



---

---

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Detección de las mutaciones en el ARNm del gen APOL1  
asociadas a la enfermedad renal crónica en la población  
estudiantil de la BUAP

Tesis presentada para obtener el grado en:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Daniela Rodríguez Flores

DIRECTOR: Luis Márquez Domínguez

Co-directora: Lorena Milflores Flores



Octubre 2025

## **RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIOR, IMSS).

## **DEDICATORIA**

A lo largo de este proceso de elaboración de mi tesis, he tenido la suerte de contar con el apoyo de muchas personas que, con su tiempo, conocimiento y paciencia, han sido fundamentales para llegar hasta aquí.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Luis Márquez Domínguez, por su orientación, consejos y su dedicación constante. Su experiencia y entusiasmo me han inspirado a seguir adelante.

De igual manera expresar mi agradecimiento a mi co-asesora de tesis la Dra. Lorena Milflores Flores, quien me brindo su apoyo, paciencia y orientación desde el inicio de mi licenciatura.

Sin el valioso acompañamiento de ambos, este trabajo no habría sido posible.

A mis compañeros de clase y amigos, por su apoyo incondicional, por las horas de trabajo compartido, su presencia ha sido esencial para hacer más llevadero el camino.

A mis padres y hermano, por su amor, comprensión y paciencia a lo largo de toda mi formación. Gracias por siempre creer en mí, por ser mi principal fuente de fuerza.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de alguna u otra manera, contribuyeron a este trabajo. Este logro es también el resultado de su apoyo y confianza.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	4
1 ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS .....	7
2 RESUMEN .....	9
3 INTRODUCCIÓN .....	11
4 ANTECEDENTES GENERALES .....	12
4.1 El riñón .....	12
4.2 Enfermedad renal crónica (ERC).....	13
4.3 Clasificación .....	15
4.3.1 Etapas de ERC .....	17
4.3.2 Etapas de albuminuria .....	18
4.4 <i>Sintomatología</i> .....	19
4.5 <i>Diagnóstico</i> .....	20
4.5.1 Análisis de sangre.....	21
4.5.2 Composición de la orina.....	21
4.6 <i>Tratamiento</i> .....	23
4.6.1 Diabetes Mellitus.....	25
4.6.2 Hipertensión.....	26
4.7 <i>Factores de riesgo</i> .....	27
5 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	28
5.1 Generalidades APOL 1.....	28
5.1.1 Gen APOL1.....	28
5.1.2 APOL1 y la inmunidad innata.....	31
5.1.3 ARNm APOL1.....	32

5.1.4	Isoformas de APOL1 .....	32
5.1.5	Proteína APOL1 .....	33
5.2	Variantes de riesgo asociadas a APOL 1 .....	36
5.2.1	Variante G1 .....	37
5.2.2	Variante G2 .....	40
5.3	Presencia de G1/G2 en Afrodescendientes .....	41
5.4	Polimorfismos G1/G2 y la ERC .....	42
5.5	Expresión de G1/G2 en células renales .....	42
5.6	Polimorfismos G1/G2 y posible el desarrollo de ERC .....	45
5.7	APOL1-B3 mecanismos de inflamación .....	45
5.8	APOL1 trasplante renal .....	46
5.9	APOL1 en la autofagia, cáncer .....	47
5.10	APOL1 en población latina .....	47
6	JUSTIFICACIÓN .....	49
7	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	51
8	OBJETIVO GENERAL .....	52
9	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
10	METODOLOGÍA .....	53
11	MATERIAL Y MÉTODOS .....	54
11.1	<i>Cultivo celular</i> .....	54
11.2	<i>Extracción ARN total en células</i> .....	56
11.3	<i>Obtención de ADNc por Retrotranscripción</i> .....	57
11.4	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) .....	59
11.5	<i>Purificación de ADN</i> .....	60

11.6	<i>Clonación de amplicón de APOL1</i> .....	60
11.1	<i>Generación de células competentes</i> .....	61
11.2	<i>Transformación de células bacterianas</i> .....	61
11.3	<i>Análisis de clonas</i> .....	62
11.4	<i>Extracción de plásmido por lisis alcalina</i> .....	62
11.5	<i>Corroboración de las clonas</i> .....	63
12	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	64
12.1	<i>Mantenimiento celular</i> .....	64
12.2	<i>Extracción ARN total</i> .....	64
12.3	<i>Electroforesis en gel</i> .....	65
12.4	<i>PCR</i> .....	65
12.5	<i>Purificación</i> .....	67
12.6	<i>Análisis de secuencia y representación gráfica por WebLogo</i> .....	69
12.7	<i>Control de reacción por clonación pJET 1.2</i> .....	71
13	<b>CONCLUSIONES</b> .....	74
14	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	75
15	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	76
16	<b>ANEXOS</b> .....	83

## 1 ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleótido
APOL1	Apolipoproteína L1
ARN	Ácido ribonucleico
CDS	Segmento codificante
DHL	Lipoproteína de alta densidad
DM	Diabetes Mellitus
DL	Desequilibrio de ligamento
EMEM	Eagle's minimum essential medium
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCT	Enfermedad renal crónica terminal
ERET	Enfermedad renal en etapa terminal
ERT	Enfermedad renal terminal
GBD	<i>Global Burden Disease</i>
HAS	Hipertensión arterial sistémica
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
PQRAD	Poliquistosis renal autosómica dominante
SFB	Suero fetal bovino
TFG	Tasa de filtración glomerular
TSFR	Terapia de sustitución de la función renal

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
-----	--------------------------------------

**ESUMEN**

La enfermedad renal crónica (ERC) es un padecimiento que afecta de 10 a 15% de la población mundial. Durante el 2021, en México la prevalencia de la ERC fue de 9,184 por cada 100,000 habitantes. Esta enfermedad se caracteriza por anomalías en la función de uno o ambos riñones y el deterioro progresivo lo que implica una disminución de la función renal. La diabetes y la hipertensión son las causas más comunes de la ERC. Sin embargo, en el país, muchos de los diagnósticos registrados se catalogan bajo "otras causas" o "causas no especificadas", lo que plantea la necesidad de investigar otros posibles orígenes de la enfermedad. Estudios previos en la población afroamericana han identificado una asociación entre el gen APOL 1 (Apolipoproteína L1) y el riesgo de desarrollar ERC o si está presente ya la enfermedad, su evolución es más rápida, específicamente con las variantes proteicas de riesgo G1 y G2. La identificación de estas variantes en la población mexicana podría aportar nuevas estrategias de prevención y para el estudio de esta enfermedad en el contexto nacional.

Se utilizaron 4 líneas celulares diferentes todas de origen humano y muestras de pacientes, fueron sometidas a un proceso de extracción de ARN total por el método fenol/cloroformo, con la finalidad de generar ADNc por Retrotranscripción y PCR, finalmente se mandó a secuenciar, las secuencias fueron analizadas para confirmar o descartar la presencia de las variantes proteicas de riesgo G1 y G2 asociadas a enfermedad renal crónica.

El análisis nos permitió la identificación de polimorfismos a nivel ADN, pero esos cambios a nivel proteína no están presentes en las variantes proteicas de riesgo en APOL1.

Sin embargo, se logró la estandarización de la prueba molecular para la detección de estas variantes de riesgo, la cual puede utilizarse en un futuro en la identificación y diagnóstico de ERC para personas de manera global.

**PALABRAS CLAVES:** APOL 1, Enfermedad renal crónica, variantes de riesgo, RT-PCR.

### **3 INTRODUCCIÓN**

La enfermedad renal crónica (ERC) es un padecimiento que afecta de 10 a 15% de la población mundial. Durante el 2021, en México la prevalencia de la ERC fue de 9,184 por cada 100,000 habitantes; esta enfermedad se caracteriza por anomalías en la función de uno o ambos riñones y su deterioro progresivo lo que implica una disminución de la función renal. La diabetes y la hipertensión son las causas más comunes de la ERC. Sin embargo, muchos de los diagnósticos registrados catalogan bajo "otras causas" o "causas no especificadas" (Argaiz et al., 2023). Esto plantea la necesidad de investigar otros posibles orígenes de la enfermedad. Estudios previos en la población afroamericana han identificado una asociación entre el gen APOL 1 (Apolipoproteína L1) y el riesgo de desarrollar ERC o si está presente ya la enfermedad, su evolución es más rápida, específicamente con las variantes de riesgo G1 y G2. La identificación de estas variantes en la población mexicana podría aportar nuevas perspectivas para el estudio de esta enfermedad en el contexto nacional.

## 4 ANTECEDENTES GENERALES

### 4.1 El riñón

El riñón es el órgano principal encargado de la excreción del ácido úrico (Papadakis M, 2025), este se presenta en el cuerpo en par, es considerado esencial ya que participa en el control del líquido extracelular, equilibrio electrolítico y del equilibrio ácido-básico; de igual modo produce algunas hormonas como calcitriol y la eritropoyetina (Carracedo J, 2024).

A su vez se encarga del control de la presión arterial y el control de la anemia (García-Montemayor et al., 2019). Este mismo presenta una estructura necesaria para poder realizar su función de manera eficiente.

Como la unidad funcional renal tenemos a las nefronas, en humanos cada riñón contiene alrededor de 800.000 a 1.000.000 nefronas, cada una tiene la capacidad de formar orina, formada por un agrupamiento de vasos capilares llamados glomérulos, estos filtran grandes cantidades de líquidos desde la sangre, a través de un túbulo largo el líquido filtrado se convierte en orina en su trayecto hacia la pelvis renal; los riñones procesan un volumen considerable de sangre cada día, el flujo sanguíneo que llega a los glomérulos es de 1200 mililitros de sangre cada minuto, de estos, 650ml corresponden a plasma sanguíneo y a partir de este, una quinta parte aproximadamente se filtra en los glomérulos; de manera paulatina el número de nefronas se puede reducir gradualmente ya que estas no tienen la capacidad de regenerarse; esto debido al envejecimiento renal normal, también pueden perderse por lesiones o por enfermedad (Carracedo J, 2024).

Otra estructura fundamental de los riñones son los podocitos, estos son células polarizadas y especializadas que presentan prolongaciones las cuales se entrelazan con las de otros podocitos vecinos, proporcionando un abrazo a los capilares sanguíneos, contribuyendo al mantenimiento de la presión hidrostática y formando un filtro selectivo para el paso de ciertas moléculas (Carracedo J, 2024).

Como con cualquier órgano en nuestro cuerpo, los riñones no están exentos de enfermedades que afecten su correcto funcionamiento, las enfermedades renales son un conjunto de patologías en las cuales se engloban un número elevado, estas corresponden con un cuadro sindrómico determinado, estas suelen progresar a lo largo del tiempo; los principales síndromes renales son: hematuria, proteinuria, síndrome nefrótico, fracaso renal agudo, tubulopatías, infecciones urinarias y enfermedad renal crónica (ERC).

#### **4.2 Enfermedad renal crónica (ERC)**

La ERC se define como la presencia de alteraciones estructurales o funcionales del riñón, con o sin reducción de la tasa de filtración glomerular, que persisten por un período mínimo de tres meses y que tienen implicaciones para la salud. Dichas alteraciones incluyen una velocidad de filtración glomerular por debajo de  $60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$  o bien la evidencia de daño renal manifestada por marcadores

como albuminuria, alteraciones en el sedimento urinario, anomalías en estudios de imagen o histología renal (Orozco, B. R. 2010).

La ERC genera preocupación a nivel global debido a su prevalencia, el impacto prolongado y el deterioro en la salud de los individuos. A esto se suma el elevado costo económico que conlleva, tanto para las familias que deben afrontar gastos en consultas, medicamentos y terapias de reemplazo renal como para el Estado, que destina una parte considerable de sus presupuestos en salud al tratamiento y manejo de esta enfermedad. Llegando a ser considerado un problema de salud pública a nivel internacional, ya que se ha registrado que afecta de un 10% a un 15% de la población mundial (Zubiran S, 2016).

La tasa de incidencia de ERC es mayor en hombres que en mujeres, lo que se ha asociado con factores como la mayor prevalencia de hipertensión arterial, diabetes mellitus y hábitos de riesgo como el tabaquismo y/o consumo de alcohol en la población masculina, además de posibles diferencias hormonales y genéticas que aceleran el deterioro renal, además la prevalencia por millón de habitantes es mayor para personas de 65 a 74 años en la mayoría de los países debido a que el envejecimiento se acompaña de una disminución natural en la tasa de filtración glomerular, mayor exposición acumulada a factores de riesgo y la presencia de comorbilidades crónicas que contribuyen al desarrollo y progresión de la enfermedad [(Esparza, K.,2020).

El mayor número de pacientes con ERC en el mundo se concentra en 3 regiones: Oceanía, África subsahariana y América latina, siendo México el segundo lugar en incidencia de ERC en Latinoamérica (Del Rosario et al., 2024).

En nuestro país se carece de un registro de pacientes con ERC, por lo que se desconoce el número preciso de estos. Se estima que la incidencia es de 377 casos por millón de habitantes

al año y que existen alrededor de 52,000 pacientes en terapia sustitutiva hasta el 2010, de los cuales 66% se encuentra en diálisis peritoneal (Rincon, P. R, 2024).

De acuerdo con un estudio de *Global Burden Disease* (GBD), en el año 2021 en México la prevalencia de ERC fue de 9184.9 por cada 100,000 habitantes. El Estado con mayor cantidad de casos fue la Ciudad de México, con 10,902 casos registrados (Rincon, P. R, 2024). Estas cifras van aumentando con el paso los años siendo una cuestión preocupante en el ámbito de la salud de la población mexicana.

#### **4.3 Clasificación**

Para que el personal médico pueda clasificar las fases o estadios de la enfermedad, la asociación *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) desarrollo y proporcionó una guía de práctica clínica destinada a la evaluación y tratamiento de la ERC denominada guía KDIGO, la cual ofrece recomendaciones clínicas cuyo propósito principal es optimizar la atención a los pacientes y fomentar mejores resultados en cuanto a la salud renal y la calidad de vida (National Kidney Foundation, 2024).

