

¿El análisis de variaciones genéticas en tejido renal puede identificar las distintas formas de enfermedad renal crónica?

Qiu C, Huang S, Park J, Park Y, Ko YA, Seacock MJ, et al. Renal compartment-specific genetic variation analyses identify new pathways in chronic kidney disease. *Nat Med.* 2018;24:1721-31.

Análisis crítico: **Eliecer Coto**

Grupo de Investigación Cardiorrenal. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias. Oviedo

NefroPlus 2019;11(1):37-40

© 2019 Sociedad Española de Nefrología. Servicios de edición de Elsevier España S.L.U.

■ Objetivos

Identificar genes que se expresan de forma diferente en células aisladas del glomérulo y del túbulo renal. La desregulación de estos genes podría relacionarse con el desarrollo de la enfermedad renal crónica (ERC). Para verificar esta hipótesis se comparan los niveles de expresión de estos genes con los estudios de polimorfismos genéticos asociados al riesgo de ERC. Se trata así de superar la limitación de analizar el tejido renal total, que podría reducir la capacidad para identificar genes que se expresan de forma diferente en un compartimento renal y no en el otro.

■ Antecedentes e hipótesis

En los últimos años se han publicado varios estudios casos-controles para buscar polimorfismos del genoma asociados al riesgo de ERC. Para ello se comparan las frecuencias de los genotipos de miles de estos polimorfismos en series grandes de sujetos con y sin ERC, definiendo esta de forma heterogénea en su origen (nefropatía diabética, filtrado renal reducido, etc.). Estos estudios han identificado polimorfismos concretos asociados al riesgo de ERC con una confianza estadística muy alta, pero salvo algunas excepciones no se han podido relacionar esos cambios en la secuencia del ADN con diferencias en la función o expresión de genes concretos. La mayoría de estos estudios han comparado la expresión de genes a nivel del ARN mensajero —ARNm— (el transcriptoma) entre tejido renal de sujetos con genotipos diferentes.

En un estudio previo del transcriptoma de 96 muestras de tejido renal, los autores del trabajo comentado identificaron 5 genes entre un grupo de 83 polimorfismos asociados a la ERC según estudios previos de polimorfismos de todo el genoma (estudios GWAs, o *genome wide association studies*)¹. Entre estos genes cuya expresión parece estar desregulada en el tejido renal se hallaban *UMOD* y *SHROOM3*, también relacionados con la ERC mediante modelos animales. Para muchos polimorfismos relacionados con el riesgo de ERC, no se han po-

didado constatar diferencias de expresión en genes concretos analizando el tejido renal total. La capacidad para poder analizar qué genes se expresan en células aisladas lleva a los autores a poner a prueba la hipótesis de que en su origen la ERC podría no ser tanto una enfermedad específica de órgano como específica de célula. Así, las diferentes causas de ERC derivarían de células diferentes, por lo que un análisis del transcriptoma en tejido renal total tendría un potencial limitado para identificar genes desregulados en las distintas formas de ERC. En este sentido sería más efectivo investigar el transcriptoma de células concretas, como las del glomérulo o el túbulo.

■ Diseño y metodología

Estudio de 151 tejidos renales de sujetos sin enfermedad renal. No se especifica el origen de las muestras, aunque las características de los donantes se resumen en una tabla dentro del material suplementario², destacando que eran de origen europeo, menores de 60 años y con un filtrado glomerular medio por encima de 75 ml/min/1,72m². Se realizó una evaluación histológica rigurosa para asegurarse de que todos los tejidos no tenían alteraciones estructurales que podrían afectar a los resultados del estudio de expresión génica. Al mismo tiempo, la proporción de los diferentes tipos celulares sería similar entre todos los tejidos.

Se pudieron aislar células tubulares y glomerulares en 121 y 119 de las muestras empleando microdissección manual, que según los autores reduciría la heterogeneidad celular de los 2 compartimentos celulares; así se permitió caracterizar de forma más precisa el transcriptoma específico de cada uno.

Para cada muestra de células tubulares y glomerulares se secuenció su transcriptoma; es decir, se determinó el número de copias de todos los ARNm presentes en cada muestra, lo que daría una idea de la abundancia de cada uno en el grupo celular correspondiente.

Para todos los donantes se determinó el genotipo de polimorfismos repartidos por todo el genoma, siguiendo una aproximación experimental tipo GWAs.

*Revisión por expertos bajo la responsabilidad de la Sociedad Española de Nefrología.

A continuación se determinó si había algún grado de correlación entre los niveles de cada ARNm y los genotipos de las muestras procedentes de glomérulo y túbulo. Para cada polimorfismo se identificarían así genes expresados de forma diferente según el genotipo en los 2 compartimentos celulares.

