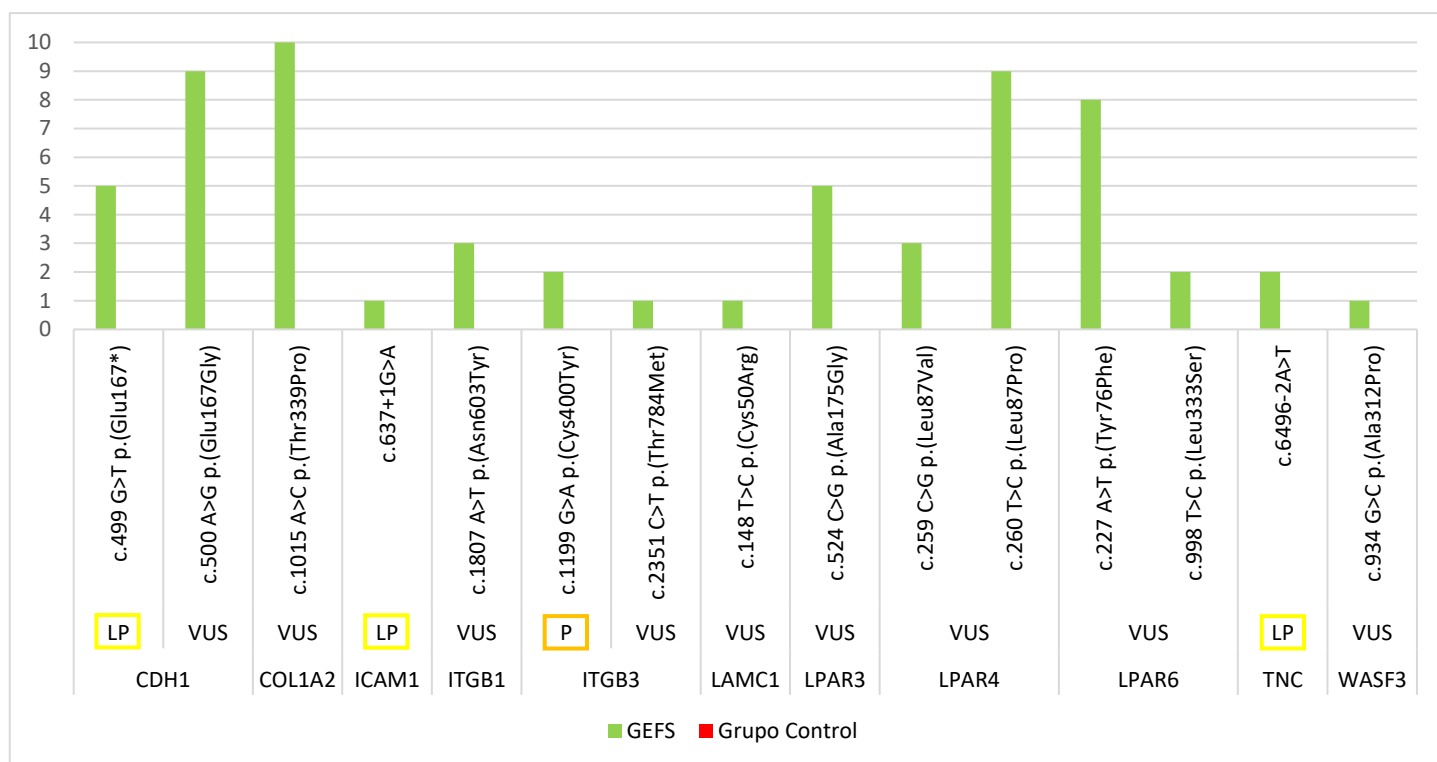


Figura 22. Frecuencia de mutaciones LP, P y VUS en GEFS y grupo control

significado incierto. Ninguna de las variantes genéticas enumeradas anteriormente se detectó en el grupo control.

Se encontraron diferencias significativas, respecto al grupo control, en el número de mutaciones ($p < 0,0001$), y específicamente en *CDH1*: c.500 A>G p.(Glu167Gly) ($p = 0,0078$), *LPAR4*: c.260 T>C p.(Leu87Pro) ($p = 0,0078$), y *LPAR6*: c.227 A>T p.(Tyr76Phe) ($p = 0,0127$).

Se detectó la mutación *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*), en cinco pacientes, dos mujeres y tres hombres, con una edad media de 52,6 años. Dos de ellos, además, presentaban la mutación *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr). El primer paciente fue diagnosticado de anemia hemolítica autoinmune y actualmente está en estudio por enfermedad pulmonar intersticial (EPI) y recibe tratamiento con Rituximab. El segundo desarrolló una ERCA con posterior trasplante y recurrencia de GEFS en la biopsia de control. El resto de pacientes con la mutación *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*) se encuentran actualmente bajo control sin tratamiento IS y presentan ERC leve.

Las mutaciones que alteran el patrón de *splicing* se identificaron en tres pacientes, dos mujeres y un varón, con una edad promedio de 36,33 años. Sendos pacientes presentaron síndrome nefrótico al inicio de la enfermedad. Dos de estos pacientes, están en seguimiento en otro hospital, uno de los cuales ha desarrollado corticorresistencia. La tercera paciente, que fue trasplantada en 2016, ha mantenido una función renal normal.

Mutaciones con significado clínico y variantes morfológicas

Teniendo en cuenta las variantes morfológicas, observamos que la media de mutaciones es mayor en la variante perihiliar, sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,6291$) (Figura 23), aunque llama la atención mutaciones exclusivas en ésta: *ICAM1*: c.637+1G>A, *ITGB3*: c.2351 C>T p.(Thr784Met) y *LAMC1*: c.148 T>C p.(Cys50Arg) (Figura 24).

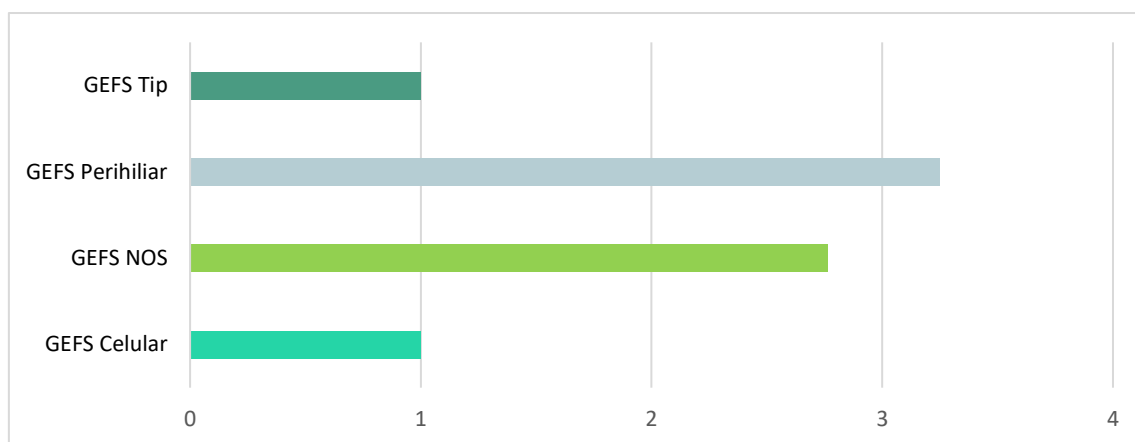


Figura 23. Media de mutaciones según variantes morfológicas de GEFS

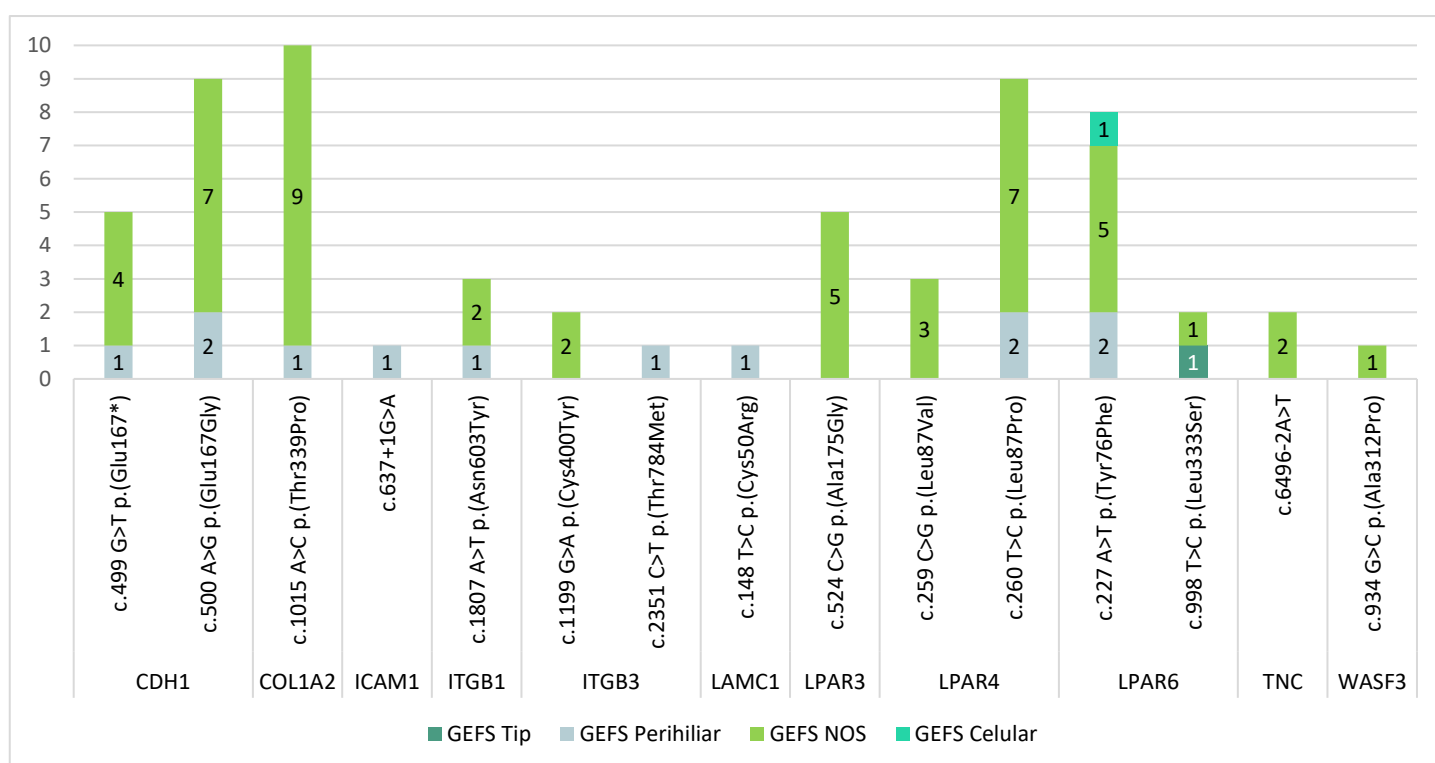


Figura 24. Distribución de las mutaciones según variantes morfológicas de GEFS

Mutaciones con significado clínico y gravedad de enfermedad

Se buscó una correlación entre las mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido y la gravedad de la enfermedad, medida por el nivel de proteinuria, además de considerar la alteración en los niveles de creatinina. Se observó una tendencia hacia una mayor acumulación de mutaciones en los pacientes con niveles subnefróticos de proteinuria (Figura 25), con un valor estadísticamente significativo ($p = 0,0019$). Lo mismo ocurrió con las mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas ($p =$

0,0479). En cuanto a los niveles de creatinina, se encontró un mayor número de mutaciones en pacientes con creatinina alterada (Figura 26), aunque no fue estadísticamente significativo ($p = 0,1422$).

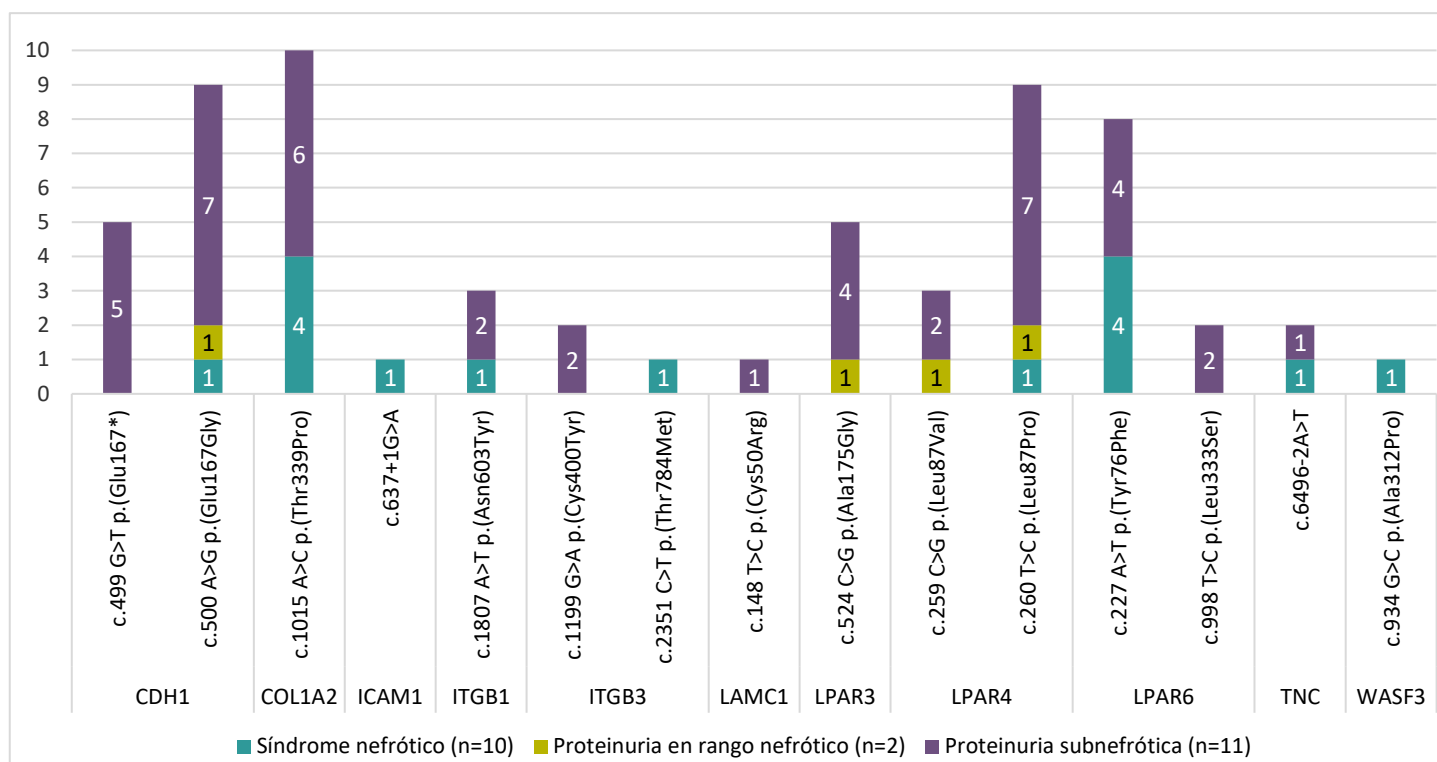


Figura 25. Distribución de mutaciones en GEFS por nivel de proteinuria

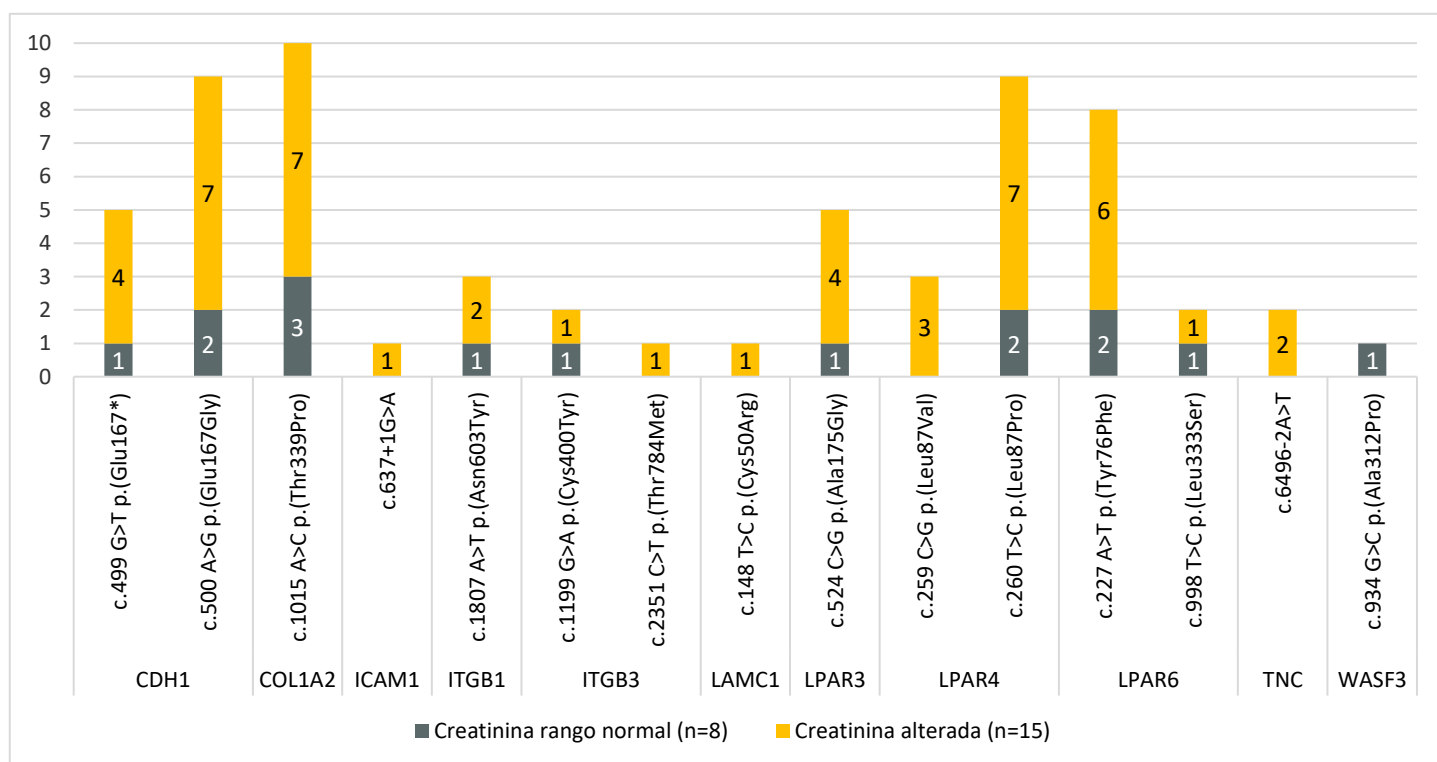


Figura 26. Distribución de mutaciones en GEFS por valores de creatinina

Además, para correlacionar directamente estas mutaciones con la GEFS, consideramos los estadios de la ERC. Según el análisis estadístico, el número de mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido, no es una variable dependiente del estadio de la ERC ($p = 0,1168$), y lo mismo ocurre con las mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas ($p = 0,5034$). La Figura 27 muestra la distribución de mutaciones atendiendo a la etapa de ERC y al tipo de gen en el que se encuentran.

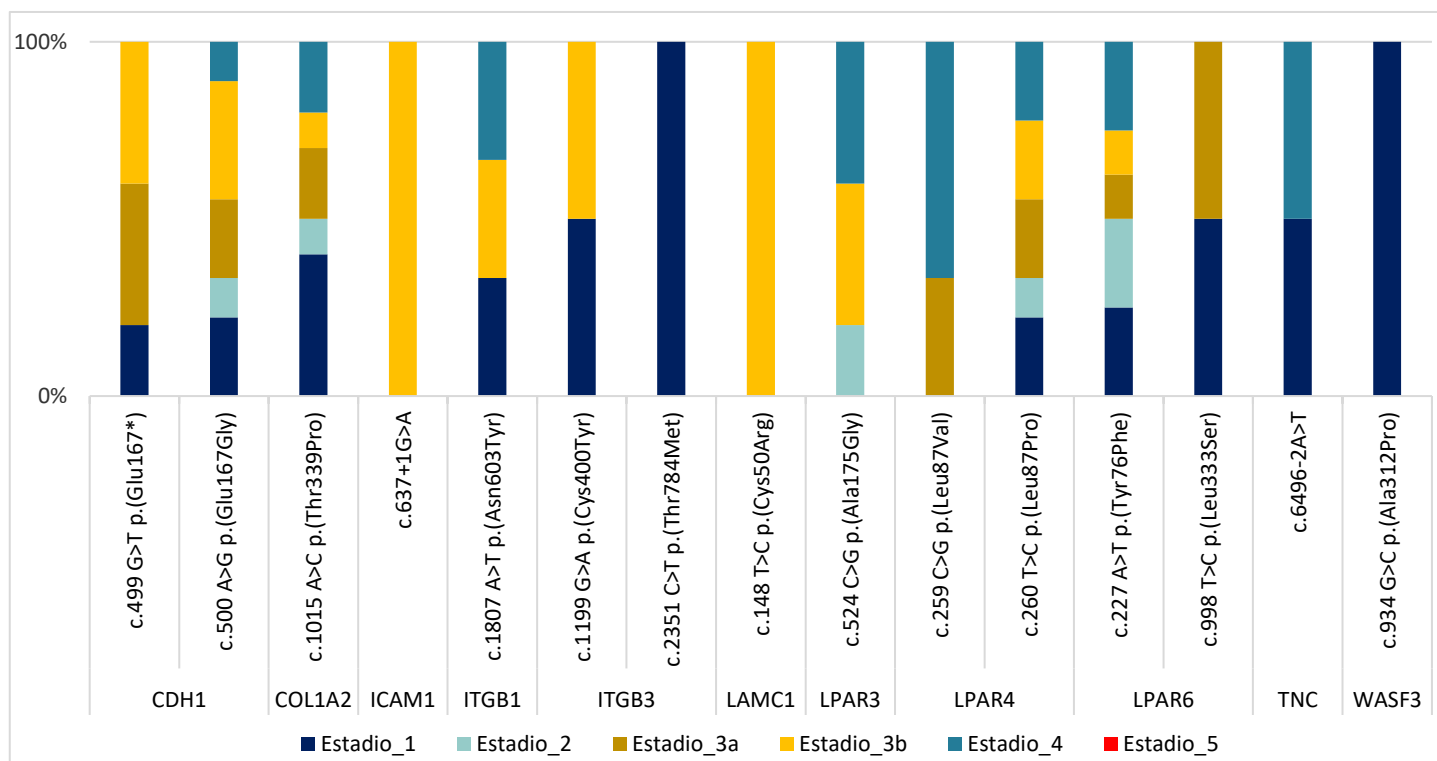


Figura 27. Distribución de mutaciones en GEFS por estadios de ERC

4.6. GLOMERULONEFRITIS MEMBRANOPROLIFERATIVA

4.6.1. Características clínicas y patológicas

Las características clínicas de los pacientes con GNMP se encuentran resumidas en la Tabla 13.

De los 19 pacientes con GNMP, el 74% (14) eran hombres y el 26% (5) mujeres. La media de edad fue de $55,53 \pm 18,52$ años (en un rango de 1-78 años). El 84% padecían HTA. El filtrado glomerular medio estimado fue de $43,78 \pm 28,72$ ml/min, la proteinuria media fue de $7,48 \pm 12,51$ g/día.

Se identificó la variante GnC3 en cuatro pacientes (21%) (Tabla 14 y Figura 28).

En cuanto a los estadios de ERC, se observó en un 10,5% de los pacientes en estadio 1 y 4 respectivamente; 16% en estadio 2; 5% en estadio 3a; 31,6% en estadio 3b; y 21% en estadio 5.