Se clasifican 6 estadios de la enfermedad, basándose en categorías de tasa de filtración glomerular (TFG) y por nivel de albumina en sangre de acuerdo con la tabla 1, la TFG funge como un indicador que refleja la cantidad de sangre filtrada por los glomérulos por minuto, ajustada a 1.73 m<sup>3</sup> de superficie corporal. Representa la principal medida del funcionamiento renal y permite clasificar la gravedad de la ERC. Dado que medirla directamente es complejo, en la práctica clínica se estima a partir de marcadores en sangre como la creatinina sérica o la cistatina C,

junto con variables como la edad y el sexo del paciente. La prueba de TFG se utiliza para detectar ERC en personas que presentan y/o aún no presentan síntomas (Levey et al. 2009).

La siguiente medida de clasificación del estadio de la ERC se basa en el nivel de albuminuria del paciente, la información mostrada por las guías KDIGO nos la define como la presencia de albumina en la orina y constituye un signo temprano de daño renal. La albúmina es una proteína fundamental de la sangre, cuya función principal es mantener la presión oncótica y transportar diversas moléculas. En condiciones normales, los riñones evitan que esta proteína pase de la sangre a la orina; sin embargo, cuando existe daño en los glomérulos o alteraciones en la permeabilidad de la barrera de filtración, la albúmina se pierde en cantidades detectables, lo que indica disfunción renal.

Tabla 1. Clasificación de las etapas de la ERC de acuerdo con la guía KDIGO.

KDIGO: Pronóstico de la ERC por categorías de TFG y albuminuria				Categorías de albuminuria persistente		
				Descripción y rango		
				A1	A2	A3
				Normal a ligeramente	Aumento moderado	Aumento severo
				<30 mg/g	30-300 mg/g	>300 mg/g
				<3 mg/mmol	3-30 mg/mmol	>30 mg/mmol
Categorías de TFG (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ) Descripción y rango	G1	Normal o alto	≥90			
	G2	Disminución leve	60-89			
	G3a	Disminución de leve a moderada	45-59			
	G3b	Disminución de moderada a grave	30-44			
	G4	Disminución severa	15-29			
	G5	Fallo renal	<15			

Las guías KDIGO para la ERC también proporciona información sobre las etapas consideradas por el TFG, de igual manera, las clasifica por categorías en el caso de albuminuria, las cuales se abordarán a continuación.

#### 4.3.1 Etapas de ERC

KDIGO clasifica las etapas en 6, siendo estas G1, G2, G3a, G3b, G4 y G5, dando información detallada de lo que ocurre en los riñones y los síntomas que pueden presentarse cada etapa.

- La ERC en etapa G1, los riñones presentan daños leves y conservan su función normal, la persona puede presentar indicios de daño renal o lesiones físicas en los riñones, el paciente tiene una TFG normal de 90 o más, pero tiene la presencia de albumina en la orina si otro signo de indicio, el daño renal podría no ser reversible.

- Dentro de la etapa G2 la TFG se presenta en rangos de 60 a 89, los riñones aún tienen capacidad de filtrar la sangre casi con normalidad, en esta etapa ya se puede observar los indicios de daño renal.
- En la etapa G3, los valores de TFG se encuentran entre 30 y 59, esta etapa se divide en dos subetapas en función de la TFG:
  - Etapa G3a: TFG entre 45 y 59
  - Etapa G3b: TFG entre 30 y 44

Los riñones presentan daños que afectan a su función y por ende el inicio de la presencia de síntomas, los desechos pueden comenzar a dañar otras partes como el aumento de la presión arterial, anemia y problemas en huesos, a esta acumulación se le llama uremia.

- En esta etapa G4 de ERC los riñones tienen daños moderados a severos, no depuran los desechos correctamente, la TFG se encuentra entre 15 a 29, es la última etapa antes de la falla renal.
- Dentro de la etapa G5 de ERC los riñones están a punto del fallo renal, a esta falla se le denomina enfermedad renal terminal (ERT) o enfermedad renal en etapa terminal (ERET), la TFG es inferior a 15.

#### **4.3.2 Etapas de albuminuria**

Las etapas de la ERC por las guías KDIGO también se clasifican en función de la albumina en orina. Esto es importante porque permite evaluar el daño renal temprano, incluso cuando la TGF es normal o levemente reducida. Existen 3 categorías:

- A1: Cantidad de albumina en orina normal o ligeramente aumentada (menos de 30 mg/g o 3 mg/mmol)

- A2: Cantidad de albumina en la orina moderadamente elevada (30-300 mg/g o 3-30 mg/mmol)
- A3: Cantidad de albumina elevada (>300 mg/g o >30 mg/mmol) daño renal severo.

#### *4.4 Sintomatología*

Los pacientes con ERC presentan un conjunto de síntomas, signos y anomalías que pueden observarse mediante pruebas de laboratorio, esto debido a la naturaleza progresiva y prolongada de la enfermedad y los efectos sistémicos que genera la misma (Gary.D. 2015). Debido a que la ERC es asintomática en grados tempranos, se da un subdiagnóstico del problema y por ende una referencia tardía al nefrólogo (Zubiran S, 2016).

Por lo general la ERC causa una disminución progresiva de la función renal, si se diagnostica en etapas tempranas, existe tratamiento o si es ocasionado por medicamentos u otras causas se puede revertir eliminando la causa que lo genera. La pérdida de las nefronas conduce a hipertrofia compensadora y filtración glomerular supranormal del resto de las nefronas, esto como mecanismo para conservar la homeostasis global. La hiperfiltración compensadora genera un daño por "exceso de trabajo" en las nefronas restantes (Maxine A. 2025).

Los primeros indicios se presentan de manera insidiosa, los signos iniciales pueden ser:

- Cambios en la micción: Se presenta como aumento en la frecuencia urinaria, más comúnmente en la noche (nicturia), o, al contrario, se manifiesta la disminución en la cantidad de orina producida.
- Fatiga y debilidad: La ERC puede llegar a afectar la producción de la hormona eritropoyetina, esta estimula la creación de

glóbulos rojos provocando anemia y como resultado puede causar fatiga y debilidad.

- Hinchazón: La disminución de la función renal puede producir la acumulación de líquido en el cuerpo, el cual provoca hinchazón en piernas, tobillos, pies, abdomen y o cara.
- Presión arterial alta: La presión alta puede ser una causa al igual como una consecuencia de la ERC (Contacto, 2025).

Entre los síntomas iniciales también se incluye el malestar generalizado, trastornos de la memoria, pérdida de la libido, los cuales son frecuentes y no focales en la ERC de moderada a grave (Smith 2020).

Las personas en etapas avanzadas pueden presentar debilidad, anorexia y náuseas, en episodios tardíos pueden manifestar prurito y disnea y con menor frecuencia se llega a presentar pericarditis o calcificación de tejidos blandos (Zubiran S, 2016).

En este punto el paciente desarrolla síndrome urémico, Este síndrome implica la acumulación plasmática de solutos urémicos de moléculas pequeñas y toxinas, disfunción multiorgánica y disbiosis de la microbiota intestinal (Nigam & Bush, 2019).

#### ***4.5 Diagnóstico***

El daño renal puede evidenciarse a través de la determinación de diferentes metabolitos o compuestos en la sangre, la orina, o morfología del tejido por medio de la histología o radiológicos (Orozco, B. R. 2010). Para detectar la ERC es más preciso basarse en estimaciones de la TFG que únicamente evaluar con la creatinina sérica (CENETEC, 2019).

#### **4.5.1      *Análisis de sangre***

Dentro de los exámenes de sangre para diagnosticar la ERC se determina la concentración de la creatinina sérica, esta es un producto desecho que se obtiene por la digestión de las proteínas de alimentos y la descomposición normal del tejido muscular, un nivel alto de creatinina puede ser atribuido a la presencia de una lesión renal aguda o ERC (Rincon, P. R, 2024). Con el desarrollo de la ERC, se evidencia una reducción en la depuración de ciertos solutos del riñón o ambos riñones afectados y da como resultado una retención de líquidos corporales (Zubiran S,2016).

Con el deterioro de la función renal se puede generar deficiencia de hierro, se puede llegar a presentar un recuento normal plaquetario, pero existe una disfunción la cual se caracteriza por mostrar tiempos de sangrado anormales. Existen anomalías en los electrolitos séricos y el metabolismo mineral que se manifiestan cuando la TFG desciende por debajo de 30 ml/min (Smith 2020).

#### **4.5.2      *Composición de la orina***

Cuando el volumen de orina es bajo y la TFG se encuentra por debajo de 5% de lo normal, se ven afectados los mecanismos de concentración urinaria (densidad urinaria baja) y acidificación (pH urinario bajo), lo que se refleja en una densidad urinaria disminuida y un pH urinario bajo. La proteinuria puede ser variable y, en algunos casos, el examen puede mostrar leucocitos mononucleares (leucocituria). No obstante, el análisis de orina suele ser inespecífico y en ocasiones puede arrojar resultados dentro de rangos normales (Smith y Tanagho, 2020).

En las pruebas para diagnosticar ERC, también se emplea otra que a comparación de la TFG utiliza orina en lugar de sangre, la prueba del cociente albúmina/ creatinina urinaria (UACR), la cual se utiliza para detectar el daño renal temprano, se considera que un UACR inferior a 30 mg/g indica una función renal saludable; esta mide la cantidad de albúmina con respecto a la concentración de creatinina, esto ayuda a determinar si los riñones están filtrando de la manera correcta, un nivel más alto significa que hay más albumina en la orina indicando un daño renal importante. La concentración de creatinina se ve afectada por la masa muscular de la persona: la TFG de quienes tienen menos masa muscular podría sobreestimar su función renal, en cambio, la masa muscular no influye en la prueba UACR, ayudando a tener una idea más completa de la salud y el daño renal (American Kidney Fund, 2025).

En el análisis del sedimento urinario, la presencia de cilindros céreos anchos indica dilatación e hipertrofia de las nefronas. Por otra parte, los estudios de imagen, en especial la ecografía, permiten identificar riñones pequeños e hiperecogénicos, generalmente con un diámetro menor de 9 a 10 cm (Maxine A. 2025). Desde el punto de vista etiológico, la ERC se considera multifactorial, siendo sus principales causas la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, las glomerulonefritis y las enfermedades hereditarias (De Mier, M. P, 2019). Dada su alta carga de morbilidad, se recomienda evaluar la función renal al menos una vez al año en pacientes con factores de riesgo (CAM, 2015).

#### **4.6 Tratamiento**

El tratamiento es paliativo, en los 4 primeros estadios de la enfermedad, se recomienda los siguientes cuidados:

- Control de cuidados médicos
- Control en el consumo de alimentos

Es importante identificar y corregir todos los elementos dañinos que puedan ser reversibles o factores de exacerbación, como el descarte de obstrucción de vías urinarias, hipovolemia, hipotensión, nefrotoxinas, hipertensión grave o urgencia hipertensiva e insuficiencia cardiaca. El signo físico más frecuente de la ERC es la hipertensión, esta como consecuencia de la alteración en la excreción de sodio, la cual suele presentarse en las etapas iniciales y tiende a empeorar conforme la enfermedad evoluciona (Maxine A. 2025).

Como medida para retrasar la evolución de la ERC se debe tratar la causa original, se recomienda controlar la presión arterial, glucosa en sangre y el manejo de la dieta, esto especialmente a pacientes que presentan diabetes y proteinuria (ADA,2025, American Kidney Fund, 2025).

El control de la presión arterial es importante para retrasar la evolución, en personas con proteinuria, es importante consumir sustancias que bloqueen el sistema renina-angiotensina-aldosterona, a su vez puede considerarse bloquear los receptores de mineralocorticoides en etapas más tempranas de la ERC (Erraez et al., 2020).

En pacientes en estadio 5 con ERCT, el tratamiento se basa en la terapia de sustitución de la función renal (TSFR) el cual es mediante el trasplante renal, pero no todos los pacientes llegan

a ser candidatos. Existen 2 opciones disponibles de TSFR los cuales son la hemodiálisis y diálisis peritoneal (Del Rosario et al., 2024).

La hemodiálisis se basa en la filtración de toxinas y agua de la sangre, sustituyendo la función de los riñones sanos, este tratamiento ayuda a controlar la presión arterial y a equilibrar los minerales importantes en la sangre como el potasio, sodio y calcio. En este proceso se bombea la sangre a través de un filtro llamado dializador, fuera del organismo, con el uso de una maquina la cual bombea la sangre a través del filtro y la devuelve al organismo. La hemodiálisis no es una cura para la ERCT, pero puede aumentar la esperanza de vida del paciente (NIDDK, 2018).

En el caso de la diálisis peritoneal, la sangre se filtra dentro del cuerpo, en este tipo de diálisis se utiliza como filtro la membrana que recubre el abdomen, también llamada peritoneo. Antes de iniciar el tratamiento, se requiere una cirugía menor para colocar un catéter, o tubo blando en el vientre (Diálisis, 2025).

Existen dos tipos comunes de diálisis peritoneal:

- Diálisis peritoneal ambulatoria continua (en inglés *Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis*, CAPD)
- Diálisis peritoneal automatizada (en inglés *Automated Peritoneal Dialysis*, APD)

La diálisis es una opción eficaz para eliminar los productos de desecho y el líquido adicional de la sangre. Sin embargo, no reemplaza por completo todas las funciones del riñón, por ende, no se considera una cura para ERC (Diálisis, 2025).

La selección de la técnica depende de varios factores, entre ellos, la necesidad primaria, eliminación de solutos, eliminación de agua o ambos; de la indicación subyacente, enfermedad renal aguda o crónica; del acceso vascular, la estabilidad hemodinámica, la disponibilidad, y la preferencia y capacidad del paciente (Hechanova, 2024). Como tratamiento renal sustitutivo tenemos el trasplante por elección para los pacientes con insuficiencia renal. Sin embargo, no todos los pacientes son candidatos para el trasplante, la idoneidad se determina por los riesgos percibidos del trasplante en relación con los riesgos de no recibir el trasplante. Se recomienda el trasplante a todos los pacientes con ERC en estadios G4-G5, donde su TFG sea  $<30 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , el trasplante de riñón mejora la supervivencia, calidad de vida y a menor costo que la diálisis. Dependiendo del paciente y la región, el proceso de evaluación del trasplante puede tardar semanas a meses en completarse (KDIGO, 2020).