■ Estadística

Test estadísticos para comparar niveles de expresión medios entre los diferentes grupos, bien entre genotipos de un polimorfismo concreto o bien entre células tubulares y glomerulares, entre otros el test de la t de Student.

■ RESULTADOS PRINCIPALES

En primer lugar se confirmó que algunos genes "característicos" del epitelio tubular renal estaban más expresados en las muestras aisladas del túbulo (p. ej., *SLC12A1* y *SLC34A1*). Por el contrario, genes ya conocidos como específicos de glomérulo se expresaban de forma casi exclusiva en las muestras de glomérulos.

Varios genes que se han relacionado con el riesgo de desarrollar síndrome nefrótico se expresaban de forma preferente en muestras de glomérulo, mientras que genes relacionados con tubulopatía proximal aparecen más expresados en las de los túbulos. Estos datos se pueden tomar como un control de calidad para validar el procedimiento empleado para aislar los 2 compartimentos celulares y la fiabilidad de análisis del transcriptoma.

En cuanto a la relación entre los polimorfismos genéticos y las diferencias en la expresión de genes, en las muestras del túbulo se identificaron 4.081 transcritos, cuyos niveles diferían para un total de 389.454 polimorfismos, frente a 4.081 genes para 389.454 polimorfismos en el glomérulo. Se debe tener en cuenta que varios polimorfismos pueden relacionarse con diferencias en la expresión de un mismo gen. Mediante un metaanálisis se pudieron definir 417 genes específicos del túbulo, 674 específicos del glomérulo y 3.493 compartidos entre las 2 localizaciones.

Si se comparan los resultados con los de estudios que relacionaron GWAs (polimorfismos repartidos por todo el genoma) con los niveles de expresión en tejido renal total, el análisis diferenciado de glomérulo y túbulo permitió identificar varios genes nuevos. Esto se debe a la asociación con los niveles de expresión en un compartimento, pero no en el otro. Como ejemplo, la expresión de *LRR3* difería entre los genotipos del polimorfismo rs2838917 en el túbulo, pero no en el glomérulo o en el tejido renal total. La situación opuesta se observó para el polimorfismo rs3068 y el gen *ANXA2* en el glomérulo.

A continuación, los autores analizan sus resultados comparándolos con los de los polimorfismos que se han asociado con el riesgo de ERC en varios estudios casos-controles que emplearon tecnología GWAs. Identifican un total de 32 genes con resultados concordantes. Para algunos hay pruebas de su papel en la ERC mediante modelos animales. De los 32 genes, solo en 5 podrían relacionarse los polimorfismos con cambios en el transcriptoma renal total, mientras que en los otros 27 habría diferencias entre los 2 compartimentos celulares. En este punto, los autores llegan a varias conclusiones.

- Polimorfismos que apuntaron a genes codificantes de proteínas reguladoras de varios metabolitos estarían asociados a diferencias en el transcriptoma tubular.
- Los genes con expresión diferencial en el túbulo son señalados por polimorfismos asociados a varias enfermedades renales, como la nefropatía IgA (inmunoglobulina A).
- La tasa de filtración glomerular mostraría un mayor grado de asociación con genes específicos de túbulo.
- Los genes específicos de glomérulo se relacionaban con polimorfismos asociados a la ERC, y también a la presión arterial.

En un estudio previo, los autores habían secuenciado el transcriptoma de células renales murinas aisladas (a escala de una sola célula) e identificaron 16 tipos celulares diferentes. Para refinar aún más su hipótesis de que la expresión diferencial de genes implicados en la enfermedad renal sería específica de célula, los autores determinan los niveles de los 27 genes específicos de túbulo o glomérulo en estos tipos celulares. Un total de 23 genes estarían expresados de forma preferente en células concretas, en lugar de en todos los tipos de células renales, con una abundancia de genes candidatos para la ERC en células epiteliales del túbulo proximal.

Finalmente, los autores fijan su atención en 2 genes concretos, *C9* (Complement C9) y *DAB2* (Disabled homolog 2). Un polimorfismo cercano a estos genes (rs11959928) se había asociado al riesgo de ERC en varios estudios GWAs, pero sin diferencias de expresión entre los genotipos cuando se analizó el transcriptoma de tejido renal total. Sin embargo, el polimorfismo de riesgo se asoció a mayores niveles de *DAB2* en el túbulo, pero no en el glomérulo. Más aún, al analizar los 16 tipos celulares renales, los autores concluyen que la expresión de *DAB2* está limitada a las células tubulares proximales y a los macrófagos. Para confirmar el papel de

DAB2, los autores crearon un ratón modificado genéticamente para reducir su expresión en el epitelio tubular, pero no observaron anomalías funcionales o histológicas en estos animales. Sin embargo, al inducir daño renal mediante ácido fólico, los ratones mostraron una reducción del ARNm de *DAB2* y un menor grado de expresión de marcadores de fibrosis al compararlos con ratones normales. Por tanto, este modelo animal confirmaría lo sugerido por el estudio del transcriptoma de los compartimentos renales, que relacionaba un polimorfismo con el riesgo de ERC a través de un incremento en la expresión de un gen concreto (*DAB2*) específicamente en el epitelio tubular.