Tabla 13. Características clínicas pacientes GNMP

	GNMP (n=19)
Sexo: Hombres / Mujeres, n (%)	14 / 5 (73,68/26,32)
Edad (años), media (DE)	55,53 (18,52)
Clínica, media (DE)	
Proteinuria (g/día)	7,48 (12,51)
Creatinina (mg/dl)	3,37 (3,71)
TFG (ml/min)	43,78 (28,72)
HTA, n (%)	16 (84,21)
Estadio de la ERC, n (%)	
1	2 (10,53)
2	3 (15,79)
3a	1 (5,26)
3b	6 (31,58)
4	2 (10,53)
5	4 (21,05)

DE: Desviación estándar. TFG: Tasa de filtración glomerular. ERC: Enfermedad renal crónica.

Tabla 14. Características histopatológicas GNMP

Variantes GNMP	n	%
GNMP	15	79
GnC3	4	21

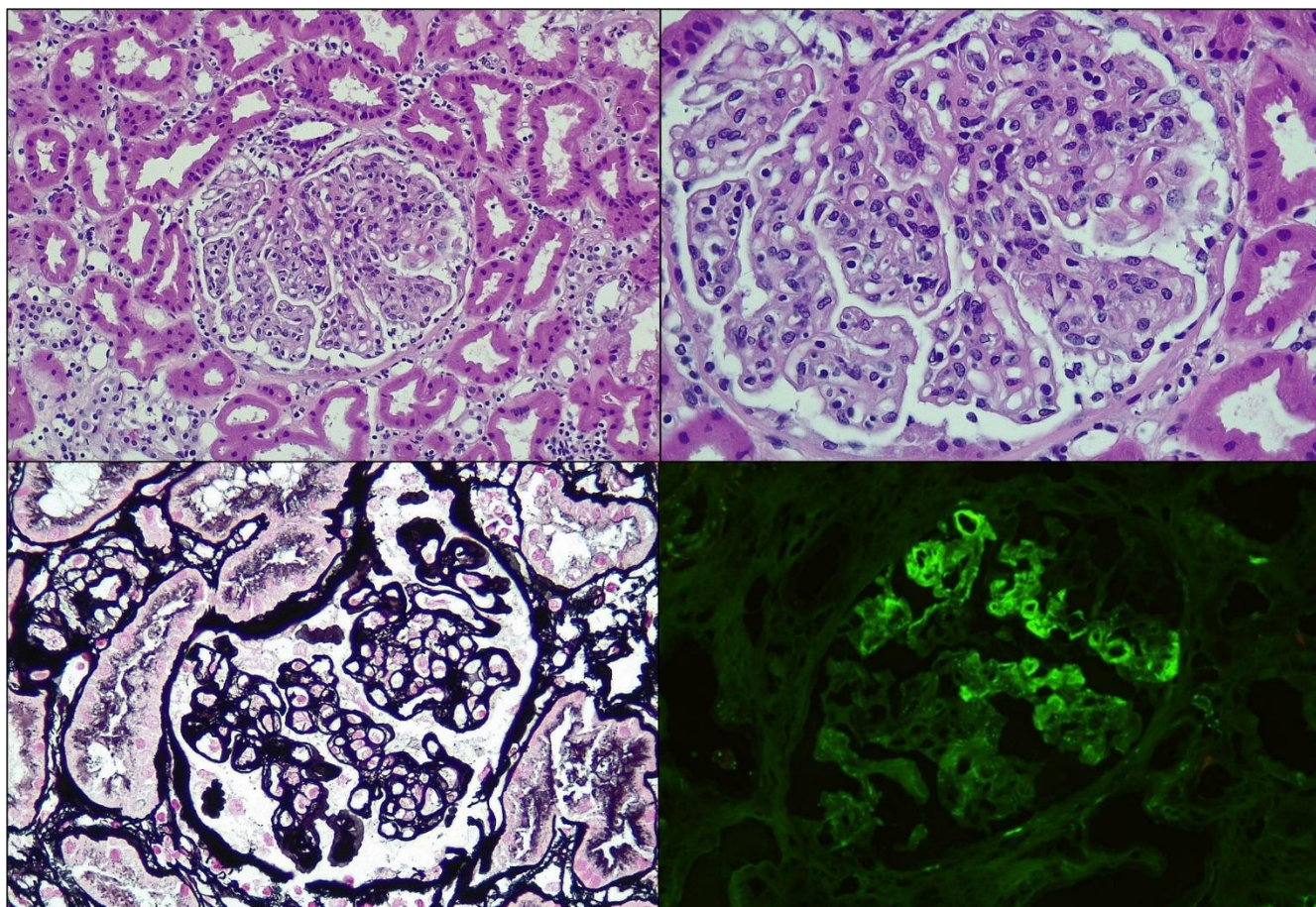


Figura 28. Caso GnC3. HE. Glomérulo con lobulación, proliferación mesangial y endocapilar, y engrosamiento de la membrana basal. Plata evidencia de dobles contornos. IF C3.

4.6.2. Análisis mutacional

Se identificaron un total de 392 mutaciones de las que el 55% son mutaciones silentes. Comenzando por las mutaciones no silenciosas, obtenemos un total de 177 SNV, desglosadas en la Figura 29, por gen afectado.

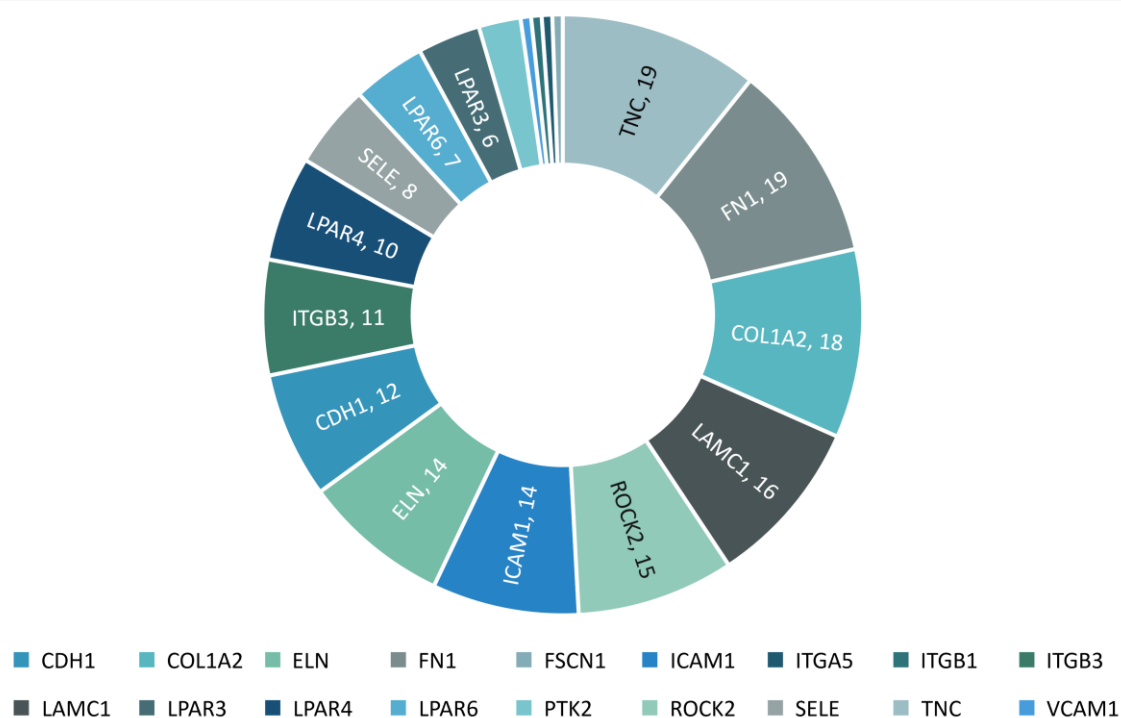


Figura 29. Mutaciones no silenciosas por gen, en pacientes GNMP

Mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido

De los 19 pacientes con GNMP, el 95% presentaba mutaciones de clase 3, 4 y/o 5. Se determinaron variantes *missense* de significado incierto en los genes *CDH1*: c.500 A>G p.(Glu167Gly), *COL1A2*: c.1015 A>C p.(Thr339Pro), *ELN*: c.1531 C>T p.(Pro511Ser), *FN1*: c.1544 G>A p.(Arg515Gln), *FN1*: c.2593 G>A p.(Val865Ile), *FN1*: c.4046 C>T p.(Pro1349Leu), *FN1*: c.5389 G>A p.(Asp1888Asn), *ITGB1*: c.1807 A>T p.(Asn603Tyr), *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr), *LAMC1*: c.148 T>C p.(Cys50Arg), *LAMC1*: c.3195 G>A p.(Met1065Ile), *LPAR3*: c.524 C>G p.(Ala175Gly), *LPAR4*: c.259 C>G p.(Leu87Val), *LPAR4*: c.260 T>C p.(Leu87Pro), *LPAR6*: c.227 A>T p.(Tyr76Phe), *LPAR6*: c.998 T>C p.(Leu333Ser), *PTK2*: c.2266 A>G p.(Met756Val), *PTK2*: c.2660 G>A p.(Ser887Asn), *SELE*: c.130 T>C p.(Tyr44His), y *TNC*: c.3422 C>G p.(Thr1141Arg), así como una mutación patogénica *missense* en el gen *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr), una *nonsense*

potencialmente patogénica en el gen *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*), y una mutación que altera el patrón de *splicing*, potencialmente patogénica *TNC*: c.6496-2A>T. En el grupo control se identifica en uno de ellos, en comparativa, la mutación *missense* de significado incierto *TNC*: c.3422 C>G p.(Thr1141Arg) (Figura 30). Se encontraron diferencias significativas, respecto al grupo control, en el número de mutaciones ($p < 0,0001$), y específicamente en las mutaciones individuales de *CDH1*: c.500 A>G p.(Glu167Gly) ($p = 0,0009$), *LPAR3*: c.524 C>G p.(Ala175Gly) ($p = 0,0332$), *LPAR4*: c.259 C>G p.(Leu87Val) ($p = 0,0187$), *LPAR4*: c.260 T>C p.(Leu87Pro) ($p = 0,0017$), y *LPAR6*: c.227 A>T p.(Tyr76Phe) ($p = 0,0187$).

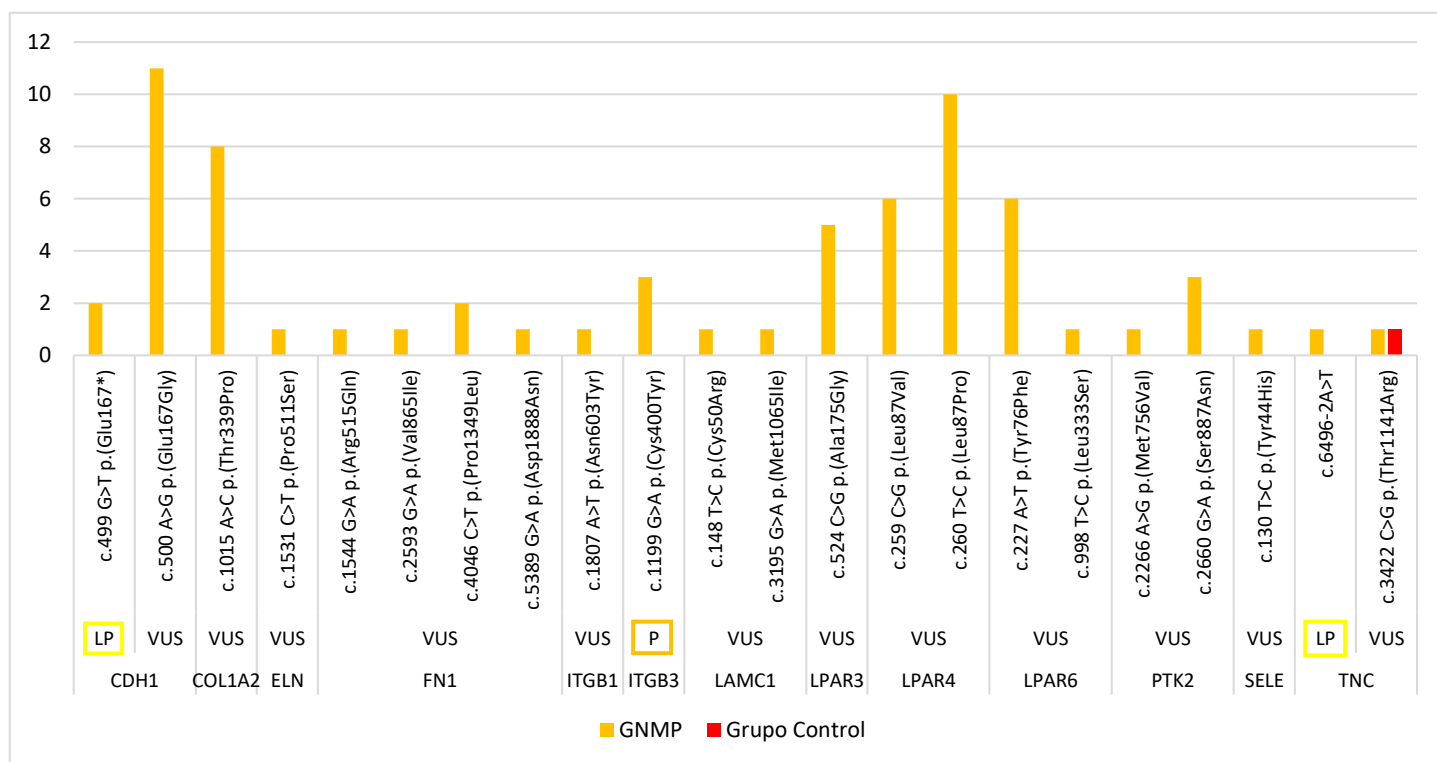


Figura 30. Frecuencia de mutaciones LP, P y VUS en GNMP y grupo control

Tres pacientes presentaron la mutación *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr), dos hombres y una mujer, con una edad media de 70 años. La mutación *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*), se encontró en dos pacientes varones con una edad media de 64,5 años, uno de ellos con la mutación añadida de *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr).

El paciente con ambas mutaciones debutó con FRA y proteinuria de rango nefrótico. Durante su ingreso se diagnosticó de carcinoma epidermoide pulmonar multicéntrico, por lo que fue valorado por oncología. Actualmente presenta una mejoría de la función

renal, con ERC estadio 3. Otro de los pacientes, evoluciona con ingresos repetidos por fiebre, progresando además la ERC de estadio 3 a estadio 5 en un año y actualmente precisando hemodiálisis. La tercera paciente, con la mutación *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr), presenta HTA de larga evolución, sufriendo reagudizaciones de IR en el contexto de anemia grave por hemorragia digestiva alta. El último paciente, con mutación *CDH1*: c.499 G>T p.(Glu167*), presenta desde el inicio una ERCA, segundo TR. El primer injerto perdido por recidiva de GNMP con depósito de C3 y rechazo crónico activo mediado por anticuerpos a los nueve años postrasplante. Actualmente con HTA de mal control e IR, con ERC estadio 3b.

La mutación *TNC*: c.6496-2A>T se detectó en un hombre, que debutó con ERC estadio 5. Este paciente ha estado en diálisis peritoneal desde 2018. En 2020 se sometió a TR, pero en 2021 experimentó un rechazo activo mediado por anticuerpos.

Mutaciones con significado clínico y subtipos GNMP

Por otra parte, teniendo en cuenta los subtipos histopatológicos, observamos que la media de mutaciones no es superior en GnC3 ($p = 0,2232$) (Figura 31). No obstante, podemos identificar que hay algunas de las mutaciones que sólo se encuentran en aquellos casos de GnC3: *FN1*: c.4046 C>T p.(Pro1349Leu), *ITGB1*: c.1807 A>T p.(Asn603Tyr), *SELE*: c.130 T>C p.(Tyr44His), y *TNC*: c.6496-2A>T (Figura 32).

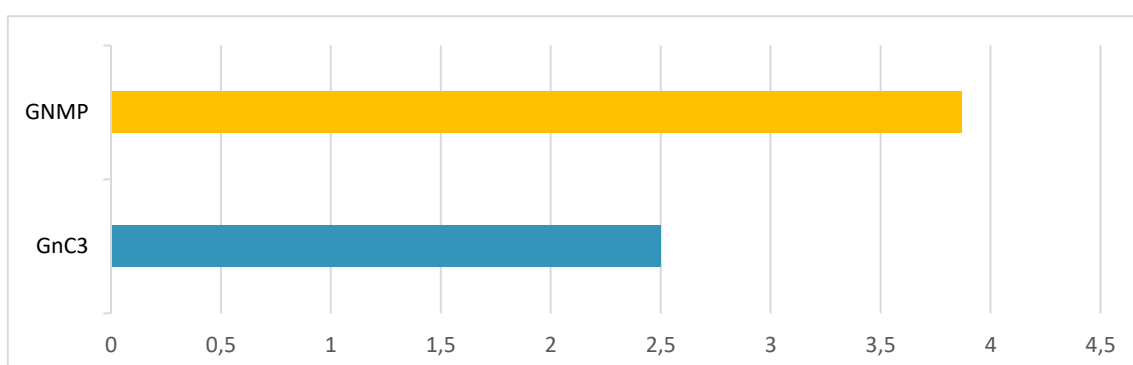


Figura 31. Media de mutaciones en GNMP y GnC3

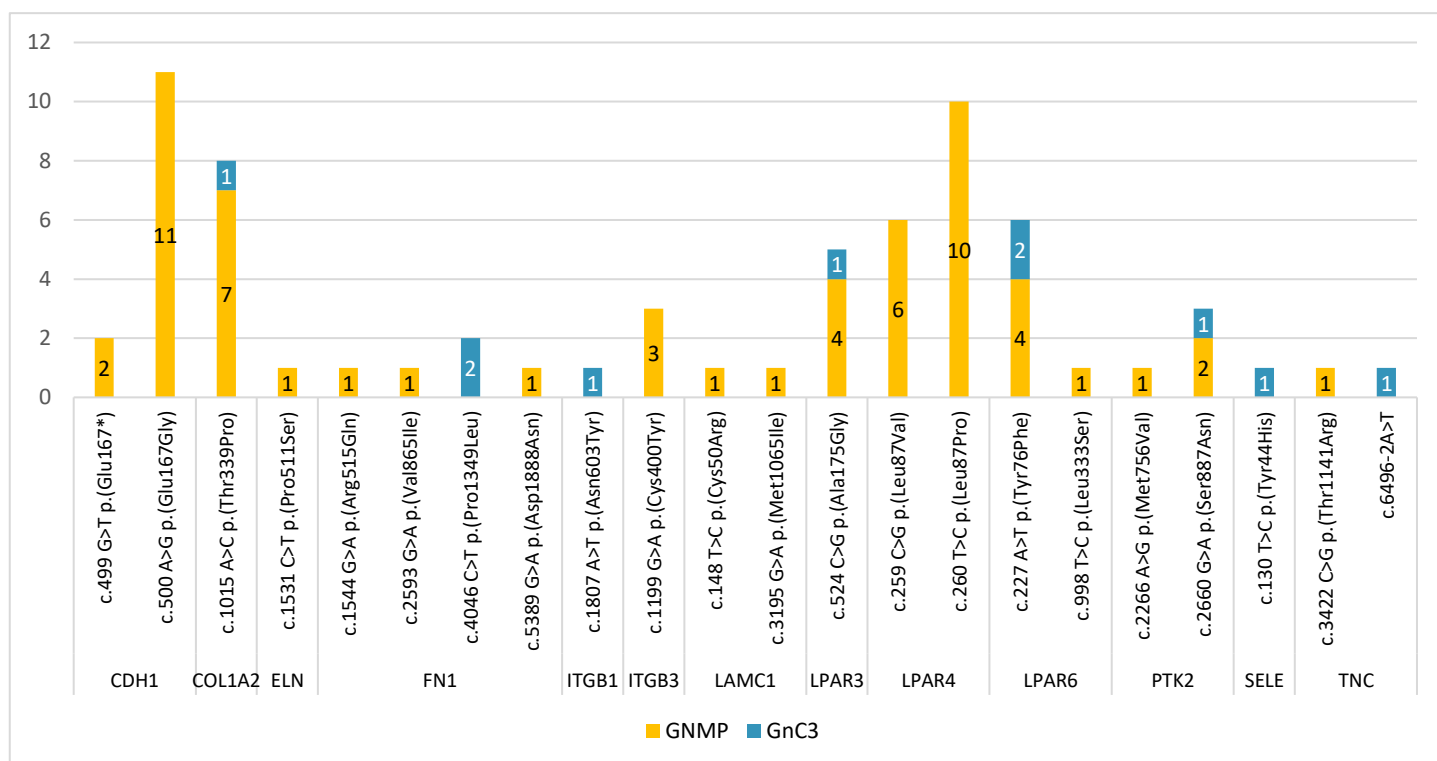


Figura 32. Distribución de las mutaciones según subtipo de GNMP

Mutaciones con significado clínico y gravedad de enfermedad

En otro enfoque, se exploró la relación entre las mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido y la gravedad de la enfermedad, determinada por el nivel de proteinuria, incluyendo también la variación en los niveles de creatinina. Se observó que existe una distribución de mutaciones ligeramente superior en pacientes con niveles de proteinuria en rango nefrótico (Figura 33), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0573$). Asimismo, las mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas se agrupan en pacientes con niveles de proteinuria en rango nefrótico, con significación estadística ($p = 0,0112$). En cuanto a los niveles de creatinina, se observó que las mutaciones son más frecuentes en los pacientes con niveles altos de creatinina (Figura 34), aunque esta asociación no alcanza significación estadística ($p = 0,6960$).

