

Polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1* como marcador en estadios tempranos de nefropatía en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2

rs2291166 TJP1 polymorphism as a marker in early stages of nephropathy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Sabina López Toledo¹, Perla M. Madrigal Ruiz², Luis J. Flores Alvarado², Carlos E. Cabrera Pivaral³, Nory O. Dávalos Rodríguez⁴, Sergio Alberto Ramírez García¹

RESUMEN

Objetivo: Analizar la asociación entre el polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1* con los niveles de glucosaminoglucanos (GAGS) excretados en orina como marcador de las primeras etapas de la nefropatía. **Material y métodos:** Se analizaron 600 muestras de orina de sujetos recién diagnosticados con diabetes tipo 2, de las cuales se incluyeron 203. La detección de GAGS en orina directa se realizó mediante prueba de turbidez de albúmina ácida y precipitación con cetilpiridinio (CPC). **Resultados:** El 26,64% de los pacientes diabéticos se encuentran en estadios tempranos de nefropatía, lo que corresponde a pacientes con prueba GAG positiva, siendo los que tienen mayor excreción de GAGS, heterocigotos para el polimorfismo. **Conclusión:** Sugerimos que el polimorfismo de *TJP1* rs2291166 influye en la mucopolisacariduria en pacientes diabéticos tipo 2 de la población mexicana; que podría usarse como un marcador genético/bioquímico válido para las primeras etapas de la nefropatía diabética.

PALABRAS CLAVE: heparán sulfato;

mucopolisacariduria; nefropatía; permeabilidad glomerular

ABSTRACT

Objective: To analyze the association between the polymorphism rs2291166 of *TJP1* gene, with the urine-excreted levels of GAGS as a marker of early stages of nephropathy. **Methods:** A 600 urine samples from newly diagnosed subjects with type 2 diabetes were analyzed, of which 203 were included. The GAGS detection in direct urine (corresponding to the first urine of the morning), was performed by albumin turbidity test and precipitation with cetylpyridinium (CPC). **Results:** The present study shows that 26.64% of diabetic patients are in early stages of nephropathy, corresponding to patients with a positive GAG test, being those with the highest GAGS excretion, heterozygous for the polymorphism. **Conclusion:** We suggest that the *TJP1* polymorphism rs2291166 influences mucopolysacchariduria in type 2 diabetic patients of the Mexican population, which could be used as a valid genetic/biochemical marker for the early stages of diabetic nephropathy.

Correspondencia:
Dr. S. A. Ramírez García
ORCID: 0000-0002-6343-9278
sergio7genetica@hotmail.com

Financiamiento:
Fundación Mexicana de Enfermedades Genéticas y Medicina Genómica, AC.

Conflicto de intereses:
Ninguno

Recibido: 08-01-2021
Corregido: 06/04/2021
Aceptado: 23-05-2021

- 1) Instituto de Nutrición, Universidad de la Sierra Sur, Sistema de Universidades Estatales de Oaxaca (SUNEO), Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México
- 2) Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Universidad de Guadalajara, Jalisco, México
- 3) Centro de Estudios en Salud, Población y Desarrollo Humano, Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Universidad de Guadalajara, Jalisco, México
- 4) Instituto de Genética Humana, Departamento de Biología molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

KEYWORDS: heparan sulfate; mucopolysacchariduria; nephropaty; glomerular permeability

