DOI: https://doi.org/10.62954/zm7bdn22 Revista Mexicana de Investigación Médica Número 5 Mayo-Octubre pp 76-84
Recepción: 15/06/2026
Aceptado: 03/09/2026
Publicado en línea: 07/09/2026

ARTÍCULO ORIGINAL

ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE UNA REGIÓN CODIFICANTE DE APOL1 MEDIANTE RT-PCR EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS

STANDARDIZATION OF THE AMPLIFICATION OF A CODING REGION OF APOL1 BY RT-PCR IN HUMAN CELL LINES.

Susana A. Rodríguez Jiménez[a], Ericka V. Limón Moreno[b], Tania Estrada Jiménez[b], Daniela Rodríguez Flores[c], Lorena Milflores Flores[c], Dalia Molina Romero[c], Noe Velázquez Márquez[d], Lilia Sánchez Minutti[e], Amado I. Grandes Blanco[e], Oscar Castañeda Sánchez[f], Gerardo Santos López[g], Luis Márquez Domínguez[g*].

[a]Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Calle 13 sur 2702 Colonia Volcanes C.P 72410. Puebla Pue., México.

[b]Facultad de Medicina, Decanato de Ciencias de la Vida y de la Salud, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. Calle 21 sur 1103 Barrio Santiago C.P: 72410, Puebla Pue., México

[c]Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio, Edificio 112-A, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel C. P. 72570, Puebla, Pue. México.

[d]Escuela de Medicina, Universidad de la Salud del Estado de Puebla. Reforma 722 Colonia Centro C.P 72000, Puebla, Pue. México.

[e]Facultad de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Avenida Universidad Politécnica de Tlaxcala, No.1 San Pedro Xalcatzinco, C. P. 90180, Tepeyanco Tlaxcala, México.

[f]Hospital General de Zona No. 1. Instituto Mexicano del Seguro Social. Avenida Universidad s/n, Colonia Xicoténcatl, C.P. 90062, Tlaxcala,Tlax. México.

[g]Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social. Carretera Federal Atlixco-Metepec Km. 4.5. C.P. 74360. Metepec, Puebla, México.

***Autor de correspondencia:** lumardo80@gmail.com*

RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) representa un creciente problema de salud pública en México, donde su etiología involucra factores metabólicos, ambientales y genéticos. Entre estos últimos, las variantes del gen APOL1 se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar ERC en poblaciones con ascendencia africana; sin embargo, su caracterización en poblaciones latinoamericanas continúa siendo limitada. El objetivo de este estudio fue estandarizar una estrategia molecular basada en ARN mensajero de APOL1 para la amplificación de una región codificante de APOL1 que contiene las variantes de riesgo G1 y G2 y su caracterización mediante secuenciación Sanger. Se diseñó un par de oligonucleótidos dirigidos a una región codificante del exón 7 de APOL1, correspondiente al dominio IV de la proteína. Se optimizaron las condiciones de amplificación mediante RT-PCR utilizando ARN total obtenido de cuatro líneas celulares humanas, HaCaT, HeLa, SW-480, C33A, empleadas como modelo biológico para la estandarización técnica. Los amplicones obtenidos (203 pb) fueron analizados mediante secuenciación Sanger para verificar la identidad de la región amplificada.

La amplificación del fragmento esperado (203 pb) se obtuvo de manera reproducible en las líneas celulares evaluadas. La secuenciación confirmó la identidad del amplicón obtenido y los análisis bioinformáticos complementarios (BLASTN, Primer-BLAST, In-Silico PCR y dbSNP) respaldaron la evaluación de la especificidad del par de oligonucleótidos diseñados para la región blanco de APOL1. No se identificaron cambios nucleotídicos correspondientes a las variantes de riesgo G1 y G2 en las secuencias analizadas, resultado consistente con el modelo biológico utilizado.

Esta metodología constituye una aproximación analítica preliminar para la amplificación y caracterización molecular de una región de APOL1 que alberga las variantes de riesgo G1/G2 y proporciona una base metodológica para futuros estudios orientados a completar la validación analítica del método mediante la incorporación de controles positivos y muestras clínicas previamente caracterizadas.