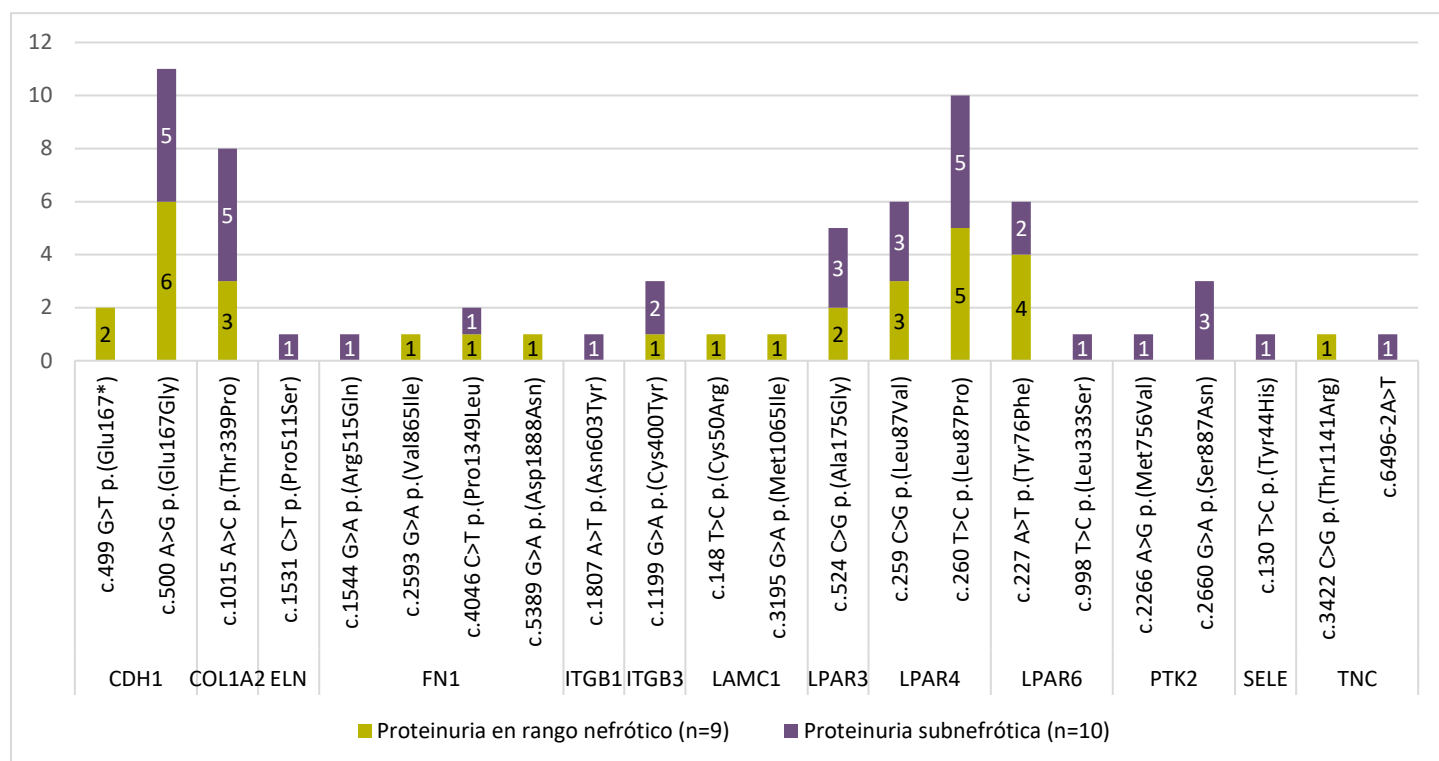


Figura 33. Distribución de mutaciones en GNMP por nivel de proteinuria

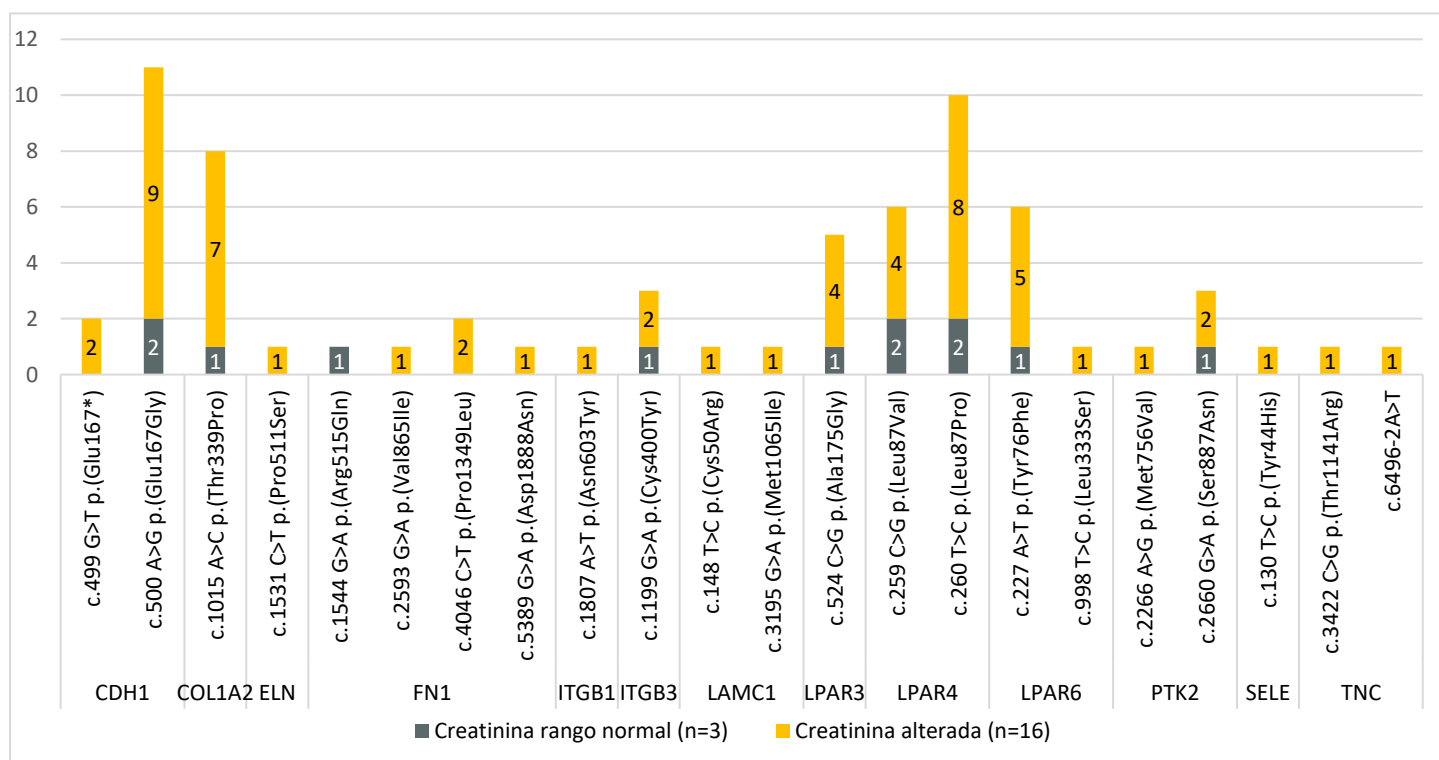


Figura 34. Distribución de mutaciones en GNMP por valores de creatinina

Además, para establecer una correlación directa entre estas mutaciones y la GNMP, se tomaron en cuenta los estadios de la ERC. De acuerdo con el análisis estadístico, la cantidad de mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido no es una variable dependiente del estadio de la ERC ($p = 0,3025$), y lo mismo ocurre con las mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas ($p = 0,5419$). Creamos un gráfico que ilustra la distribución de mutaciones por genes y etapas de ERC (Figura 35), en el que destaca la presencia de mutaciones con una mayor prevalencia en fases avanzadas, como se observa en los genes *CDH1*, *ITGB1*, *LAMC1*, *SELE* y *TNC*.

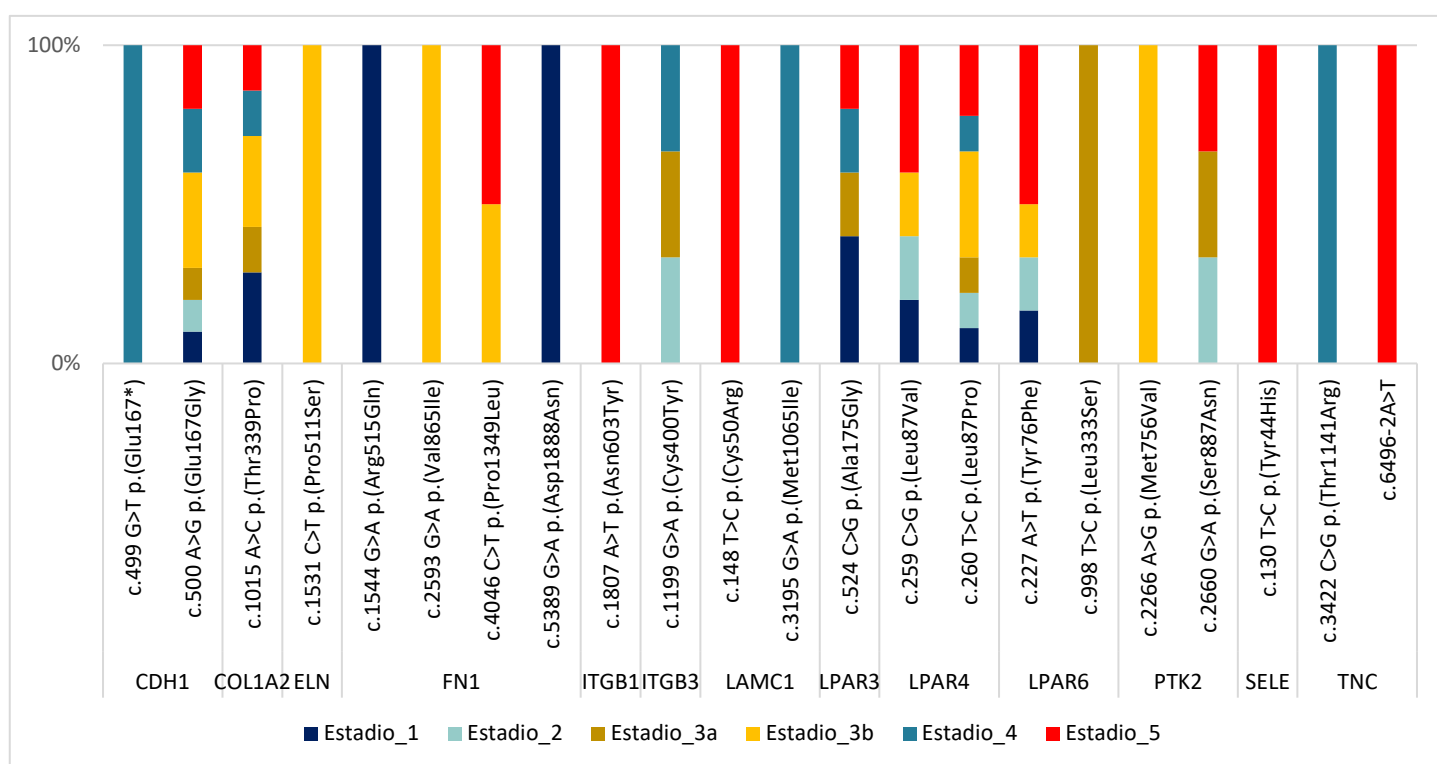


Figura 35. Distribución de mutaciones en GNMP por estadios de ERC

5. *DISCUSIÓN*

5.1. DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA

5.1.1. Fortaleza del estudio

El presente trabajo, basado en el estudio por secuenciación masiva de genes relacionados con los mecanismos de anclaje celular, ha permitido identificar alteraciones, previamente desconocidas, vinculadas al desarrollo de distintas entidades de glomerulopatías.

El enfoque del estudio, fundamentado en analizar el tejido renal patológico, nos permite analizar las alteraciones intrínsecas al tejido, ya sea por mutaciones puntuales en células madre o por alteraciones con una expresión quimérica en el organismo.

5.1.2. Limitaciones del estudio

Cabe mencionar varias limitaciones. Aunque nuestro estudio arroja luz sobre la prevalencia de mutaciones en las moléculas de adhesión y las glicoproteínas de la MEC en pacientes con GN IgA, GEFS y GNMP, es importante tener en cuenta que estos hallazgos se basan en un tamaño de muestra relativamente pequeño, lo que puede limitar la generalización de los resultados.

En el caso de la GEFS, la falta de un sistema de clasificación bien definido para la GEFS de inicio en la edad adulta y la ausencia de métodos validados para distinguir la GEFS no familiar (48) dificulta sacar conclusiones definitivas. Así como la ausencia de análisis de ME impide diferenciar entre formas primarias y adaptativas de GEFS.

Además, en este análisis, la población control no es representativa de la población utilizada en las bases de datos generales, como *1000 Genomes*, así que una desviación frente a la frecuencia en la base de datos de *1000 Genomes* no necesariamente implica que haya asociación con la enfermedad. El mejor control, no obstante, es nuestro grupo control, teniendo presente que en estos estudios de asociación, o la asociación es muy fuerte, o necesariamente necesitaríamos secuenciar a cientos o miles de personas.

Por último, la interpretación de nuevas variantes sin una importancia clínica conocida puede ser un desafío y se necesitan pruebas funcionales adicionales para vincular estas variantes a las glomerulopatías (17,53–55).

5.1.3. Sesgos

En este estudio, se analizan mutaciones en muestras de tejido renal obtenidas de material FFIP. Es importante destacar que la extracción de ADN de muestras FFIP puede introducir artefactos que podrían ser interpretados erróneamente como mutaciones. Por lo tanto, aunque hemos tomado precauciones para minimizar estos artefactos, mediante la reconversión de las desaminaciones formólicas, la posibilidad de error no puede ser completamente eliminada.

Aunque no disponemos de información sobre la frecuencia alélica de las variantes (VAF), hemos supuesto que las mutaciones identificadas son somáticas. Esta suposición se fundamenta en nuestra hipótesis inicial, que propone que durante el desarrollo embrionario se generan mutaciones que resultan en mosaicismos y quimerismos. Estos, en presencia de un entorno inflamatorio y moléculas de adhesión anormales, darían lugar a la glomerulopatía. Sin embargo, serían necesarios estudios pareados con ADN genómico de sangre de estos mismos pacientes para descartar su origen germinal.

5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5.2.1. Características poblacionales

En nuestra cohorte de estudio, la edad media es significativamente menor en GN IgA frente a GEFS y GNMP ($p = 0,0137$). Como bien está descrito en la literatura, GN IgA se puede presentar a cualquier edad existiendo un pico en la segunda y tercera década de la vida (18), por lo que se desarrolla con mayor frecuencia entre mediados de la adolescencia y alrededor de los 35 años (56). GEFS es otra entidad responsable del síndrome nefrótico en el niño (<10%) pero su frecuencia aumenta a medida que aumenta la edad, llegando a un 20% en adolescentes y adultos jóvenes (15). La posibilidad de que se diagnostique una alteración genética en un paciente con GEFS disminuye según aumenta la edad de debut de la enfermedad (28). En cuanto a la GNMP, se describe que las formas idiopáticas son más prevalentes en población infantil y adultos jóvenes, frente a las formas secundarias que se diagnostican con más frecuencia en la edad adulta (42).

5.2.2. Estudios mutacionales

Destaca la asociación entre la detección de mutaciones con significado clínico patogénico y la presencia de glomerulopatía ($p = 0,004$) (RP 1,39; IC 95%: 1,18 a 1,64), y evidenciada por el hecho de que el 36% de los pacientes con glomerulopatía presentan dichas mutaciones, ausentes en el grupo control. Este hallazgo no solo subraya la relevancia de la genética en estas afecciones renales, sino que también plantea posibles intervenciones diagnósticas y terapéuticas. Es importante señalar que, en nuestro estudio, no se detectó ninguna mutación en un solo gen que pudiera explicar cada una de las glomerulopatías. Sin embargo, cada paciente presentaba un número variable de mutaciones no silenciosas (entre 9 y 27), y estas diferencias también fueron estadísticamente significativas en comparación con el grupo control ($p < 0,0001$). Esto podría explicar, al menos en parte, la predisposición a la enfermedad que se desarrollaría en respuesta a varios estímulos lesivos.

Durante muchos años, se han realizado investigaciones sobre las modificaciones moleculares en varios componentes, no solo en el componente glomerular, sino también a nivel tubulointersticial. Los trabajos publicados se enfocan en las modificaciones que resultan en proteinuria y lo relacionado con ella; por lo tanto, se estudia la biología celular del podocito y la membrana de filtración (57).

La mayor parte de estos estudios, como hemos podido comprobar, se basan en niveles diferenciales de expresión génica de moléculas que en mayor o menor medida están asociadas con la respuesta inflamatoria o la conformación de estructuras subcelulares como los pedicelos. Nuestro análisis se distingue de los demás en que se fundamenta en las alteraciones existentes en el tejido patológico, las cuales tendrían la capacidad de alterar la conformación o afectar significativamente la funcionalidad de las moléculas que participan en la adhesión celular. La utilización de muestras de tejido renal patológico, en lugar de ADN sanguíneo genómico, es un enfoque innovador que podría permitir la identificación de cambios genéticos no detectados por otros grupos de investigación. Este enfoque puede haber hecho posible la detección de cambios en mosaicos, que son variaciones genéticas presentes solo en ciertos tipos de células o tejidos, y no distribuidas de manera uniforme en todo el organismo.

El rol de la nefrina es esencial para la maduración del podocito durante su desarrollo. La nefrina y los miembros de la familia *Neph* desempeñan un papel en la adhesión celular y la señalización, por lo que regulan la estructura y función de los podocitos y mantienen la ultrafiltración glomerular normal. Por lo tanto, las mutaciones o deleciones en el gen *NPHS1* que codifica la nefrina conducen a proteinuria y síndrome nefrótico (58–60).

Las alteraciones en diversas proteínas relacionadas con el diafragma de hendidura, como *Neph1*, podocina, la proteína asociada a CD2 y FAT, resultan en la desestructuración y alteración del desarrollo del proceso del podocito. De igual manera, las mutaciones en la integrina, α -actinin-4, y $\alpha3\beta1$, que vinculan los podocitos a la MBG, y en la podocalixina, localizada en el dominio apical de los podocitos, conducen a un estado de proteinuria (58).

Las alteraciones en *NPHS1* y 2, que codifican para nefrina y podocina respectivamente, pueden desencadenar el desarrollo de síndrome nefrótico. CD2AP es una proteína que une la nefrina y la podocina al citoesqueleto de actina, y la podoplanina une el pie y la MBG, por lo que su ausencia podría causar proteinuria (61).

Se han investigado también las mutaciones en el colágeno IV, componente esencial en la MBG (62) así como otras moléculas involucradas, destacando VCAM-1 y selectina E (63), la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 por la vasculatura renal y las células epiteliales parietales glomerulares y LFA1 (64,65). De este modo, la expresión anómala de ICAM-1 en el epitelio del túbulo proximal se asocia con la infiltración glomerular e intersticial de los leucocitos, por lo que la expresión tubular e intersticial de la ICAM-1 puede ser un indicador de alteración túbulointersticial en GN IgA (66–69).

Recientemente, los estudios se centran en paneles de NGS, analizando genes clásicos como *COL4A3* y *COL4A4*, y otros como *INF2*, gen modificador de proteínas, cuya mutación se ha relacionado con la GEFS (70); *CLCN5*, gen que codifica una proteína miembro de la familia CIC de canales de iones de cloruro y transportadores de iones; *MYO1E*, cuya mutación se ha vinculado con la GEFS (71); destacando la importancia de la secuenciación de exomas en la identificación de fenocopias en pacientes con enfermedades renales hereditarias (72), e integrando, además, análisis bioinformáticos (73).

La proteinuria es un factor de riesgo importante para la progresión de la enfermedad renal. Koop y colaboradores estudian el papel de las moléculas asociadas a los podocitos en la proteinuria de las enfermedades renales adquiridas, incluyendo la GN IgA y GEFS (61), y sugieren que la disminución de la expresión de nefrina, podocina y podocalixina podría contribuir a la fisiopatología de la proteinuria en las enfermedades renales adquiridas (74). En nuestros resultados, observamos una tendencia hacia una mayor acumulación de mutaciones en el rango subnefrótico de proteinuria, con significación estadística, en pacientes con GN IgA ($p = 0,0119$) y GEFS ($p = 0,0019$). Sin embargo, en la GNMP notamos una distribución ligeramente superior de mutaciones en pacientes con niveles de proteinuria en el rango nefrótico, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0573$). Curiosamente, las mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas se agrupan en pacientes con GNMP que presentan niveles de proteinuria en rango nefrótico, con significación estadística ($p = 0,0112$).

Cabe destacar que, en nuestro trabajo, todos los pacientes con glomerulopatías mostraron alteraciones en la tenascina y la fibronectina 1, que previamente se han relacionado con lesión de los podocitos (75–77). También se ha propuesto su relación con la progresión de GN IgA (78–80), y se ha sugerido que la expresión aumentada de *FN1* puede estar asociada con la proliferación mesangial y la fibrosis en la GN IgA (81). La fibronectina, como componente de la MEC, junto a laminina, colágenos y proteoglicanos, han sido clásicamente objeto de estudio, postulando que cualquier alteración estructural puede ser causante de la proteinuria en las glomerulopatías (82). No obstante, aunque en todos nuestros pacientes encontramos variantes en *FN1*, todas ellas fueron benignas.

Siguiendo las líneas de investigaciones contemporáneas, nuestro estudio se basa en la asociación genética mediante secuenciación masiva, lo que nos permitió examinar de manera eficiente múltiples genes en un único experimento en alta resolución (54). Esta estrategia facilita la identificación de nuevas moléculas o vías involucradas o que contribuyen al desarrollo de las glomerulopatías aquí estudiadas.

5.2.3. GN IgA y moléculas de adhesión

La IgA es un tipo de anticuerpo que desempeña un papel importante en la inmunidad, y además de su función inmunológica, puede interactuar con moléculas de adhesión para regular la respuesta inflamatoria y la adhesión celular. En el contexto de la GN IgA, las moléculas de adhesión desempeñan un papel importante en la inflamación y el daño renal.

En el grupo de estudio de pacientes con GN IgA, notamos una frecuencia elevada de mutaciones en las moléculas de adhesión y las glicoproteínas de la MEC. La prevalencia de mutaciones no silenciosas fue significativamente mayor en los pacientes con GN IgA en comparación con el grupo control ($p < 0,0001$). Además, se observó lo mismo con las mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido ($p < 0,0001$), y específicamente en las mutaciones con significado clínico patogénico ($p = 0,0165$). Además, en el análisis estadístico de asociación, la detección de mutaciones con significado clínico patogénico y la presencia de GN IgA es significativo ($p = 0,002$) (PR 2,32; IC 95%: 1,51 a 3,56).

El primer estudio de vinculación de todo el genoma demostró la asociación de GN IgA a 6q22-23 (llamado IGAN1) (83). En el año 2006, Bisceglia y colaboradores (84) realizaron un estudio de vinculación de todo el genoma que replicó esta vinculación con 6q22–23 e identificó dos señales de vinculación sugerentes en la región 4q26–31. En 2007, se detectó un nuevo locus de susceptibilidad a la GN IgA en el cromosoma 2q36 (85), identificándose 22 genes anotados y 17 no anotados en esta región del cromosoma 2q36, incluidos *COL4A3* y *COL4A4*, que se asociaron con el desarrollo del síndrome de Alport (86) y la enfermedad de la membrana basal delgada (87). Pero ninguno de estos estudios identificó genes causales de GN IgA. Hasta la fecha, se han llevado a cabo más de 160 estudios de asociación de genes candidatos para la GN IgA (17).

En los primeros estudios, los genes candidatos seleccionados eran principalmente el gen *MHC* clase II, el gen de la cadena α o β del receptor de células T (*TCR*), genes asociados con citoquinas y genes relacionados con el sistema renina-angiotensina, con un enfoque principal en la progresión de la GN IgA más que en la susceptibilidad a la enfermedad. A medida que se ha ido comprendiendo mejor la patogénesis de la GN IgA, se ha considerado que la glicosilación anormal de IgA1 es el mecanismo patogénico más

relevante (26,88). Las glicosiltransferasas que intervienen en la glicosilación de IgA1 (*C1GALT1*, *C1GALT1CA* y *ST6GALNAC2*) se seleccionaron como genes candidatos para analizar su asociación con el riesgo de GN IgA, Li y su equipo fueron los primeros en sugerir que las variantes en el gen *C1GALT1* y el gen *ST6GALNAC2* estaban asociadas con la susceptibilidad a la GN IgA (89,90).

Es importante señalar que, en nuestro estudio, no se detectó ninguna mutación en un solo gen que pudiera explicar la GN IgA, sin embargo, cada paciente mostraba un número fluctuante de mutaciones no silenciosas (de 13 a 27 por paciente), y todos los pacientes presentaban mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido, lo cual podría justificar parcialmente la susceptibilidad a la enfermedad que se manifestaría en respuesta a diversos estímulos dañinos.

Cabe destacar que, en nuestra cohorte, el 95%, 21 de los 22 pacientes, presentan mutaciones en *COL1A2*, observando en 14 de ellos, mutaciones de tipo VUS, *COL1A2*: c.1015 A>C p.(Thr339Pro), añadiendo en uno de los mismos, *COL1A2*: c.2168 A>G p.(Asn723Ser). Además, un gran porcentaje de nuestros pacientes exhibieron mutaciones en lamininas y elastinas (91%) e *ICAM1* (82%) que se han descrito en otros estudios (67,68).

