

Detección de mutaciones del gen de HNF1B en niños con malformaciones congénitas renales y del tracto urinario

Detection of mutations of the HNF1B gene in children with congenital anomalies of the kidney and urinary tract

M. Nicole Bascur P.^a, M. Luisa Ceballos O.^b, Mauricio Farfán U.^b, Iván Gajardo H.^b y Joaquín López C.^b

^aHospital Guillermo Grant Benavente, Concepción

^bHospital Luis Calvo Mackenna, Santiago, Chile

Recibido el 18 de junio de 2018; aceptado el 12 de noviembre de 2018

Resumen

Las anomalías congénitas del riñón y del tracto urinario se originan de alteraciones genéticas, en su mayoría desconocidas. Las mutaciones en el gen que codifica para el factor hepatocitario nuclear 1B (*HNF1B*), son la causa monogénica más frecuentemente descrita. Se desconocen datos en Chile y Latinoamérica. **Objetivo:** Determinar la presencia de variantes del gen *HNF1B* en niños chilenos con anomalías congénitas del riñón y/o tracto urinario y sus características clínicas. **Pacientes y Método:** Estudio descriptivo con pacientes entre 10 meses y 17 años, consultantes en Unidad de Nefrología Hospital Luis Calvo Mackenna, período abril - diciembre 2016, portadores de displasia renal quística, displasia/hipoplasia renal no quística y/o riñón en herradura. Se determinaron variantes de *HNF1B* mediante secuenciación de exones 1, 2, 3 y 4; previa extracción y amplificación de DNA. Se utilizaron enzimas de restricción para definir si variantes eran homo o heterocigotas. Familiares directos de casos índices se estudiaron con secuenciación del exón afectado. **Resultados:** Se incluyeron 32 pacientes, 43,75% varones, mediana edad 11 años. El 65,6% displasia/hipoplasia renal no quística, 31,25% displasia renal quística y 3,15% riñón en herradura. En 2 pacientes (6,25%) se detectó una misma variante genética heterocigota en exón 4, posición 1027 (*C1027T*), no descrita anteriormente. El estudio de familiares determinó la variante en 3 de 5 individuos, todos sin anomalías nefrourológicas congénitas. **Conclusiones:** Confirmamos la presencia de una variante genética heterocigota del gen *HNF1B*, no descrita previamente, dando inicio a la búsqueda de este tipo de mutaciones en nuestro medio, lo cual nos permite aproximarnos al conocimiento de causalidad, determinación de compromiso extrarrenal y consejo genético.

Palabras clave:

Tracto urinario;
CAKUT;
mutaciones;
Anomalías congénitas;
Riñón;
displasia renal;
enfermedad renal
quística

Abstract

Introduction: Congenital anomalies of the kidney and urinary tract are caused by genetic alterations mostly unknown. Mutations in the gene that codes for hepatocyte nuclear factor 1B (HNF1B) are the most frequently described monogenic causes. Data are unknown in Chile and Latin America. **Objective:** To determine the presence of variants of the HNF1B gene in Chilean children with congenital anomalies of the kidney and/or the urinary tract and their clinical characteristics. **Patients and Method:** Descriptive study with children aged 10 months to 17 years, patients of the Calvo Mackenna Hospital Nephrology Unit, with cystic renal dysplasia, non cystic renal dysplasia/hypoplasia, horseshoe kidney between April and December 2016. HNF1B variants were determined by sequencing of exons 1, 2, 3 and 4 after DNA extraction and amplification. Restriction enzymes were used to define if the variants were homo or heterozygous. Direct family members of index cases were studied with sequencing of the affected exon. **Results:** 32 patients were included, 43.75% males, median age 11 years. 65.6% of them had non-cystic renal dysplasia, 31.25% cystic renal dysplasia, and 3.15% horseshoe kidney. In two patients (6.25%) the same heterozygous genetic variant was detected in exon 4, position 1027 (C1027T), not previously described. The study of relatives found the same variant in three out of five individuals, all without congenital nephro-urological anomalies. **Conclusions:** We confirmed the presence of a not previously described heterozygous genetic variant of the *HNF1B* gene. This work initiates the search for this type of mutations in our region which allows us to approach the knowledge of causality, determination of extrarenal involvement, and genetic counseling.