INTRODUCCIÓN

La prevalencia mundial de diabetes mellitus tipo 2 en mayores de 18 años ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas, pasando del 4,7% (108 millones de personas) al 8,5% (422 millones) de 1980 a 2014, siendo más prevalente en los países con ingresos medianos y bajos.⁽¹⁾ Dichas cifras son alarmantes dado que este padecimiento ocasiona diversas complicaciones para la salud, una de las más prevalentes es la nefropatía o insuficiencia renal, pudiendo afectar a entre el 30-50% de la población diabética.⁽¹⁾ Se trata de una complicación microvascular que afecta ambos riñones y que se desarrolla en cinco estadios, de los cuales los tres primeros son subclínicos e incipientes, con lo que su diagnóstico se torna muy complicado al progresar silenciosamente. Durante los estadios 1 y 2 ocurre un aumento en la permeabilidad glomerular y la excreción de glucosaminoglicanos (GAGS) de la lámina basal del glomérulo (como el heparán sulfato). La pérdida de dichos GAGS aumenta la permeabilidad glomerular ocasionando la pérdida de la carga negativa y promoviendo el paso de proteínas, provocando la aparición de macro-proteinuria, estableciéndose un daño renal irreversible.⁽²⁾ Como ya se ha mencionado, esto es importante para la detección temprana de la nefropatía, ya que clínicamente es muy difícil o raro detectarlo en estadios iniciales, por lo cual es necesaria la propuesta de nuevos biomarcadores diagnósticos en la práctica clínica, como los de la barrera de filtración. La barrera de filtración glomerular esta situada entre la sangre y el espacio urinario, la conforman el endotelio vascular fenestrado de los capilares glomerulares, la membrana basal glomerular, la hendidura del poro y la zona entre los pedicelos de los podocitos (diafragmas). Entre el espacio endotelial y la lámina basal se forma una red de andamiaje entre proteínas como la colágena IV, entactina, fibronectina, actininas y los GAGS, todos ellos son moléculas con carga negativa capaz de evitar el paso de la mayoría de las proteínas plasmáticas y regulando el paso del agua, de pequeñas moléculas de soluto y de iones.⁽³⁻⁴⁾ De los GAGS el principal es el heparán sulfato (HS) que se encuentra en los proteoglicanos, principalmente en la decorina y el perlecano. La

arquitectura de la lámina basal está regulada por la enzima heparasa que se encarga del recambio de este GAG, manteniendo la arquitectura de la barrera de filtración. La pérdida del HS por actividad desregulada de esta enzima, conduce a proteinuria y a la nefropatía diabética.⁽³⁻⁴⁾

En el paciente diabético la pérdida del HS está asociada con la regulación positiva corriente arriba asociada a la hiperglucemia del gen *HPSE*, que codifica para la heparasa. Por otra parte, los podocitos encargados de sintetizar la membrana basal glomerular y formar los poros de filtración, expresan proteínas indispensables para el mantenimiento de la barrera de filtración junto con los procesos pedicelares interdigitados (pedicelos) y los diafragmas de hendidura. La superficie del podocito se divide en tres dominios y en cada uno existen proteínas fundamentales para la estabilidad de la arquitectura.⁽³⁻⁴⁾ En el dominio apical encontramos podocalixina, ezrina y el complejo NHERF-2; en el dominio del diafragma la nefrina y ZO1. A este nivel, también encontramos P-cadherina, neph-1, podocina, filtrina.⁽³⁻⁴⁾ El dominio basal y lateral de anclaje es el encargado de fijar al pedicelo a la membrana basal glomerular, y en él encontramos al distroglicano, la integrina $\alpha 3 \beta 1$, la megalina y las proteínas de las uniones estrechas como ZO1; la disrupción o disregulación de cualquiera de estas moléculas conduce a proteinuria, síndrome nefrótico así como insuficiencia renal.⁽³⁻⁴⁾ Destacando la función de ZO-1 en el diafragma de filtración entre los pies de los podocitos, ya que al perderse su interactómica, aumenta el espacio del diafragma entre los podocitos, lo que conduce al paso de proteínas a la luz tubular y de los GAGS de la membrana basal por la pérdida de las cargas negativas de la barrera, estableciéndose la micro y macro-proteinuria. ZO-1 es codificada por el gen *TJP1*, de la familia de genes de las uniones estrechas. Algunas variantes en este gen con *locus* en sitio crítico que regula la transcripción o SNV como el rs2291166 que conduce a cambio de aminoácido, pueden disminuir la expresión de ZO-1 o producir un cambio conformacional de la estructura cuaternaria, que con lleva a incrementar el espacio de los diafragmas, incrementado la excreción de GAGS desprendidos de la membrana basal, así como la pérdida de la carga negativa que conduce a la albuminuria y proteinuria en los diabéticos.⁽³⁻⁴⁾

En este tópic, tomando en cuenta las características fisiopatológicas de los primeros estadios de la enfermedad renal en el paciente diabético, llama la atención el factor genético, ya que la albuminuria se ha asociado a la variante SNV rs2291166 del gen *TJP1* en población mexicano-americana.⁽⁵⁾ Con estas consideraciones anteriores el objetivo principal del presente estudio fue analizar la asociación entre el polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1* con los niveles excretados de GAGS en orina como marcador temprano de nefropatía en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 600 muestras de orina de sujetos con diabetes mellitus tipo 2 recién diagnosticados, de los cuales se incluyeron sólo 203. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado. Los criterios de inclusión fueron tener un rango de edad entre 35-40 años, ser un paciente con valores negativos de proteinuria, presentar: creatinina <1,2 mg / dl, urea <33 mmol, glucemia entre 126-150 mg/dl, hemoglobina glucosilada entre el 6,5 y el 7,0% y consumir metformina 850 mg cada 12 horas. Este estudio forma parte del proyecto titulado: “Estudio de cribado poblacional para la identificación de factores de riesgo ambientales y genéticos, asociados al desarrollo de enfermedades complejas relacionadas con la nutrición en el occidente y sur de México”, registrado con los números IBM/DIF/2010-2012 (DIF-Jalisco) e IISSP/BAMM/03 (Universidad de la Sierra Sur/Oaxaca, México), aprobados por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad de conformidad con la Declaración de Helsinki y los principios del tratado de Belmont.