¿Cómo se relaciona la expresión de *DAB2* con la fibrosis y la ERC? A través de análisis de células tubulares cultivadas, los autores muestran que una reducción de su expresión conlleva menores niveles de proteínas profibróticas inducidas por el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), lo que les lleva a concluir que *DAB2* es un gen que regula la actividad profibrótica del TGF- β en las células tubulares. Por tanto, un mecanismo genético que se asociase a diferencias en sus niveles de expresión (como el polimorfismo rs11959928) podría condicionar el riesgo de desarrollar ERC.

■ CONCLUSIONES DE LOS AUTORES

Los autores cuantifican los transcriptomas de células aisladas del glomérulo y del túbulo renal y lo comparan con polimorfismos de todo el genoma. Se trata de identificar qué polimorfismos muestran diferencias de expresión para genes concretos en cada compartimento celular. Esta aproximación supera la limitación de analizar tejido renal total, en la que se podría no identificar diferencias de expresión que sean específicas de compartimento.

Esta aproximación experimental les permitió identificar varios polimorfismos de riesgo para la ERC, que en algunos casos explicaba la relación entre los genotipos y la enfermedad a través de diferencias en la expresión en los compartimentos glomerular o tubular. Los estudios de tejido renal total no habrían aclarado la relación entre esos polimorfismos y genes concretos. Para validar su aproximación experimental, los autores se centran en un gen concreto, *DAB2*, y llegan a relacionar un polimorfismo asociado al riesgo de ERC con diferencias en la expresión en células del epitelio tubular. Asimismo demuestran en un modelo murino que la expresión de este gen condicionaría el nivel de fibrosis renal regulando la actividad del TGF- β .

■ CONCLUSIONES DEL REVISOR

Se trata de un estudio metodológicamente muy amplio y complejo, que parte de una hipótesis atractiva: las diferentes formas de ERC se podrían explicar por desregulación de genes en células específicas. Es decir, se tendría que hablar en su origen de enfermedades a nivel celular más que a nivel del órgano completo. Para demostrar la hipótesis analizan la expresión de genes en células diseccionadas del túbulo y del glomérulo, y relacionan las diferencias en los niveles de los ARN con varios polimorfismos que se han asociado al riesgo de enfermedad renal. A la luz de este estudio habría que reevaluar los patrones de expresión del genoma en todos los tipos de ERC, ya que en muchos casos se han identificado polimorfismos de riesgo para una forma concreta de la enfermedad, pero no se ha podido justificar su relación causal analizando tejido renal total. Quizás un análisis individualizado de los tipos celulares arrojaría luz al respecto.

Una limitación del estudio es que el tamaño muestral es limitado, con 121 y 119 muestras de los 2 compartimentos renales, por lo que, al analizar miles de polimorfismos del genoma, muchas de las diferencias de expresión entre los genotipos no serían reales. Los autores se centran solo en polimorfismos que se habían relacionado con la ERC en estudios previos, lo que incrementa la fiabilidad de que los genes finalmente candidatos estén realmente implicados en la ERC.

Una carencia del estudio sería la ausencia de una descripción de las características básicas de todos los donantes de las muestras de tejidos. Estos serían sujetos sin enfermedad renal manifiesta, pero se presentan como una tabla resumen en el material suplementario y con un valor medio de filtrado renal por encima de 60.

■ CLASIFICACIÓN

Tema: Enfermedad renal crónica

Subtema: Genómica funcional (transcriptómica)

Tipo de artículo: Investigación genómica básica, prueba de concepto

Palabras clave: Enfermedad renal crónica. Expresión génica. Túbulo renal. Glomérulo renal

NIVEL DE EVIDENCIA: Medio

GRADO DE RECOMENDACIÓN: Alto

Conflicto de intereses

El autor declara que no tiene conflictos de interés en relación con este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS RECOMENDADAS

1. Ko YA, Yi H, Qiu C, Huang S, Park J, Ledo N, et al. Genetic-Variation-Driven Gene-Expression Changes Highlight Genes with Important Functions for Kidney Disease. *Am J Hum Genet.* 2017;100:940-53.
2. Qiu C, Huang S, Park J, Park Y, Ko YA, Seacock MJ, et al. Renal compartment-specific genetic variation analyses identify new pathways in chronic kidney disease. *Nat Med.* 2018;24:1721-31.