Palabras Clave: *APOL1, enfermedad renal crónica, RT-PCR, variantes de riesgo.*

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) represents a growing public health concern in Mexico, where its etiology involves metabolic, environmental, and genetic factors. Among the latter, variants of the APOL1 gene have been associated with an increased risk of CKD in populations of African ancestry; however, their characterization in Latin American populations remains limited. The aim of this study was to standardize an mRNA-based molecular strategy for the amplification of a coding region of APOL1 containing the G1 and G2 risk variants and its characterization by Sanger sequencing. A pair of oligonucleotide primers targeting a coding region within exon 7 of APOL1, corresponding to protein domain IV, was designed. Amplification conditions were optimized by RT-PCR using total RNA extracted from four human cell lines (HaCaT, HeLa, SW-480, and C33A)w, which were employed as biological models for technical standardization. The resulting amplicons (203 bp) were analyzed by Sanger sequencing to verify the identity of the amplified region.

Reproducible amplification of the expected 203-bp fragment was achieved in all evaluated cell lines. Sanger sequencing confirmed the identity of the amplified product, while complementary bioinformatic analyses (BLASTN, Primer-BLAST, In-Silico PCR, and dbSNP) supported the *in silico* assessment of primer specificity for the target region of APOL1. No nucleotide changes corresponding to the G1 and G2 risk variants were identified in the analyzed sequences, a finding consistent with the biological model used.

This methodology constitutes a preliminary analytical approach for the amplification and molecular characterization of an APOL1 region harboring the G1/G2 risk variants and provides a methodological basis for future studies aimed at completing the analytical validation of the method through the incorporation of positive controls and previously characterized clinical samples.

Keywords: *APOL1, Chronic Kidney Disease, Risk Variants, RT-PCR.*

Esta obra está bajo Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la presencia de un filtrado glomerular (FG) menor a 60 ml/min/1.73 m^2, así como daño renal evidenciado por marcadores como albuminuria, alteraciones del sedimento urinario, desequilibrios hidroelectrolíticos o anormalidades estructurales detectadas por imagen o histología, persistentes durante más de tres meses[1,2]. En México, las principales causas reportadas de ERC incluyen diabetes mellitus (DM) 53%, hipertensión arterial sistémica (HAS) 35%, glomerulopatías 4%, además de formas idiopáticas y de probable origen genético[3]. A nivel mundial, en 2019 se reportó un estimado de 697.3 millones de casos de ERC y de 19 millones de casos incidentes. La tasa de incidencia se incrementó un 29.3% de 1990 a 2019[4]. En México, la ERC representa una carga creciente para el sistema de salud; se estima que más de 14.5 millones de personas viven con esta enfermedad y que para el 2030 aproximadamente 5,4 millones requerirán terapia de reemplazo renal (TRR) con el consecuente incremento en los costos de atención[4-7].

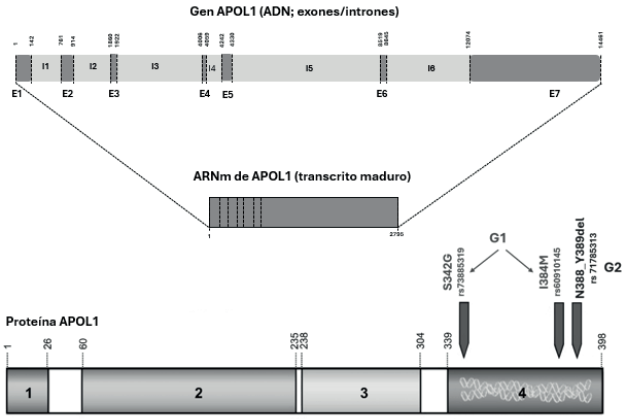
Existen factores de susceptibilidad como edad avanzada, historia familiar de ERC, masa renal disminuida, bajo peso al nacer, ascendencia africana y otras minorías étnicas, hipertensión arterial sistémica (HAS), diabetes mellitus (DM), obesidad y nivel socioeconómico bajo[8].