Keywords:

Urinary tract;
CAKUT;
mutations;
Congenital anomalies;
Kidney;
renal dysplasia;
renal cysts

Introducción

Las malformaciones congénitas del riñón y tracto urinario (CAKUT: *congenital anomalies of the kidney and urinary tract*), tienen una incidencia de 1 en 500 recién nacidos vivos, y son actualmente la causa más frecuente de Enfermedad Renal Crónica en la infancia. Las mutaciones en el gen *TCF2*, que codifica para el factor hepatocitario nuclear 1B (*HNF1B*), son la causa monogénica más común de alteraciones del desarrollo renal en los pacientes con CAKUT¹.

El factor de transcripción *HNF1B* regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo precoz de órganos como riñón, páncreas, hígado, intestino y pulmón²; originalmente se identificó como el responsable de la diabetes tipo MODY5 (*maturity onset diabetes of the young*), enfermedad monogénica que se transmite de forma autosómica dominante. La observación de la alta frecuencia de malformaciones renales en estos pacientes permitió determinar su asociación con CAKUT^{1,2}.

El gen *TCF2* está ubicado en la región q12 del cromosoma 17 y contiene 9 exones. Hasta la fecha se han reportado más de 50 mutaciones diferentes, de tipo missense, nonsense, frame-shift y splicing. En un porcentaje importante de los pacientes se ha detectado una delección completa del gen. De las mutaciones reportadas, la mayoría están en los exones 1, 2, 3, 4. Debido al alto número de mutaciones descritas, el estudio de asociación entre este gen y la patología renal se realiza principalmente mediante técnicas de secuenciación¹.

Las malformaciones renales originadas por la de-

lección y/o mutaciones del gen *TCF2* son muy heterogéneas, siendo la displasia renal quística uni o bilateral el hallazgo más frecuente. También se ha encontrado aplasia o hipoplasia renal, y riñón en herradura¹⁻³.

La afectación extrarrenal puede incluir: incremento de enzimas hepáticas, compromiso pancreático endocrino y exocrino, malformaciones de tracto genital causantes de infertilidad, hipomagnesemia, hiperuricemia y gota de inicio precoz. Desde el punto de vista clínico, la presencia de compromiso extrarrenal no contribuye en forma significativa al diagnóstico temprano, ya que suele expresarse más tardíamente en la vida^{1,2,4}.

Se han realizado estudios de prevalencia de mutaciones en el gen *TCF2* en pacientes portadores de CAKUT en Europa, Estados Unidos y Japón⁵⁻⁷, sin embargo, se desconocen datos en Latinoamérica. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de variantes del gen que codifica para *HNF1B* (*TCF2*) en niños chilenos con anomalías congénitas del riñón y/o tracto urinario y sus características fenotípicas.

Pacientes y Método

Pacientes

Estudio prospectivo, observacional, descriptivo, con pacientes que consultaron en la Unidad de Nefrología del Hospital Luis Calvo Mackenna en un periodo de 9 meses, entre abril y diciembre del 2016. Como criterio de inclusión se consideró la presencia de, al menos, uno de los siguientes fenotipos: displasia renal quística uni o bilateral, displasia o hipoplasia renal uni o bilateral, riñón en herradura. La evaluación ecográ-

fica fue realizada por médicos radiólogos pediátricos del Hospital Luis Calvo Mackenna. Desde el punto de vista ecográfico, se definió displasia renal como el hallazgo de alteración de la diferenciación córticomedular y/o hiperecogenicidad difusa del parénquima renal; hipoplasia por una longitud renal menor a 2 DS para la edad⁸. Se excluyeron aquellos pacientes portadores de uropatías obstructivas y/o reflujo vésicoureteral moderado a severo (grado 3 a 5), que pudieran generar daño renal secundario; y los que tuvieran evidencias clínicas y/o moleculares de otras anomalías genéticas que explicaran las malformaciones que presentaban en el tracto nefroureteral, como por ejemplo, enfermedad renal poliquística autosómica dominante o recesiva.