#### **4.6.1 Diabetes Mellitus**

En pacientes con diabetes mellitus (DM), el tratamiento intensivo con insulina puede revertir parcialmente la hipertrofia glomerular y la hiperfiltración, retrasar la aparición de albuminuria y disminuir la progresión de la reducción de la TFG. Por ello, se recomienda un adecuado control de la glucosa en sangre para retardar el desarrollo de daño renal. Asimismo, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, el uso de inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT-2) y bloqueadores del receptor de angiotensina ha demostrado reducir el riesgo de progresión de la enfermedad renal. Complementariamente, la restricción de sal en la dieta a menos de  $70 \text{ mEq/día}$  potencia el efecto antiproteínúrico

de los bloqueadores del receptor de angiotensina (CENETEC, 2019).

En pacientes con TFG  $<60$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, se sugiere una ingesta diaria de proteínas de aproximadamente 0.8 g/kg, mientras que no se recomienda una restricción más estricta (0.6 g/kg/día) (CENETEC, 2019).

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y 2 tienen menor probabilidad de figurar en la lista de candidatos a trasplante renal en comparación con personas con ERC terminal debido a enfermedades como glomerulonefritis o poliquistosis renal. No obstante, se recomienda considerar a los pacientes con diabetes tipo 1 o 2 como candidatos a trasplante renal, y en aquellos con ERC terminal y diabetes tipo 1, se debe valorar la posibilidad de un trasplante simultáneo páncreas-riñón cuando sea factible. La tasa de supervivencia renal y general en pacientes con diabetes es inferior, atribuida a una mayor carga de complicaciones vasculares, quirúrgicas e infecciosas; sin embargo, la supervivencia tras el trasplante renal sigue siendo superior a la de la diálisis en la mayoría de los candidatos con ERC secundaria a diabetes (KDIGO, 2020).

#### **4.6.2 Hipertensión**

En pacientes adultos con diabetes e hipertensión, el tratamiento recomendado consiste en una combinación de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y bloqueadores del receptor de angiotensina (ARA-II). La monoterapia con cualquiera de estos fármacos también disminuye la probabilidad de desarrollar ERC (CENETEC, 2019).

#### 4.7 Factores de riesgo

Identificar los factores que predisponen al desarrollo de ERC es fundamental, ya que algunos pueden ser modificados para prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad. Entre estos se encuentran el tabaquismo, la obesidad, la hipertensión y la diabetes mellitus, los cuales facilitan la progresión rápida hacia estadios avanzados de ERC. Otros factores incluyen la exposición a metales pesados, el consumo excesivo de alcohol y el uso prolongado de analgésicos (CENETEC, 2019).

Los factores de riesgo pueden clasificarse en tres categorías: factores de susceptibilidad, de inicio y de progresión resumidos en la tabla 2 (CAM, 2015, CENETEC, 2019).

Tabla 2: Factores de riesgo ERC

De susceptibilidad	De inicio	De progresión
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor de 60 años</li> <li>• Historia familiar de ERC</li> <li>• Origen hispano</li> <li>• Masculino</li> <li>• Síndrome metabólico</li> <li>• Reducción de la masa renal</li> <li>• Estados de hiperfiltración</li> <li>• Disminución del número de nefronas</li> <li>• Tensión arterial (TA) <math>\geq 125/75</math></li> <li>• Obesidad</li> <li>• Ingesta elevada de proteínas</li> <li>• Anemia</li> <li>• Proteinuria</li> <li>• Dislipidemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedades renales primarias</li> <li>• DM</li> <li>• Hipertensión arterial sistémica (HAS)</li> <li>• Autoinmunes</li> <li>• Nefrotoxinas</li> <li>• AINE</li> <li>• Aminoglucósidos</li> <li>• Patologías urológicas</li> <li>• Obstrucción</li> <li>• Litiasis</li> <li>• Infecciones recurrentes</li> <li>• Enfermedades hereditarias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteinuria</li> <li>• Tensión arterial sistémica (TAS) <math>\geq 130</math></li> <li>• Alta ingesta de proteínas</li> <li>• Descontrol de glucemia</li> <li>• Obesidad</li> <li>• Anemia</li> <li>• Dislipidemia</li> <li>• Tabaquismo</li> <li>• Hiperuricemia</li> <li>• Nefrotoxinas</li> <li>• Enfermedad cardíaca</li> </ul>

## **5 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

Existen diversos factores genéticos que influyen en el riesgo de progresión de la ERC. Algunos se relacionan con variantes monogénicas, como ocurre en la poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD). Además, se han identificado asociaciones más complejas entre la ERC y ciertos polimorfismos genéticos, entre los cuales destaca el gen APOL1, que codifica la apolipoproteína L1 y cuya variación puede incrementar la susceptibilidad al daño renal (Lerma E.V., 2017)

### **5.1 Generalidades APOL 1**

#### **5.1.1 Gen APOL1**

El gen APOL1 se localiza en el cromosoma 22q13, abarca una región de 14,461 nucleótidos. Presenta siete exones y seis intrones y codifica un ARNm de 3039 nucleótidos. Considerando el ARNm de longitud completa, 1245 nucleótidos abarcan el segmento codificante (CDS) que codifica 414 aminoácidos, 274 nucleótidos están presentes en el segmento de la región 5' no traducida (5'UTR) y 1520 nucleótidos representan el segmento de la región 3' no traducida (3'UTR). El CDS de APOL1 se compone de segmentos de unión de seis exones, figura 1 (Peng et al., 2017).

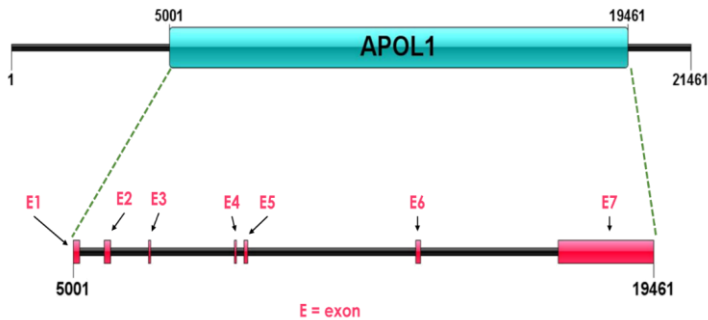


Figura 1: Regiones no codificantes y codificantes del gen APOL1

Cabe destacar que APOL1 se encuentra únicamente en primates del viejo mundo, lo que limita su estudio en modelos animales comunes (Shah et al., 2019).

Las características que distinguen a APOL1 de los otros miembros de la familia de genes APOL son:

- APOL1 está en orientación opuesta a los otros tres, APOL2, APOL3 y APOL4
- Codifica la única proteína secretora en los genes APOL (Peng et al., 2017).
- APOL1 es el único miembro que contiene un péptido señal que permite su secreción en la sangre para proporcionar inmunidad frente a *T. brucei* (Cheatham et al., 2018).

Varias líneas de evidencia indican que los genes APOL están asociadas con la hiperlipidemia, la obesidad y la aterosclerosis (Hu et al., 2012).

APOL1 circula en el suero en moléculas de HDL y se expresa de forma casi ubicua, en el páncreas, próstata, bazo,

hígado, riñón placenta y pulmones, ver tabla 3. Se expresa con niveles especialmente elevados (Shah et al., 2019).

Tabla 3: Expresión tisular del gen APOL1 en humanos mediante RNA-seq y SAGE.

Tejidos humanos	Secuencia ARN/SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)
Medula ósea	SAGE
Sangre total	Secuencia de RNA
Leucocitos	Secuencia de RNA
Ganglio linfático	Secuencia de RNA
Cerebro	Secuencia ARN/SAGE
Corteza cerebral	Secuencia ARN/SAGE
Cerebelo	Secuencia ARN/SAGE
Retina	SAGE
Médula espinal	Secuencia ARN/SAGE
Nervio tibial	Secuencia ARN
Corazón	Secuencia ARN/SAGE
Arteria	Secuencia ARN
Musculo esquelético	Secuencia ARN/SAGE
Intestino delgado	Secuencia ARN
Colon	Secuencia ARN/SAGE
Adipocito	Secuencia ARN
Riñón	Secuencia ARN/SAGE
Hígado	Secuencia ARN/SAGE

Pulmón	Secuencia ARN/SAGE
Bazo	Secuencia ARN
Estómago	Secuencia ARN
Esófago	Secuencia ARN
Vejiga	Secuencia ARN
Páncreas	Secuencia ARN/SAGE
Tiroides	Secuencia ARN/SAGE
Glándula salival	Secuencia ARN
Glándula suprarrenal	Secuencia ARN
Hipófisis	Secuencia ARN

Pecho	Secuencia ARN/SAGE
Piel	Secuencia ARN/SAGE
Ovario	Secuencia ARN
Útero	Secuencia ARN
Placenta	SAGE
Próstata	Secuencia ARN/SAGE
Testículo	Secuencia ARN

### 5.1.2 *APOL1 y la inmunidad innata*

APOL1 cumple un papel crítico en la inmunidad innata, actuando como defensa frente a parásitos del género

Trypanosoma. Esta actividad se debe a su capacidad tripanolítica, mediada por la formación de poros en la membrana celular del parásito. Al interactuar con la membrana, APOL1 provoca hinchazón osmótica y lisis del parásito, mediante un mecanismo que involucra procesos similares a la apoptosis tras la transferencia intracelular desde vesículas endosómicas hacia la mitocondria de este (Friedman, D. J., 2020, Hung et al., 2023, Uzureau et al., 2020). La proteína requiere un pH ácido para insertarse en membranas y mantiene actividad de canal catiónico incluso a pH neutro, lo que le permite funcionar tanto en vesículas intracelulares como en el plasma sanguíneo.

### **5.1.3      *ARNm APOLI***

El ARNm de APOL1 está compuesto por siete exones y se expresa en la mayoría de los órganos humanos. Tras la escisión del péptido señal localizado en el exón 4, la proteína madura se secreta y se incorpora a partículas de HDL circulantes, facilitando su función defensiva en el plasma. Por el contrario, se prevé que la isoforma C, que carece de péptido señal, permanezca retenida dentro de la célula. Hasta la fecha, se desconoce con precisión el patrón de expresión de las distintas variantes de empalme de APOL1 en órganos y tipos celulares específicos (Wakashin et al., 2020). Esta organización génica y la localización de los dominios explican cómo APOL1 puede ejercer su actividad tripanolítica y catiónica de manera regulada, dependiendo de la secreción, el pH y la interacción con lipoproteínas, conectando su función inmunitaria con su estructura genética y postraduccional.

### **5.1.4      *Isoformas de APOLI***

El gen APOL1 al estar compuesto por siete exones puede generar múltiples transcritos mediante splicing alternativo,

principalmente a través de la inclusión selectiva de los exones 2 y 4, lo que da lugar a distintas isoformas proteicas. En particular, el exón 4 codifica una porción de la secuencia N-terminal que actúa como péptido señal, esencial para la correcta localización intracelular y la secreción de APOL1 (Cheatham et al., 2018).

Se han identificado varias variantes de empalme del ARNm de APOL1, que se predice codifican distintas isoformas, aunque aún no se ha aclarado cuáles se expresan específicamente en el riñón ni cuáles contribuyen a la enfermedad renal. Hasta ahora se han descrito seis variantes: V1 (Isoforma A), V3 (Isoforma A), V2-1 (Isoforma B1) y V4 (Isoforma C), así como dos variantes recientemente identificadas dentro del exón 2, denominadas V2-2 y V2-3; esta última carece del péptido señal (Wakashin et al., 2020).

La variante A (vA) que incluye el exón 4 constituye el transcrito principal en células glomerulares y tubulares del riñón estimuladas con IFN $\gamma$ , mientras que los transcritos que carecen del exón 4, como la variante C, representan solo una fracción menor de los ARNm de APOL1 expresados en el riñón (Cheatham et al., 2018).

#### **5.1.5 Proteína APOLI**

La proteína APOL1 es de 43 kDa perteneciente a la familia de las lipocalinas, esta presenta 4 variantes que codifican 3 isoformas diferentes; las variantes 1 y 3 codifican la isoforma a, mientras que las variantes 2 y 4 codifican las isoformas b y c respectivamente (Peng et al., 2017). Posee un péptido señal (SP), un dominio formador de poros (PFD), un dominio de direccionamiento de membrana (MAD) y un dominio de interacción con SRA, los cuales se corresponden con regiones

específicas del ARNm. En particular, el exón 7 constituye aproximadamente el 78% de toda la secuencia del ARNm y codifica tres de los dominios funcionales: parte del PFD, el MAD completo y el dominio de interacción con SRA (Peng et al., 2017).

Los cuatro dominios funcionales se destacan por las siguientes características (figura 2):

- Dominio N-terminal señal del péptido (aa 1–27): este dominio dirige la proteína hacia el exterior de la célula, facilitando su secreción extracelular y su incorporación en complejos circulantes como las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Lan, X., 2015).

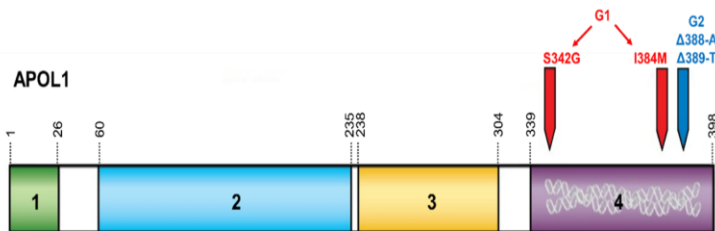
- Dominio formador de poros (aa 60–237): conforma un bucle hidrofóbico rodeado por un haz de alfa hélices anfipáticas, permitiendo la formación de poros aniónicos en membranas, principalmente para iones de cloro. Esta actividad iónica induce despolarización de membranas, mediando la acción tripanolítica frente a los parásitos (Pays, E., 2014).