Una de las moléculas de adhesión más estudiadas en la GN IgA es la molécula ICAM-1, que se expresa en las células endoteliales de los glomérulos y otras células renales, y esta expresión se incrementa durante la inflamación. La interacción de la IgA con la ICAM-1 puede contribuir a la inflamación y al daño renal en esta enfermedad (66,67). Mutaciones en *ICAM-1* se observaron en un 82% (18/22) de nuestros pacientes, siendo dos de ellas mutaciones de clase 3, *ICAM1*: c.628 C>T p.(Gln210*), en 6 pacientes, y añadiendo *ICAM1*: c.625 C>T p.(Leu209Phe) en dos de los mismos. Y una mutación de clase 4, *ICAM1*: c.637+1G>A, en otro paciente.

Otra molécula de adhesión implicada en la GN IgA es la molécula VCAM-1, que está involucrada en la inflamación y la adhesión celular. Se ha demostrado que la expresión de VCAM-1 se incrementa en la GN IgA y puede contribuir al reclutamiento de células inflamatorias y al daño renal (91). No obstante, en nuestra cohorte de pacientes con GN IgA no se observaron mutaciones no silenciosas en *VCAM-1*.

Está descrito que el sistema Rho/factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) juega un papel crucial en la progresión del daño renal debido a la estimulación del depósito de moléculas de la MEC (79), demostrándose que la inhibición de *ROCK2* puede tener efectos beneficiosos en la nefropatía (92). Aunque hemos encontrado mutaciones en *ROCK2* en un 77% (17/22) de nuestros pacientes, todas fueron benignas.

El gen *ITGB2*, codifica una cadena beta de integrina. Esta cadena beta se une a varias cadenas alfa para formar distintos heterodímeros de integrina. Las integrinas, que son proteínas integrales de la superficie celular, desempeñan un papel en la adhesión celular y en la señalización mediada por la superficie celular. La proteína que codifica este gen tiene un papel crucial en la respuesta inmune, y los defectos en este gen resultan en una deficiencia en la adhesión de los leucocitos. Se ha demostrado que *ITGB2* está involucrado en la adhesión celular y la remodelación de la MEC en pacientes con cáncer renal (93). Un análisis bioinformático en pacientes con ERC mostró que *ITGB2* correlaciona negativamente la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) de los pacientes con ERC (94). En nuestro estudio, que incluye subunidades de integrinas, observamos variantes en *ITGB3* en el 68% (15/22) de los pacientes con un espectro mutacional diverso. Destaca la mutación patogénica *ITGB3*: c.1199 G>A p.(Cys400Tyr) en cuatro pacientes, y la mutación VUS *ITGB3*: c.580 T>C p.(Ser194Pro) en otro paciente. Se han reportado, también, cambios en la expresión de estas integrinas en la GN IgA, identificando a *ITGB2* como un posible actor importante en el desarrollo de la GN IgA (95). En dicho análisis se descubrió que *FCER1G* e *ITGB2* exhiben también mayor expresión en otros tipos de GN primaria como la GEFS, lo que indica que estos genes pueden estar asociados con la patogénesis de otros tipos de GN primaria. Aunque tienen la expresión más alta en la GN IgA en comparación con otros tipos de GN primaria, desempeñarían un papel importante en la GN IgA, pero sin ser específicos de la enfermedad.

Muy recientemente, el metanálisis GWAS más grande hasta la fecha (96), que incluye 17 cohortes internacionales de casos y controles, ha identificado 30 loci de riesgo significativos de GN IgA en todo el genoma, incluyendo 16 loci nuevos, lo que representa el 11% del riesgo general de la enfermedad, y sugiere que todavía queda una gran cantidad de variantes genéticas por descubrir.

5.2.4. GEFS y moléculas de adhesión

En nuestra cohorte de pacientes con GEFS de inicio en la edad adulta observamos por primera vez una alta tasa de mutaciones en las moléculas de adhesión y las glicoproteínas de la MEC, siendo la alta prevalencia de mutaciones no silenciosas un resultado clave de nuestra investigación. Tanto en la población general (población europea, dbSNP, *1000 Genomes*) como en nuestro grupo de control, esta tasa de alteraciones es menor que en el grupo de pacientes con GEFS, habiéndose identificado de forma estadísticamente significativa un mayor número de mutaciones global en el grupo de pacientes ($p < 0,0001$). También se encontraron diferencias significativas, respecto al grupo control, en el número de mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido ($p < 0,0001$). Al igual que este trabajo, otros estudios genéticos han informado previamente sobre mutaciones en moléculas de adhesión y glicoproteínas de la MEC en pacientes con GEFS (53,97,98).

La mayoría de las investigaciones genéticas han establecido una correlación directa entre las mutaciones en los genes de podocitos y colágeno *COL4A* (A3/A4/A5), y el desarrollo de GEFS familiar. Esta correlación persiste incluso en casos de GEFS de inicio en la edad adulta, donde se pudo identificar una causa monogénica de GEFS hasta en el 29% de los casos (27,55,99–101). Se informó una tasa similar de mutación en el SNCR de inicio en la edad adulta, con una mayor edad de inicio de la GEFS relacionada con una tasa más baja de identificación de un solo gen (102).

Se han notificado mutaciones en el gen *INF2* en GEFS familiar de ascendencia caucásica y asiática (53,98), mientras que Marx y colaboradores identificaron una nueva variante *nonsense* en el gen *PODXL* en una familia de tres generaciones con una nefropatía glomerular atípica parecida a la GEFS (97). Aunque estos estudios encontraron mutaciones en grupos de moléculas específicas, no investigaron el conjunto completo de genes que constituyen estos grupos. Por tanto, la mayor parte de series publicadas en este sentido se han relacionado con familias y síndromes hereditarios y no con enfermedades esporádicas como es nuestro caso. Es decir, las mutaciones descritas lo han sido a partir de estudios en línea germinal y no en células de línea somática.

Cabe destacar en nuestro estudio que, un gran porcentaje de pacientes exhibieron mutaciones en lamininas (87%) e integrinas (78%), que se han descrito en otros estudios, (103,104) los cuales discutiremos a continuación.

Si bien la degradación de los podocitos es un paso crítico en la fisiopatología de la GEFS, el medio ambiente también puede contribuir al desarrollo de lesiones segmentarias. La investigación ha demostrado que las alteraciones en las células epiteliales parietales y mesangiales adyacentes también desempeñan un papel en la GEFS (105). Las glicoproteínas de la MEC y las moléculas de adhesión también contribuyen a la salud de los podocitos (77,106–108). Los estudios en cultivos celulares y en animales han relacionado las alteraciones en estas moléculas con el síndrome nefrótico y el daño de los podocitos (75,76,103,109–112). Además, las mutaciones en proteínas de adhesión como la laminina $\beta 2$, la integrina $\alpha 3$ y la integrina $\beta 4$ en humanos se han asociado con el SNCR debido a una falta de adhesión adecuada de los podocitos a la MBG (113–116). La GEFS experimental y humana exhibe una expresión alterada de proteínas de la MEC, incluidas laminina-1, perlecano, colágeno tipo IV-2, laminina-2, agrina y colágeno tipo IV-4, que son producidas por células epiteliales parietales y podocitos (103). Por lo tanto, estas variaciones en las proteínas de la MEC posiblemente puedan tener un impacto en el tipo histopatológico de GEFS (117).

Además de otras señales, las moléculas de adhesión y las glicoproteínas de la MEC son componentes de una red que implica interacciones redundantes entre moléculas (77). La heterogeneidad de la investigación y la dificultad para identificar una única etiología común de una enfermedad, que frecuentemente es sindrómica, se explica por esta complicada red (27,30).

Es importante destacar que, nuestra investigación no reveló ninguna mutación en un solo gen que pudiera explicar la GEFS, pero cada paciente presentaba un rango variable de mutaciones no silenciosas (entre 9 y 22 mutaciones por paciente), mostrando el 96% de ellos mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido. Esto podría explicar, al menos en parte, la predisposición a la enfermedad que se desarrollaría ante varios estímulos lesivos.

Múltiples variantes genéticas pueden interactuar para promover el daño de los podocitos causado por diferentes formas no mendelianas de GEFS (101). Por lo tanto, cada mutación individual afecta sólo a unos pocos pacientes y la suma de mutaciones, que pueden promover estas lesiones menores, contribuye al desarrollo de lesiones segmentarias. En este sentido, un mayor número de mutaciones en las moléculas de adhesión y glicoproteínas de la MEC podría favorecer la aparición de GEFS al aumentar la susceptibilidad a la enfermedad (101). Es interesante que varios autores hayan notado un efecto sinérgico de varias mutaciones en GEFS. Frese y colaboradores demostraron que los portadores de mutaciones en el gen del colágeno tipo IV (*COL4A5*) con polimorfismos relacionados, en los genes del diafragma hendido, experimentan formas graves de GEFS (118), mientras que Bullich y colaboradores informaron resultados similares con mutaciones *COL4A3* (119). En nuestra cohorte, el 95%, 21 de los 22 pacientes, presentan mutaciones en *COL1A2*, observando en 10 de ellos, mutaciones de tipo VUS, *COL1A2*: c.1015 A>C p.(Thr339Pro).

En los estudios más recientes en pacientes con GEFS se ha optado por buscar mecanismos potenciales de resistencia a esteroides, hallando la vía NOX4/ROS/P38 MAPK/MMP-2 y *STRA6*, codificando este último una proteína de membrana involucrada en el metabolismo del retinol (120).

En particular, no podemos estar seguros del papel exacto de las variantes que encontramos, y clasificamos a la mayoría de ellas como benignas o de significado incierto (51), entendiendo que serán necesarios más estudios para comprender el papel patogénico de las moléculas de adhesión y mutaciones de glicoproteínas de la MEC en el desarrollo de GEFS.

5.2.5. GNMP y moléculas de adhesión

Nuestro grupo de estudio compuesto por pacientes con GNMP presentó una prevalencia elevada de mutaciones en las moléculas de adhesión y las glicoproteínas de la MEC. De hecho, se identificó un número significativamente mayor de mutaciones globales en el grupo de pacientes con GNMP, respecto al grupo control ($p < 0,0001$), así como de mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido ($p < 0,0001$). Recientes investigaciones se centran en la arquitectura genética de la GNMP primaria y la GnC3, una enfermedad renal caracterizada por la activación del sistema del complemento. Se han llevado a cabo análisis de secuenciación de genoma completo para identificar mutaciones genéticas en pacientes con estas enfermedades (121), identificándose mutaciones en varios genes del complemento en pacientes con GnC3, y cuyos resultados sugieren que las mutaciones en los genes del complemento son una causa importante de dicha patología. De este modo, se describe que la GNMP es impulsada por la autoinmunidad, en lugar de un trastorno monogénico subyacente de la regulación del complemento (121). Estos hallazgos no son inconsistentes con los resultados de nuestro estudio, en el que no se encontraron mutaciones en un solo gen que pudiera explicar la GNMP. En cambio, se observó un número variable de mutaciones no silenciosas (entre 11 y 26 mutaciones por paciente), y el 95% de los pacientes presentaban mutaciones de clase 3, 4 o 5. Esto podría explicar cierta predisposición a la enfermedad.

Previamente, otros estudios afirmaron que un perfil completo de las anormalidades genéticas en el sistema del complemento es crítico en la patogénesis de la GnC3 (122), considerando la NGS una herramienta útil para identificar variantes genéticas en pacientes con GnC3. El documento menciona que la diversidad de las variantes genéticas es grande y que las correlaciones genotipo-fenotipo son débiles, en parte debido al tamaño insuficiente por la rareza del trastorno. Por lo tanto, aunque se identificaron variantes genéticas en algunos pacientes con GnC3, no se estableció una correlación clara entre las variantes genéticas y los fenotipos de la enfermedad. En nuestra cohorte de pacientes con GNMP, un 21% corresponden a GnC3, no existiendo diferencias significativas en cuanto a número de mutaciones ($p = 0,2232$). No obstante, sí se observa que hay mutaciones que se encuentran en los casos de GnC3, como *FN1*: c.4046 C>T p.(Pro1349Leu), *ITGB1*: c.1807 A>T p.(Asn603Tyr), *SELE*: c.130 T>C

p.(Tyr44His), y *TNC*: c.6496-2A>T, en las que será preciso un análisis más exhaustivo para poder definir su alcance.

Por otra parte, en nuestra cohorte, el 95%, 18 de los 19 pacientes, presentan mutaciones en *COL1A2*, observando en 8 de ellos, mutaciones de tipo VUS, *COL1A2*: c.1015 A>C p.(Thr339Pro), y un 84% de nuestros pacientes exhibieron mutaciones en *LAMC1*. Clásicamente, se ha investigado la distribución de componentes de la MEC en las glomerulopatías, describiéndose que tanto laminina como colágeno tipo III, IV, V y VI, entre otros, en la GNMP, aumentan en el mesangio y MBG (82,123).

Los estudios de casos no familiares de GNMP han identificado variantes raras en genes del complemento en hasta el 40% de los pacientes (124,125). Estos hallazgos, junto con la presencia casi invariable de C3 en el glomérulo, han implicado la activación de la vía alternativa del complemento como un mecanismo causal clave, y actualmente se recomiendan pruebas de mutaciones del gen del complemento en *C3* (121). El paradigma actual sugiere que la enfermedad puede ser el resultado de un defecto genético en la regulación del complemento. Sin embargo, es importante recordar que la enfermedad generalmente no es familiar, y que existe una asociación reconocida de GNMP con otras enfermedades autoinmunes (126), lo que obliga a seguir profundizando en el mecanismo patogénico.

6. *CONCLUSIONES*

1. Se describe el perfil mutacional en moléculas de adhesión correspondientes a tres de las glomerulopatías más prevalentes, empleando secuenciación masiva y técnicas estadísticas de asociación, en biopias renales fijadas en formol e incluidas en parafina.
2. La metodología de este estudio, centrada en el análisis de tejido patológico, permite acceder a datos que son inaccesibles mediante el estudio de la línea germinal, como la detección de alteraciones mosaicas.
3. Los resultados muestran una elevada prevalencia de mutaciones con significado clínico patogénico o desconocido en las moléculas de adhesión y las glicoproteínas de la matriz extracelular estudiadas en pacientes con GN IgA, GEFS y GNMP, adquiendo significación estadística en comparación con el grupo control.
4. Se identifican nuevos genes con potencial implicación en la etiopatogenia de la GN IgA, GEFS y GNMP, destacando la presencia de patrones mutacionales comunes y específicos asociados con cada tipo de glomerulopatía.
5. Son necesarios estudios funcionales adicionales para vincular estas variantes genéticas con las glomerulopatías, con el fin de esclarecer las relaciones genotipo-fenotipo y facilitar el desarrollo de nuevas terapias personalizadas.

7. *BIBLIOGRAFÍA*

1. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5ª Edición. In: 5ª Edición. 2007.
2. Goldblum J, McKenney J, Lamps L, Myers J. Rosai y Ackerman Patología Quirúrgica. 11ª Edición. 2019.
3. Valastyan S, Weinberg RA. Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules. *J Cell Sci.* 2011 Apr 1;124(7):999–1006.
4. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):633–43.
5. Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 1993 Sep;4(9):953–61.
6. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(4):619–26.
7. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):816–26.
8. Arrizabalaga Clemente P. Moléculas de adhesión y glomerulonefritis. Orientación hacia nuevas estrategias terapéuticas. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2002;119(4):145–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)73344-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7753(02)73344-7)
9. Gauer S, Yao J, Schoecklmann HO, Bernd Sterzel R. Adhesion molecules in the glomerular mesangium. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1447–53.
10. Dal Canton A. Adhesion molecules in renal disease. *Kidney Int.* 1995 Dec;48(6):1687–96.
11. Savage CO, Brooks CJ, Adu D, Richards G, Howie AJ. Cell adhesion molecule expression within human glomerular and kidney organ culture. *J Pathol.* 1997 Jan;181(1):111–5.
12. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4*. Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843–54.
13. Shi S, Yu L, Chiu C, Sun Y, Chen J, Khitrov G, et al. Podocyte-selective deletion of *Dicer* induces proteinuria and glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2008;19(11):2159–69.
14. Patel V, Nouredine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21(4):410–6.
15. Rosa González ME, Vallejo Hernández R, Esteban del Canto E, Ortega Polar E, Gómez González del Tánago P, Panadero Carlavilla FJ. Glomerulonefritis primarias. *Panorama Actual Med.* 2018;42(416):774–81.
16. Lai KN, Tang SCW, Schena FP, Novak J, Tomino Y, Fogo AB, et al. IgA nephropathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Feb 11;2(1):16001.
17. Xu LL, Zhou XJ, Zhang H. An Update on the Genetics of IgA Nephropathy. *J Clin Med.* 2023 Dec 25;13(1):123.

18. Espinoza Hernández M, Ortega R. Nefropatía IgA. Nefrología al día [Internet]. 2023; Available from: <http://www.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-nefropatia-iga-162>
19. Gutiérrez E, González E, Hernández E, Morales E, Martínez MÁ, Usera G, et al. Factors That Determine an Incomplete Recovery of Renal Function in Macrohematuria-Induced Acute Renal Failure of IgA Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2007 Jan;2(1):51–7.
20. Suzuki Y, Monteiro RC, Coppo R, Suzuki H. The Phenotypic Difference of IgA Nephropathy and its Race/Gender-dependent Molecular Mechanisms. *Kidney360*. 2021 Aug;2(8):1339–48.
21. Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, Eison TM, Suzuki H, Julian BA, et al. Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch–Schönlein purpura nephritis. *Kidney Int*. 2011 Jul;80(1):79–87.
22. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, et al. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011 Oct;22(10):1795–803.
23. Zhu L, Zhang H. The Genetics of IgA Nephropathy: An Overview from China. *Kidney Diseases*. 2015;1(1):27–32.
24. Wang YN, Zhou XJ, Chen P, Yu GZ, Zhang X, Hou P, et al. Interaction between GALNT12 and C1GALT1 Associates with Galactose-Deficient IgA1 and IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2021 Mar;32(3):545–52.
25. Markowitz G. Updated Oxford Classification of IgA nephropathy: a new MEST-C score. *Nat Rev Nephrol*. 2017 Jul 22;13(7):385–6.
26. Boyd JK, Cheung CK, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2012 May;81(9):833–43.
27. Yao T, Udwan K, John R, Rana A, Haghighi A, Xu L, et al. Integration of genetic testing and pathology for the diagnosis of adults with FSGS. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2019 Feb 7;14(2):213–23.
28. Ballarin J, Arce Y, Ars E, Marco H, Díaz M. Glomerulosclerosis Focal y Segmentaria. *Nefrología al día*. 2022;
29. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2011 Dec 22;365(25):2398–411.
30. Lepori N, Zand L, Sethi S, Fernandez-Juarez G, Fervenza FC. Clinical and pathological phenotype of genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis in adults. *Clin Kidney J*. 2018;11(2):179–90.
31. De Vriese AS, Wetzels JF, Glassock RJ, Sethi S, Fervenza FC. Therapeutic trials in adult FSGS: lessons learned and the road forward. *Nat Rev Nephrol*. 2021 Sep 20;17(9):619–30.

32. Landini S, Mazzinghi B, Becherucci F, Allinovi M, Provenzano A, Palazzo V, et al. Reverse phenotyping after whole-Exome sequencing in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2020;15(1):89–100.
33. Büscher AK, Weber S. Educational paper. *Eur J Pediatr*. 2012 Aug 13;171(8):1151–60.
34. De Vriese AS, Sethi S, Nath KA, Glassock RJ, Fervenza FC. Differentiating primary, genetic, and secondary FSGS in adults: A clinicopathologic approach. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2018;29(3):759–74.
35. Fogo A, Glick AD, Horn SL, Horn RG. Is focal segmental glomerulosclerosis really focal? Distribution of lesions in adults and children. *Kidney Int* [Internet]. 1995 Jun;47(6):1690–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815590066>
36. Hommos MS, Glassock RJ, Rule AD. Structural and Functional Changes in Human Kidneys with Healthy Aging. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 2017 Oct;28(10):2838–44. Available from: <https://journals.lww.com/00001751-201710000-00007>
37. Canaud G, Dion D, Zuber J, Gubler MC, Sberro R, Thervet E, et al. Recurrence of nephrotic syndrome after transplantation in a mixed population of children and adults: Course of glomerular lesions and value of the Columbia classification of histological variants of focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;25(4):1321–8.
38. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis*. 2004 Feb;43(2):368–82.
39. Daina E, Cravedi P, Alpa M, Roccatello D, Gamba S, Perna A, et al. A Multidrug, Antiproteinuric Approach to Alport Syndrome: A Ten-Year Cohort Study. *Nephron*. 2015;130(1):13–20.
40. Wasilewska AM, Kuroczycka-Saniutycz E, Zoch-Zwierz W. Effect of cyclosporin A on proteinuria in the course of glomerulopathy associated with WT1 mutations. *Eur J Pediatr*. 2011 Mar 17;170(3):389–91.
41. Vazquez Fonseca L, Doimo M, Calderan C, Desbats MA, Acosta MJ, Cerqua C, et al. Mutations in COQ8B (ADCK4) found in patients with steroid-resistant nephrotic syndrome alter COQ8B function. *Hum Mutat*. 2018 Mar;39(3):406–14.
42. Fernández Juárez G, Villacorta Pérez J. Glomerulonefritis membranoproliferativa. *Nefrología al día* [Internet]. 2022; Available from: <http://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-glomerulonefritis-membranoproliferativa-209>
43. Noris M, Donadelli R, Remuzzi G. Autoimmune abnormalities of the alternative complement pathway in membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy. *Pediatric Nephrology*. 2019 Aug 9;34(8):1311–23.
44. Noris M, Daina E, Remuzzi G. Membranoproliferative glomerulonephritis: no longer the same disease and may need very different treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2023 Feb 13;38(2):283–90.

45. Sethi S, Nester CM, Smith RJH. Membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy: resolving the confusion. *Kidney Int.* 2012 Mar;81(5):434–41.
46. Masani N, Jhaveri KD, Fishbane S. Update on Membranoproliferative GN. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2014 Mar;9(3):600–8.
47. Adler S, Brady HR. Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *American Journal of Medicine.* 1999;107(4):371–86.
48. Rovin BH, Adler SG, Barratt J, Bridoux F, Burdge KA, Chan TM, et al. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int.* 2021;100(4S):S1–276.
49. Bierzynska A, Soderquest K, Dean P, Colby E, Rollason R, Jones C, et al. MAGI2 mutations cause congenital nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2017;28(5):1614–21.
50. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *Journal of Molecular Diagnostics* [Internet]. 2017;19(1):4–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>
51. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine.* 2015;17(5):405–24.
52. Stata Corp. Stata Statistical Software: Release 16. [Internet]. 2019. Available from: <https://www.stata.com/>
53. Brown EJ, Schlöndorff JS, Becker DJ, Tsukaguchi H, Uscinski AL, Higgs HN, et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2010;42(1):72–6.
54. Renkema KY, Stokman MF, Giles RH, Knoers NVAM. Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(8):433–44.
55. Sharif B, Barua M. Advances in molecular diagnosis and therapeutics in nephrotic syndrome and focal and segmental glomerulosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018;27(3):194–200.
56. Nefropatía por IgA (enfermedad de Berger) - Síntomas y causas - Mayo Clinic [Internet]. [cited 2024 Feb 4]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/iga-nephropathy/symptoms-causes/syc-20352268>
57. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol Rev.* 2015;83(1):253–307.
58. Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, Iino N, Zhou HL, Farquhar MG. Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul;102(28):9814–9.