Se realizó estudio molecular y ecográfico a los familiares de primer grado de los casos índices.

Detección de variantes del gen TCF2

Se obtuvo DNA genómico desde sangre periférica utilizando el kit "Magna Pure Compact" (Roche) según protocolo del fabricante. Los primeros 4 exones del gen TCF2 se amplificaron a través de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), se utilizaron partidores específicos para los exones 1, 2, 3 y 4 (Promega) descritos previamente en la literatura⁹. La pureza del amplión obtenido se evaluó mediante un gel de agarosa 2%. El producto de la PCR fue sometido a secuenciación mediante la técnica de Sanger, para lo que se utilizaron los servicios de Macrogen (Korea) con una cobertura de secuenciación de un 100%. El análisis Bioinformático de las secuencias se realizó con el programa *Sequencher* 5.4.5 (Genecodes). Como referencia, se utilizó la secuencia del gen TCF2 NM_00458.2.

Para determinar si la variante encontrada afectaba a uno o ambos alelos (homo o heterocigota), se utilizó la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena-Polimorfismos de Longitud con Enzimas de Restricción (PCR-RFLP). El exón 4, que presentó la variante en estudio, se amplificó por PCR, y el producto amplificado se digirió con la enzima *EcoRI* (Promega), capaz de reconocer el segmento de DNA que incorpora la posición nucleotídica variante. Los productos de la digestión enzimática se analizaron a través de Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Estudio bioquímico

Se realizó evaluación de parámetros bioquímicos en plasma a todos los pacientes incorporados al estudio que incluyó: Creatinina (mg/dl), Nitrógeno ureico (mg/dl), glicemia (mg/dl), transaminasas: GPT - GOT (UI/L), ácido úrico (mg/dl) y magnesio (mEq/L). Las muestras se procesaron en el Laboratorio Central del Hospital Luis Calvo Mackenna. El cálculo de la velocidad de filtración glomerular se realizó a través de la Fórmula de Schwartz¹⁰.

Se realizó estudio molecular y ecográfico renal a los familiares de primer grado de los casos índices.

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la Dirección del Hospital Luis Calvo Mackenna. Se obtuvo Consentimiento Informado del adulto responsable en todos los casos y Asentimiento en pacientes sobre los 12 años.

Resultados

Se incluyeron 32 pacientes, 18 de sexo femenino (56,25%), la mediana de edad fue de 11 años, con un rango entre 10 meses y 17 años. Veintiuno de los 32 presentaban displasia renal no quística (65,6%); de este grupo, un 76,2% tenía afectación bilateral. Diez pacientes (31,25% del total de la muestra) presentaron displasia quística, bilateral en 3 de ellos. Un paciente ingresó al estudio con diagnóstico de riñón en herradura (figura 1).

Respecto a la función renal, 12 pacientes presentaban ERC en etapa 1, 6 pacientes en etapa 2 y 14 pacientes en etapa 5. De este último grupo, 2 pacientes estaban en peritoneodiálisis y 12 pacientes se encontraban trasplantados (figura 2).