Entre los casos diagnosticados como "idiopáticos" existe una contribución genética. En este contexto, el gen APOL1 (apolipoproteína L1) ha cobrado relevancia. Esta proteína, parte esencial de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), participa tanto en la regulación del colesterol plasmático como en mecanismos de inmunidad innata, debido a su capacidad lítica frente a ciertos protozoos[9]. Se han descrito dos variantes de riesgo en el gen APOL1: G1, definida por las sustituciones S342G (rs73885319) e I384M (rs60910145), y G2 (rs71785313), correspondiente a una deleción de seis nucleótidos que ocasiona la pérdida de los aminoácidos N388 y Y389 (p.Asn388_Tyr389del), ambas ubicadas en el dominio IV de la proteína, figura 1. En contraste, el alelo Go representa la variante no asociada con riesgo. Las variantes de riesgo de APOL1 pueden encontrarse en individuos heterocigotos o homocigotos. Diversos estudios han demostrado una fuerte asociación entre las variantes G1 y G2 y la aparición de ERC, particularmente en individuos de ascendencia africana[10]. Además, en pacientes que ya presentan la ERC, la presencia de estas variantes de riesgo se ha vinculado con una progresión acelerada hacia estadios avanzados de la enfermedad, lo que incrementa la probabilidad de desarrollar complicaciones severas y reduce el tiempo hasta la falla renal terminal[11, 12].

Estudios recientes de genómica poblacional, como el Mexican Biobank (2023), han demostrado que la ascendencia africana presenta una distribución heterogénea en la población mexicana. En este contexto, las variantes de riesgo de APOL1 han sido identificadas previamente en individuos latinoamericanos mediante estudios de genómica poblacional, principalmente mediante plataformas de genotipificación y cohortes reclutadas en Estados Unidos[13]. Sin embargo, existe información limitada acerca de estrategias metodológicas dirigidas a la amplificación y caracterización molecular de regiones codificantes de APOL1 mediante aproximaciones complementarias.

Históricamente, la ascendencia africana fue incorporada como factor en el cálculo de la tasa de filtrado glomerular estimada (eGFR) [14]. No obstante, en 2021, la National Kidney Foundation y la American Society of Nephrology recomendaron eliminar el ajuste basado en raza debido a cuestionamientos sobre su validez biológica y su impacto en la equidad del acceso al diagnóstico y tratamiento[15,16]. La identificación de estas variantes se realiza convencionalmente mediante análisis de ADN genómico, considerado el estándar para estudios de genotipificación debido a su estabilidad e independencia del nivel de expresión génica[9,17].

No obstante, en el presente trabajo se empleó ARN mensajero como modelo para la estandarización analítica de la amplificación de una región codificante de APOL1 que contiene las variantes G1/G2. Debido a que ambas variantes se localizan dentro del mismo exón, el empleo de ARNm permitió establecer las condiciones para la amplificación de la región codificante de interés y verificar la identidad del amplicón obtenido mediante secuenciación Sanger[18,19]. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estandarizar una estrategia basada en RT-PCR para la amplificación de una región codificante de APOL1 que contiene las variantes de riesgo G1 y G2, utilizando líneas celulares humanas como modelo biológico y verificar la identidad del amplicón mediante secuenciación Sanger.



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 1. Representación esquemática del gen APOL1 y de la proteína codificada (isoforma de referencia NP_003652.2). En la parte superior se muestra la organización génica, indicando exones (cajas) e intrones (líneas), así como la región codificante correspondiente. En la parte inferior se presenta la estructura de la proteína y la organización de sus dominios funcionales. Los números (1–4) indican: (1) péptido señal (M1–R26), (2) dominio formador de poros (M60–W235), (3) dominio de direccionamiento de membrana (A238–P304) y (4) dominio de interacción con SRA (*Serum Resistance-Associated protein* por sus siglas en inglés) (A339–L398). Se muestran las posiciones de las variantes de riesgo: G1, definido por dos sustituciones no sinónimas rs73885319 (p.Ser342Gly) y rs60910145 (p.Ile384Met); y G2, correspondiente a la deleción rs71785313 (p.Asn388_Tyr389del). Las posiciones de los aminoácidos se indican con base en la secuencia de referencia. Estas variantes se localizan en el dominio C-terminal implicado en la interacción con SRA, asociado a la actividad tripanolítica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un par de oligonucleótidos dirigidos a amplificar una región codificante del exón 7 del gen APOL1 que abarca las variantes de riesgo G1 (rs73885319, rs60910145) y G2 (rs71785313) (Tabla I).