Extracción de glucosaminoglucanos (GAGS)

La detección de GAGS en orina directa (correspondiente a la primera orina de la mañana) se realizó prueba de turbidez de albúmina y la precipitación con cetilpiridinio (CPC) reportado por Pennock y modificado por Sánchez *et al.*⁽⁶⁻⁷⁾ La prueba de turbidez de albúmina ácida en orina se realizó agregando a 1ml de orina en un tubo de ensayo, 6 gotas de ácido clorhídrico al 5N, posteriormente 2 ml de albúmina ácida, se dejó reposar durante 10 minutos y se observó la turbidez (escala 0,+, ++, +++, +++++). La albúmina ácida se preparó al 22% en un amortiguador de acetato al 0,1M, pH3,75; se preparó a partir de dos soluciones;

la primera que con 1,15 ml de ácido acético glacial aforado a 100 ml y la segunda con acetato de sodio 0,2 M aforado a 100 ml, se tomaron 46,3 ml del primero, y luego se agregaron 3,7 ml del segundo, se ajustó a pH 3,75 con ácido clorhídrico aforando a 100 ml.⁽⁶⁻⁷⁾ Para el aislamiento de GAGS se preparó CPC al 5% V/V (escala 0,+, ++, +++, +++++). Se adicionó 1ml del reactivo a 4 ml de orina, se mezcló suavemente y se almacenó durante 18 horas a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante, y se adicionó al precipitado 1ml de agua estéril, se mezcló vigorosamente para adicionar 2 ml de solución de KCl al 75% P/V etanol, para lavar los precipitados de GAGS. Centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado por evaporación, para finalmente disolver en 100µl de agua.⁽⁶⁻⁷⁾

Análisis molecular

De la genoteca se tomaron alícuotas de ADN correspondientes las muestras de orina incluidas, para la reacción de amplificación PCR-PASA (reacción en cadena de la polimerasa alelo específico) para detectar el SNV rs2291166 de *TJP1*. Para ello se utilizaron los cebadores previamente reportados: 5'-CTTCATCTTCTTCAGGTT-3', 5'-ATATTCTTCATCTTCTTCAGG TG-3', 5'-GTCATTCATTATCTGTAGG-3' (Genosys Sigma-Aldrich). El programa de amplificación realizado en el termociclador Labnet MultiGene™, consistió en 30 ciclos: 95° C, durante 5 minutos de desnaturalización inicial a 95° C, posteriormente otros 30 segundos desnaturalización. La hibridación a 48° C, 45 segundos, así como la polimerización 72° C, 30 segundos, con una extensión final de 72° C, 5 minutos. La mezcla de reacción; Buffer KCl 2,5 µl, MgCl₂ 1,5 µl (25 mM), 0,5 µl de dNTP's (0,2 mM), 0,5 µl de cada iniciador, 2 µl de templado de ADN (200 ng), DNA Pol Taq 0,3 µl (Vivantis), reacción final 25 ml. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en poliacrilamida en la proporción 29:1 al 12%, con ulterior corrimiento electroforético con buffer TBE 1X por 3.5 horas a 200 volts, 80-84 mA. Los productos se diferenciaron por los tamaños; el de 102 bases corresponde al alelo T, mientras que el de 107 bases corresponde al alelo G, como se reportó previamente.⁽⁸⁾

La frecuencia de alelos y genotipos se estableció por conteo directo y se estratificaron los portadores

en base a la mucopolisacariduria. La asociación entre la mucopolisacariduria y el polimorfismo se validó mediante una prueba de X^2 de Pearson, considerando como significativo $p < 0,05$, para la razón de riesgo atribuible y la estimación de verosimilitud condicional. Se estimó el intervalo de confianza del 95%. Los cálculos se realizaron con el paquete estadístico OpenEpi (Estadísticas epidemiológicas de código abierto para Salud Pública, versión 3.01).