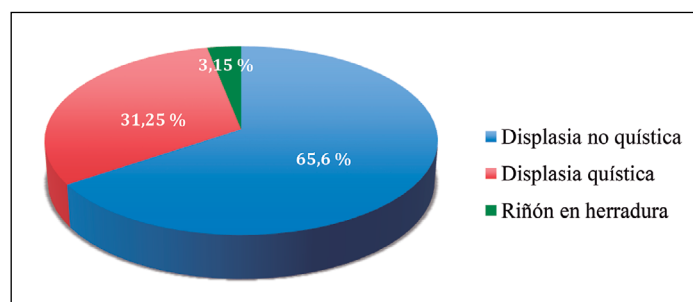


Figura 1. Caracterización de la muestra de acuerdo a tipo de Malformación Nefrourológica.

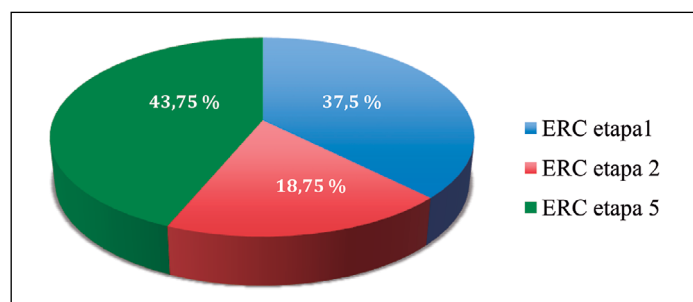


Figura 2. Caracterización de la muestra de acuerdo a la Etapa de Enfermedad Renal Crónica.

Los niveles de glicemia, transaminasas, magnesio y ácido úrico de los 32 pacientes estuvieron dentro de rangos normales.

Se encontró una misma variante heterocigota (figura 3) en 2 de los 32 pacientes estudiados, lo que corresponde a un 6,25% de la muestra. Esta variante se ubica en el exón 4, en la posición 1027, determina un cambio en la base nitrogenada (Citosina por Timina - C1027T), lo que origina un cambio en el aminoácido codificado en la posición 343 de Prolina por Serina.

Una de las pacientes afectadas por esta variante es una adolescente de 17 años, portadora de displasia renal quística izquierda, con función renal normal. El otro caso índice corresponde a un paciente de sexo

masculino, de 8 años, con displasia renal no quística bilateral, que actualmente está trasplantado (tabla 1). Estos pacientes no tienen relación de consanguinidad conocida.

Se estudió la presencia de esta variante en la familia de uno de los casos índices, ya que el otro paciente tiene padres adoptivos y se desconocen antecedentes de su familia consanguínea. Se encontró la misma variante heterocigota (C1027T) en 3 de los 5 familiares estudiados (uno de los padres y 2 de sus 3 hermanos), lo que permite evidenciar que no se trata de una variante di novo (figura 3). Estos familiares estudiados son asintomáticos, con estudio ecográfico renal y del tracto urinario normal.

Tabla 1. Características generales de los casos índices

ID paciente	Edad (a)	Sexo	CAKUT	Etapa ERC	Exon	Mutación
10	17	F	Displasia quística izquierda	1	4	C1027T
24	8	M	Displasia no quística bilateral	5	4	C1027T