- Dominio de direccionamiento de membrana (aa 283–303): estructuralmente, consta de dos alfa hélices que forman un bucle sensible al pH. A pH neutro (plasma), el dominio expone superficies hidrofóbicas que favorecen la asociación con HDL circulante; a pH ácido (vesículas endocíticas), cambia de conformación, permitiendo la liberación de APOL1 del complejo HDL y su inserción en la membrana del organelo objetivo. Este mecanismo es crucial para que APOL1 alcance la membrana lisosomal del parásito (Pays, E., 2014).

- Dominio de interacción con SRA (aa 339–398): Localizado en el extremo carboxilo de la proteína, forma una

héllice alfa larga con un cierre de leucina. Este dominio interactúa con la proteína SRA (Serum Resistance Associated) producida por algunos tripanosomas. La unión de SRA a APOL1, en condiciones de pH ácido, bloquea la inserción de la proteína en la membrana lisosomal, inhibiendo su acción tripanolítica y permitiendo la supervivencia del parásito (Uzureau, S.,2016).

En conjunto, la estructura de APOL1 y sus dominios especializados explican cómo esta proteína puede desempeñar funciones defensivas circulantes y al mismo tiempo tener actividad citotóxica específica sobre parásitos, lo que resalta su importancia como componente del sistema inmunitario innato.



Región	Posición	Función
1	M1-R26	Péptido señal
2	M60-W235	Dominio formador de poros
3	A238-P304	Dominio de direccionamiento de membrana
4	A339-L398	Dominio de enlace a SRA

Figura 2: Dominios funcionales de APOL1

APOL1 y APOL3 son proteínas promotoras de la muerte celular que están asociadas al retículo endoplásmico y a la membrana de Golgi, figura 3 (Uzureau et al., 2020). Los demás miembros de la familia APOL, que no contienen un péptido señal

se localizan principalmente en el retículo endoplásmico y el citoplasma (Cheatham et al., 2018).

A su vez, también participa de manera destacada en las vías autofágicas, y se ha demostrado que la autofagia bien conservada es crucial para mantener la integridad de los podocitos glomerulares (Tzur et al., 2010).

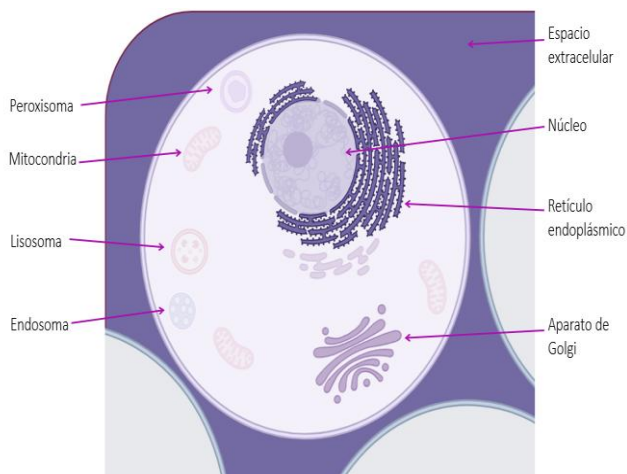


Figura 3: Regiones reportadas de la presencia de la proteína APOL1 (GeneCard, 2025)

### 5.2 Variantes de riesgo asociadas a APOL 1

Existen dos variantes genéticas de APOL1 asociadas con nefropatías que surgieron en humanos en África Subsahariana hace miles de años. Debido a que estas variantes aparecieron después de la expansión de la población fuera de África, las

variantes de riesgo asociadas a la ERC solo se han observado en individuos con ascendencia africana (Friedman & Pollak, 2020).

Estas variantes se han relacionado de manera significativa con el riesgo de desarrollar glomeruloesclerosis segmentaria focal (GESF), nefropatías asociadas al virus de la inmunodeficiencia humana (NAVIH) y enfermedad renal secundaria a hipertensión (arterioesclerosis) (Wakashin et al., 2020). La expresión de APOL1 se ha detectado en células epiteliales tubulares proximales, podocitos y estructuras vasculares preglomerulares, lo que sugiere que podría desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades renales al afectar la estructura y función de estas células (Wakashin et al., 2020, Hu et al., 2012).

Las variaciones en el dominio C-terminal podrían modificar la interacción de APOL1 con alguna proteína intracelular renal aún no identificada, cuya función sería regular la disponibilidad de APOL1 para la formación de poros y otras actividades celulares (Tzur et al., 2010).

Dado que una secuencia codificada en el exón 4 forma parte del péptido señal de APOL1, la delección de este exón podría afectar su secreción, alterando la localización intracelular y la función de la proteína. Por lo tanto, aunque las mutaciones de riesgo G1 y G2 se localizan en el exón 7 terminal, la pérdida del exón 4 podría influir en la actividad biológica de estas variantes (Cheatham et al., 2018).

### **5.2.1 Variante G1**

En datos recopilados del NCBI (NM\_003661.3) se puede observar el par de polimorfismos de la variante G1 a nivel ADN, la cual se manifiesta por una sustitución de un nucleótido a otro,

presentándose de dos posibles formas, siendo una sustitución en el nucleótido (figura 4) 1024 modificando una adenina (A) por guanina (G) (1024A>G).

La segunda forma posible de manifestarse G1 es igualmente por una sustitución (figura 4), pero esta ocurre en el nucleótido 1152 modificando la timina (T) que se encuentra en esa posición por una guanina (G) (1152T>G).

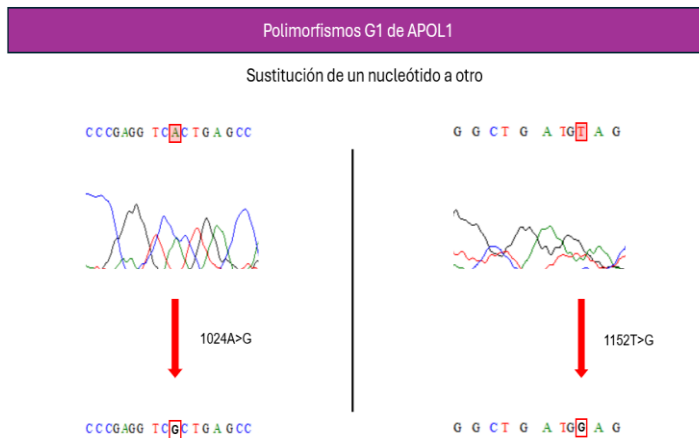


Figura 4: Polimorfismo G1 en secuencia de ADN

A nivel proteico la variante G1 es un haplotipo bialélico formado por dos cambios codificantes no sinónimos las cuales podemos observar en la figura 5, siendo ([S342G] e [I384M]) en completo desequilibrio de ligamiento (Shah et al., 2019).

Polimorfismos G1 de APOL1

Transición de un aminoácido de la secuencia

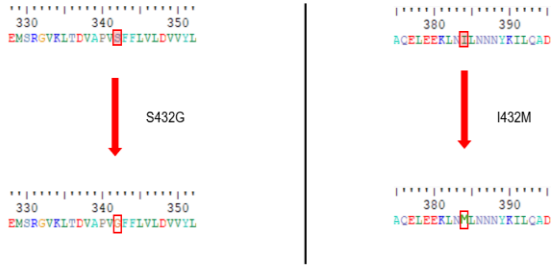


Figura 5: Modificación de aminoácidos en secuencia de la proteína APOL1 para G1

Se consideran mutaciones de tipo cambio de sentido (missense), caracterizadas por la sustitución de un nucleótido que provoca la incorporación de un aminoácido diferente en la proteína, lo que puede alterar su estructura, función o estabilidad (Stefl et al., 2013).

Tabla 4: Variantes genéticas G1 en la proteína APOL1 (Partridge et al., 2004, Tromp et al., 1989)

Mutación	Polaridad	Efecto potencial
<b>S342G</b>	S (Serina): Polar G (Glicina): No polar	Perdida de enlaces H
<b>I384M</b>	I (Isoleucina): No polar M (Metionina): No polar	Menos disruptivo en polaridad

### 5.2.2 Variante G2

G2 es una eliminación de 6 pares de bases (rs7178513) y es mutuamente excluyente con G1 (Kramer et al., 2016).

Observando los datos proporcionados por NCBI (NM\_003661.4) en la figura 6 se observa que a nivel ADN esta eliminación ocurre desde el nucleótido 1164 al nucleótido 1169 (1164\_1169del).

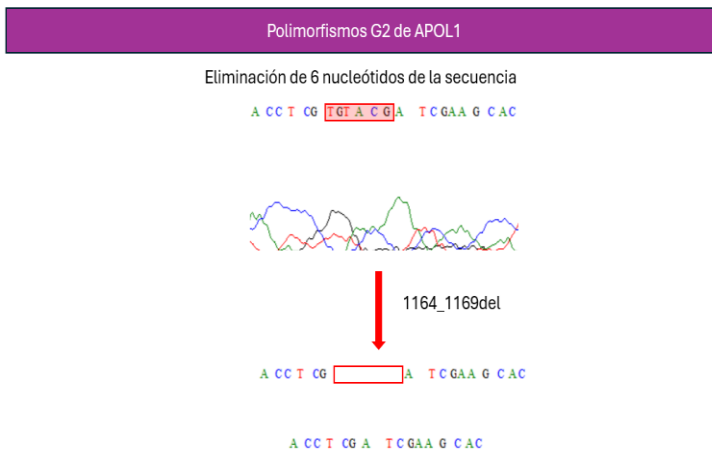


Figura 6: Modificaciones para el polimorfismo G2 en la secuencia de nucleótidos de ADN

En la proteína la variante G2 se observa en la eliminación de dos aminoácidos, N388 y Y389, dentro del mismo dominio funcional que G1 (figura 7).

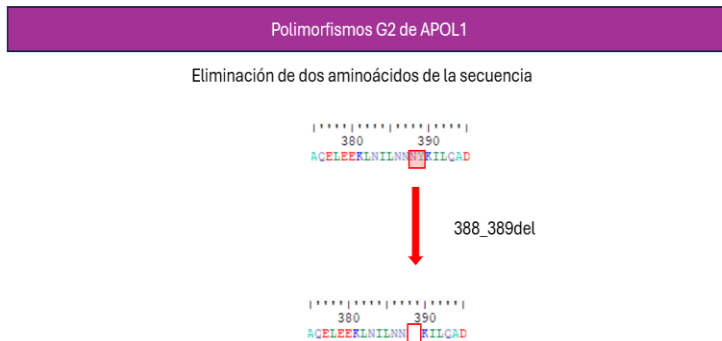


Figura 7: Modificación en la secuencia de aminoácidos en presencia del polimorfismo G2

Tanto G1 como G2 son mutaciones exónicas, que alteran la secuencia de la proteína codificada por APOL1 (Shah et al., 2019).

Se ha identificado un alelo sin riesgo denominado G0, que presenta secuencias con propiedades funcionales normales. Cada persona hereda una copia del gen APOL1 de cada progenitor, por lo que puede poseer cero, una o dos copias de alelos de riesgo asociados a ERC (Friedman & Pollak, 2020).

### 5.3 Presencia de G1/G2 en Afrodescendientes

Las variantes de alto riesgo G1 y G2 son comunes en individuos de ascendencia africana occidental, ya que confieren resistencia frente a infecciones letales por *Trypanosoma brucei rhodesiense*, un patógeno endémico en esa región y presente en otras zonas de África (Hung et al., 2023). Sin embargo, estas variantes producen disfunción de la proteína, afectando procesos moleculares como la función mitocondrial, la activación del inflamosoma, el estrés del retículo endoplásmico, la autofagia y el transporte iónico a través de la membrana (Grampp et al., 2023).

#### **5.4 Polimorfismos G1/G2 y la ERC**

A pesar de su función antitripanolítica, la presencia de dos copias de las variantes de APOL1 G1/G1, G2/G2 o G1/G2 aumenta significativamente el riesgo de desarrollar ERC (Waitzman & Lin, 2019).

Las variantes naturales G1 y G2 contienen mutaciones en la cremallera de leucina (LZ) C-terminal, que alteran su estructura y la unión con la proteína SRA, permitiendo que APOL1 escape de la neutralización mediada por SRA (Uzureau et al., 2020).

El hígado constituye la principal fuente de APOL1 circulante; por lo tanto, en pacientes con variantes de riesgo, el APOL1 mutante circulante se origina en este órgano. Sin embargo, datos de la cohorte CRIC indican que los niveles plasmáticos de las variantes G1/G2 no se asociaron con ERC, lo que sugiere que la enfermedad renal relacionada con APOL1 no depende del APOL1 circulante, sino de mutaciones genéticas intrínsecas al riñón o de interacciones gen-gen y gen-ambiente que modifican el riesgo (Shah et al., 2019).

#### **5.5 Expresión de G1/G2 en células renales**

La expresión de las variantes de APOL1 en células renales es tóxica. Estudios in vitro han implicado múltiples mecanismos en la muerte celular mediada por APOL1, incluyendo el influjo de cationes a través de la función formadora de poros, la disfunción mitocondrial y los efectos sobre la proteína relacionada APOL3. La incertidumbre sobre los mecanismos exactos ha limitado el desarrollo de terapias dirigidas a la ERC mediada por APOL1, figura 8 (Hung et al., 2023).

En modelos experimentales con ratones, la expresión de las proteínas que portan las variantes G1 o G2 en podocitos

provoca lesiones renales y glomeruloesclerosis, conduciendo a fallo renal (Olabisi, 2024).

En podocitos, la truncación de la hélice C-terminal de APOL1 (APOL1 $\Delta$ ) o la eliminación de APOL3 (APOL3KO) induce reorganización de la actomiosina, relacionada con la inhibición de la síntesis de fosfatidilinositol-4-fosfato [PI(4)P] por la PI(4)-cinasa IIIB del Golgi (PI4KB). La alteración de la hélice C-terminal de APOL1 incrementa su unión a APOL3 y afecta la interacción APOL3-NCS-1. Dado que los podocitos de pacientes con variantes G1 y G2 presentan un fenotipo similar a APOL1 $\Delta$  o APOL3KO, se sugiere que estas variantes pueden inducir enfermedad renal al impedir que APOL3 active PI4KB, lo que conduce a la reorganización de la actomiosina de los podocitos. Tanto las alteraciones de la hélice C-terminal de APOL1 como la delección de APOL3 reducen la síntesis de PI(4)P en el Golgi, acompañadas de reorganización de actomiosina, aumento de la motilidad celular y fisión de orgánulos, procesos que podrían contribuir a la disfunción podocitaria (Uzureau et al., 2020).