Previo al diseño de los oligonucleótidos, se realizó un alineamiento múltiple de más de 100 secuencias del transcrito de APOL1 disponibles en bases de datos públicas (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) para identificar regiones conservadas dentro del exón de interés. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando como referencia la secuencia del transcrito de APOL1 (NM_003661.4), con el objetivo de amplificar la región codificante correspondiente al exón 7 que contiene las variantes de riesgo G1/G2. El diseño se realizó mediante la herramienta Primer Design de la plataforma VectorBuilder v3.2.0-WIN considerando longitud del oligonucleótido, contenido de GC, temperatura de fusión (Tm) y minimización de estructuras secundarias. Posteriormente, el par de oligonucleótidos fue sometido a una evaluación bioinformática mediante BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) para evaluar la especificidad del alineamiento del par de oligonucleótidos frente al genoma humano; Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi) para confirmar el tamaño del amplicón esperado y descartar amplificaciones inespecíficas; In-Silico PCR del UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr), ensamblaje GRCh38/hg38, para corroborar la localización cromosómica del producto de amplificación; y la base de datos dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/) para verificar la ausencia de variantes reportadas dentro de las regiones de unión de ambos oligonucleótidos. Los resultados de estas evaluaciones se emplearon como evidencia complementaria para respaldar la selección del par de oligonucleótidos dirigido a la amplificación de la región blanco de APOL1.

Para la estandarización de la amplificación del transcrito de APOL1 se emplearon cuatro líneas celulares humanas:

1. HaCaT, queratinocitos epidermales humanos (ATCC PCS-200-11)[20].
2. HeLa, carcinoma cervical humano (ATCC CRM-CCL2)[21].
3. SW-480, adenocarcinoma colorrectal humano (ATCC CCL-228)[22].
4. C33A, carcinoma cervical humano HPV negativo[23].

Las líneas celulares utilizadas en este estudio (HaCaT, SW-480, C33A y HeLa) se encontraban disponibles en el laboratorio al momento del estudio. Algunas fueron adquiridas originalmente de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) y otras fueron obtenidas mediante donación de otros grupos de investigación. En todos los casos, las líneas celulares corresponden a cepas originalmente derivadas de ATCC. Las células fueron mantenidas bajo condiciones estándar de cultivo y se verificó su morfología característica durante el mantenimiento.

Las líneas celulares fueron empleadas exclusivamente como modelo biológico para la estandarización de los procesos de extracción de ARN, amplificación y verificación por secuenciación del fragmento de interés. No fueron utilizadas con fines de representatividad poblacional ni para evaluación funcional de APOL1. La selección de modelos celulares con expresión detectable del transcrito permitió evaluar la amplificación de la región codificante objetivo en distintos contextos celulares.

Las células se mantuvieron con medio DMEM 1X, suero fetal bovino (SFB) al 5-10% en una atmósfera de CO_2 al 5%. Cuando alcanzaron una confluencia de 80 – 100% se procedió a realizar la extracción de ARN total eliminando el sobrenadante y directamente a la monocapa celular se adicionó TRIzol™ (Cat.: 15596018, Invitrogen, Carlsbad, CA), método fenol-cloroformo. La concentración y pureza del ARN total se evaluó por espectrofotometría (NanoPhotometer® N60, IMPLEN), obteniéndose valores de concentración en ng/μl y una pureza con valores $A_{260/280}$ 1.7-1.9. La integridad del ARN total se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo condiciones no desnaturalizantes (TAE 0.5X a 100 V durante 50 min) como control preliminar de la calidad. El ARN total extraído fue tratado con DNasa I (Cat.: EN0521 ThermoFisher Scientific) para eliminar ADN genómico residual. El ARN total previamente tratado con DNasa I se utilizó para la síntesis del ADN complementario (ADNc) mediante el kit Revert Aid H Minus (Cat.: EP0451, ThermoFisher Scientific) empleando hexámeros aleatorios y siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante la síntesis de ADNc no se incluyó una reacción control sin transcriptasa reversa (-RT), por lo que la posible contribución de ADN genómico residual no fue evaluada de manera experimental durante esta etapa del estudio. Para estandarizar las condiciones de amplificación entre las diferentes muestras, el ARN total fue ajustado previamente a 500 ng/μl antes de la síntesis del ADNc, manteniéndose dentro del intervalo recomendado del fabricante (rango recomendado: 0.1 ng – 5 μg por reacción). Posteriormente, el ADNc obtenido se utilizó como molde para la reacción de PCR, empleando 2 μl del producto de retrotranscripción por reacción.