59. Li X, Chuang PY, D'Agati VD, Dai Y, Yacoub R, Fu J, et al. Nephric Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;26(10):2361–77.
60. Ristola M, Lehtonen S. Functions of the podocyte proteins nephrin and Neph3 and the transcriptional regulation of their genes. *Clin Sci*. 2014 Mar;126(5–6):315–28.
61. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 Aug 1;14(8):2063–71.
62. Papazachariou L, Demosthenous P, Pieri M, Papagregoriou G, Savva I, Stavrou C, et al. Frequency of COL4A3/COL4A4 Mutations amongst families segregating glomerular microscopic hematuria and evidence for activation of the unfolded protein response. Focal and segmental glomerulosclerosis is a frequent development during ageing. *PLoS One*. 2014;9(12):1–25.
63. Lai KN, Wong KC, Li PKT, Lai CKW, Chan CHS, Lui SF, et al. Circulating leukocyte-endothelial adhesion molecules in IgA nephropathy. *Nephron* [Internet]. 1994;68(3):294–300. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0028073862&partnerID=40&md5=099f812a4f1e350b13fec808448cc928>
64. Garner CM, Richards GM, Adu D, Pall AA, Taylor CM, Richards NT, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression and function on cultured human glomerular epithelial cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1994;95(2):322–6. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0028304723&partnerID=40&md5=e9347ed5b2a5e11c0d511b3cdd1bf2ae>
65. Wągrowiska-Danilewicz M, Danilewicz M. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), leucocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and leucocyte infiltration in proliferative human glomerulonephritis. *Acta Histochem* [Internet]. 1998;100(2):201–15. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0344074565&doi=10.1016%2FS0065-1281%2898%2980028-7&partnerID=40&md5=f85e51039fa542bb4faec6223c539199>
66. Arrizabalaga P, Solé M, Quintó IL, Ascaso C. Intercellular adhesion molecule-1 mediated interactions and leucocyte infiltration in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1997;12(11).
67. Arrizabalaga P, Solé M, Abellana R, De Las Cuevas X, Soler J, Pascual J, et al. Tubular and interstitial expression of ICAM-1 as a marker of renal injury in IgA nephropathy. *Am J Nephrol*. 2003;23(3).
68. Arrizabalaga P, Solé M, Abellana R, De las Cuevas X, Soler J, Pascual J, et al. Renal expression of ICAM-1 in IgA nephropathy. A marker of tubulointerstitial injury. *Med Clin (Barc)*. 2001;117(9).
69. Arrizabalaga P, Solé M, Abellana R, Ascaso C, Cardesa A. Renal expression of intercellular adhesion molecule-1 in immunoglobulin A nephropathy: Tubulointerstitial injury and prognosis. *Virchows Archiv* [Internet]. 2001;439(1):27–34. Available from:

- <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034920364&doi=10.1007%2Fs004280100443&partnerID=40&md5=ddc7e3629539b1d98b003fed75935509>
70. Safarikova M, Stekrova J, Honsova E, Horinova V, Tesar V, Reiterova J. Mutational screening of inverted formin 2 in adult-onset focal segmental glomerulosclerosis or minimal change patients from the Czech Republic. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):1–7.
 71. Mele C, Iatropoulos P, Donadelli R, Calabria A, Maranta R, Cassis P, et al. MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(4):295–306.
 72. Riedhammer KM, Braunisch MC, Günthner R, Wagner M, Hemmer C, Strom TM, et al. Exome Sequencing and Identification of Phenocopies in Patients With Clinically Presumed Hereditary Nephropathies. *American Journal of Kidney Diseases*. 2020;
 73. Chen X, Sun M. Identification of key genes, pathways and potential therapeutic agents for liver fibrosis using an integrated bioinformatics analysis. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2020;21(2).
 74. Kang HG, Lee M, Lee KB, Hughes M, Kwon BS, Lee S, et al. Loss of podocalyxin causes a novel syndromic type of congenital nephrotic syndrome. *Exp Mol Med*. 2017 Dec 15;49(12):e414–e414.
 75. Kliewe F, Kaling S, Löttsch H, Artelt N, Schindler M, Rogge H, et al. Fibronectin is up-regulated in podocytes by mechanical stress. *FASEB J*. 2019;33(12):14450–60.
 76. Madne TH, Dockrell MEC. TGFβ1-mediated PI3K/Akt and p38 MAP kinase dependent alternative splicing of fibronectin extra domain A in human podocyte culture. *Cell Mol Biol*. 2018;64(5):127–35.
 77. Potter AS, Drake K, Brunskill EW, Steven Potter S. A bigenic mouse model of FSGS reveals perturbed pathways in podocytes, mesangial cells and endothelial cells. *PLoS One*. 2019;14(8):e0216261.
 78. Masaki T, Yorioka N, Taniguchi Y, Oda H, Yamakido M. Tenascin expression may reflect the activity and chronicity of human IgA nephropathy. *Clin Nephrol*. 1998 Oct;50(4):205–13.
 79. Mattii L, Segnani C, Cupisti A, D'Alessandro D, Moscato S, Meola M, et al. Kidney expression of RhoA, TGF-β1, and fibronectin in human IgA nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*. 2005;101(1):16–24.
 80. Yan M, Liu S, Zhang M, Lai L, Xie Q, Hao C. Mesangial cell-derived tenascin-C contributes to mesangial cell proliferation and matrix protein production in IgA nephropathy. *Nephrology*. 2022 May 2;27(5):458–66.
 81. Castelletti F, Donadelli R, Banterla F, Hildebrandt F, Zipfel PF, Bresin E, et al. Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7).
 82. Oomura A, Nakamura T, Arakawa M, Ooshima A, Isemura M. Alterations in the extracellular matrix components in human glomerular diseases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1989;415(2):151–9.

83. Gharavi AG, Yan Y, Scolari F, Schena FP, Frasca GM, Ghiggeri GM, et al. IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22–23. *Nat Genet.* 2000 Nov;26(3):354–7.
84. Bisceglia L, Cerullo G, Forabosco P, Torres DD, Scolari F, Di Perna M, et al. Genetic Heterogeneity in Italian Families with IgA Nephropathy: Suggestive Linkage for Two Novel IgA Nephropathy Loci. *The American Journal of Human Genetics.* 2006 Dec;79(6):1130–4.
85. Paterson AD, Liu XQ, Wang K, Magistroni R, Song X, Kappel J, et al. Genome-Wide Linkage Scan of a Large Family with IgA Nephropathy Localizes a Novel Susceptibility Locus to Chromosome 2q36. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2007 Aug;18(8):2408–15.
86. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen. *New England Journal of Medicine.* 2003 Jun 19;348(25):2543–56.
87. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int.* 2003 Oct;64(4):1169–78.
88. Yu HH, Chu KH, Yang YH, Lee JH, Wang LC, Lin YT, et al. Genetics and Immunopathogenesis of IgA Nephropathy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011 Oct 29;41(2):198–213.
89. Li GS, Zhang H, Lv JC, Shen Y, Wang HY. Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2007 Mar;71(5):448–53.
90. Li GS, Zhu L, Zhang H, Lv JC, Ding JX, Zhao MH, et al. Variants of the ST6GALNAC2 promoter influence transcriptional activity and contribute to genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Hum Mutat.* 2007 Oct;28(10):950–7.
91. Ferrario F, Rastaldi MP, Napodano P. Morphological features in IgA nephropathy. Vol. 150, *Annales de Medecine Interne.* 1999.
92. You R, Zhou W, Li Y, Zhang Y, Huang S, Jia Z, et al. Inhibition of ROCK2 alleviates renal fibrosis and the metabolic disorders in the proximal tubular epithelial cells. *Clin Sci.* 2020;134(12).
93. Boguslawska J, Kedzierska H, Poplawski P, Rybicka B, Tanski Z, Piekielko-Witkowska A. Expression of Genes Involved in Cellular Adhesion and Extracellular Matrix Remodeling Correlates with Poor Survival of Patients with Renal Cancer. *Journal of Urology.* 2016 Jun;195(6):1892–902.
94. Wang W, Shen J, Qi C, Pu J, Chen H, Zuo Z. The key candidate genes in tubulointerstitial injury of chronic kidney diseases patients as determined by bioinformatic analysis. *Cell Biochem Funct.* 2020 Aug 27;38(6):761–72.
95. Jiang X, Xu Z, Du Y, Chen H. Bioinformatics analysis reveals novel hub gene pathways associated with IgA nephropathy. *Eur J Med Res.* 2020 Dec 7;25(1):40.
96. Kiryluk K, Sanchez-Rodriguez E, Zhou XJ, Zanoni F, Liu L, Mladkova N, et al. Genome-wide association analyses define pathogenic signaling pathways and prioritize drug targets for IgA nephropathy. *Nat Genet.* 2023 Jul 19;55(7):1091–105.

97. Marx D, Caillard S, Olagne J, Moulin B, Hannedouche T, Touchard G, et al. Atypical focal segmental glomerulosclerosis associated with a new PODXL nonsense variant. *Mol Genet Genomic Med*. 2021;9(5):e1658.
98. Xie J, Hao X, Azeloglu EU, Ren H, Wang Z, Ma J, et al. Novel mutations in the inverted formin 2 gene of Chinese families contribute to focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2015;88(3):593–604.
99. Braunisch MC, Riedhammer KM, Herr PM, Draut S, Günthner R, Wagner M, et al. Identification of disease-causing variants by comprehensive genetic testing with exome sequencing in adults with suspicion of hereditary FSGS. *European Journal of Human Genetics*. 2021;29(2):262–70.
100. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, Johnson RC, Genovese G, An P, et al. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(11):2129–37.
101. Yu H, Artomov M, Brähler S, Stander MC, Shamsan G, Sampson MG, et al. A role for genetic susceptibility in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(3):1067–78.
102. Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, Pabst WL, Gee HY, Kohl S, et al. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;26(6):1279–89.
103. Chan GC, Eng DG, Miner JH, Alpers CE, Hudkins K, Chang A, et al. Differential expression of parietal epithelial cell and podocyte extracellular matrix proteins in focal segmental glomerulosclerosis and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;317(6):F1680–94.
104. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*. 2011;17:952–60.
105. Lim BJ, Yang JW, Do WS, Fogo AB. Pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *J Pathol Transl Med*. 2016;50(6):405–10.
106. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;14(5):160.
107. Sachs N, Sonnenberg A. Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(4):200–10.
108. Sohrabi-Jahromi S, Marashi SA, Kalantari S. A kidney-specific genome-scale metabolic network model for analyzing focal segmental glomerulosclerosis. *Mammalian Genome*. 2016;27((3-4)):158–67.
109. Bukosza EN, Kratochwill K, Kornauth C, Schachner H, Aufricht C, Gebeshuber CA. Podocyte RNA sequencing reveals Wnt- And ECM-associated genes as central in FSGS. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231898.
110. Stotter BR, Talbot BE, Capen DE, Artelt N, Zeng J, Matsumoto Y, et al. Cosmc-dependent mucin-type O-linked glycosylation is essential for podocyte function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;318(2):F518–30.

111. Sugar T, Wassenhove-McCarthy DJ, Wayne Orr A, Green J, Van Kuppevelt TH, McCarthy KJ. N-sulfation of heparan sulfate is critical for syndecan-4-mediated podocyte cell-matrix interactions. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(10):F1123-35.
112. Uchio-Yamada K, Yasuda K, Monobe Y, Akagi KI, Suzuki O, Manabe N. Tensin2 is important for podocyte-glomerular basement membrane interaction and integrity of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;318(6):F1520–30.
113. Chen YM, Kikkawa Y, Miner JH. A missense LAMB2 mutation causes congenital nephrotic syndrome by impairing laminin secretion. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(5):849–58.
114. Has C, Spartà G, Kiritsi D, Weibel L, Moeller A, Vega-Warner V, et al. Integrin α 3 Mutations with Kidney, Lung, and Skin Disease. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(16):1508–14.
115. Kambham N, Tanji N, Seigle RL, Markowitz GS, Pulkkinen L, Uitto J, et al. Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with β 4 integrin mutation and epidermolysis bullosa. *American Journal of Kidney Diseases*. 2000;36(1):190–6.
116. Matejas V, Hinkes B, Alkandari F, Al-Gazali L, Annexstad E, Aytac MB, et al. Mutations in the human laminin β 2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat*. 2010;31(9):992–1002.
117. Merchant ML, Barati MT, Caster DJ, Hata JL, Hobeika L, Coventry S, et al. Proteomic analysis identifies distinct glomerular extracellular matrix in collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2020;31(8):1883–904.
118. Frese J, Kettwig M, Zappel H, Hofer J, Gröne HJ, Nagel M, et al. Kidney injury by variants in the COL4A5 gene aggravated by polymorphisms in slit diaphragm genes causes focal segmental glomerulosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):519.
119. Bullich G, Trujillano D, Santín S, Ossowski S, Mendizábal S, Fraga G, et al. Targeted next-generation sequencing in steroid-resistant nephrotic syndrome: Mutations in multiple glomerular genes may influence disease severity. *European Journal of Human Genetics*. 2015;23(9):1192–9.
120. Tong J, Jin Y, Weng Q, Yu S. Glomerular Transcriptome Profiles in Focal Glomerulosclerosis : New Genes and Pathways for Steroid Resistance. *Am J Nephrol*. 2020;
121. Levine AP, Chan MMY, Sadeghi-Alavijeh O, Wong EKS, Cook HT, Ashford S, et al. Large-Scale Whole-Genome Sequencing Reveals the Genetic Architecture of Primary Membranoproliferative GN and C3 Glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2020 Feb;31(2):365–73.
122. Zhao W, Ding Y, Lu J, Zhang T, Chen D, Zhang H, et al. Genetic analysis of the complement pathway in C3 glomerulopathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018;33(11):1919–27.

123. Setty S, Michael AA, Fish AJ, Michael Mauer S, Butkowski RJ, Virtanen I, et al. Differential expression of laminin isoforms in diabetic nephropathy and other renal diseases. *Modern Pathology*. 2012 Jun;25(6):859–68.
124. Bu F, Borsa NG, Jones MB, Takanami E, Nishimura C, Hauer JJ, et al. High-Throughput Genetic Testing for Thrombotic Microangiopathies and C3 Glomerulopathies. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016 Apr;27(4):1245–53.
125. Servais A, Noël LH, Roumenina LT, Le Quintrec M, Ngo S, Dragon-Durey MA, et al. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney Int*. 2012 Aug;82(4):454–64.
126. Dizdar O, Kahraman S, Genctoy G, Ertoy D, Arici M, Altun B, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with type 1 diabetes mellitus and Hashimoto's thyroiditis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004 Apr 1;19(4):988–9.

8. *MATERIAL COMPLEMENTARIO*

8.1. ANOTACIÓN DE LOS 29 GENES ESTUDIADOS Y DISTINCIÓN ENTRE GENES

NEFROPÁTICOS Y FENOCOPIA

<i>Genes</i>	<i>Sinónimos</i>	<i>Chr</i>	<i>Referencia</i>	<i>Acción</i>	<i>OMIM</i>	<i>Genes nefropáticos/fenocopias</i>
ACTB actina beta	BRWS1; PS1TP5BP1	7	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica una de las seis proteínas de actina diferentes. Las actinas son proteínas involucradas en la motilidad celular, estructura, integridad y señalización intercelular. La proteína codificada es un componente principal del aparato contráctil y una de las dos actinas citoesqueléticas no musculares.	*102630	<i>f</i>
ARHGDIA Rho GDP dissociation inhibitor alpha	GDIA1; NPHS8; RHOGDI; RHOGDI-1; HEL-S-47e	17	(Bierzynska et al., 2017; Gee et al., 2013; Gupta et al., 2013)	Codifica una proteína que desempeña un papel importante en la regulación de la señalización a través de Rho GTPasas. La proteína codificada inhibe la disociación de los miembros de la familia Rho del GDP, manteniendo así estos factores en un estado inactivo.	*601925	Nephrotic syndrome, type 8 (Bierzynska et al., 2017; Gee et al., 2013)
CDC42 Cell division cycle 42	TKS G25K CDC42Hs	1	(Valastyan & Weinberg, 2011)	La proteína codificada por este gen es una pequeña GTPasa de la subfamilia Rho ² , que regula las vías de señalización que controlan diversas funciones celulares.	*116952	<i>f</i>
CDH1 Cadherin 1	UVO; CDHE; ECAD; LCAM; Arc-1; BCDS1; CD324	16		Codifica una cadherina clásica de la superfamilia cadherina. Es una proteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio.	*192090	<i>f</i>

² La familia Rho de GTPasas (GTPasas Rho, Rac y Cdc42), es parte de la superfamilia Ras. Son interruptores moleculares que controlan una amplia variedad de vías de transducción de señales, una vez activadas, las GTPasas se unen a un espectro de efectores para estimular las vías de señalización.

COL1A2 collagen type I alpha 2 chain	OI4; EDSCV; EDSARTH2	7	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica la cadena pro-alfa2 del colágeno tipo I cuya triple hélice comprende dos cadenas alfa1 y una cadena alfa2. El tipo I es un colágeno formador de fibrillas que se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos.	*120160	<i>f</i>
ELN Elastin	WS; WBS; SVAS; ADCL1	7	Base de datos <i>GENE</i>	Codifica una proteína que es uno de los dos componentes de las fibras elásticas. Los productos de degradación de la proteína codificada, conocidos como péptidos derivados de elastina o elastocinas, se unen al complejo receptor de elastina y otros receptores y estimulan la migración y la proliferación de monocitos y fibroblastos de la piel.	*130160	<i>f</i>
FN1 fibronectin 1	FN; CIG; FNZ; MSF; ED-B; FINC; GFND; LETS; GFND2; SMDCF	2	(Assad et al., 1993; Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica la fibronectina, una glucoproteína que participa en los procesos de adhesión y migración celular.	*135600	Glomerulopathy with fibronectin deposits (Assad et al., 1993)
FSCN1 fascin actin- bundling protein 1	HSN; SNL; p55; FAN1	7	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica un miembro de la familia fascina de proteínas de unión a actina, jugando un papel crítico en la migración celular, la motilidad, la adhesión y las interacciones celulares.	*602689	<i>f</i>
ICAM1 Intercellular adhesion molecule 1	BB2 CD54 P3.58	19	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica una glucoproteína de la superficie celular que se expresa en las células endoteliales y las células del sistema inmune. Se une a las integrinas de tipo CD11a / CD18 o CD11b / CD18.	*147840	<i>f</i>

ITGA5 integrin subunit alpha 5	FNRA; CD49e; <u>VLA-5</u> ; VLA5A	12	(Valastyan & Weinberg, 2011)	El producto de este gen pertenece a la familia de la cadena α de integrina. Esta subunidad se asocia con la subunidad β -1 para formar un receptor de fibronectina.	*135620	<i>f</i>
ITGB1 integrin subunit beta 1	CD29; FNRB; MDF2; VLAB; GPIIA; MSK12; VLA-BETA	10	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica una subunidad β de la proteína integrina ³	*135630	<i>f</i>
ITGB3 integrin subunit beta 3	GT; CD61; GP3A; BDPLT2; GPIIIa; BDPLT16	17	(Valastyan & Weinberg, 2011)	El producto es la subunidad β 3 de la cadena β de la integrina La integrina β - 3 se encuentra junto con la cadena α -IIb en plaquetas.	*173470	<i>f</i>
LAMC1 laminin subunit gamma 1	LAMB2	1	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica la isoforma laminina ⁴ de la cadena gamma, gamma 1.	*150290	<i>f</i>

³ Las integrinas son proteínas heterodiméricas formadas por subunidades alfa y beta. Se han descrito al menos 18 subunidades alfa y 8 betas en mamíferos. Los miembros de la familia Integrina son receptores de membrana involucrados en la adhesión.

⁴ Las lamininas, una familia de glicoproteínas de la matriz extracelular, son los principales componentes no colágeno de las membranas basales. Han sido implicados en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo la adhesión celular. Las lamininas, compuestas de 3 cadenas no idénticas: laminina alfa, beta y gamma, tienen una estructura que consta de tres brazos cortos, cada uno formado por una cadena diferente, y un brazo largo compuesto por las tres cadenas. Cada cadena de laminina es una proteína multidominio codificada por un gen distinto. Se han descrito varias isoformas de cada cadena. Los diferentes isómeros de cadena alfa, beta y gamma se combinan para dar lugar a diferentes isoformas de laminina.

LPAR1 lysophosphatidic acid receptor 1	EDG2; LPA1; VZG1; GPR26; edg- 2; vzg-1; Gpcr26; Mrec1.3; rec.1.3	9	La proteína de membrana integral codificada por este gen es un receptor de ácido lisofosfatídico ⁵ (LPA) de un grupo conocido como receptores EDG. Estos receptores son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Utilizados por LPA para la señalización celular, los receptores EDG median diversas funciones biológicas, incluyendo proliferación, agregación plaquetaria, contracción del músculo liso, inhibición de la diferenciación celular del neuroblastoma, quimiotaxis e invasión de células tumorales.	*602282	f
LPAR2 lysophosphatidic acid receptor 2	EDG4; LPA2; EDG-4; LPA- 2	19	Codifica a un miembro de la familia I de los receptores acoplados a proteínas G, así como a la familia de proteínas EDG. Esta proteína funciona como un receptor de LPA y contribuye a la movilización de Ca^{2+} , una respuesta celular crítica a LPA en las células, a través de la asociación con proteínas Gi y Gq.	*605110	f

⁵ El ácido lisofosfatídico (LPA), es un regulador importante de la supervivencia y la apoptosis en muchos tipos de células, a través de su receptor LPA 1 (LPAR1). La señalización de LPA-LPA 1 parece mediar específicamente mediante anoikis, la apoptosis de las células dependientes del anclaje inducidas por su desprendimiento.