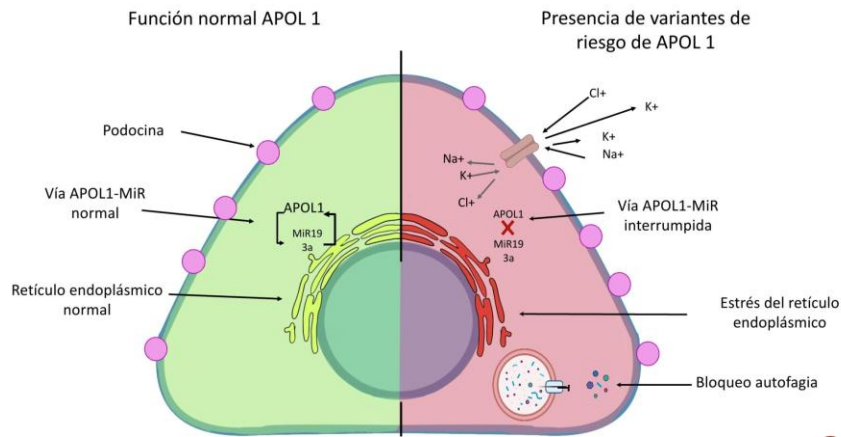


Figura 8: Diagrama podocito con y sin las variantes de riesgo de APOL1

Estudios en ratones sugieren además un posible papel del ARN del alelo de riesgo de APOL1, más que de la proteína, en la inducción de lesiones en podocitos (Zhong et al., 2019). APOL1 se encuentra ampliamente en las mitocondrias, y sus efectos adversos podrían extenderse más allá de cambios en la permeabilidad de la membrana interna. La disfunción mitocondrial también se ha asociado con enfermedades renales no mediadas por APOL1 (Ma et al., 2020).

Desde otro estudio con ratones como modelo experimental se ha demostrado que las variantes de riesgo de APOL1 puede inducir necrosis hepática grave. Sin embargo, en humanos, las variantes procedentes de donantes de hígado no se han asociado con resultados desfavorables del injerto. Esto sugiere que es la expresión renal específica de APOL1, y no la proteína circulante,

la que resulta patogénica en la ERC asociada a las variantes de riesgo (Shah et al., 2019).

Se propone que la expresión intrarenal de APOL1, más que la fracción circulante, está estrechamente vinculada con la ERC. Dado que las mayorías de las nefropatías por APOL1 son enfermedades podocitarias, la expresión de las variantes de riesgo de APOL1 en podocitos y posiblemente en células vasculares renales contribuyen al desarrollo de la ERC (Wakashin et al., 2020).

#### **5.6 Polimorfismos G1/G2 y posible el desarrollo de ERC**

A pesar de la presencia de uno o ambos alelos de riesgo de APOL1, solo una minoría de los portadores desarrolla nefropatía asociada a APOL1. Esto ha dado lugar a la hipótesis de un modelo de dos factores, que requiere la presencia de las variantes de riesgo junto con la contribución de factores ambientales o sistémicos, como por ejemplo infecciones virales, que pueden iniciar y promover la nefropatía (Grampp et al., 2023). La mayoría de los individuos portadores de las dos variantes de riesgo no desarrollan enfermedad renal, lo que sugiere que es necesario un factor modificador. Entre los modificadores identificados se incluyen alteraciones inducidas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la respuesta inmunitaria y la administración de interferones. En estos casos, los niveles de expresión de APOL1 aumentan a través de vías dependientes de receptores tipo Toll 3. (TLR3) (Ma et al., 2020).

#### **5.7 APOL1-B3 mecanismos de inflamación**

La inflamación crónica contribuye a la progresión de enfermedades glomerulares. En el estudio NEPTUNE, realizado en pacientes con estas patologías, se observó que las variantes

de APOL1 aumentan la expresión glomerular de CXCL9 y CXCL11, quimiocinas inducidas por citocinas proinflamatorias como TNF. En este contexto, se examinó el papel de APOL1 en la regulación de la señalización proinflamatoria en células glomerulares, identificándose una nueva isoforma de proteína intracelular, APOL1-B3, la cual se asocia con NLRP12. Además, se encontró que APOL1-B3-G2 potencia el daño podocitario en nefropatías inducidas en modelo murino, identificando una nueva variante de ARNm, APOL1-V2-3, la cual carece de secuencia señal, sugiriendo que APOL1-B3 es una proteína citoplasmática y no es secretada como es el caso de la isoforma A (Wakashin et al., 2020).

#### **5.8 APOL1 trasplante renal**

El riesgo de nefropatía asociada a APOL1 persiste en aloinjertos renales de donadores portadores de variantes de riesgo, lo que indica que los efectos patogénicos se generan dentro de las células renales. Por lo tanto, cualquier factor que modifique la expresión de APOL1 en el riñón puede alterar el riesgo de desarrollar enfermedad (Grampp et al., 2023).

Se ha demostrado que los riñones de donantes de raza negra presentan tasas significativamente más bajas de supervivencia del injerto. Sin embargo, este efecto no se debe a la ascendencia africana en sí misma, sino a la presencia de las variantes de riesgo. Los donantes de raza negra que no portan los alelos de riesgo muestran tasas de supervivencia a largo plazo comparables a las de donantes no negros (Shah et al., 2019).

Asimismo, se ha planteado que existen “segundos golpes” (second hits) que modifican el riesgo en riñones con variantes de APOL1. En trasplantes, estos factores incluyen obesidad,

tabaquismo, proteinuria, hipertensión, viremia BK, viremia por CMV, así como la edad del donante y del receptor, los cuales pueden actuar como modificadores del riesgo de pérdida del injerto (Shah et al., 2019).

### **5.9 APOL1 en la autofagia, cáncer**

Se ha demostrado que APOL1 es una nueva proteína BH3-Only, un subgrupo específico de la familia Bcl-2 que comparte el dominio estructural BH3 pero carece de los demás dominios de homología. Estas proteínas son iniciadoras clave de la apoptosis (Glab et al., 2016).

Cuando APOL1 se sobreexpresa intracelularmente, induce autofagia y muerte celular asociada a este proceso en distintos tipos celulares. La disfunción de la autofagia se ha vinculado con el desarrollo de diversas enfermedades, como cáncer, cardiomiopatías, enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad, enfermedades neurodegenerativas y ERC. Alteraciones en proteínas que deterioran los procesos de apoptosis y autofagia han sido relacionadas con la patogénesis de diferentes tipos de cáncer (Hu et al., 2012).

### **5.10 APOL1 en población latina**

En Estados Unidos, la población latina o hispana representa el 15.1% de los adultos mayores de 20 años, un grupo con alto riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, incluida la ERC. Aunque pocos estudios han explorado esta asociación, se han reportado vínculos significativos entre las variantes de riesgo de APOL1 y la ERC no diabética en adultos hispanos en diálisis o registrados en biobancos clínicos (Kramer et al., 2016).

Se ha demostrado que las variantes genéticas de APOL1 se asocian con el riesgo de ERC en adultos hispanos/latinos en

Estados Unidos. La frecuencia de estas variantes varía según el origen: es hasta 14 veces mayor en latinos de origen caribeño (Puerto Rico, República Dominicana o Cuba) en comparación con aquellos de origen continental (México, Centroamérica o Sudamérica) (Kramer et al., 2016).

## **6 JUSTIFICACIÓN**

La ERC representa actualmente un problema de salud pública en México. La incidencia anual estimada es de aproximadamente 45 mil casos nuevos, lo que corresponde a 346 por millón de habitantes (Sosa, J. A., 2023). De igual manera, se ha documentado un incremento notable en la mortalidad relacionada con esta enfermedad, pasando de 5,621 defunciones en el año 2000 a 11,833 en 2020 (Investigación en Ciencias de Información Geoespacial AC, C, 2024). Estas cifras reflejan la creciente carga de la ERC en la población mexicana. En el ámbito económico, la ERC constituye un reto considerable para los sistemas de salud. En 2014, su tratamiento representó aproximadamente el 15% del gasto total anual del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), equivalente a 13,250 millones de pesos, a pesar de destinarse únicamente al 0.8% de los derechohabientes (Cortés-Sanabria, L., 2017).

Además de su impacto sanitario y económico, la ERC afecta de forma significativa la calidad de vida de los pacientes. Actualmente, el diagnóstico se basa en exámenes de orina y sangre, así como en estudios histológicos y radiológicos (Orozco, B. R., 2010). No obstante, aunque se ha demostrado que factores genéticos como las variantes de riesgo G1 y G2 del gen APOL1 contribuyen al desarrollo de la enfermedad, se desconoce la prevalencia de estas variantes en la población mexicana. Este vacío de conocimiento limita la identificación temprana de individuos en riesgo y, en consecuencia, la implementación de estrategias preventivas personalizadas. Ante este panorama, la presente investigación tiene como objetivo desarrollar y estandarizar una prueba molecular para amplificar el transcrito de APOL1 e identificar las variantes genéticas G1 y G2 en cultivos

de células humanas. Este avance permitirá comprender mejor la base genética de la ERC en México y sentar las bases para futuras aplicaciones clínicas orientadas al diagnóstico temprano y la medicina personalizada.

## **7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La ERC constituye una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, y México no es la excepción. En un gran número de casos, no se logra identificar el origen específico de la patología, lo que dificulta su prevención y tratamiento. En poblaciones de ascendencia afroamericana se ha descrito un factor genético determinante: las variantes de riesgo G1 y G2 del gen APOL1, las cuales incrementan significativamente la susceptibilidad a desarrollar ERC. Considerando el linaje multicultural de la población mexicana, es probable que estas variantes también estén presentes en el país; sin embargo, su prevalencia y posible contribución a la enfermedad aún no han sido estudiadas. En México, no se dispone de pruebas moleculares específicas para identificar polimorfismos genéticos asociados a la ERC, ni se cuenta con información sobre la frecuencia de las variantes G1 y G2 de APOL1 en la población. Esta carencia limita la implementación de estrategias de prevención, diagnóstico temprano y tratamientos dirigidos, lo que representa un vacío crítico en el abordaje de la ERC a nivel nacional.

Ante esta situación, la presente investigación propone desarrollar y estandarizar una prueba molecular para amplificar el transcrito del gen APOL1 e identificar las variantes G1 y G2 en cultivos de células humanas. Este enfoque permitirá sentar las bases para determinar la contribución genética de APOL1 al desarrollo de la ERC en México y abrir nuevas perspectivas hacia un manejo más preciso y personalizado de la enfermedad.

## **8 OBJETIVO GENERAL**

Diseñar y estandarizar una prueba molecular para la detección de las variantes de riesgo del gen APOL1 asociadas a la ERC, utilizando líneas celulares y sangre de origen humano.

## **9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Amplificar el ARNm maduro del gen APOL1 y la región del exón E7
- Analizar los cambios de nucleótidos de los amplificadores
- Analizar los cambios a nivel aminoácidos de la proteína APOL1

## 10 METODOLOGÍA

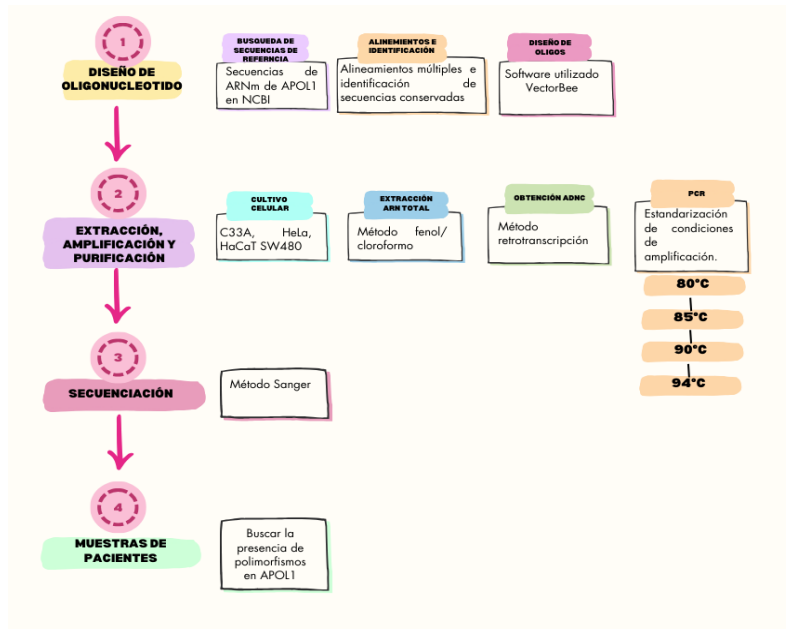


Figura 9: presentación grafica de metodología

## 11 MATERIAL Y MÉTODOS

### 11.1 *Cultivo celular*

Dado que el acceso a muestras humanas implica consideraciones éticas, regulatorias y logísticas, se optó por utilizar líneas celulares de origen humano como modelo experimental para la estandarización del protocolo de detección de variantes del gen APOL1. Estas líneas celulares ofrecen varias ventajas: permiten disponer de un material genético humano reproducible, controlado y libre de variaciones asociadas a factores clínicos; además, facilitan la obtención de ADN de alta calidad en cantidades suficientes para pruebas repetitivas de optimización. El empleo de este sistema experimental constituye un paso intermedio seguro y confiable antes de la aplicación del protocolo en muestras biológicas provenientes de pacientes. Se seleccionaron las líneas celulares C33A, HeLa, HaCaT y SW480 debido a que representan modelos de diferentes tejidos de origen humano (cérnix, epitelio cervical, queratinocitos y colon, respectivamente), lo que permite evaluar la expresión y amplificación del gen APOL1 en distintos contextos celulares. Estas líneas están bien caracterizadas, son ampliamente utilizadas en investigación biomédica y garantizan la disponibilidad constante de material genético humano. El uso de varias líneas celulares, además, permite descartar sesgos asociados a un único tipo celular y proporciona mayor robustez a la estandarización del protocolo molecular.