La amplificación de un segmento del dominio 4 de APOL1 se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados (APOL1-4 sentido y APOL1-4 antisentido) y el PCR Master Mix (Cat.: M7502, Promega) bajo las condiciones descritas en la tabla II. Inicialmente, las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μl para verificar la obtención del fragmento esperado. Para cada línea celular se realizaron dos experimentos independientes a partir de cultivos celulares distintos, incluyendo extracción independiente de ARN total, síntesis de ADNc y amplificación por PCR, con el fin de evaluar la reproducibilidad del procedimiento. Cada reacción incluyó ambos oligonucleótidos a una concentración de 10 μM, obteniendo una concentración final de 0.5 μM para cada oligonucleótido en la reacción. Una vez confirmada la amplificación del fragmento esperado, se realizaron tres reacciones adicionales de 30 μl manteniendo la misma concentración final de oligonucleótidos (0.5 μM

por reacción) para obtener cantidad suficiente de producto para purificación y secuenciación.

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% (TAE 0.5X, 100 V, 50 min). Se realizaron reacciones de PCR con un mayor volumen para obtener suficiente producto, el cual fue purificado a partir del gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Cat.:28704, QIAGEN). La concentración final se cuantificó nuevamente por espectrofotometría para su posterior secuenciación mediante el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon utilizando el software BioEdit 7.7.1 mediante la herramienta ClustalW Multiple Alignment para realizar el alineamiento múltiple[24]. Posteriormente, las secuencias se alinearon con la secuencia de referencia del transcrito de APOL1 (NM_003661.4) y con las secuencias de referencia correspondientes a los alelos G0, G1 y G2 para verificar la cobertura de las posiciones de rs73885319, rs60910145 y rs71785313. Adicionalmente, se inspeccionaron las posiciones de unión de ambos oligonucleótidos para confirmar la ausencia de variantes reportadas que pudieran interferir con la amplificación del fragmento de interés.

Tabla I. Características del par de oligonucleótidos diseñado para la amplificación de una región codificante del gen APOL1 que contiene las variantes de riesgo G1/G2.

Nombre	Tm °C	Tamaño del amplicón	Secuencia (5' → 3')	Longitud (nt)	GC (%)	Posición NM_003661.4
APOL 1-4 sentido	60.1	203 pb	GCAGAGGAGTCAAGCTCACGG	21	61.9	1095 - 1115
APOL 1-4 antisentido	59.8		TTCTTGGTCCGCCTGCAGAATC	22	54.5	1276 - 1297

Tabla II. Condiciones de retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la región codificante de APOL1 que contiene las variantes de riesgo.

PCR

Temperatura °C	Tiempo	# Ciclos
94°	2:00	1
94°	0:30	35
60°	0:30	
72°	1:00	
72°	5:00	1
4°	∞	

Retrotranscripción

Temperatura °C	Tiempo	# Ciclos
25°	5:00	1
42°	1:00:00	
72°	5:00	
4°	∞	

RESULTADOS

El análisis bioinformático del par de oligonucleótidos mostró resultados consistentes entre las herramientas empleadas. BLASTN evidenció el alineamiento de ambos oligonucleótidos con la región blanco del gen APOL1; Primer-BLAST predijo la obtención de un único amplicón del tamaño esperado (203 pb); el análisis mediante In-Silico PCR localizó el producto esperado en el cromosoma 22 (GRCh38/hg38); y la consulta en la base de datos dbSNP mostró ausencia de variantes reportadas dentro de las regiones de unión de ambos oligonucleótidos. En conjunto, estos resultados respaldaron la selección del par de oligonucleótidos para la amplificación de la región codificante de APOL1 evaluada en este estudio.

Posteriormente, se obtuvo la amplificación del fragmento esperado de 203 pb correspondiente a la región codificante de APOL1 en las cuatro líneas celulares humanas evaluadas (figura 2). En todos los casos se observó un único producto de amplificación del tamaño esperado y no se detectaron bandas adicionales bajo las condiciones experimentales evaluadas. Los productos amplificados fueron purificados y analizados mediante secuenciación Sanger. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia de referencia del transcrito de APOL1 (NM_003661.4) y se compararon con las secuencias de referencia correspondientes a los alelos G0, G1 y G2 para verificar la cobertura de las posiciones asociadas con las variantes de riesgo. El análisis de los cromatogramas y del alineamiento mostró conservación de la secuencia de referencia en las posiciones correspondientes a rs73885319, rs60910145 y rs71785313.