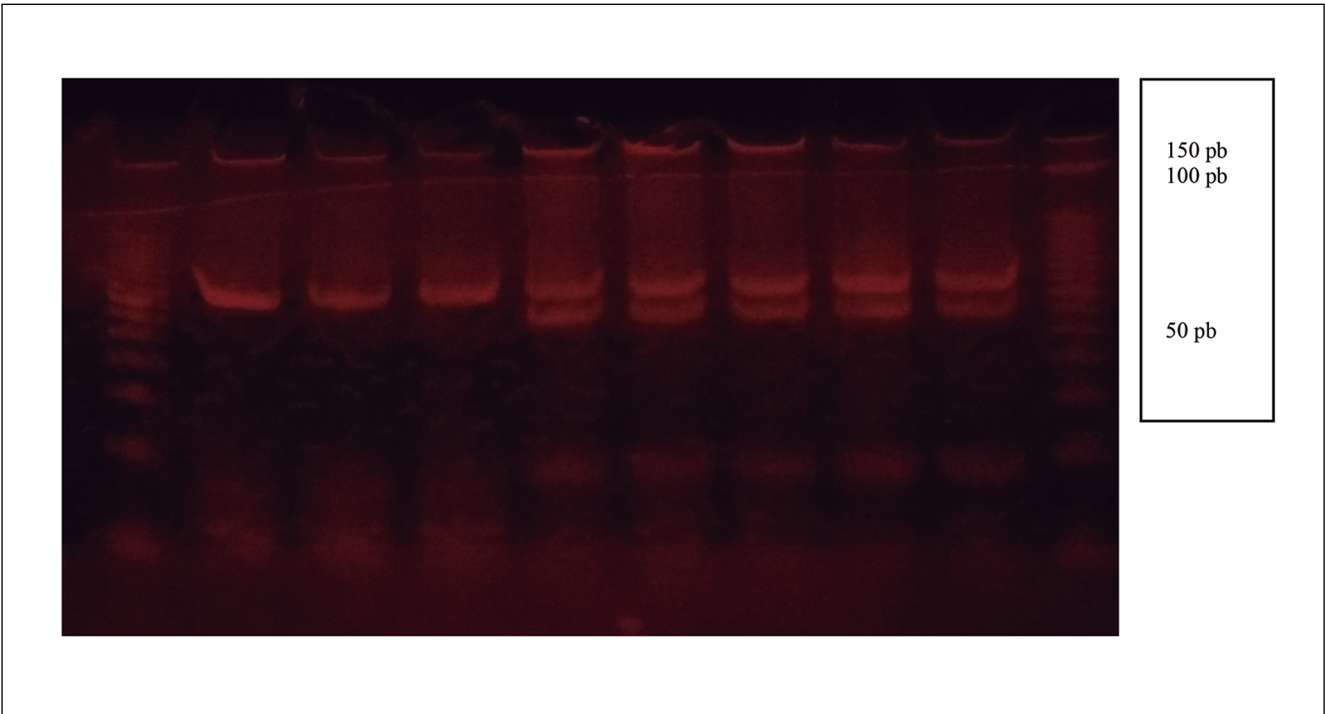


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida que muestra productos de la digestión de exón 4 con enzima de restricción. El exón 4, previamente amplificado a través de PCR, se digiere usando endonucleasa de restricción Earl, que reconoce el segmento de DNA que incorpora la variante. Se analizaron 8 muestras, las primeras 3 a la izquierda son de pacientes controles y las 5 a derecha corresponden a los 2 casos índices y sus 3 familiares portadores de la variante. Se puede observar que en los controles la enzima no fragmenta el ADN, y en los portadores de la variante uno de los alelos se fragmenta y el otro queda intacto, lo que nos permite evidenciar que se trata de una variante heterocigota. La fragmentación por la enzima da origen a trozos de ADN más pequeños que migran en el gel con mayor velocidad y pueden ser observados.

Discusión

Por primera vez se realiza en Chile un estudio que intenta buscar asociación entre CAKUT y variantes del gen que codifica para *HNF1B*.

Analizamos 32 pacientes no consanguíneos con fenotipo de CAKUT e identificamos 2 de ellos con una misma variante heterocigota en el exón 4 del gen que codifica para *HNF1B*. Esta variante no está descrita previamente en la literatura, por lo que se desconoce su rol patogénico, pese a que el hallazgo de una idéntica alteración en ambos pacientes podría sugerirla. Para intentar determinar su patogenicidad se utilizó un análisis in silico (simulación computacional) con tres softwares disponibles: Polyphen-2, SIFT y Mutation Taster. Los dos primeros predicen un efecto benigno y tolerable; el tercero indica que esta variante podría ser causal de enfermedad.