Las células C33-A son células epiteliales de cérnix de una paciente caucásica de 66 años con cáncer cervicouterino negativas a la presencia del virus de papiloma humano. Se caracteriza por una alteración genética en el gen TP53, debido a una mutación puntual en el codón 273 se genera una sustitución

de arginina por cisteína, esto da como resultado una expresión elevada de la proteína p53. Esta variante desempeña un papel crítico en la fisiopatología de las células, esta influye en su crecimiento y en su potencial tumorigénico (Cytion, 2025). Las células HeLa son células del cérvix uterino de una paciente afroamericana de 30 años con cáncer de cuello uterino, presenta un complejo cariotipo donde se encuentra un alto grado de aneuploidía y reordenamientos estructurales, presentan 82 cromosomas, pero puede variar de 70 a 164, el 98% de las células poseen un pequeño cromosoma telocéntrico (*Células HELA*, 2025). Las células HaCaT son queratinocitos de un hombre caucásico de 62 años, estas células son de la piel, son hipodiploides (*Línea Celular HaCaT*. 2025). Las células SW-480 son células del intestino largo y colon, obtenidas de un cociente con cáncer colorrectal, estas células se obtuvieron de un hombre caucásico de 50 años (*Células SW-480*, 2025). Estas células expresan niveles altos de la proteína p53, sus receptores expresados son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), queratina. matrilisina, una metaloproteínasa asociada a la invasibilidad tumoral, esta no se expresa (*Células SW-480*, 2025).

Las líneas celulares C33-A (cat. HTB-31), HeLa (cat. CRM-CCL-2), HaCaT (Cat. CRL-2404) y SW-480 (Cat. CCL-228), se mantuvieron en condiciones controladas; cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) adicionado con suero fetal bovino al 10%, a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (figura 10).

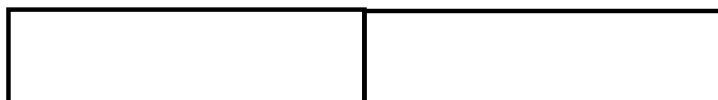
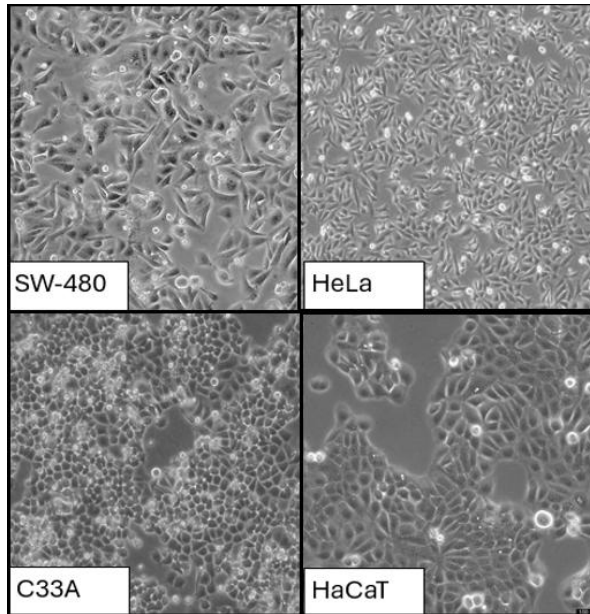


Figura 10. Líneas celulares SW-480, HeLa, C33A y HaCaT



### 11.2 Extracción ARN total en células

Para la extracción de ARN total se utilizó el reactivo TRizol™ (NO, Cat, 15596018, Invitrogen, Carlsbad, CA), se adicionó directamente a una caja T25 de cultivo celular al 100% de confluencia, se procedió a homogenizar la monocapa celular y se recolectó en un tubo de 2 ml. Posteriormente se siguieron las indicaciones del fabricante hasta resuspender nuestro ARN total en agua libre de nucleasas.

A nuestros productos obtenidos, se midió la concentración y la pureza del producto en un nanofotómetro N60 IMPLIN GMBH y se visualizó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 1% con amortiguador Tris acetato EDTA (TAE) al 0.5X a un voltaje de 100 voltios por 60 minutos.

El Tris-Acetato EDTA (TAE) es un buffer que se utiliza en la electroforesis, tiene mayor capacidad de resolución para tamaños grandes de ADN (Cornejo Amelia, 2014). Es un tampón estándar compuesto de Tris (2-amino-2-[hidroximetil]-1,3-propanodiol), ácido acético y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), este presenta iones que transportan la corriente eléctrica, amortiguan el pH y mantienen un medio de baja conductividad (Sanderson et al., 2014).

### 11.3 Obtención de ADNc por Retrotranscripción

Para la obtención de ADNc a partir de ARN se realizó una retrotranscripción utilizando el kit comercial de síntesis ADNc RevertAid H Minus (Thermo Scientific™) con número de catálogo K1622, utilizando los hexámeros aleatorios y agua libre de RNAsas. Se adicionaron los reactivos de acuerdo con la tabla 5.

Tabla 5: Mezcla de reacción para RT

Componentes	Volumen
<b>ARN Total</b>	1 ng - 5 µg ARN total
	10 pg - 0.5 µg ARNm
	0.01 pg – 0.5 µg ARN específico
<b>Hexámeros aleatorios</b>	1µl
<b>µM</b>	
<b>Agua libre de nucleasas</b>	Aforar a 12 µl
<b>Volumen total</b>	12 µL

La reacción fue sometida a un proceso de incubación a 65 °C por 5 minutos, esto permite disociar las estructuras secundarias presentes en el ARN total, posterior a ello se añadieron los siguientes componentes (tabla 6).

Tabla 6: Segunda mezcla de reacción para RT

Componentes	Volumen
5x Buffer de reacción	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20/ U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200/ U/µl)	1 µL
<b>Volumen total</b>	<b>20 µl</b>

Dentro del termociclador se utilizaron las siguientes condiciones observadas en la tabla 5 para la amplificación de ADNc a partir de ARN total.

Tabla 7: Condiciones de amplificación de RT

Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
25	5 min	1
42	60 min	1
70	5 min	1

#### 11.4 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Utilizando el ADNc generado anteriormente, se utilizaron oligonucleótidos específicos de APOL 1 que amplifican la región de interés, los cuales se representan en la tabla 8 y de acuerdo con las condiciones de la tabla 9.

Tabla 8: Oligos de APOL1

Oligo	Temperatura °C	Tamaño del amplicón	Secuencia
Apol T	60	1196 pb	Fw_ApoL1-T TGAGAGTCTCTGTCCTCTGC
			Rw_ApoL1-T TTGGTCCGCCTGCAGAATCTT AT
Apol 1-4	60	203 pb	Fw_Apol1-4 GCAGAGGAGTCAAGCTCACG G
			Rw_Apol1-4 TTCTTGGTCCGCCTGCAGAAT C

Tabla 9: Condiciones de PCR para la amplificación de APOL Total y región 4 de APOL 1

Temperatura °C	Tiempo	# Ciclos
94	2 min	1
94	30 seg	
45 - 60	30 seg	40
72	1 min	
72	5 min	1

Se esperaron 2 amplicones que cumplieran con los tamaños de 1196 pb y 203pb; el cual se corroboró por medio de un corrimiento en gel de agarosa de electroforesis en las condiciones anteriormente mencionadas.

#### **11.5 Purificación de ADN**

Para el proceso de extracción y purificación de ADN en gel se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Se siguieron las instrucciones del proveedor y el producto se corrió en un gel de electroforesis de agarosa al 0.8%, a un voltaje de 100V por 60 minutos. Se cortaron las bandas en el gel que correspondían a 203 pb. Estas muestras se midió su concentración y se volvieron a correr en un gel de agarosa para corroborar que no existen productos inespecíficos que obstruyan la secuenciación.

#### **11.6 Clonación de amplicón de APOL1**

Para la clonación se usó el kit Thermo Scientific™ CloneJET PCR Cloning Kit, siguiendo las instrucciones del proveedor se colocaron las condiciones utilizadas en la tabla 10. Es importante recalcar que la clonación se realiza con extremos romos, por lo cual el tratamiento inicial es con una enzima rasuradora para generar dichos extremos.

MUESTRA	CANTIDAD EN $\mu$ l
2X BUFFER DE REACCIÓN	10
PRODUCTO DE PCR APOL1	2
AGUA LIBRE DE NUCLEASAS	5
ENZIMA ADN BLUNTING	1
Se incubó a 70°C y se añadió lo siguiente:	
pJET 1.2 blunt	1
ADN LIGASA T4	1
Se incuba la reacción a temperatura ambiente 5 minutos, inmediatamente se procede a la transformación de células competentes.	

Tabla 10.- Mezcla de reacción para la clonación con pJET 1.2 blunt para APOL1.

### 11.1 Generación de células competentes

A partir de un cultivo permanente de *E. coli* cepa TOP10 se inocularon 10 ml de medio Luria-Bertoni (LB) durante 3 horas y con centrifugación de 250 rpm. Posteriormente la biomasa se empaquetó en un tubo de polipropileno de 2 ml, se lavó la pastilla que se obtuvo con 350  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, se incubó en hielo por 15 minutos y se volvió a centrifugar a 4,000 rpm a 4°C por 10 minutos, posterior a la centrifugación se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M para su transformación.

### 11.2 Transformación de células bacterianas

Se resuspendieron las células competentes, tomando una alícuota de 100  $\mu$ l y adicionando 1  $\mu$ l del plásmido, se incubó

durante 15 minutos en hielo y se dio un choque térmico a 42°C e inmediatamente se incubó en hielo por 3 minutos y se agregó a 1 ml de LB sin antibiótico incubándose a 37°C durante 1 hora. Finalizando la incubación se centrifugaron los tubos a 4,500 rpm a 4 °C por 5 minutos, eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla con 100 µl de LB sin antibiótico. El resuspendido se siembra de forma masiva en placas de LB con ampicilina a una concentración de 100µg/µl. Se dejaron incubar a 37°C por 18 horas.

### **11.3 *Análisis de clonas***

Del crecimiento de las colonias en las placas de LB con antibiótico se seleccionaron 3-5 clonas de cada placa. Cada una de ellas se sembró en 10 ml de medio LB con ampicilina a una concentración de 100µg/µl e incubándose a 37°C, 250 rpm durante 18 horas para posteriormente la realización de la extracción de ADN plasmídico.

### **11.4 *Extracción de plásmido por lisis alcalina***

Se centrifugaron los cultivos que resultaron de las clonas seleccionadas, obteniendo la biomasa, esta se resuspendió en 100 µl de la Solución I de lisis y se mezcló vigorosamente en el vortex durante 60 segundos, se adicionó 8 µl de lisozima y 5 µl de RNasa, se mezcló por vortex para homogeneizar toda la solución. Después se añadió 200 ul de Solución de lisis II la cual está constituida por 100 µl de SDS al 2% y 100 ul de NaOH 0.4N, una vez adicionada la Solución II, se le agregaron 150 ul de Solución de lisis III y se invirtió varias veces, incubando en hielo por 5 minutos. Paso seguido se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 5 minutos y todo el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril. Al tubo estéril se le añadió 150 µl de isopropanol y se

mezcló por inversión, se incubó a -20 °C durante 5 minutos para después centrifugar a 10,000 rpm a 4°C por 5 minutos. Se removió el sobrenadante quedando una pastilla, se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 2 minutos, se removió el sobrenadante, se dejó evaporar el alcohol y se resuspendió la pastilla con 50 µl de agua libre de DNAsas. Este producto obtenido se midió la concentración por absorbancia. A estos plásmidos se corroboró el tamaño del amplicón introducido por medio de PCR con las condiciones ya estandarizadas y mediante un perfil de restricción

#### 11.5 Corroboración de las clonas

Se realizó una PCR con los oligos del plásmido pJet1.2 blunt para asegurarnos que el amplicon insertado en el plásmido corresponde a APOL1, el programa de PCR se resume en la tabla 11.

Numero de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 minutos
40	94°C	30 segundos
	60°C	1 minuto
	72°C	2 minutos
1	72°C	5 minutos

Tabla 11.- Condiciones de PCR para pJET1.

## 12 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 12.1 *Mantenimiento celular*

El mantenimiento celular de las 4 líneas celulares SW-480, HeLa, C33A y HaCaT fue el óptimo para el proceso de extracción de RNA.

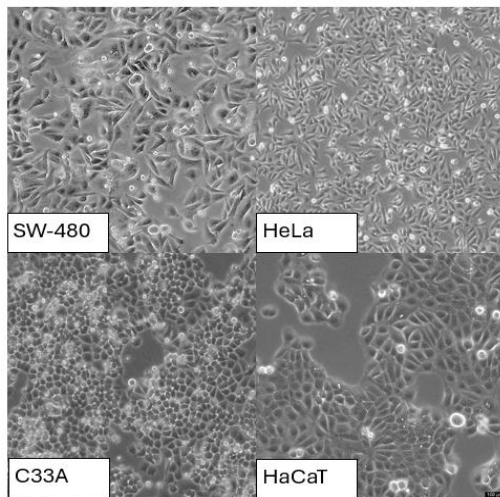


Figura 11: Líneas celulares SW-480, HeLa, C33A y HaCaT

### 12.2 *Extracción ARN total*

Se realizó la extracción de ARN por el método fenol/cloroformo de las 4 líneas celulares, obteniendo así la siguiente tabla de absorbancia y pureza:

Tabla 12. Concentración y absorbancia obtenidas de las líneas celulares.

Línea celular	Concentración ng/ $\mu$ l	A <sub>260/280</sub>
SW-480	723.73	1.796
C33A	710.08	1.906
HaCaT	817.56	1.958
HeLa	801.48	1.903

### 12.3 *Electroforesis en gel*

Para visualizar que el ARN total extraído no experimentara un proceso de degradación, se añadieron las muestras en un gel de agarosa al 1%, el cual fue sometido a un voltaje de 100 V por 50 minutos, con amortiguador TAE 0.5X, figura 8.