Para el análisis comparativo, las secuencias de referencia correspondientes a los alelos G1 y G2 se construyeron incorporando, respecto a la secuencia de referencia G0 (NM_003661.4), las sustituciones nucleotídicas rs73885319 y rs60910145 para G1, y la deleción rs71785313 para G2. No se identificaron las sustituciones nucleotídicas asociadas con G1 ni la deleción característica de G2 respecto a la secuencia de referencia en ninguna de las secuencias obtenidas de las cuatro líneas celulares analizadas (figura 3).

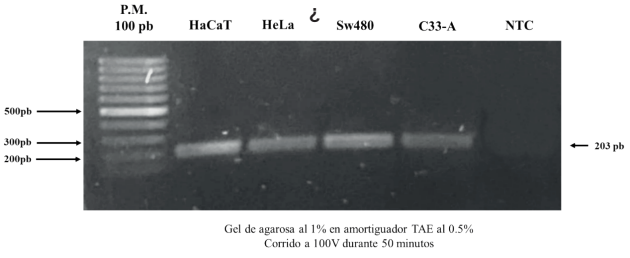


Figura 2. Amplificación por PCR del fragmento correspondiente al dominio IV del gen APOL1 en líneas celulares humanas. Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2–5: productos de amplificación obtenidos a partir de las líneas celulares evaluadas; NTC (No Template Control): control negativo, que contiene todos los reactivos de la PCR excepto ADNc. Se observa un único amplicón del tamaño esperado (203 pb), sin bandas adicionales visibles bajo las condiciones experimentales evaluadas.

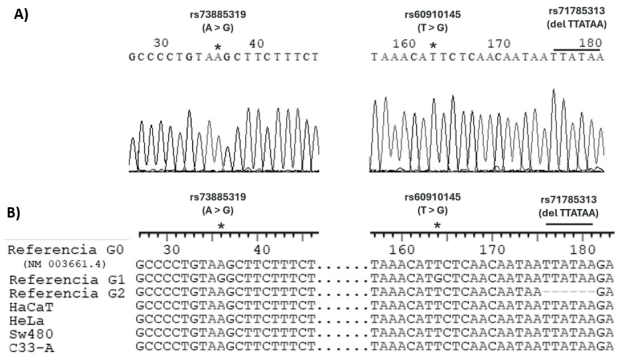


Figura 3. Confirmación por secuenciación Sanger de la región codificante de APOL1 que contiene las variantes de riesgo G1/G2. A) Cromatogramas representativos obtenidos de las secuencias de las líneas celulares humanas evaluadas. B) Alineamiento comparativo entre las secuencias obtenidas de las líneas celulares humanas y las secuencias de referencia correspondientes a los alelos G0, G1 y G2. Se indican las posiciones correspondientes a rs73885319 y rs60910145 (sustituciones que definen G1) y rs71785313 (deleción que define a G2). Las posiciones señaladas permitieron verificar la identidad del amplicón y corroborar que las secuencias obtenidas correspondieron a la secuencia de referencia y que no presentaron las variantes de riesgo analizadas. La numeración de nucleótidos se realizó con base en la secuencia de referencia del transcrito APOL1 (NM_003661.4).

DISCUSIÓN

La amplificación de la región codificante de APOL1 que contiene las variantes de riesgo G1/G2 en las cuatro líneas celulares humanas, junto con la validación bioinformática del par de oligonucleótidos y la confirmación del amplicón mediante secuenciación Sanger, respaldan la obtención del fragmento de interés bajo las condiciones experimentales evaluadas. En las secuencias obtenidas no se identificaron las sustituciones correspondientes a rs73885319, rs60910145 ni la deleción rs71785313, resultado consistente con el modelo biológico utilizado y con el objetivo del estudio.

La selección de esta región del gen APOL1 se fundamentó en su relevancia biológica, ya que las variantes G1 y G2 han sido ampliamente asociadas con susceptibilidad y progresión acelerada de enfermedad renal crónica en determinadas poblaciones. Estas variantes presentan una distribución