LPAR3 lysophosphatidic acid receptor 3	EDG7; GPCR; LPA3; Edg-7; LP-A3; HOFNH30; RP4-678I3	1	Codifica un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G, así como la familia de proteínas EDG. Esta proteína funciona como un receptor celular para el LPA y media la movilización de calcio provocado por éste. Este receptor se acopla predominantemente a proteínas alfa G (q/11).	*605106	<i>f</i>
LPAR4 lysophosphatidic acid receptor 4	LPA4; P2Y9; GPR23; P2RY9; P2Y5-LIKE	X	Codifica un miembro de la familia de receptores de LPA. También puede estar relacionado con los receptores P2Y, una familia de receptores que se unen a nucleótidos de purina y pirimidina y están acoplados a proteínas G.	*300086	<i>f</i>
LPAR5 lysophosphatidic acid receptor 5	GPR92, GPR93, KPG_010, LPA5	12	Codifica un miembro de la clase rodopsina de los receptores transmembrana acoplados a la proteína G. Esta proteína transmite señales extracelulares del LPA a las células a través de proteínas G heterotriméricas y media numerosos procesos celulares.	*606926	<i>f</i>
LPAR6 lysophosphatidic acid receptor 6	ARWH1, HYPT8, LAH3, LPA-6, P2RY5, P2Y5	13	La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de los receptores acoplados a la proteína G, que son activados preferentemente por nucleótidos de adenosina y uridina.	*609239	<i>f</i>

PTK2 protein tyrosine kinase 2	<u>FAK</u> ; FADK; FAK1; FRNK; PPP1R71; p125FAK; pp125FAK	8	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica una proteína citoplasmática tirosina quinasa que se encuentra concentrada en las adherencias focales que se forman entre las células que crecen en presencia de constituyentes de la matriz extracelular. La proteína codificada es un miembro de la subfamilia FAK de proteínas tirosina quinasas.	*600758	<i>f</i>
RHOA Ras homolog family member A	ARHA; ARH12; RHO12; EDFAOB; RHOH12	3	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica a un miembro de la familia Rho de pequeñas GTPasas.	*165390	<i>f</i>
RHOC Ras homolog family member C	H9 ARH9 ARHC RHOH9	1	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica a un miembro de la familia Rho de pequeñas GTPasas, que alternan entre estados inactivos unidos a GDP y activos unidos a GTP y funcionan como interruptores moleculares en cascadas de transducción de señales.	*165380	<i>f</i>
ROCK2 Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2	ROCK-II	2	(Valastyan & Weinberg, 2011)	La proteína codificada por este gen es una serina/treonina quinasa que regula la citocinesis, la contracción del músculo liso, la formación de fibras de estrés de actina y adherencias focales, y la activación del elemento de respuesta sérica c-fos. Esta proteína, que es una isoenzima de ROCK1, es un objetivo para la pequeña GTPasa Rho.	*604002	<i>f</i>

SELE selectin E	ELAM; ESEL; CD62E; ELAM1; LECAM2	1	(Valastyan & Weinberg, 2011)	La proteína codificada por este gen se encuentra en las células endoteliales estimuladas por citoquinas. Estas proteínas son parte de la familia Selectina de moléculas de adhesión celular. Las moléculas de adhesión participan en la interacción entre los leucocitos y el endotelio.	*131210	IgA nephropathy (Assad et al., 1993)
TNC Tenascin C	GP; JI; TN; HXB; GMEM; TN- C; DFNA56; 150-225	9	(Assad et al., 1993; Valastyan & Weinberg, 2011)	Codifica una proteína de MEC con una distribución de tejido restringida espacial y temporalmente. Esta proteína es homohexamérica con subunidades unidas por disulfuro y contiene múltiples dominios de tipo III y fibronectina tipo EGF.	*187380	Diverse glomerulopathies (Adler & Brady, 1999)
TMP1 Tropomyosin 1	CMH3; TMSA; CMD1Y; LVNC9; C15orf13; HEL-S-265; HTM-alpha	15	(Valastyan & Weinberg, 2011)	La proteína codificada es un tipo de cadena alfa helicoidal que forma la tropomiosina, funcionando también en asociación con el complejo de troponina para regular la interacción dependiente de calcio de la actina y la miosina.	*191010	<i>f</i>
TRAM1 Translocation associated membrane protein 1	TRAM PNAS8 TRAMP	8		La proteína codificada influye en la glicosilación y facilita la translocación de proteínas secretoras a través de la membrana del retículo endoplásmico.	*605190	<i>f</i>
VCAM1 vascular cell adhesion molecule 1	CD106; INCAM-100	1	(Valastyan & Weinberg, 2011)	Este gen es miembro de la superfamilia de Ig y codifica una sialoglicoproteína de la superficie celular, expresada por el endotelio activado por citoquinas. Esta proteína de membrana tipo I media la adhesión leucocito-célula	*192225	<i>f</i>

endotelial y en la transducción de señales.

WASF3 WASP family member 3	SCAR3 WAVE3 Brush-1	13	(Valastyan & Weinberg, 2011)	El producto génico es una proteína que forma un complejo multiproteico que une las quinasas receptoras y la actina. El complejo multiproteico sirve para transcribir señales que implican cambios en la forma, motilidad o función de la célula.	*605068	<i>f</i>
--------------------------------------	---------------------------	----	------------------------------	--	---------	----------

8.2. TRANSCRITOS UTILIZADOS PARA EL ALINEAMIENTO

Gen	Transcrito
<i>ACTB</i>	ENST00000331789
<i>ARHGDIA</i>	ENST00000269321
<i>CDC42</i>	ENST00000344548
<i>CDH1</i>	ENST00000261769
<i>COL1A2</i>	ENST00000297268
<i>ELN</i>	ENST00000445912
	ENST00000252034
<i>FN1</i>	ENST00000336916
<i>FSCN1</i>	ENST00000382361
<i>ICAM1</i>	ENST00000264832
<i>ITGA5</i>	ENST00000293379
<i>ITGB1</i>	ENST00000302278
<i>ITGB3</i>	ENST00000559488
<i>LAMC1</i>	ENST00000258341
<i>LPAR1</i>	ENST00000374431
<i>LPAR2</i>	ENST00000586703
<i>LPAR3</i>	ENST00000440886
<i>LPAR4</i>	ENST00000435339
<i>LPAR5</i>	ENST00000329858
<i>LPAR6</i>	ENST00000378434
<i>PTK2</i>	ENST00000522684
<i>RHOA</i>	
<i>RHOC</i>	ENST00000339083
<i>ROCK2</i>	ENST00000315872
<i>SELE</i>	ENST00000333360
<i>TNC</i>	ENST00000350763
<i>TPM1</i>	ENST00000288398
<i>TRAM1</i>	ENST00000262213
<i>VCAM1</i>	ENST00000370119
<i>WASF3</i>	ENST00000335327

9. *ANEXOS*

9.1. CERTIFICADO APROBACIÓN DEL CEIC Y CONSENTIMIENTO INFORMADO



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del **COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Papel de los genes de adhesión celular en el desarrollo de glomerulopatías primarias.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2019.206)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIm, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal Dña. **SARA MARCOS GONZALEZ**.

Como queda reflejado en el Acta: **14/2019 de 4 de octubre de 2019**.

Lo que firmo en Santander, a **18 de octubre de 2019**



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
 Secretaria del CEIm



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO:

Papel de los genes de adhesión celular en el desarrollo de glomerulopatías primarias

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Sara Marcos González (Servicio de Anatomía Patológica)

CENTRO: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro Centro, y respeta la normativa vigente.

Nuestra intención es proporcionarle información adecuada y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en el estudio. Para ello lea con atención esta hoja informativa y luego podrá preguntar cualquier duda que le surja relativa al estudio. Además, puede consultar con cualquier persona que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y puede decidir no participar. En caso de que decida participar en el estudio puede cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico y sin que se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El estudio consiste en llegar a conocer cómo se produce la enfermedad, mediante la obtención de una guía de mutaciones diferenciales de los principales genes relacionados con mecanismos de adhesión en glomerulopatías primarias, a través del material genético que extraeremos de la biopsia renal ya diagnosticada previamente, guardada en el Servicio de Anatomía Patológica, y evaluar si cada mutación presenta un potencial de afectación fisiológica, así como la capacidad de actuar sobre ellas desde el punto de vista terapéutico.

Metodología:

1. Pacientes con patología glomerular demostrada con biopsia renal con un grupo control de pacientes con función glomerular normal.
 - a. Estos casos de glomerulopatías primarias incluirán Glomerulonefritis IgA, Glomeruloesclerosis Focal y segmentaria y Glomerulonefritis Membrano-proliferativa, con seguimiento clínico de al menos 3 años.
2. Revisión de los hallazgos histológicos en las muestras de biopsia renal guardadas en parafina en el Servicio de Anatomía Patológica y extracción del material genético procedente de ese material parafinado.
3. Diseñar un panel de secuenciación masiva para el ADN extraído, que se centrará en los principales genes relacionados con los mecanismos de adhesión, célula-célula y de la célula con su medio.
4. Análisis de las alteraciones encontradas en la secuenciación masiva con el fin de determinar patrones mutacionales comunes en cada entidad por ensayos de asociación estadística.
5. Trasladar los resultados obtenidos a la práctica clínica diaria, determinando la expresión proteica de los genes en los que se hayan determinado las mutaciones más relevantes.

Trazabilidad de la muestra:

1. Laminillas y bloques en parafina con tejido renal, guardadas en el Servicio de Anatomía Patológica, se ponen un uso.
2. Revisión de los datos histológicos de la biopsia renal previamente diagnosticada.
3. Cortes del bloque en parafina, para la posterior extracción del material genético.
4. Laminillas y bloques se devuelven al archivo quedando de nuevo en el Servicio de Anatomía Patológica.
5. El material genético queda diluido en un tubo Eppendorf para los sucesivos procesos de amplificación y secuenciación de genes.
6. El excedente queda congelado hasta la finalización del estudio, procediéndose a su eliminación.

Este estudio ha sido diseñado por médicos del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander y participarán en él exclusivamente facultativos de este centro.

Las únicas intervenciones que implica para usted el participar en este estudio es permitir la recogida de sus datos, y utilización de la muestra de riñón que se realizó en su momento para el diagnóstico. Realizaremos un análisis estadístico de los datos que recogemos.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**Beneficios de la participación en el estudio.**

A medio y largo plazo, esperamos mejorar el conocimiento científico relativo al origen de las glomerulopatías primarias y así en el futuro, poder llegar a actuar sobre ellas desde el punto de vista terapéutico. Usted debe saber que toda la información que recogemos en este estudio podrá permitir que otros pacientes se beneficien en el futuro, pero es posible que usted no reciba ningún beneficio directo en su salud por su participación en este estudio.

Riesgos de la participación en el estudio.

Su participación en este estudio no conlleva ningún riesgo adicional para usted, ya que se utilizarán muestras antiguas, guardadas en el servicio de Anatomía Patológica.

CONFIDENCIALIDAD

Todos los datos personales de los pacientes registrados en este estudio se tratarán de acuerdo con el vigente Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, de Protección de Datos (RGPD) y la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código de forma que no sea posible la identificación del paciente. Sólo el investigador y personas autorizadas relacionadas con el estudio tendrán acceso a dicho código y se comprometen a usar esta información exclusivamente para los fines planteados en el estudio. Los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica o Autoridades Sanitarias pueden tener acceso a esta información en cumplimiento de requisitos legales. Se preservará la confidencialidad de estos datos y no podrán ser relacionados con usted, incluso aunque los resultados del estudio sean publicados.

DATOS DE CONTACTO

Si tiene dudas en cualquier momento puede contactar con el personal médico del estudio.

Dra. Sara Marcos González Teléfono: 942 252 025 Extensión: 73237

E-mail: sara.marcos@scsalud.es



CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO:

PAPEL DE LOS GENES DE ADHESIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE GLOMERULOPATÍAS PRIMARIAS

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Sara Marcos González (Servicio de Anatomía Patológica)

CENTRO: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

D./Dña. _____ DNI _____
(Nombre y apellidos del paciente en MAYÚSCULAS)

He leído y comprendido la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio arriba indicado, cuyo objetivo principal consiste en llegar a conocer cómo se produce la enfermedad, mediante la obtención de una guía de mutaciones diferenciales de los principales genes relacionados con mecanismos de adhesión en glomerulopatías primarias y evaluar si cada mutación presenta un potencial de afectación fisiológica, así como la capacidad de actuar sobre ellas desde el punto de vista terapéutico.

Se ha solicitado mi colaboración para este estudio que utilizará muestras de biopsia renal con diagnóstico previo, guardadas en parafina en el Servicio de Anatomía Patológica.

He hablado con el Dr./Dra. con quien he clarificado las posibles dudas.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin dar explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos.

Comprendo que la información personal que aporte será confidencial y no se mostrará a nadie sin mi consentimiento.

Y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Quiero saber los resultados de la investigación: ☐ SI ☐ NO

Firma del investigador

Firma del paciente

Fecha

(la fecha debe estar cumplimentada de puño y letra por el paciente)

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. _____
retiro el consentimiento otorgado para mi participación en el estudio arriba citado.

Fecha y firma:

9.2. COMUNICACIONES A CONGRESOS

Comunicación tipo poster presentado en el congreso europeo de la sociedad de patología en agosto de 2021 (online)

33rd European Congress of Pathology

Pathology: Compass for Optimal Patient Therapy

29 – 31 August 2021 – virtual



PRESENTATION CERTIFICATE

The abstract

Possible role of cell adhesion genes in the development of IgA Nephropathy.

has been presented as

Digital Poster

by

Sara Marcos González, Spain

during the

33rd European Congress of Pathology

Authors:

Sara Marcos González
Ainara Azueta Etxebarria
José Javier Gómez Román
Javier Freire Salinas
Emilio Rodrigo Calabia

Holger Moch
ESP President

Göran Elmberger
Chair of the LOC

Comunicación oral presentada en el congreso nacional de la SEAP-IAP/SEC/SEPAF en mayo de 2023 en Sevilla

SEAP-IAP | SEC | SEPAF

Libro Abstracts Sevilla 2023 v.26/04/2023 (23.02)

Nefropatología

525

DIFERENCIAS Y SIMILITUDES EN LOS PATRONES MUTACIONALES DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ENTRE LA NEFROPATÍA IGA Y LA GLOMERULONEFRITIS MEMBRANOPROLIFERATIVA

Marcos González, Sara; Rodrigo Calabía, Emilio; Varela, Ignacio; Freire Salinas, Javier; Gómez Román, José Javier
Presentador: Marcos González, Sara

HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA

Tipo de trabajo: Oral
(Consultar sala y hora en el Programa científico)

INTRODUCCIÓN: La adhesión celular es esencial en la comunicación y regulación celular, siendo imprescindible en el desarrollo y conservación de los tejidos. Las interacciones entre células y de éstas con su matriz extracelular influyen y controlan el comportamiento y la función celular, pudiendo, por tanto, llegar a contribuir al desencadenamiento de una enfermedad, en este caso, de dos de los tipos más frecuentes de glomerulopatías: nefropatía IgA (GNiG) y glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP).

MATERIAL Y MÉTODOS: Muestras de biopsia renal de pacientes con GNiG (n=22) y GNMP (n=18), desde el año 2004 al 2020, con seguimiento clínico de al menos 2 años. En el momento de la biopsia, las edades de los pacientes con GNiG y GNMP oscilaban entre 18 a 74 años (edad media de 40 años) y de 25 a 78 años (edad media de 58 años), respectivamente. Revisamos los hallazgos histológicos de todas las biopsias renales, y estudiamos un total de 29 genes de moléculas de adhesión celular mediante paneles de secuenciación dirigida (NGS): ACTB, ARHGAP24, CDC42, CDH1, COL1A2, ELN, FN1, FSCN1, ICAM1, ITGA5, ITGB1, ITGB3, LAMC1, LPAR1, LPAR2, LPAR3, LPAR4, LPAR5, LPAR6, PTK2, RHOA, RHOC, ROCK2, SELE, TNC, TPM1, TRAM1, VCAM1, y WASF3.

RESULTADOS: En todos los pacientes encontramos variantes, siendo la media similar en ambos grupos: 17,7 SNP en GNiG y 17,3 SNP en GNMP. Identificamos variantes comunes en ambas entidades: variantes missense de significado incierto en los genes COL1A2, LPAR3, LPAR4 y LPAR6, así como una mutación nonsense patogénica en el gen CDH1. Como patrones mutacionales diferenciadores, señalamos en el grupo de GNiG variantes missense de significado incierto en los genes COL1A2, ICAM1, LAMC1 y PTK2, una variante nonsense patogénica en los genes ICAM1 y LAMC1, y dos variantes missense potencialmente patogénicas en ITGB3 (ITGB3c.250 C>T, ITGB3c.580 T>C). Estas mutaciones son heterocigóticas y el grupo de GNMP no se vio afectado por ellas, sin embargo, sí se observa otro patrón mutacional con variantes missense de significado incierto en los genes FSCN1, FN1, ITGB1 y LAMC1, así como una variante missense potencialmente patogénica (ITGB3c.1199 C>A). Las variantes restantes son SNP benignos, muchos de los cuales tienen frecuencias similares en la población europea general.

CONCLUSIONES: El estudio molecular de las moléculas de adhesión podría permitirnos identificar patrones mutacionales diferenciales entre glomerulopatías primarias, y llegar a establecer dianas terapéuticas dirigidas.

Comunicación tipo poster presentado en el congreso nacional de la SEAP-IAP/SEC/SEPAF en mayo de 2023 en Sevilla

SEAP-IAP | SEC | SEPAF

Libro Abstracts Sevilla 2023 v.26/04/2023 (23.07)

Nefropatología

526

¿SON LOS GENES DE ADHESIÓN CELULAR CLAVES EN EL DESARROLLO DE LA NEFROPATÍA POR IGA?

Marcos González, Sara, Rodrigo Calabia, Emilio Varela, Ignacio Freire Salinas, Javier, Gómez Román, José Javier
Presentador: Marcos González, Sara

HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA

Tipo de trabajo: Póster con Defensa
(Viernes 5 de mayo de 2023; 10:45; Pantalla: 2)

INTRODUCCIÓN: La nefropatía por IgA (GNiGA) es la glomerulonefritis primaria más común en todo el mundo, indicando estudios recientes una incidencia de al menos 2,5/100 000/año en adultos. Aunque su patogenia aún no se comprende completamente y su tratamiento no está bien definido, existe evidencia de que la progresión de la insuficiencia renal está significativamente relacionada con la extensión de las lesiones. Estudios previos de GWAS (Estudio de asociación de genoma completo) han relacionado el desarrollo de la GNiGA con varias mutaciones genéticas en línea germinal, pero el papel potencial de las mutaciones de genes de adhesión celular en la patogenia de la GNiGA no se ha examinado previamente en los tejidos.

MATERIAL Y MÉTODOS: Incluimos 22 pacientes, 14 hombres y 8 mujeres, de 18 a 74 años, con GNiGA, de 2004 a 2020, con seguimiento clínico de al menos 2 años. Las muestras corresponden a biopsias por aguja de riñón propio de los pacientes con glomerulopatía primaria, que se reciben en fresco. Revisamos los hallazgos histológicos de todas las biopsias renales, siguiendo la clasificación de Oxford de la nefropatía por IgA, y estudiamos un total de 29 genes de moléculas de adhesión celular, mediante paneles de secuenciación dirigida (NGS): ACTB, ARHGAP24, CDC42, CDH1, COL1A2, ELN, FN1, FSCN1, ICAM1, ITGA5, ITGB1, ITGB3, LAMC1, LPAR1, LPAR2, LPAR3, LPAR4, LPAR6, PTK2, RHOA, RHOC, ROCK2, SELE, TNC, TPM1, TRAM1, VCAM1, y WASF3. Como grupo control, 16 muestras de tejido renal normal correspondientes a cuñas renales y nefrectomías radicales de pacientes con función renal conservada.

RESULTADOS: Tanto en el grupo control como en todos los pacientes encontramos variaciones, aunque la media de variantes acumuladas en pacientes con GNiGA fue mayor (17,7 SNP) que en el grupo control (11,8 SNP). Del mismo modo, el 100 % de los pacientes con GNiGA tenían variantes no benignas (mutaciones de significado incierto o patogénicas). Describimos variantes missense de significado incierto en los genes COL1A2, ICAM1, LAMC1, LPAR3, LPAR4, LPAR6 y PTK2, así como una mutación patogénica nonsense en los genes CDH1, ICAM1 y LAMC1, y dos mutaciones missense potencialmente patogénicas en el gen ITGB3. Estas mutaciones son heterocigóticas y nuestro grupo de control no se vio afectado por ellas a excepción de un caso que fue revisado con posterioridad y demostró una GNiGA (diagnosticada en el seguimiento en otro hospital).

CONCLUSIONES: En nuestra cohorte de pacientes con GNiGA de inicio en la edad adulta, observamos una alta tasa de alteraciones en las moléculas de adhesión y glicoproteínas de la matriz extracelular que, junto a otras toxas, podría promover el desarrollo de la GNiGA. Así, el estudio de las moléculas de adhesión en la GNiGA podría permitirnos esclarecer la compleja patogenia de esta enfermedad tan heterogénea.



9.3. CERTIFICADO DE FORMACIÓN TRANSVERSAL DE LA ESCUELA DE DOCTORADO



CERTIFICADO Nº: 232/2023
DE DOÑA SARA MARCOS GONZÁLEZ

CERTIFICACIÓN DE FORMACIÓN TRANSVERSAL

AZCONDO SANCHEZ, FRANCISCO JAVIER, DIRECTOR DE LA ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (EDUC) / HEAD OF UNIVERSITY OF CANTABRIA DOCTORAL SCHOOL (EDUC)

CERTIFICA: Que según consta en el expediente de Doña SARA MARCOS GONZÁLEZ con DNI nº 80067742G, del Programa de Doctorado en Medicina y Ciencias de la Salud, ha cursado en la EDUC un total de 101,00 horas de Formación Transversal correspondiendo a:

- Nivel Básico(B): 61,00
- Nivel Avanzado(A): 40,00

That, Ms. SARA MARCOS GONZÁLEZ with DNI nº 80067742G, Doctorate in medicine and health sciences, has taken 101,00 hours of Transversal Courses at the EDUC.

- Basic level(B): 61,00
- Advanced level(A): 40,00

BLOQUE/MODULE I			
DENOMINACION/COURSE	NIVEL/ LEVEL	COMPETENCIA/ COMPETENCE*	HORAS/ HOURS
Bloque I. 1: Marco General del Doctorado. El Método en la Ciencia	B		6,00
Bloque I A.1: El futuro profesional	A		3,00
TOTAL			9,00

BLOQUE/MODULE II			
DENOMINACION/COURSE	NIVEL/ LEVEL	COMPETENCIA/ COMPETENCE*	HORAS/ HOURS
B.I-2: La ética en la investigación científica	B	1	10,00
B.II-4: Búsqueda de información en las primeras fases de la investigación: Bases de datos y gestor bibliográfico	B	2	3,00
B.II-3: Instrumentos de ayuda en la preparación de tesis y artículos científicos	B	2	9,00



CONTINUACIÓN DE LA CERTIFICACIÓN DE FORMACIÓN TRANSVERSAL Nº: 232/2023
DE DOÑA SARA MARCOS GONZÁLEZ

B.III-1: Creación de líneas de investigación multidisciplinar y presentación de resultados	B	3	2,00
B.IV-1: La comunicación científica en Internet I: redes sociales, agregadores y curación de contenidos	B	4	20,00
B.V-2: El control de la originalidad y el plagio: conceptos y herramientas para doctorandos	B	5	8,00
B.V-1: Propiedad intelectual y propiedad industrial	B	5	3,00
A.I: Iniciación a la investigación: fuentes nacionales de financiación de la I+D+I	A	1	3,00
A.II: What, Why & How. Your Road to Entrepreneurship	A	2	10,00
A.II: Contracorriente: talento rebelde para gestionar la nueva complejidad	A	2	8,00
A.III: Taller de técnicas de creatividad Online	A	3	10,00
A.III: Generación y asociación de ideas y conceptos para la búsqueda de soluciones	A	3	6,00
TOTAL			92,00

Y para que conste, a petición del interesado, y surta los efectos pertinentes, expido la presente certificación, en Santander a 11 de diciembre de 2023 / I hereby issue this certificate in Santander on 11 December 2023.