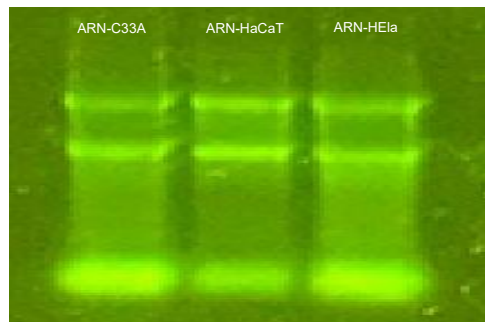


Figura 12: Bandas de ARN total en gel de electroforesis

### 12.4 **PCR**

Para estandarizar las condiciones de amplificación por PCR se utilizó la línea celular SW-480, con el uso de oligos específicos de APOL1 se realizaron pruebas con diferentes temperaturas para determinar la temperatura óptima de hibridación (tabla 13) observando que las condiciones óptimas

son 94°C para la desnaturalización, 55°C para el proceso de hibridación y una temperatura de 72°C para la amplificación.

Tabla 13. Condiciones de PCR para la amplificación del gen APOL1.

Temperatura °C	Temperatura °C	Temperatura °C	Temperatura °C
#1	#2	#3	Final
80	85	90	94
35	40	45	45 - 60
60	65	70	72

Con las condiciones estandarizadas, se logró la amplificación del fragmento esperado del gen APOL1 en las cuatro líneas celulares analizadas. En el gel de electroforesis (Figura 9) se observaron bandas definidas correspondientes al tamaño aproximado de 203 pb, lo cual coincide con el producto esperado según el diseño de los oligonucleótidos. Este hallazgo confirma que las condiciones de PCR utilizadas fueron adecuadas para generar amplicones específicos y reproducibles.

El hecho de que se obtuvieran productos de amplificación en todas las líneas celulares (C33A, HeLa, HaCaT y SW480) es particularmente relevante, ya que valida la robustez del protocolo independientemente del origen tisular de las células. Además, la coincidencia en el tamaño de los amplicones entre las diferentes líneas confirma la especificidad de los iniciadores diseñados y descarta la presencia de amplificaciones inespecíficas o artefactos experimentales.

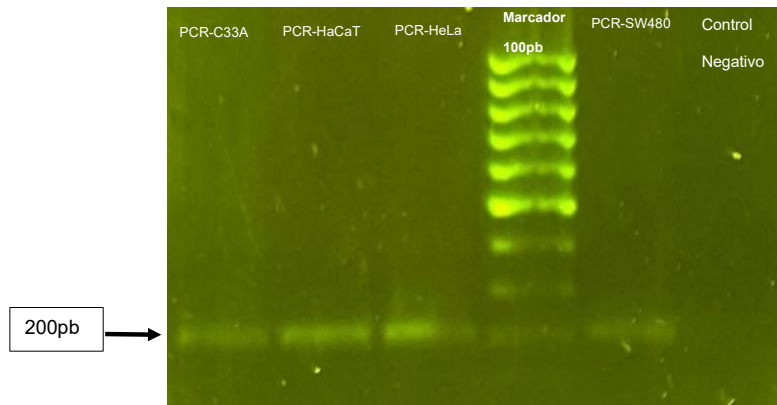


Figura 9: Amplicones de APOL1 por PCR

### **12.5 Purificación**

Se realizó la purificación y concentración del ADNc para su posterior secuenciación mediante el método Sanger, seleccionando específicamente las bandas de interés mediante corte en un gel de agarosa al 2% (Figura 10). Esta estrategia permite aislar únicamente la banda deseada, eliminando fragmentos no específicos o contaminantes que podrían interferir con la secuenciación y generar resultados ambiguos o sesgados. Al enfocarse exclusivamente en la banda correctamente amplificada y purificada, se garantiza la fidelidad de la lectura del ADNc y la validez de los datos obtenidos. Los resultados confirmaron que se logró purificar el fragmento correcto de APOL1, asegurando que la secuenciación analizaría únicamente la secuencia objetivo, lo cual es fundamental para la identificación confiable de las variantes de riesgo G1 y G2 en los ensayos posteriores.

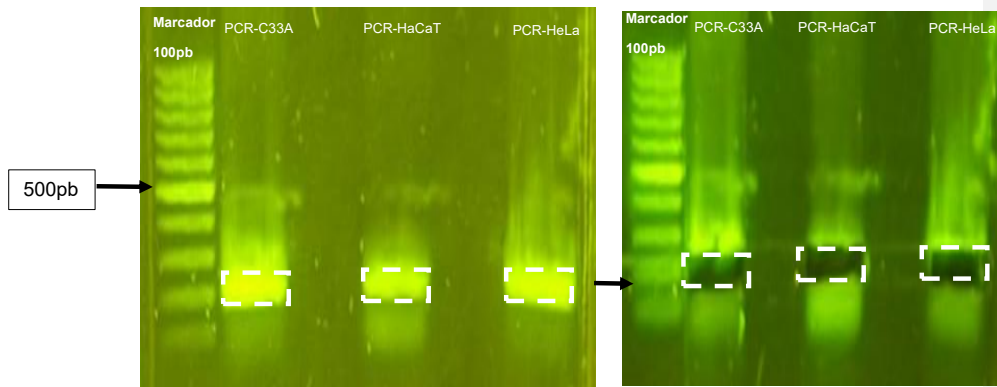


Figura 10: Corte de los amplicones generados por PCR de la region 1-4 del gen APOL1

Posterior a la purificación se realizó un gel de electroforesis para observar las bandas del producto ya purificado (figura 11).

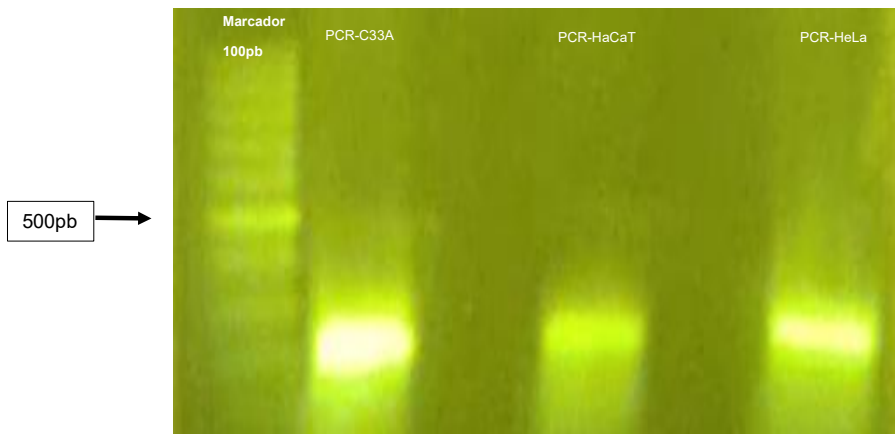


Figura 11: Bandas del producto purificado de PCR

### ***12.6. Análisis de secuencia y representación gráfica por WebLogo***

La secuenciación de nucleótidos es un paso esencial porque proporciona la información primaria de la composición genética del fragmento de APOL1, incluyendo las posibles variantes G1 y G2. Sin embargo, los datos obtenidos corresponden únicamente a nucleótidos; para comprender las posibles implicaciones funcionales de las variantes, es necesario traducir estas secuencias a su correspondiente secuencia de aminoácidos. Esta traducción permite identificar cambios en la estructura de la proteína que podrían alterar su función, como la formación de poros o la interacción con otras proteínas. Por lo tanto, la secuenciación de nucleótidos y su posterior análisis en aminoácidos es un paso crucial para validar la identidad del fragmento amplificado y garantizar que los oligonucleótidos diseñados detectan correctamente las variantes de riesgo de APOL1. Las secuencias obtenidas mediante el método Sanger se analizaron utilizando el software BioEdit 7.7.1, lo que permitió la visualización de los electroferogramas y la inspección detallada de la secuencia de nucleótidos (Figura 12).

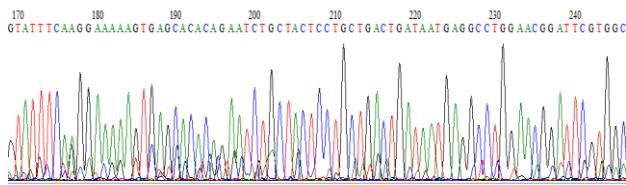


Figura 12: electroferograma de secuencia de la región 4 de APOL1

A partir de las secuencias de nucleótidos obtenidas, se realizó la traducción a secuencias de aminoácidos utilizando el programa Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>), generando una secuencia proteica correspondiente para cada una de las cuatro líneas celulares analizadas. Posteriormente, estas secuencias de aminoácidos fueron evaluadas para determinar la presencia de los polimorfismos de riesgo de APOL1, G1 y G2, y se representaron mediante la aplicación web WebLogo 2.8.2 para visualizar patrones de conservación y variación (Figura 13).

Es importante destacar que en ninguna de las líneas celulares evaluadas se detectaron las variantes de riesgo G1 o G2. Esto es consistente con su condición de células de referencia: aunque la línea HeLa proviene de una mujer afroamericana, la baja prevalencia de estas variantes en la población general hace improbable su presencia. La ausencia de estas variantes valida la especificidad y funcionalidad de los oligonucleótidos diseñados, así como la metodología empleada, confirmando que el protocolo es capaz de detectar correctamente las secuencias de APOL1 sin generar falsos positivos.

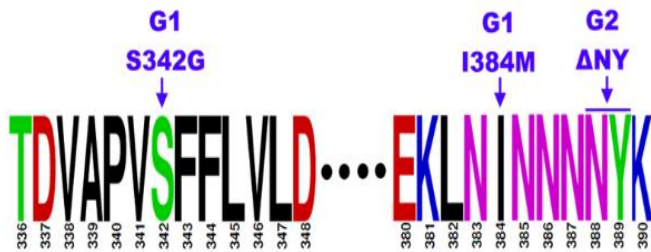


Figura 13: Representación WebLogo de las secuencias de APOL1

### ***12.7 Control de reacción por clonación pJET 1.2***

Como control experimental, se procedió a la clonación del gen APOL1 en el vector pJET 1.2 (Figura 13). Este plásmido circular está diseñado para facilitar la inserción de fragmentos de ADN mediante un sistema de clonación directa, lo que lo convierte en una herramienta útil para validar la especificidad de las reacciones de amplificación (Salomone, 2014). En este caso, se clonó un fragmento de 1196 pb, correspondiente a una región mayor del gen, con el objetivo de disponer de un control positivo que permitiera comparar y confirmar los resultados obtenidos en las diferentes muestras celulares.

La inclusión de este control es fundamental, ya que asegura que las condiciones de amplificación implementadas son capaces de reproducir el fragmento de interés de manera confiable. Además, proporciona una referencia directa para evaluar la integridad del sistema de PCR y la fidelidad de los oligonucleótidos diseñados, fortaleciendo la validez de las pruebas moleculares realizadas en las líneas celulares (Salomone, 2014).

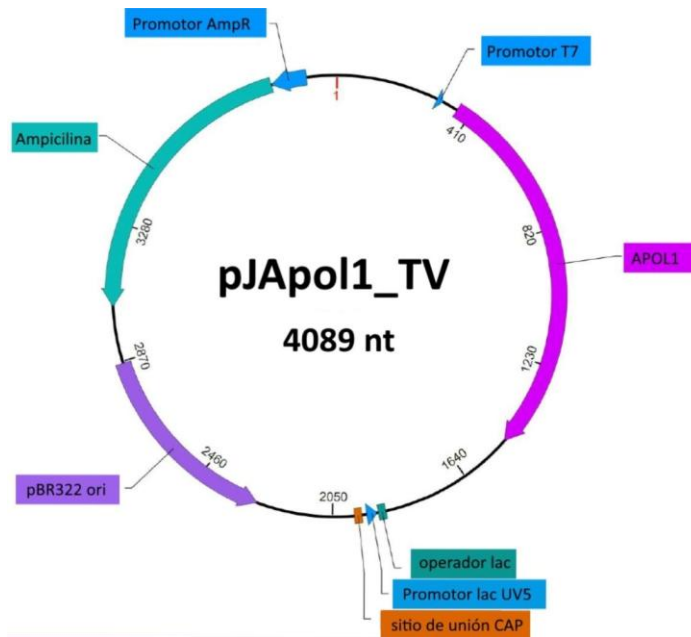


Figura 14: Mapa del plásmido de pJET 1.2 con la secuencia de APOL 1

El amplicón de APOL1 fue generado mediante la clonación en el plásmido pJET 1.2, utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados para amplificar la secuencia deseada. La amplificación se realizó directamente por PCR a partir del plásmido, y el fragmento resultante de 1196 pb fue confirmado mediante gel de electroforesis con un marcador de peso molecular de 1 kb (Figura 15). Este resultado valida que los oligos y las condiciones de PCR funcionan correctamente, lo que proporciona confianza para la posterior amplificación de fragmentos más pequeños, como los de 203 pb correspondientes a las variantes de riesgo de APOL1, asegurando así que los

ensayos posteriores estarán basados en un sistema funcional y confiable.