poblacional heterogénea y su frecuencia se ha relacionado principalmente con contribuciones variables de ascendencia africana. En México, estudios recientes de genómica poblacional como el Biobanco Mexicano (2023), que incluyó 6,057 individuos de 898 localidades rurales y urbanas en los 32 estados de México, demostraron una distribución diferencial de componentes ancestrales entre regiones. Este contexto resalta el interés de disponer de herramientas moleculares que permitan amplificar y caracterizar la región de APOL1 que contiene las variantes G1 y G2 en futuros estudios genéticos realizados en la población mexicana. Sin embargo, la composición genética individual no puede inferirse únicamente a partir del origen geográfico o demográfico[13]. El presente estudio no incluyó controles positivos previamente caracterizados para las variantes G1/G2 ni una reacción control sin transcriptasa reversa (-RT), por lo que no constituye una validación analítica completa ni permite establecer parámetros de desempeño diagnóstico como sensibilidad, especificidad o límites de detección. Aunque el tratamiento con DNasa I reduce la posibilidad de amplificación de ADN genómico residual, la ausencia del control de -RT impide descartar experimentalmente dicha contribución. No obstante, la secuenciación directa del amplicón permitió confirmar la identidad de la región amplificada y verificar la cobertura de las posiciones nucleotídicas de interés. Cabe destacar que incluso la línea celular HeLa, derivada de una mujer afroamericana, no presentó las variantes evaluadas, lo que es consistente con el hecho de que estos alelos no están universalmente presentes dentro de poblaciones con dicho componente ancestral[25].

La metodología desarrollada constituye una aproximación preliminar para la amplificación y caracterización molecular de una región codificante de APOL1 mediante RT-PCR y secuenciación Sanger. Estudios posteriores deberán incorporar controles positivos previamente caracterizados, controles sin transcriptasa reversa (-RT) y muestras clínicas previamente caracterizadas para completar la validación analítica del método y evaluar su utilidad en estudios poblacionales y asociación genética.

CONCLUSIONES

En este estudio se logró la estandarización preliminar de la amplificación de un fragmento del gen APOL1 que contiene las variantes de riesgo G1 y G2 mediante RT-PCR, así como la confirmación de la identidad del fragmento amplificado mediante secuenciación Sanger en líneas celulares humanas.

Los resultados obtenidos demostraron una amplificación reproducible del fragmento de interés, cuya identidad fue confirmada mediante secuenciación Sanger. La ausencia de las variantes de riesgo G1 y G2 en las secuencias obtenidas fue consistente con el modelo biológico utilizado y no debe interpretarse como evidencia del desempeño del método para la detección de variantes en muestras clínicas. La ausencia de controles positivos previamente caracterizados y de una reacción control sin transcriptasa reversa (-RT), así como el uso exclusivo de líneas celulares, limitan la validación analítica completa del procedimiento y no permiten establecer parámetros de desempeño como sensibilidad, especificidad o límites de detección. El presente trabajo constituye una aproximación metodológica preliminar para la amplificación y caracterización molecular de una región codificante de APOL1 y proporciona una base metodológica para futuros estudios que incorporen muestras clínicas previamente genotipificadas, controles positivos y controles sin transcriptasa reversa (-RT), con el fin de completar la validación analítica del método.

Agradecimientos

Agradecemos de manera especial el invaluable apoyo brindado por la Facultad de Medicina de la

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, la Facultad de Medicina y el Decanato de Ciencias de la Vida y de la Salud de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, la Escuela de Medicina de la Universidad de la Salud del Estado de Puebla, la Facultad de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el Hospital General de Zona No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS. Su colaboración y apoyo institucional fueron fundamentales para la realización de este estudio.

Financiamiento

El siguiente proyecto no contó con financiamiento.

Conflicto De Intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Contribuciones de autor (CRediT)

Curación de datos, análisis formal, investigación, visualización, redacción – borrador original: Susana A. Rodríguez Jiménez, Ericka V. Limón Moreno, Daniela Rodríguez Flores Administración del proyecto, recursos, supervisión, validación, visualización, redacción - borrador original: Tania Estrada Jiménez, Noe Velázquez Márquez, Lilia Sánchez Minutti, Gerardo Santos López, Lorena Milflores Flores, Dalia Molina Romero, Oscar Castañeda Sánchez Conceptualización, metodología, administración del proyecto, recursos, software, supervisión, validación, visualización, redacción - borrador original, redacción - revisión y edición: Amado I. Grandes Blanco, Luis Márquez Domínguez.

REFERENCIAS

Johnson HN, Prasad-Reddy L. Updates in chronic kidney disease. J Pharm Pract. 2024;37(6):1380-1390. https://doi.org/10.1177/08971900241262381.

Grams ME, Melamed ML. Chronic kidney disease. Ann Intern Med. 2025;178(9). https://doi.org/10.7326/ANNALS-25-02684.