El primer caso índice es una adolescente de 17 años con antecedentes de embarazo fisiológico, sin anomalías ecográficas prenatales, nació por parto vaginal a las 38 semanas, peso nacimiento 2.850 g. Ingresó al Policlínico de Nefrología en febrero del 2012, a los 13 años de edad, debido al hallazgo ecográfico de un riñón izquierdo con signos de displasia quística, en el contexto de estudio de imágenes por dolor lumbar. Cintigrama renal DMSA mostró exclusión cintigráfica del riñón izquierdo. Dentro de su estudio destaca creatininemia 0,68 mg/dl, examen orina normal. Evolución asintomática, normotensa. En abril de 2015 se traslada a medicina de adultos para continuar control. El segundo caso índice, varón de 10 años, tiene antecedentes de embarazo irregularmente controlado, sin patología materna conocida ni hallazgos ecográficos anormales. Nace por parto vaginal a las 35 semanas, peso de nacimiento de 2.020 g. Ingresó al Policlínico de Nefrología en noviembre de 2010 derivado desde otro centro pediátrico, con diagnósticos de displasia renal bilateral y enfermedad renal crónica terminal en peritoneodiálisis, para iniciar estudio pre trasplante. En su historia destaca situación de vulnerabilidad social por abandono familiar. Recibe trasplante renal de donante fallecido en febrero de 2014, a los 5 años de vida. Actualmente tiene 5 años post trasplante, al cuidado de familia adoptiva, con velocidad de filtración estimada de 70 ml/min/1,73 m².

La literatura describe casos de pacientes con variantes en *HNF1B* heredadas o de novo en alrededor del 50% de los casos, respectivamente¹. Estudiamos la familia de uno de los casos índices, constatando que 3 integrantes de ella portaban la misma variante heterocigota del exón 4. Los fenotipos muy diferentes de los dos pacientes índices y la ausencia de malformaciones renales en los familiares portadores de la variante nos reafirma la falta de correlación genotipo-fenotipo, lo

que ya está descrito en la literatura y nos sugiere una herencia con penetrancia incompleta⁶. Por lo tanto, el rol patogénico de esta variante genética es incierto. Una forma indirecta de acercarse a esto podría ser determinando su ausencia relativa en una muestra significativa de población sana, lo que podría ser realizado de manera costo-efectiva a través de PCR-RFLP.

La frecuencia de variantes del gen que codifica para *HNF1B* en nuestro estudio fue de un 6,25%, lo que está en concordancia con resultados descritos en otras series, que van entre un 5 y 31%¹. El año 2006, Ulinski¹¹ publica un estudio descriptivo de 80 pacientes franceses portadores de CAKUT, evidenciando en un 31% de ellos alteraciones de *TCF2*, ya sea mutación o delección completa del gen; Thomas¹², en el año 2011 publica una serie estadounidense de pacientes portadores de aplasia y/o hipoplasia renal, encontrando un 5% de pacientes con alteraciones del gen que codifica para *HNF1B*. En diferentes publicaciones se ha podido demostrar que la frecuencia de variantes de este gen es mayor en los pacientes con CAKUT que presentan quistes renales uni o bilaterales, llegando en este grupo al 50% de los niños estudiados^{11,13}.

No se observaron alteraciones de los niveles de ácido úrico o magnesio plasmático, como tampoco elevación de transaminasas o glicemia. Esto puede estar explicado porque gran parte de las manifestaciones extrarrenales de las variantes de *HNF1B* se manifiestan tardíamente en la vida.

No podemos dejar de mencionar las limitaciones de nuestro estudio. En primer lugar, por razones de costo, sólo se analizaron las variantes de los exones 1, 2, 3 y 4, siendo 9 en total; además, no se efectuó búsqueda de delecciones del gen, lo que habría requerido otro tipo de técnicas. Esto permite explicar la relativa baja frecuencia de variantes en el gen *TCF2* encontradas en nuestra serie. Por otra parte, el hecho de que ninguno de nuestros pacientes haya presentado anomalía de la glicemia basal no nos permite descartar diabetes o estados prediabéticos, ya que no se realizó test de tolerancia a la glucosa y/o medición de insulínemia. En este estudio no se realizaron exámenes de imágenes que permitan descartar anomalías anatómicas del páncreas o genitales internos, las cuales pueden ser manifestaciones extrarrenales de las variantes de *HNF1B*. Finalmente, no se pueden descartar en nuestros pacientes anomalías en otros genes involucrados en el desarrollo renal, que también se han asociado a CAKUT: *Ret*, *GDNF*, *Pax2*, *Six2*, *UMOD*, *BMP4*, entre otros¹⁴.