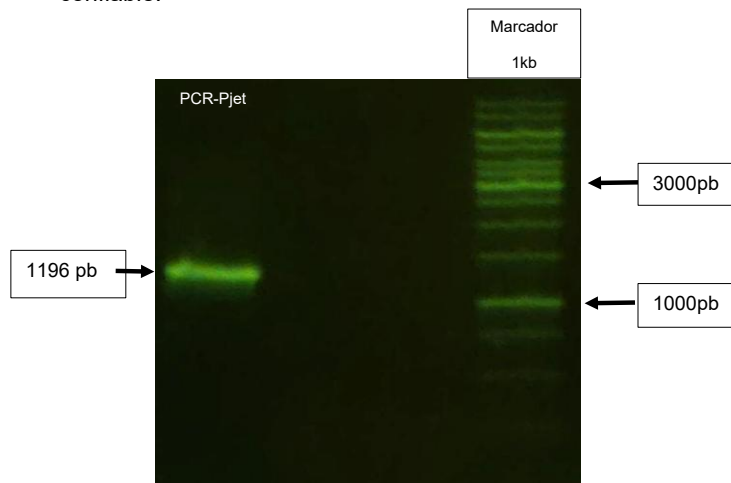


Figura 15: Gel de clonación por pJET 1.2

### **13 CONCLUSIONES**

Se logró diseñar y estandarizar la prueba molecular para la detección del gen APOL1 en células de origen humano, obteniendo amplicones con los tamaños esperados de 1196 y 203 pb. La secuenciación y el análisis de las secuencias obtenidas permitieron confirmar que, en las líneas celulares evaluadas, no se encuentran presentes los polimorfismos de riesgo G1 y G2 asociados a la ERC. Estos resultados validan la especificidad de los oligonucleótidos diseñados y demuestran que el protocolo establecido es adecuado para la amplificación y detección del transcrito de APOL1, sentando las bases para futuras aplicaciones en la identificación de variantes de riesgo en otros sistemas experimentales o muestras biológicas.

#### **14 PERSPECTIVAS**

Como perspectivas futuras, este trabajo abre la posibilidad de trasladar la metodología estandarizada a muestras de pacientes con ERC, especialmente aquellos con antecedentes familiares de la enfermedad. La prueba molecular podría aplicarse a muestras no invasivas, como sangre total o saliva, lo que facilitaría su implementación clínica y permitiría la detección temprana de las variantes de riesgo G1 y G2 del gen APOL1 en la población mexicana. Esto permitiría evaluar la frecuencia de estas variantes en pacientes con ERC hereditaria, estudiar su asociación con la progresión y severidad de la enfermedad, y sentar las bases para la medicina personalizada, priorizando el seguimiento intensivo o estrategias terapéuticas específicas para aquellos individuos portadores de variantes de riesgo. Además, la información obtenida podría integrarse en estudios poblacionales para determinar la prevalencia de estas variantes en diferentes regiones y grupos étnicos, así como para explorar posibles interacciones gen-gen y gen-ambiente que modifiquen el riesgo de desarrollar ERC.

## 15 BIBLIOGRAFÍA

1. ADA. (2025). Cómo frenar la progresión de la enfermedad renal crónica. <https://diabetes.org/espanol/cuidado/c%C3%B3mo-frenar-la-progresi%C3%B3n-de-la-enfermedad-renal-cr%C3%B3nica>
2. American Kidney Fund. (2025, January 29). Enfermedad renal crónica (ERC) en etapa 4. <https://www.kidneyfund.org/es/todo-sobre-los-rinones/etapas-o-estadios-de-la-enfermedad-renal/enfermedad-renal-cronica-erc-en-etapa-4>
3. American Kidney Fund. (2025, March 12). Etapa 1 de la enfermedad renal crónica (ERC): causas, síntomas y tratamiento. <https://www.kidneyfund.org/es/all-about-kidneys/etapas-o-estadios-de-la-enfermedad-renal/etapa-1-de-la-enfermedad-renal-cronica-erc-causas-sintomas-y-tratamiento>
4. American Kidney Fund. (2025, March 19). Análisis de orina: el UACR (cociente albúmina/creatinina urinaria). <https://www.kidneyfund.org/es/todo-sobre-los-rinones/las-pruebas-de-deteccion-de-la-enfermedad-renal/analisis-de-orina-el-uacr-cociente-albuminacreatinina-urinario>
5. Argáiz, E. R., Morales-Juárez, L., Razo, C., Ong, L., Rafferty, Q., Rincón-Pedrero, R., & Gamba, G. (2023). La carga de enfermedad renal crónica en México. *Gaceta Médica De México*, 159(6). <https://doi.org/10.24875/gmm.23000393>
6. CAM. (2015). Curso de actualización médica, capítulo 16: Nefrología y urología. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=1739&sectionid=122464011>
7. Carracedo, J., & Ramírez, R. (2024). Fisiología Renal. En: Lorenzo V., López Gómez JM (Eds). *Nefrología al día*. <https://www.nefrologiaaldia.org/335>

8. CENETEC. (2019). Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica. <http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc>
9. Cheatham, A.M., Davis, S.E., Khatua, A.K. *et al.* (2018) Blocking the 5' splice site of exon 4 by a morpholino oligomer triggers APOL1 protein isoform switch. *Sci Rep* **8**, 8739. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27104-x>
10. ClinVar. (2020). NM\_003661.3(APOL1):C.[1024A>G;1152T>G] AND Hyalinosis, Segmental Glomerular - CLINVAR - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV001195215>
11. CNDH. (2016). Afrodescendientes en México. <https://www.cndh.org.mx/sites/all/doc/cartillas/2015-2016/06-afrodescendientes-mexico.pdf>
12. Contacto. (2025, January 3). Descifrando los Signos y Síntomas de la Enfermedad Renal Crónica. Hospital Español. [https://www.hespanol.com/blogs/post/sintomas\\_enfermedad\\_renal\\_cronica](https://www.hespanol.com/blogs/post/sintomas_enfermedad_renal_cronica)
13. Cortés-Sanabria, L., *et al.* (2017). Impacto económico de la enfermedad renal crónica: Perspectiva del Instituto Mexicano del Seguro Social. <https://www.redalyc.org/journal/4577/457755436004/html/>
14. Cytion. (2025). Product sheet C-33A Células. <https://www.cytion.com/es/product/data-sheet/62e6fbb1eb114071bac533ce8772be4e>
15. De Mier, M. P. R., *et al.* (2019). Insuficiencia renal crónica. *Medicine*, **12**(79), 4683–4692. <https://doi.org/10.1016/j.med.2019.05.022>
16. Del Rosario, D. P., *et al.* (2024). Descripción epidemiológica de casos de enfermedad renal crónica terminal en tratamiento

- hemodialítico privado en Tehuacán Puebla. *LATAM*, 5(5).  
<https://doi.org/10.56712/latam.v5i5.2908>
17. Diálisis. (2025). National Kidney Foundation.  
<https://www.kidney.org/es/kidney-topics/dialisis>
  18. Erraez, S., López-Mesa, M., & Gómez-Fernández, P. (2020). Bloqueantes del receptor mineralcorticoide en la enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 41(3), 258–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.10.001>
  19. Esparza, K. L. H., et al. (2020). Calidad de vida en pacientes con enfermedad renal crónica en un hospital de Ciudad Juárez, Chihuahua. <https://doi.org/10.60568/eic.v1i1.664>
  20. Friedman, D. J., & Pollak, M. R. (2020). APOL1 Nephropathy: From genetics to clinical applications. *CJASN*, 16(2), 294–303.  
<https://doi.org/10.2215/cjn.15161219>
  21. García-Montemayor, V., De Mier, M. P. R., Peregrín, C. M., & Martín-Malo, R. (2019). Enfermedades renales. Concepto, clasificación, etiopatogenia, síndromes renales y estrategia diagnóstica. *Medicine*, 12(79), 4651–4661.  
<https://doi.org/10.1016/j.med.2019.05.019>
  22. Gary, D. (2015). Enfermedad renal crónica y tratamiento de sustitución renal. En: *Fisiopatología de la enfermedad*, 8e. BUAP.  
<https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/book.aspx?bookid=2755>
  23. Glab, J., et al. (2016). Apolipoproteins L control cell death triggered by TLR3/TRIF signaling in dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 46(8), 1854–1866.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201546252>
  24. Grampp, S., et al. (2023). Hypoxia hits APOL1 in the kidney. *Kidney International*, 104(1), 53–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.03.035>

25. Hechanova, L. A. (2024, July 9). Generalidades sobre la terapia de sustitución renal. Manual MSD. <https://www.msmanuals.com/es/professional/trastornos-urogenitales/terapia-de-reemplazo-renal/generalidades-sobre-la-terapia-de-sustituci%C3%B3n-renal>
26. Hu, C. A., et al. (2012). APOL1 and APOL3 are associated with lipid metabolism and cell death. *Journal of Lipid Research*.
27. Hung, A. M., et al. (2023). Genetic inhibition of APOL1 Pore-Forming function prevents APOL1-Mediated kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 34(11), 1889–1899. <https://doi.org/10.1681/asn.0000000000000219>
28. Investigación en Ciencias de Información Geoespacial AC, C. (2024). Datos sobre mortalidad por ERC en México.
29. Kramer, H. J., et al. (2016). African Ancestry–Specific alleles and kidney disease risk in Hispanics/Latinos. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(3), 915–922. <https://doi.org/10.1681/asn.2016030357>
30. Kumar, V., et al. (2019). Disruption of APOL1-miR193a Axis Induces Disorganization of Podocyte Actin Cytoskeleton. *Scientific Reports*, 9(1), 3582. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39376-y>
31. Lan, X., et al. (2015). Protein domains of APOL1 and its risk variants. *Experimental and Molecular Pathology*, 99(1), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.06.003>
32. Levey, A. S., et al. (2009). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of Internal Medicine*, 150(9), 604–612. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006>
33. Lerma, E. V., Rosner, M. H., & Perazella, M. A. (2017). *CURRENT Diagnosis & Treatment: Nephrology & Hypertension*, 2e. McGraw-Hill Education.

- <https://accessmedicine.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=2287&sectionid=177178220>
34. Ma, L., et al. (2020). APOL1 Kidney-Risk variants induce mitochondrial fission. *Kidney International Reports*, 5(6), 891–904. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.03.020>
35. Maxine, A. (2025). *Diagnóstico clínico y tratamiento 2024*. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3530&sectionid=295667184>
36. National Kidney Foundation. (2024). New commentary on KDIGO guidelines. <https://www.kidney.org/press-room/new-commentary-kdigo-guidelines>
37. NIDDK (2016) Albuminuria: albúmina en la orina. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-rinones/informacion-general/diagnostico/albuminuria-albumina-orina>
38. NIDDK (2018) Hemodialysis. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/kidney-failure/hemodialysis>
39. Nigam, S. K., & Bush, K. T. (2019). Uraemic syndrome of chronic kidney disease: altered remote sensing and signalling. *Nature Reviews Nephrology*, 15(5), 301–316. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0111-1>
40. Olabisi, O. A. (2024). Has APOL1 kidney disease treatment been hiding in plain sight? *Kidney International*, 106(6), 1015–1017. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2024.09.003>
41. Orozco, B. R. (2010). Prevención y tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC). *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(5), 779–789. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(10\)70600-3](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(10)70600-3)
42. Papadakis, M. A., et al. (2025). *Diagnóstico clínico y tratamiento 2025*. McGraw Hill Education.

- <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3530&sectionid=294826869>
43. Partridge, C. A., et al. (2004). Functional implications of APOL1 variants. *Journal of Molecular Medicine*.
  44. Pays, E., et al. (2014). The molecular arms race between African trypanosomes and humans. *Nature Reviews Microbiology*, 12(8), 575–584. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3298>
  45. Peng, T., Wang, L., & Li, G. (2017). The analysis of APOL1 genetic variation and haplotype diversity provided by 1000 Genomes project. *BMC Nephrology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0675-6>
  46. Prueba de tasa de filtración glomerular (TFG). (n.d.). <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-tasa-de-filtracion-glomerular-tfg/>
  47. Rincon, P. R. (2024). La carga de enfermedad renal crónica en México. *Gaceta Médica de México*, 159(6). <https://doi.org/10.24875/gmm.23000393>
  48. Salomone, A. L. (2014). Obtención de anticuerpos específicos contra una proteína de membrana de leptospiras patógenas. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.13140/2.1.4652.4169>
  49. Sanderson, B. A., et al. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 454, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003>
  50. Shah, S., et al. (2019). APOL1 high-risk genotypes and renal transplantation. *Clinical Transplantation*, 33(6). <https://doi.org/10.1111/ctr.13582>
  51. Smith y Tanagho. (2020). *Urología general*, 19ª ed. Capítulo 35: Enfermedad renal crónica y tratamiento de sustitución renal.

- <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/book.aspx?bookid=3071>
52. Sosa, J. A. (2023, marzo 6). Enfermedad renal crónica, problema de salud pública. *Gaceta UNAM*.  
<https://www.gaceta.unam.mx/enfermedad-renal-cronica-problema-de-salud-publica/>
  53. Stevens, P. E., et al. (2024). KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International*, 105(4), S117–S314.  
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.10.018>
  54. SW480 [SW-480] - CCL-228. ATCC. (n.d.).  
<https://www.atcc.org/products/ccl-228>
  55. KDIGO. (2020). KDIGO. Transplant candidate—  
<https://kdigo.org/guidelines/transplant-candidate/>
  56. Tzur, S., et al. (2010). Missense mutations in APOL1 and kidney disease risk. *Nature Genetics*.
  57. Uzureau, S., et al. (2016). Apolipoproteins L control cell death triggered by TLR3/TRIF signaling in dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 46(8), 1854–1866.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201546252>
  58. Waitzman, J. S., & Lin, J. (2019). Ten years in. *Current Opinion In Nephrology & Hypertension*, 28(4), 375–382.  
<https://doi.org/10.1097/mnh.0000000000000511>
  59. Wakashin, H., et al. (2020). APOL1 renal risk variants exacerbate podocyte injury by increasing inflammatory stress. *BMC Nephrology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01995-3>
  60. Zhong, J., et al. (2019). Mechanisms of scarring in focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 67(9), 623–632. <https://doi.org/10.1369/0022155419850170>

61. Zubiran, S. I., & Herrero, A. (2016). Manual de terapéutica médica y procedimientos de urgencias, 7ª ed. McGraw-Hill. Capítulo 52: Enfermedad renal crónica.  
<https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/book.aspx?bookid=1846>

## 16 ANEXOS

Constancias: <https://drive.google.com/drive/folders/1L-IQPNUWP06JrVqZCqCln0zuL6KVGjOA?usp=sharing>

**Comentado [LM1]:** No veo las constancias de tus participaciones y de Experiencias y tu pase al nacional