Argaiz ER, Morales-Juárez L, Razo C, Ong L, Rafferty Q, Rincón-Pedrero R, et al. La carga de enfermedad renal crónica en México. Análisis de datos basado en el estudio Global Burden of Disease 2021. Gac Med Mex. 2023;159(6):501-508. https://doi.org/10.24875/GMM.23000393.

Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC). Prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica: guía de evidencias y recomendaciones. México: CENETEC; 2019. Disponible en: http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc

Cortés-Sanabria L, Álvarez-Santana G, Orozco-González CN, Soto-Molina H, Martínez-Ramírez HR, Cueto-Manzano AM. Impacto económico de la enfermedad renal crónica: perspectiva del Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2017;55(Suppl 2).

Stevens PE, Ahmed SB, Carrero JJ, Foster B, Francis A, Hall RK, et al. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int. 2024;105(4 Suppl). https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.10.018.

Abdissa D. Purposeful review to identify risk factors, epidemiology, clinical features, treatment and prevention of chronic kidney disease of unknown etiology. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2020;13:367-377. https://doi.org/10.2147/IJNRD.S283161.

Chen S, Chen L, Jiang H. Prognosis and risk factors of chronic kidney disease progression in patients with diabetic kidney disease and non-diabetic kidney disease: a prospective cohort CKD-ROUTE study. Ren Fail. 2022;44(1):1309-1318. https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2106872.

Friedman DJ, Pollak MR. APOL1 and kidney disease: from genetics to biology. Annu Rev Physiol. 2020;82:323-342. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034345.

Hopper T, Olabisi OA. APOL1-mediated kidney disease. JAMA. 2024;331(19):1668-1669. https://doi.org/10.1001/jama.2024.2667.

Kramer HJ, Stilp AM, Laurie CC, Reiner AP, Lash J, Daviglus ML, et al. African ancestry-specific alleles and kidney disease risk in Hispanics/Latinos. J Am Soc Nephrol. 2017;28(3):915-922. https://doi.org/10.1681/ASN.2016030357.

Pays E, Vanhollebeke B, Uzureau P, Lecordier L, Perez-Morga D. The molecular arms race between African trypanosomes and humans. Nat Rev Microbiol. 2014;12(8):575-584. https://doi.org/10.1038/nrmicro3298.

Sohail M, Palma-Martínez MJ, Chong AY, Quinto-Cortés CD, Barberena-Jonas C, Medina-Muñoz SG, et al. Mexican Biobank advances population and medical genomics of diverse ancestries. Nature. 2023;622(7984):775-783. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06560-0.

Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med. 2009;150(9):604-612. https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.

Delgado C, Baweja M, Burrows NR, Crews DC, Eneanya ND, Gadegbeku CA, et al. Reassessing the inclusion of race in diagnosing kidney diseases: an interim report from the NKF-ASN Task Force. Am J Kidney Dis. 2021;78(1):103-115. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2021.03.008.

Inker LA, Eneanya ND, Coresh J, Tighiouart H, Wang D, Sang Y, et al. New creatinine- and cystatin C-based equations to estimate GFR without race. N Engl J Med. 2021;385(19):1737-1749. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2102953.

Freedman BI, Limou S, Ma L, Kopp JB. APOL1-associated nephropathy: a key contributor to racial disparities in CKD. Am J Kidney Dis. 2018;72(5 Suppl 1). https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.06.020.

Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, et al. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. Science. 2010;329(5993):841-845. https://doi.org/10.1126/science.1193032.

Tzur S, Rosset S, Shemer R, Yudkovsky G, Selig S, Tarekegn A, et al. Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end-stage kidney disease risk previously attributed to MYH9. Hum Genet. 2010;128(3):345-350. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0861-0.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J Cell Biol. 1988;106(3):761-771. https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761.

Wildy P, Stoker M. Multiplication of solitary HeLa cells. Nature. 1958;181(4620):1407-1408. https://doi.org/10.1038/1811407a0.

Shi ZR, Tsao D, Kim YS. Subcellular distribution, synthesis, and release of carcinoembryonic antigen in cultured human colon adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. 1983;43(9):4045-4049.

Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV-negative human cervical carcinoma cell lines. Oncogene. 1991;6(5):873-875.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999;41:95-98.

Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stutz AM, et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. G3 (Bethesda). 2013;3(8):1213-1224. https://doi.org/10.1534/g3.113.005777.