El director / Head of the EDUC

Azcondo Sanchez, Francisco Javier



**Competencias/Competences: Básicas/Basic: 1. La ciencia y la ética en la investigación científica (1. Science and ethics in scientific research); 2. Los instrumentos de ayuda en la preparación de tesis y artículos científicos (2. Supporting tools when doing your PhD dissertation and scientific papers); 3. La preparación, redacción y presentación de publicaciones científicas (3. Preparing, writing and presenting scientific results); 4. La comunicación, la divulgación y la docencia de la ciencia (4. Communicating, divulging and teaching science); 5. La transferencia del conocimiento: propiedad intelectual y propiedad industrial (Knowledge transfer: intellectual property and industrial property). Avanzadas/Advanced: 1. La financiación de la investigación y los proyectos de investigación (Research funding and research projects); 2. La colaboración Universidad/Empresas/administraciones (Collaboration University/Companies/public administrations); 3. El pensamiento creativo (Creative thinking);*

9.4. ARTÍCULO PUBLICADO



Article

High Rate of Mutations of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Glycoproteins in Patients with Adult-Onset Focal and Segmental Glomerulosclerosis

Sara Marcos González ^{1,*}, Emilio Rodrigo Calabia ², Ignacio Varela ³, Michal Červienka ⁴, Javier Freire Salinas ⁵ and José Javier Gómez Román ⁶

¹ Pathology Department, Marqués de Valdecilla University Hospital, Institute of Research Valdecilla (IDIVAL), 39008 Santander, Spain

² Nephrology Department, Marqués de Valdecilla University Hospital, 39008, University of Cantabria, 39005 Santander, Spain; emilio.rodrido@scsalud.es

³ Institute of Biomedicine and Biotechnology of Cantabria (IBBTec), 39011, University of Cantabria-CSIC, 39005 Santander, Spain; ignacio.varela@unican.es

⁴ Nephrology Department, Rio Carrion General Hospital, 34005 Palencia, Spain; mcervienka@saludcastillayleon.es

⁵ Anatomic Pathology, Marqués de Valdecilla University Hospital, Institute of Research Valdecilla (IDIVAL), 39008 Santander, Spain; javifreiresalinas@gmail.com

⁶ Pathology Department, Marqués de Valdecilla University Hospital, Institute of Research Valdecilla (IDIVAL), School of Medicine, University of Cantabria, 39008 Santander, Spain; josejavier.gomez@scsalud.es

* Correspondence: sara.marcos@scsalud.es; Tel: +34-651595084



Citation: Marcos González, S.; Rodrigo Calabia, E.; Varela, I.; Červienka, M.; Freire Salinas, J.; Gómez Román, J.J. High Rate of Mutations of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Glycoproteins in Patients with Adult-Onset Focal and Segmental Glomerulosclerosis. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1764. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061764>

Academic Editor: Katarina Vukojević

Received: 11 May 2023

Revised: 15 June 2023

Accepted: 18 June 2023

Published: 20 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: (1) Background: Focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) is a pattern of injury that results from podocyte loss in the setting of a wide variety of injurious mechanisms. These include both acquired and genetic as well as primary and secondary causes, or a combination thereof, without optimal therapy, and a high rate of patients develop end-stage renal disease (ESRD). Genetic studies have helped improve the global understanding of FSGS syndrome; thus, we hypothesize that patients with primary FSGS may have underlying alterations in adhesion molecules or extracellular matrix glycoproteins related to previously unreported mutations that may be studied through next-generation sequencing (NGS). (2) Methods: We developed an NGS panel with 29 genes related to adhesion and extracellular matrix glycoproteins. DNA was extracted from twenty-three FSGS patients diagnosed by renal biopsy; (3) Results: The average number of accumulated variants in FSGS patients was high. We describe the missense variant *ITGB3c.1199G>A*, which is considered pathogenic; in addition, we discovered the nonsense variant *CDH1c.499G>T*, which lacks a Reference SNP (rs) Report and is considered likely pathogenic. (4) Conclusions: To the best of our knowledge, this is the first account of a high rate of change in extracellular matrix glycoproteins and adhesion molecules in individuals with adult-onset FSGS. The combined effect of all these variations may result in a genotype that is vulnerable to the pathogenesis of glomerulopathy.

Keywords: adhesion molecules; glomerulonephritis; focal and segmental glomerulosclerosis; next-generation sequencing

1. Introduction

Focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) is one of the most common causes of adult-onset nephrotic syndrome alongside membranous nephropathy, and it is the primary glomerular disease that leads to end-stage renal disease (ESRD) in the United States [1,2]. Despite the numerous research studies conducted in recent years, an ideal therapy is still difficult to find, and a high percentage of patients eventually progress to ESRD because of years of unsatisfactory care and severe accompanying morbidity. In fact, 10 years following the diagnosis of primary FSGS, 45% of individuals develop ESRD [3].

Cell adhesion is essential in cell communication and regulation, being essential in the development and maintenance of tissues. Mechanical interactions between cells and between cells and their extracellular matrix (ECM) can influence and control cell behavior and function [4]. Cell adhesion status, involving both cell–cell and cell–matrix interactions, is a fundamental determinant of a wide variety of cell biological responses [5].

Maintenance of proper cell–cell adhesion is crucial for a variety of cell types. Cell–cell adhesion plays a vital role in homeostatic control by creating the physical tethering that permits the assembly of complex tissues. Furthermore, within individual cells, the activation of various signal transduction pathways is initiated by cell–cell adhesion receptors [5]. Within tissues, cells must adhere properly, not only to one another but also to components of the ECM that surrounds them [5]. Indeed, appropriate interactions between cells and the surrounding ECM are crucial for normal cellular survival. It is therefore logical that deregulation of cell–cell or cell–matrix interactions can contribute to the pathogenesis of human diseases [5,6].

Genetic research has contributed to the advancement of knowledge about FSGS syndrome, particularly in the case of congenital FSGS. More than 50 genes have been identified as being linked to hereditary FSGS, expanding the disease's spectrum from children to some young adults [7]. Furthermore, various genetic studies have reported that certain genes, including *APOL1*, *WNK4*, *KANK1*, and *ARHGEF17*, are more prevalent in patients with primary FSGS [8,9]. The latter three genes alter the structure and function of podocytes, the key cells in the pathogenesis of FSGS, according to Yu et al.'s mouse model [9]. However, the exact mechanism by which *APOL1* variations contribute to FSGS is not well understood [9]. The initial stage leading to the segmental lesion involves the loss of podocytes and their detachment from the basement membrane [10].

The cytoskeleton maintains the structure and function of podocytes, but other molecules such as extracellular matrix glycoproteins and adhesion molecules collaborate on this task [11,12]. For example, among other adhesion molecules, some integrin mutations have been identified as being related to nephrotic syndrome [13]. In fact, treatment with the CTLA4-modulator abatacept restores $\beta 1$ integrin activation of B7-1-expressing podocytes and reduces proteinuria in patients with B7-1-positive FSGS [14]. Unfortunately, abatacept therapy did not yield favorable results for several other patients who had male gender, FSGS, and post-transplant status, were children aged below 18 years, and who had previously failed treatment. These factors were associated with a lower remission rate, although the correlations did not attain statistical significance. This underscores the diverse mechanisms that contribute to the development of primary FSGS [15].

One advantage of the new recently available genetic research tools is that they allow the rapid analysis of multiple genes at the same time, enabling the discovery of previously unknown disease mechanisms. For example, next-generation sequencing (NGS) has been utilized to describe previously unidentified mutations in genetically complicated kidney illnesses such as steroid-resistant nephrotic syndrome, congenital anomalies of the kidney and urinary tract, and nephronophthisis [16,17]. Our hypothesis is that patients with primary FSGS may possess underlying changes in adhesion molecules or extracellular matrix glycoproteins that are associated with previously unreported mutations and that these can be investigated using NGS.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Controls

All the patients involved in this research were admitted and then followed up at the Nephrology Department of the Marqués de Valdecilla University Hospital. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of Cantabria (protocol internal code 2019.206; date of approval: 4 October 2019).

We analyzed the histological results after the pathologist in charge of the nephropathology division had routinely diagnosed all renal biopsy slides.

We included twenty-three patients with FSGS that had been demonstrated by renal biopsy during the period 2004–2020 and followed them clinically for a minimum of 2 years. The main patient characteristics are shown in Table 1. Briefly, the mean age was 53.96 ± 18.81 years, 26% were female, and 74% suffered high blood pressures. The mean estimated glomerular filtration rate was 60.30 ± 29.95 mL/min, mean proteinuria was 10.13 ± 5.96 g/day, and 43% showed nephrotic syndrome.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of patients with focal and segmental glomerulosclerosis included in the study.

Patients	Clinical Characteristics		Pathological Characteristics		Clinical Onset				
	Gender	Age	Morphological Variants	Proteinuria (g/Day)	Serum Albumin (g/dL)	HBP	Creatinine (mg/dL)	Creatinine Clearance (mL/min)	CKD Stage
1	M	52	Perihilar	2.2	3.1	Yes	1.9	40	3b
2	F	68	NOS	3.0	3.7	Yes	0.7	91	1
3	M	82	NOS	2.1	3.4	Yes	0.9	80	2
4	M	26	Perihilar	4.3	3.1	No	1.5	110	1
5	M	68	NOS	1.3	4.2	Yes	1.5	46	3a
6	M	52	NOS	2.6	3.2	Yes	1.8	42	3b
7	M	38	NOS	0.4	3.8	No	2.2	37	3b
8	M	70	NOS	6.5	3.8	Yes	1.9	35	3b
9	F	37	NOS	1.3	4.1	Yes	1.3	49	3a
10	M	79	NOS	1.2	3.6	Yes	2.4	28	4
11	M	65	NOS	6.5	3.6	Yes	3.8	17	4
12	M	56	NOS	3.8	3.4	Yes	1.0	60	2
13	M	62	NOS	6.6	3.1	Yes	2.8	25	4
14	M	43	NOS	6.3	3.0	Yes	1.8	60	2
15	M	56	NOS	5.5	3.3	No	0.9	100	1
16	F	74	Tip lesion	1.6	3.8	No	1.0	90	1
17	M	54	NOS	12.9	2.8	Yes	0.9	100	1
18	M	73	Cellular	1.6	2.8	Yes	3.3	30	3b
19	M	53	NOS	6.5	3.0	Yes	0.9	75	2
20	F	67	NOS	32.0	1.9	Yes	1.4	37	3b
21	F	29	Perihilar	6.2	3.5	No	2.3	35	3b
22	F	18	NOS	1.9	4.0	No	1.2	100	1
23	M	19	Perihilar	15.0	2.7	Yes	0.8	100	1

F, female; M, male; HBP, high blood pressure; CKD, chronic kidney disease.

A total of 16 samples of normal renal tissue received at the Pathology Department of the Marqués de Valdecilla University Hospital in Santander were selected as the control group; these corresponded to renal wedges (from organ donors) and radical nephrectomies (mainly due to renal cancer) of patients with preserved renal function. Subsequently, after a thorough review of the criteria, the control group comprised 15 samples, as one sample was not selected due to a diagnosis of IgA GN at another hospital.

In addition, CNVs were compared with publicly available control databases, such as the Genome Aggregation Database (gnomAD), the Database of Genomic Variants (DGV), and databases for pathogenic CNVs, such as ClinVar.

2.2. Identification and Annotation of Genes of Cellular Adhesion Molecules

Using information gathered from a variety of sources, including databases such as the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and journal publications, 29 genes were chosen as potential human cell-adhesion molecule gene candidates [4]: *ACTB*, *ARHGDI*, *CDC42*, *CDH1*, *COL1A2*, *ELN*, *FN1*, *FSCN1*, *ICAM1*, *ITGA5*, *ITGB1*, *ITGB3*, *LAMC1*, *LPAR1*, *LPAR2*, *LPAR3*, *LPAR4*, *LPAR5*, *LPAR6*, *PTK2*, *RHOA*, *RHOC*, *ROCK2*, *SELE*, *TNC*, *TPM1*, *TRAM1*, *VCAM1*, and *WASF3*.

Based on Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM; <https://www.omim.org>, accessed on 4 March 2022), we distinguished between nephropathic and phenocopy genes. As a result, “nephropathic genes” were defined as genes that were recognized in OMIM as causing “nephropathy”. In contrast, “phenocopy genes” were those genes in OMIM found to produce a syndromic or unrelated illness. (Supplementary Table S1). Where a case was not yet documented in OMIM, recent research pointing to the gene’s causal pathogenic role in the nephrotic syndrome was considered to stratify cases as nephropathic vs. phenocopy [18,19].

2.3. Sample Preparation and Mutational Analysis

The renal biopsy was performed by percutaneous strategy under ultrasound guidance. Renal tissues were processed, formalin fixed, and paraffin embedded according to standard procedures for histological diagnosis.

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material. From the FFPE material, 5 sections of 3 μ m were taken and collected in a 1.5 mL Eppendorf tube. First, tissue deparaffinization was carried out by adding 160 μ L of Deparaffinization Solution (QIAGEN, Hilden, Germany) and incubating at 56 °C for 5 min at 700 rpm. Next, DNA extraction was carried out using Cobas[®] DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the manufacturer’s protocol (Supplementary dataset).

Once DNA was extracted from the samples, nucleic acid quantification was performed using the Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); according to the manufacturer, samples at a concentration of at least 2 μ g/ μ L were considered valid for sequencing. Finally, all the samples were diluted up to 1 ng/ μ L to begin the preparation of libraries.

2.3.1. Design of the Targeted Sequencing Panel

We designed a custom panel for the targeted sequencing of DNA extracted from FFPE material using AmpliSeq technology (ThermoFisher Scientific), which is the standard for FFPE sequencing.

Due to the nature and quality of the FFPE material, PCR amplification was performed instead of hybrid capture. We designed a panel with complete exon coverage $\pm$ 15 bases for possible splicing and leaving the UTR control regions unsequenced for the following genes: *ACTB*, *ARHGDI1*, *CDC42*, *CDH1*, *COL1A2*, *ELN*, *FN1*, *FSCN1*, *ICAM1*, *ITGA5*, *ITGB1*, *ITGB3*, *LAMC1*, *LPAR1*, *LPAR2*, *LPAR3*, *LPAR4*, *LPAR5*, *LPAR6*, *PTK2*, *RHOA*, *RHOC*, *ROCK2*, *SELE*, *TNC*, *TPM1*, *TRAM1*, *VCAM1*, and *WASF3*. All this was carried out using an automated platform, Ion AmpliSeq On-Demand Panels for Targeted Sequencing (ThermoFisher Scientific), which formulates the necessary primers.

Primer design was performed for the FFPE tissue to generate 175 bp length amplicons, covering 92.65 kb over 29 genes with a total 910 amplicons.

2.3.2. Library Preparation

Library preparation was performed automatically using the Ion AmpliSeq kit for Ion Chef DL8 (ThermoFisher Scientific), with a 31-amplification-cycle program of 4 min. Once amplified, libraries were quantified and diluted to equimolar concentrations.

2.3.3. Sequencing

Sequencing was performed using Ion S5 (ThermoFisher Scientific) with a 520 chip, which generated a minimum of 5 million useful reads to determine germinal coverage to at least $\times 100$.

2.3.4. Sequencing Data Collection

Only cases with a coverage greater than or equal to 160 reads were selected for analysis. In those patients where the library had a depth of less than 160 reads, the entire sequencing process was repeated.

2.3.5. Bioinformatic Analysis

The human genome (hg19) was aligned using BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>, accessed on 18 June 2020), which was used to align fastq files. Later, the alignments were sorted and filtered using samtools and picardtools (<https://broadinstitute.github.io/picard/> and <http://www.htslib.org/>, respectively) (accessed on 18 June 2020). UnifiedGenotyper was used to detect mutations (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360036365812-HaplotypeCaller>, accessed on 18 June 2020). Using vcftools (<http://vcftools.sourceforge.net/>, accessed on 18 June 2020), we then filtered the mutations in the region of interest. PED and MAP files were created using customized PERL scripts to perform association studies with the Plink program (<https://www.cog-genomics.org/plink/1.9/>, accessed on 18 June 2020); default values were utilized without considering gender differences, and multitest correction was not performed. Finally, annotation of the functional consequence of each mutation was carried out using custom PERL scripts using the Ensembl database API.

All detected alterations were classified according to the ACMG guideline [20,21] using the Franklin ACMG Classification (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, accessed on 1 June 2023).

3. Results

3.1. Clinical and Pathological Characteristics

A total of 23 patients were included in the study (clinical and histopathological characteristics are summarized in Table 1). Of these patients, 74% were male, and 26% were female. The median age was 54 years (range 18–82 years); mean age: 54 years), and all 23 patients were adults ≥ 18 years old.

In almost all cases (74%; $n = 17$), classical or NOS (not otherwise specified) FSGS was the predominant morphological variant observed on biopsy. A perihilar variant was identified in four patients (17%; $n = 4$), while cellular and tip variants were observed in one patient each.

Patients with diabetic nephropathy or hypertensive nephropathy were excluded from the study. Patients were classified into chronic kidney disease (CKD) stages according to the established KDIGO classification [22]: 30% stage 1, with normal or high GFR (≥ 90 mL/min); 18% stage 2, mild CKD (60–89 mL/min); 9% stage 3a (45–59 mL/min); 30% stage 3b (30–44 mL/min); and 13% stage 4, severe CKD (15–29 mL/min); no patients were detected in stage 5.

3.2. Mutational Analysis

Of the 29 genes studied, variants were found in all of them, except in the *RHOA* and *LPAR5* genes, although many of them were silent mutations (Supplementary Table S2). UTR regions as well as non-coding regions, which do not affect splicing, were not considered. All the raw sequencing data can be accessed from the European Nucleotide Archive (ENA) using this link: <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/search?query=PRJEB53199> (accessed on 31 May 2022).

Initially, we examined all non-silent mutations, specifically noting the presence of alterations in the *FN1* and *TNC* genes in all FSGS patients. The frequencies of variations in the different genes analyzed are shown in Figure 1.

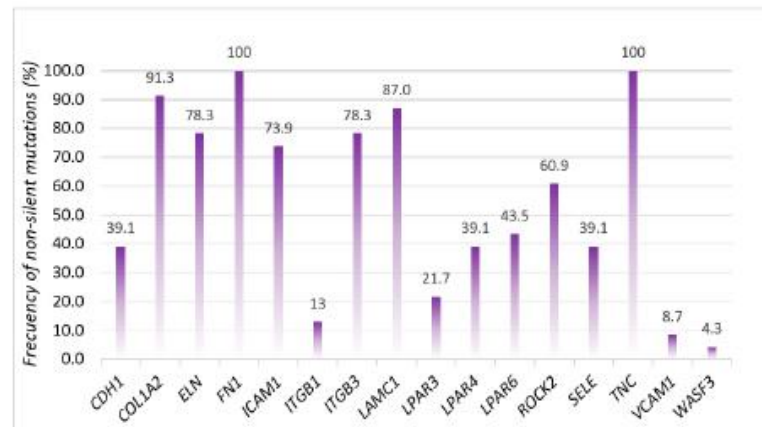


Figure 1. Frequencies of non-silent mutations (%).

Variations were observed in both the control group and in all patients, although the average number of cumulative variants (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) was higher in FSGS patients (16.5 SNPs) compared with the control group (mean of 11.8 SNPs).

We then shifted our focus to non-benign variants; specifically, those classified as pathogenic, probably pathogenic, and uncertain significant variants (Table 2). Two patients were found to have the pathogenic missense variant *ITGB3*c.1199G>A, and five FSGS patients were discovered to have the likely pathogenic nonsense variant *CDH1*c.499G>T, which has no Reference SNP (rs) Report. The missense variants *COL1A2*c.1015A>C, *ITGB1*c.1807A>T, *ITGB3*c.2351C>T, *LAMC1*c.148T>C, *LPAR3*c.524C>G, *LPAR4*c.259C>G, *LPAR4*c.260T>C, *LPAR6*c.227A>T, *LPAR6*c.998T>C, and *WASF3*c.934G>C were classified as uncertain significant variants. None of the gene variants listed above were detected in the control group, but the difference was not statistically significant.

Table 2. The genetic data of patients with FSGS according to sequencing, based on the Franklin ACMG guideline.

Gene	Variant	Frequency in Patients (n = 23)	Frequency in European Population (dbSNP, 1000 G)	Zygosity	ACMG
<i>CDH1</i>	c.499 G>T (p.Glu167 *)	(5) 0.2174		Het	LP
<i>COL1A2</i>	c.1015 A>C (p.Thr339Pro)	(9) 0.3913		Het	US
<i>ITGB1</i>	c.1807 A>T (p.Asn603Tyr)	(3) 0.1304		Het	US
<i>ITGB3</i>	c.1199 G>A (p.Cys400Tyr)	(2) 0.0869	0.0000	Het	P
	c.2351 C>T (p.Thr784Met)	(1) 0.0435	0.0010	Het	US
<i>LAMC1</i>	c.148 T>C (p.Cys50Arg)	(1) 0.0435		Het	US
<i>LPAR3</i>	c.524 C>G (p.Ala175Gly)	(5) 0.2174		Het	US
<i>LPAR4</i>	c.260 T>C (p.Leu87Pro)	(9) 0.3913		Het	US
	c.259 C>G (p.Leu87Val)	(3) 0.1304		Het	US
<i>LPAR6</i>	c.227 A>T (p.Tyr76Phe)	(7) 0.3043		Het	US
	c.998 T>C (p.Leu333Ser)	(2) 0.0869		Het	US
<i>WASF3</i>	c.934 G>C (p.Ala312Pro)	(1) 0.0435		Het	US

ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; Het, heterozygous; LP, likely pathogenic; P, pathogenic; US, uncertain significance; *CDH1*, cadherin 1; *COL1A2*, collagen type 1 alpha 2 chain; *ITGB1*, integrin subunit beta 1; *ITGB3*, integrin subunit beta 3; *LAMC1*, laminin subunit gamma 1; *LPAR3*, lysophosphatidic acid receptor 3; *LPAR4*, lysophosphatidic acid receptor 4; *LPAR6*, lysophosphatidic acid receptor 6; *WASF3*, WASP family member 3; *, STOP codon.

Five patients had the *CDH1*c.499G>T mutation (patients 1, 2, 5, 7, and 9): two women and three men, with a mean age of 52.6 years. Two of them also had the *ITGB3*c.1199G>A mutation (patients 2 and 7). The first patient was diagnosed with autoimmune hemolytic anemia and is currently being studied for interstitial lung disease (ILD) and receiving treatment with Rituximab. The other patient developed an advanced chronic disease with subsequent transplantation and recurrence of FSGS in the control biopsy. The rest of the patients with the *CDH1*c.499G>T mutation are currently under control without immunosuppressive treatment and have mild CKD.

The remaining variants were deemed benign, with many having similar frequencies in the overall European population (Supplementary Table S4). Additionally, we identified new variants that have not yet been annotated and therefore have no Reference SNP (rs) Report (Table 3).

Table 3. Mutations found without Reference SNP (rs) Report.

Gene	rs	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Type of Alteration	ACMG
<i>CDH1</i>	-	c.500 A>G	p.Glu167Gly	Missense	LB
	-	c.499 G>T	p.Glu167 *	Nonsense	LP
<i>COL1A2</i>	-	c.1015 A>C	p.Thr339Pro	Missense	US
<i>ELN</i>	-	c.1435 G>A	p.Val479Met	Missense	LB
<i>ICAM1</i>	-	Exon 3 + 1 G>A	-	Essential splice	-
<i>ITGB1</i>	-	c.1807 A>T	p.Asn603Tyr	Missense	US
<i>LAMC1</i>	-	c.148 T>C	p.Cys50Arg	Missense	US
<i>LPAR3</i>	-	c.524 C>G	p.Ala175Gly	Missense	US
<i>LPAR4</i>	-	c.259 C>G	p.Leu87Val	Missense	US
	-	c.260 T>C	p.Leu87Pro	Missense	US
<i>LPAR6</i>	-	c.227 A>T	p.Tyr76Phe	Missense	US
	-	c.998 T>C	p.Leu333Ser	Missense	US
<i>TNC</i>	-	c.4241 G>C	p.Arg1414Thr	Missense	LB
	-	Exon 28—2 A>T	-	Essential splice	-
<i>WASF3</i>	-	c.934 G>C	p.Ala312Pro	Missense	US

ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; LB, likely benign; LP, likely pathogenic; P, pathogenic; US, uncertain significance; *CDH1*, cadherin 1; *COL1A2*, collagen type I alpha 2 chain; *ELN*, elastin; *ITGB1*, integrin subunit beta 1; *ITGB3*, integrin subunit beta 3; *LAMC1*, laminin subunit gamma 1; *LPAR3*, lysophosphatidic acid receptor 3; *LPAR4*, lysophosphatidic acid receptor 4; *LPAR6*, lysophosphatidic acid receptor 6; *TNC*, Tenascin C; *WASF3*, WASP family member 3; *, STOP codon.

On the other hand, when we searched for a correlation between non-benign mutations and disease severity, as measured by the level of proteinuria, we observed a tendency toward a greater accumulation of mutations in the subnephrotic range of proteinuria (Figure 2).