Conclusiones

Este trabajo es el primer estudio realizado en Chile que busca variantes del gen que codifica para *HNF1B*,

cuyas alteraciones son reconocidas como la causa monogénica más frecuente de CAKUT, y nos ha permitido el reconocimiento de una nueva variante cuyo valor patogénico desconocemos.

La caracterización genotípica de este grupo de pacientes está lejos de ser una realidad en la práctica clínica, sin embargo, en grupos seleccionados podría ser de gran utilidad para el consejo genético, prevención y búsqueda de manifestaciones extrarrenales.

La investigación científica que permite conocer las características genotípicas de los pacientes portadores de malformaciones nefroulinarias proporciona una base para la comprensión cabal del origen de estas enfermedades, y es el puntapié inicial de futuros estudios.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran

que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Cano Schuffenecker, por su contribución a la redacción del trabajo.

Financiamiento

Concurso de Investigación Hospital Luis Calvo Mackenna, versión noviembre 2015. Concurso de proyectos de Investigación SAVAL 2015.

Referencias

- Clissold RL, Hamilton AJ, Hattersley AT, Ellard S, Bingham C. HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11:102-12.
- Bockenhauer D, Jaureguierry G. HNF1B associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatr Nephrol* 2015; 8 [Epub ahead of print].
- Igarashi P, Shao X, McNally BT, Hiesberger T. Roles of HNF-1b in kidney development and congenital cystic diseases. *Kidney Int* 2005;68: 1944-7.
- Adalat S, Woolf AS, Johnstone KA, et al. HNF1B Mutations Associate with Hypomagnesemia and Renal Magnesium Wasting. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1123-31.
- Nakayama M, Nozu K, Goto Y, et al. HNF1B alterations associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol* 2010;25:1073-9.
- Heidet L, Decramer S, Pawtowski A, et al. Spectrum of HNF1B Mutations in a Large Cohort of Patients Who Harbor Renal Diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1079-90.
- Edghill EL, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1b and their related phenotypes. *J Med Genet* 2006;43:84-90.
- Han BK, Babcock DS. Sonographic measurements and appearance of normal kidneys in children. *AJR Am J Roentgenol.* 1985;145(3):611-6.
- Beards F, Frayling T, Bulman M, et al. Mutations in hepatocyte nuclear factor 1 beta are not a common cause of Maturity-onset Diabetes of the young in the UK. *Diabetes* 1998; 47:7.
- Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al. New Equations to Estimate GFR in Children with CKD. *Am Soc Nephrol.* 2009;20(3): 629-37.
- Ulinski T, Lescure S, Beauvils S, et al. Renal Phenotypes Related to Hepatocyte Nuclear Factor-1B (TCF2) Mutations in a Pediatric Cohort. *J Am Soc Nephrol* 2006;17: 497-503.
- Thomas R, Sanna-Cherchi S, Warady BA, Furth SL, Kaskel FJ, Gharavi AG. HNF1B and PAX2 mutations are a Common Cause of Renal Hypodysplasia in the CKiD Cohort. *Pediatr Nephrol* 2011; 26(6):897-903.
- Weber S, Moriniere V, Knüppel T, et al. Prevalence of Mutations in Renal Developmental Genes in Children with Renal Hypodysplasia: Results of the ESCAPE Study. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:2864-70.
- Song R, Yosypiv IV. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 353-64.