Furthermore, to directly correlate these mutations with glomerulopathies, we considered the stages of CKD. According to the statistical analysis, the number of mutations is not dependent on the stage of chronic kidney disease ($p = 0.1164$). However, on average, stage 3a has 2.42 more mutations compared with stage 1. We created a graph showing the distribution of mutations by genes and CKD stages (Figure 3).

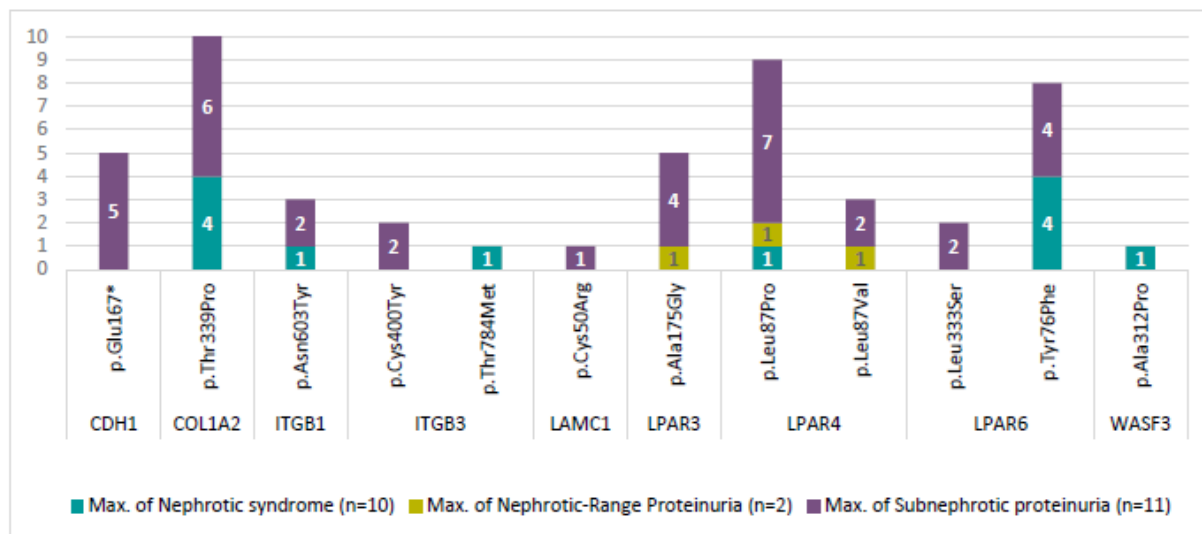


Figure 2. Distribution of non-benign mutations according to disease severity (proteinuria).

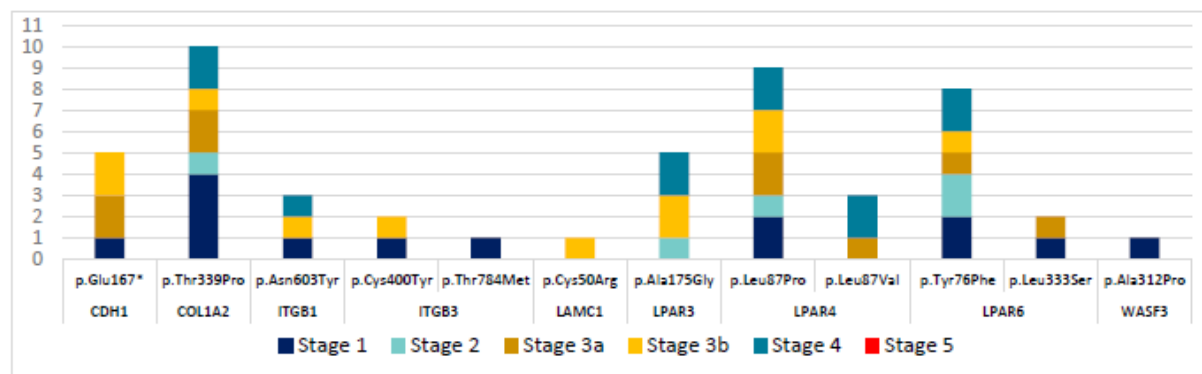


Figure 3. Frequency of mutations by genes and CKD stages.

4. Discussion

In our cohort of patients with adult-onset FSGS, we observed for the first time a high rate of mutations in adhesion molecules and extracellular matrix glycoproteins, with the high prevalence of non-silent mutations the key result of our investigation, although the limited sample size does not allow for statistical significance. Both in the general population (European population, dbSNP, 1000 Genomes) and in our control group, this rate of alteration is lower than in the FSGS patient group (Supplementary Table S5). Similar to this study, other genetic studies have previously reported mutations in adhesion molecules and extracellular matrix glycoproteins in patients with FSGS [23–25].

Most genetic research has established a direct correlation between mutations in podocyte and collagen *COL4A* (*A3/A4/A5*) genes and the development of familial FSGS. This correlation persists even in cases of adult-onset FSGS, where a monogenic cause of FSGS could be identified in up to 29% of cases [7–9,26,27]. A similar rate of mutation was reported in adult-onset steroid-resistant nephrotic syndrome, with a higher age of onset of FSGS related to a lower rate of single-gene identification [28].

Mutations in the *INF2* gene have been reported in familial FSGS of both Caucasian and Asian ancestry [23,24], while Marx et al. identified a novel nonsense variant in the *PODXL* gene in a three-generation family with an atypical glomerular nephropathy resembling

FSGS [25]. Although these studies found mutations in specific molecule groups, they did not investigate the entire set of genes that constitute these groups.

To perform a comprehensive analysis of these genes, we utilized NGS technology, which allowed us to rapidly study multiple genes in a single experiment at high resolution [16]. This approach facilitates the identification of new molecules or pathways involved in or contributing to the development of FSGS. However, interpreting new variants without a known clinical significance can be challenging, and additional functional tests are necessary to link these variants to FSGS [7,16,23].

It is noteworthy that in our study, all the FSGS patients showed alterations in tenascin and fibronectin 1, which have previously been linked to podocyte injury [29–31]. Additionally, a large percentage of our patients exhibited mutations in integrins (78%) and laminins (87%), which have been described in other studies [32,33] that we will discuss below.

While podocyte degradation is a critical step in the pathophysiology of FSGS, the environment may also contribute to the development of segmental lesions. Research has shown that alterations in adjacent epithelial parietal and mesangial cells also play a role in FSGS [34]. Extracellular matrix glycoproteins and adhesion molecules also contribute to podocyte health [11,29,35,36], and animal and cell culture studies have linked alterations in these molecules to nephrotic syndrome and podocyte damage [30–32,37–40]. Moreover, mutations in adhesion proteins such as laminin $\beta 2$, integrin $\alpha 3$, and integrin $\beta 4$ in humans have been associated with steroid-resistant nephrotic syndrome due to a lack of appropriate adhesion of podocytes to the glomerular basement membrane [13,41–43]. Experimental and human FSGS exhibit altered expression of extracellular matrix proteins, including laminin-1, perlecan, collagen type IV-2, laminin-2, agrin, and collagen type IV-4, that are produced by parietal epithelial cells and podocytes [32]. Therefore, these variations in extracellular matrix proteins may possibly have an impact on the histopathologic type of FSGS [44].

In addition to other signals, adhesion molecules and extracellular matrix glycoproteins are components of a network that involves redundant interactions between molecules [29]. The heterogeneity of research and the difficulty in identifying a single common etiology of a disease that is frequently syndromic is explained by this complicated network [26,45].

It is important to note that, in our study, no mutation in a single gene was detected that could explain FSGS, but each patient had a variable number of non-silent mutations (9 to 22 non-silent mutations per patient) (Supplementary Table S3), which could partially explain the predisposition to the disease.

Multiple gene variants may interact to promote podocyte damage caused by different non-Mendelian forms of FSGS [9]. Therefore, each individual mutation affects only a few patients, and the addition of mutations that may promote these minor injuries contributes to the development of segmental lesions. In this sense, a greater number of mutations in adhesion molecules and extracellular matrix glycoproteins could favor the occurrence of FSGS by increasing susceptibility to the disease [9]. It is interesting that several authors have noted a synergistic effect of various FSGS mutations. Frese et al. demonstrated that carriers of type IV collagen (*COL4A5*) gene mutations with related polymorphisms in the slit diaphragm genes experience severe forms of FSGS [46], while Bullich et al. report a similar result with *COL4A3* mutations [17].

Notably, we cannot be sure of the exact role of the variants we found, and we classified most of them as benign or “of uncertain significance” [21], understanding that further studies will be needed to understand the pathogenic role of adhesion molecule and extracellular matrix glycoprotein mutations in the development of FSGS.

Several limitations should be mentioned. Although our study sheds light on the prevalence of mutations in adhesion molecules and extracellular matrix glycoproteins in adult-onset FSGS patients, it is limited by a small sample size. Furthermore, the lack of a well-defined classification system for adult-onset FSGS and the absence of validated methods for distinguishing non-familial FSGS [22] make it difficult to draw definitive conclusions. While we excluded patients with secondary forms of FSGS and suspected

familial forms, it is still possible that some patients had these forms. Additionally, the absence of electron microscopy analysis prevented us from differentiating between primary and adaptive forms of FSGS. Further research is needed to fully understand the complex pathogenesis of this heterogeneous disease.

5. Conclusions

We were able to identify a high rate of mutation in adhesion molecules and extracellular matrix glycoproteins in all of the selected adult patients with FSGS.

We found mutations without a Reference SNP (rs) Report. Two patients were found to have the pathogenic missense variant *ITGB3*c.1199G>A, and five FSGS patients were discovered to have the likely pathogenic nonsense variant *CDH1*c.499G>T. None of the gene variants were detected in the control group; however, this difference was not statistically significant.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines11061764/s1>, Section S1. DNA extraction protocol (Cobas® DNA Sample Preparation Kit). Table S1. Panel of 29 genes analyzed with next-generation sequencing, and distinction between nephropathic and phenocopy genes. Table S2. Total variants and silent, and non-silent mutations in FSGS patients. Table S3. List of variants based on the UnifiedGenotyper and ACMG score. Table S4. Frequency of annotated variants found in our study. References [18,47–49] are cited in Supplementary Materials.

Author Contributions: Conceptualization, J.J.G.R. and E.R.C.; methodology, S.M.G. and M.C.; software, I.V.; validation, I.V. and J.F.S.; formal analysis, S.M.G., J.F.S., E.R.C., I.V. and J.J.G.R.; investigation, S.M.G. and E.R.C.; resources, S.M.G.; data curation, J.J.G.R.; writing—original draft preparation, S.M.G. and E.R.C.; writing—review and editing, J.J.G.R.; supervision, E.R.C. and J.J.G.R.; project administration, J.F.S. and J.J.G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was reviewed and approved by the Clinical Research Ethics Committee of Cantabria (Ref: 2019.206) according to local standards.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/search?query=PRJEB53199> (accessed on 31 May 2022).

Acknowledgments: We thank the patients for their participation in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Braden, G.L.; Mulhern, J.G.; O'Shea, M.H.; Nash, S.V.; Ucci, A.A.; Germain, M.J. Changing incidence of glomerular diseases in adults. *Am. J. Kidney Dis.* **2000**, *35*, 878–883. [CrossRef] [PubMed]
2. Kitiyakara, C.; Eggers, P.; Kopp, J.B. Twenty-one-year trend in ESRD due to focal segmental glomerulosclerosis in the United States. *Am. J. Kidney Dis.* **2004**, *44*, 815–825. [CrossRef] [PubMed]
3. Stirling, C.M.; Mathieson, P.; Boulton-Jones, J.; Feehally, J.; Jayne, D.; Murray, H.; Adu, D. Treatment and outcome of adult patients with primary focal segmental glomerulosclerosis in five UK renal units. *QJM-Mon. J. Assoc. Physicians* **2005**, *98*, 443–449. [CrossRef] [PubMed]
4. Valastyan, S.; Weinberg, R.A. Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules. *J. Cell Sci.* **2011**, *124* Pt 7, 999–1006. [CrossRef] [PubMed]
5. Parsons, J.T.; Horwitz, A.R.; Schwartz, M.A. Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 633–643. [CrossRef]
6. Guo, W.; Giancotti, F.G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 816–826. [CrossRef]
7. Sharif, B.; Barua, M. Advances in molecular diagnosis and therapeutics in nephrotic syndrome and focal and segmental glomerulosclerosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2018**, *27*, 194–200. [CrossRef]

8. Kopp, J.B.; Nelson, G.W.; Sampath, K.; Johnson, R.C.; Genovese, G.; An, P.; Friedman, D.; Briggs, W.; Dart, R.; Korbet, S.; et al. *APOL1* genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 2129–2137. [\[CrossRef\]](#)
9. Yu, H.; Artomov, M.; Brähler, S.; Stander, M.C.; Shamsan, G.; Sampson, M.G.; White, J.M.; Kretzler, M.; Miner, J.H.; Jain, S.; et al. A role for genetic susceptibility in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1067–1078. [\[CrossRef\]](#)
10. Wiggins, R.C. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* **2007**, *71*, 1205–1214. [\[CrossRef\]](#)
11. Lennon, R.; Randles, M.J.; Humphries, M.J. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front. Endocrinol.* **2014**, *14*, 160. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Schell, C.; Huber, T.B. The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 3166–3174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Has, C.; Spartà, G.; Kiritsi, D.; Weibel, L.; Moeller, A.; Vega-Warner, V.; Waters, A.; He, Y.; Anikster, Y.; Esser, P.; et al. Integrin $\alpha 3$ Mutations with Kidney, Lung, and Skin Disease. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 1508–1514. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Yu, C.-C.; Fornoni, A.; Weins, A.; Hakrrouch, S.; Maiguel, D.; Sageshima, J.; Chen, L.; Ciancio, G.; Faridi, M.H.; Behr, D.; et al. Abatacept in B7-1-Positive Proteinuric Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 2416–2423. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Hansrivijit, P.; Puthenpura, M.M.; Ghahramani, N. Efficacy of abatacept treatment for focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease: A systematic review of case reports, case series, and observational studies. *Clin. Nephrol.* **2020**, *94*, 117–126. [\[CrossRef\]](#)
16. Renkema, K.Y.; Stokman, M.F.; Giles, R.H.; Knoers, N.V.A.M. Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2014**, *10*, 433–444. [\[CrossRef\]](#)
17. Bullich, G.; Trujillano, D.; Santin, S.; Ossowski, S.; Mendizábal, S.; Fraga, G.; Madrid, A.; Ariceta, G.; Ballarín, J.; Torra, R.; et al. Targeted next-generation sequencing in steroid-resistant nephrotic syndrome: Mutations in multiple glomerular genes may influence disease severity. *Eur. J. Hum. Genet.* **2015**, *23*, 1192–1199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Bierzynska, A.; Soderquest, K.; Dean, P.; Colby, E.; Rollason, R.; Jones, C.; Inward, C.D.; McCarthy, H.J.; Simpson, M.A.; Lord, G.M.; et al. *MAGI2* mutations cause congenital nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 1614–1621. [\[CrossRef\]](#)
19. Landini, S.; Mazzinghi, B.; Becherucci, F.; Allinovi, M.; Provenzano, A.; Palazzo, V.; Ravaglia, F.; Artuso, R.; Bosi, E.; Stagi, S.; et al. Reverse phenotyping after whole-Exome sequencing in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2020**, *15*, 89–100. [\[CrossRef\]](#)
20. Li, M.M.; Datto, M.; Duncavage, E.J.; Kulkarni, S.; Lindeman, N.I.; Roy, S.; Tsimberidou, A.M.; Vnencak-Jones, C.L.; Wolff, D.J.; Younes, A.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J. Mol. Diagn.* **2017**, *19*, 4–23. [\[CrossRef\]](#)
21. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Rovin, B.H.; Adler, S.G.; Barratt, J.; Bridoux, F.; Burdige, K.A.; Chan, T.M.; Cook, H.T.; Fervenza, F.C.; Gibson, K.L.; Glasscock, R.J.; et al. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int.* **2021**, *100*, S1–S276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Brown, E.J.; Schlöndorff, J.S.; Becker, D.J.; Tsukaguchi, H.; Tonna, S.J.; Uscinski, A.L.; Higgs, H.N.; Henderson, J.M.; Pollak, M.R. Mutations in the formin gene *INF2* cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 72–76. [\[CrossRef\]](#)
24. Xie, J.; Hao, X.; Azeloglu, E.U.; Ren, H.; Wang, Z.; Ma, J.; Liu, J.; Ma, X.; Wang, W.; Pan, X.; et al. Novel mutations in the inverted formin 2 gene of Chinese families contribute to focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **2015**, *88*, 593–604. [\[CrossRef\]](#)
25. Marx, D.; Caillard, S.; Olgne, J.; Moulin, B.; Hannedouche, T.; Touchard, G.; Dupuis, A.; Gachet, C.; Molitor, A.; Bahram, S.; et al. Atypical focal segmental glomerulosclerosis associated with a new *PODXL* nonsense variant. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2021**, *9*, e1658. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Yao, T.; Udwan, K.; John, R.; Rana, A.; Haghighi, A.; Xu, L.; Hack, S.; Reich, H.N.; Hladunewich, M.A.; Cattran, D.C.; et al. Integration of genetic testing and pathology for the diagnosis of adults with FSGS. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2019**, *14*, 213–223. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Braunisch, M.C.; Riedhammer, K.M.; Herr, P.-M.; Draut, S.; Günthner, R.; Wagner, M.; Weidenbusch, M.; Lungu, A.; Alhaddad, B.; Renders, L.; et al. Identification of disease-causing variants by comprehensive genetic testing with exome sequencing in adults with suspicion of hereditary FSGS. *Eur. J. Hum. Genet.* **2021**, *29*, 262–270. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Sadowski, C.E.; Lovric, S.; Ashraf, S.; Pabst, W.L.; Gee, H.Y.; Kohl, S.; Engelmann, S.; Vega-Warner, V.; Fang, H.; Halbritter, J.; et al. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 1279–1289. [\[CrossRef\]](#)
29. Potter, A.S.; Drake, K.; Brunskill, E.W.; Steven Potter, S. A bigenic mouse model of FSGS reveals perturbed pathways in podocytes, mesangial cells and endothelial cells. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216261. [\[CrossRef\]](#)
30. Kliewe, F.; Kaling, S.; Löttsch, H.; Artelt, N.; Schindler, M.; Rogge, H.; Schröder, S.; Scharf, C.; Amann, K.; Daniel, C.; et al. Fibronectin is up-regulated in podocytes by mechanical stress. *FASEB J.* **2019**, *33*, 14450–14460. [\[CrossRef\]](#)
31. Madne, T.H.; Dockrell, M.E.C. TGF β 1-mediated PI3K/Akt and p38 MAP kinase dependent alternative splicing of fibronectin extra domain A in human podocyte culture. *Cell. Mol. Biol.* **2018**, *64*, 127–135. [\[CrossRef\]](#)

32. Chan, G.C.; Eng, D.G.; Miner, J.H.; Alpers, C.E.; Hudkins, K.L.; Chang, A.; Pippin, J.W.; Shankland, S.J. Differential expression of parietal epithelial cell and podocyte extracellular matrix proteins in focal segmental glomerulosclerosis and diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2019**, *317*, F1680–F1694. [\[CrossRef\]](#)
33. Wei, C.; El Hindi, S.; Li, J.; Fomoni, A.; Goes, N.; Sageshima, J.; Maiguel, D.; Karumanchi, S.A.; Yap, H.-K.; Saleem, M.; et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 952–960. [\[CrossRef\]](#)
34. Lim, B.J.; Yang, J.W.; Do, W.S.; Fogo, A.B. Pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *J. Pathol. Transl. Med.* **2016**, *50*, 405–410. [\[CrossRef\]](#)
35. Sohrabi-Jahromi, S.; Marashi, S.A.; Kalantari, S. A kidney-specific genome-scale metabolic network model for analyzing focal segmental glomerulosclerosis. *Mamm. Genome* **2016**, *27*, 158–167. [\[CrossRef\]](#)
36. Sachs, N.; Sonnenberg, A. Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2013**, *9*, 200–210. [\[CrossRef\]](#)
37. Uchio-Yamada, K.; Yasuda, K.; Monobe, Y.; Akagi, K.I.; Suzuki, O.; Manabe, N. Tensin2 is important for podocyte-glomerular basement membrane interaction and integrity of the glomerular filtration barrier. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2020**, *318*, F1520–F1530. [\[CrossRef\]](#)
38. Stotter, B.R.; Talbot, B.E.; Capen, D.E.; Artelt, N.; Zeng, J.; Matsumoto, Y.; Endlich, N.; Cummings, R.D.; Schlondorff, J.S. Cosmc-dependent mucin-type O-linked glycosylation is essential for podocyte function. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2020**, *318*, F518–F530. [\[CrossRef\]](#)
39. Sugar, T.; Wassenhove-McCarthy, D.J.; Wayne Orr, A.; Green, J.; Van Kuppevelt, T.H.; McCarthy, K.J. N-sulfation of heparan sulfate is critical for syndecan-4-mediated podocyte cell-matrix interactions. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2016**, *310*, F1123–F1135. [\[CrossRef\]](#)
40. Bukosza, E.N.; Kratochwill, K.; Kornauth, C.; Schachner, H.; Aufricht, C.; Gebeshuber, C.A. Podocyte RNA sequencing reveals Wnt- And ECM-associated genes as central in FSGS. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0231898. [\[CrossRef\]](#)
41. Matejas, V.; Hinkes, B.; Alkandari, F.; Al-Gazali, L.; Annexstad, E.; Aytac, M.B.; Barrow, M.; Bláhová, K.; Bockenhauer, D.; Cheong, H.L.; et al. Mutations in the human laminin $\beta 2$ (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 992–1002. [\[CrossRef\]](#)
42. Kambham, N.; Tanji, N.; Seigle, R.L.; Markowitz, G.S.; Pulkkinen, L.; Uitto, J.; D'Agati, V.D. Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with $\beta 4$ integrin mutation and epidermolysis bullosa. *Am. J. Kidney Dis.* **2000**, *36*, 190–196. [\[CrossRef\]](#)
43. Chen, Y.M.; Kikkawa, Y.; Miner, J.H. A missense LAMB2 mutation causes congenital nephrotic syndrome by impairing laminin secretion. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 849–858. [\[CrossRef\]](#)
44. Merchant, M.L.; Barati, M.T.; Caster, D.J.; Hata, J.L.; Hobeika, L.; Coventry, S.; Brier, M.E.; Wilkey, D.W.; Li, M.; Rood, I.M.; et al. Proteomic analysis identifies distinct glomerular extracellular matrix in collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2020**, *31*, 1883–1904. [\[CrossRef\]](#)
45. Lepori, N.; Zand, L.; Sethi, S.; Fernandez-Juarez, G.; Fervenza, F.C. Clinical and pathological phenotype of genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis in adults. *Clin. Kidney J.* **2018**, *11*, 179–190. [\[CrossRef\]](#)
46. Frese, J.; Kettwig, M.; Zappel, H.; Hofer, J.; Gröne, H.-J.; Nagel, M.; Sunder-Plassmann, G.; Kain, R.; Neuweiler, J.; Gross, O. Kidney injury by variants in the COL4A5 gene aggravated by polymorphisms in slit diaphragm genes causes focal segmental glomerulosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 519. [\[CrossRef\]](#)
47. Assad, L.; Schwartz, M.M.; Virtanen, I.; Gould, V.E. Immunolocalization of tenascin and cellular fibronectins in diverse glomerulopathies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* **1993**, *63*, 307–316. [\[CrossRef\]](#)
48. Maxwell, P.H.; Wang, Y. Genetic studies of IgA nephropathy. *Nephron-Exp Nephrol* **2006**, *102*, 76–80. [\[CrossRef\]](#)
49. Adler, S.; Brady, H.R. Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am. J. Med.* **1999**, *107*, 371–386. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.