RESULTADOS

Se detectó un 26,64% de pacientes diabéticos

con nefropatía temprana, correspondiente a pacientes con prueba positiva por el test de la turbidez de la albúmina y del aislamiento mediante CPC (**Tabla 1**). El polimorfismo tiene un papel importante en la mucopolisacariduria, que se refleja en la fracción etiológica de la población, explica más del 50% de los casos. El presente estudio demuestra que los portadores heterocigotos presentan mayores valores de excreción de GAGS, validados por las dos pruebas (**Tabla 2**). Se obtuvo la estimación de máxima verosimilitud condicional del 19,95, Chi cuadrado 66,17, $p < 0,001$ (IC95% 8,728-48,99 con un riesgo atribuible de 9,22.

Tabla 1. Prueba de turbidez de la albúmina/Precipitación con CPC

Genotipo SNV rs2291166	++++	+++	++	+	Negativo
T/T	4	4	0	1	135
T/G	25	6	2	1	25
G/G	0	0	0	0	0
Grupo de estudio	Sujetos	Grupo de estudio	Sujetos	Total	%
Total de pruebas positivas para diabéticos con el genotipo T/G	N=34	Total de pruebas negativas para diabéticos con el genotipo T/G	N=25	N=59	29,07
Total de pruebas positivas para diabéticos con el genotipo no T/G (T/T+G/G)	N=9	Total de pruebas negativas para diabéticos con el genotipo no T/G (T/T+G/G)	N=135	N=144	70,93

Nota: escala de positividad para las pruebas de detección de GAGS urinarios en los diabéticos tipo 2 (escala 0, +, ++, +++, +++++). Se aprecia que los portadores heterocigotos para el SNVrs2291166 de TJP1 presentan valores más altos de excreción de GAGS (++++), que representa poco más de 16.7% de las muestras de orina analizadas (n=34). CPC=cloruro de cetilpiridinio. Interpretación de los genotipos (T/T, G/G= homocigotos; T/G=heterocigoto)

Tabla 2. Estimador basado en riesgo de diabéticos por genotipo/turbidez de albúmina/aislamiento por CPC

Estimador basado en riesgos	Valor	Intervalo de confianza
Riesgo en expuestos	57,63%	95% (44,93-69,39)
Riesgo en no expuestos	6,25%	95% (3,17-11,60)
Riesgo total	21,18%	95% (16,10-27,34)
Riesgo atribuible	9,22	95% (4,72-18,01)
Diferencia de riesgo	51,38%	95% (38,16-64,59)
Fracción etiológica en la población (EFP)	70,49%	95% (54,25-86,74)
Fracción etiológica en expuestos (EFE)	89,15%	95% (78,82-94,45)

Nota: El estimador como hallazgos principales muestra un riesgo incrementado de 9.2 veces para los diabéticos tipo 2 portadores heterocigotos del SNVrs2291166 con mucopolisacariduria, y una alta fracción etiológica atribuida a la población (>70%). CPC=cloruro de cetilpiridinio.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio a nivel mundial que muestra el efecto del polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1* sobre la mucopolisacariduria, lo

cual sugiere que podría ser un biomarcador para la detección temprana de nefropatía diabética y como pronóstico de la evolución del daño renal en el paciente con diabetes mellitus tipo 2,

considerando que en las etapas iniciales subclínicas de la nefropatía diabética existe un incremento en la excreción urinaria de GAGS, y cuya progresión se relaciona con la proteinuria por la pérdida de la carga negativa de los GAGS en la lámina basal del glomérulo.⁽²⁻⁴⁾ La idea de que el polimorfismo rs2291166 pueda estar asociado al riesgo de nefropatía diabética surge por los siguientes hechos: la albuminuria se ha asociado al SNV rs2291166 del gen *TJPI* en población México-americana y este polimorfismo, demostrado por estudios de DOCKING, conduce a cambio conformacional en ZO-1, por el cambio aspartato-alanina, lo que afecta la estructura cuaternaria de ZO-1 produciendo disrupción de las uniones estrechas en los diafragmas, incrementado la permeabilidad para GAGS, proteínas y otras moléculas.^(5, 8-9) Un efecto similar se puede ver por el polimorfismo rs2910164 en el gen para el microRNA146a, cuyo cambio nucleótido G/C conduce cambio conformacional del miRNA y se relaciona con una disminución de la expresión, el cual es importante porque regula genes del metabolismo y de la barrera de filtración.⁽¹⁰⁾ Además, dicha hipótesis se sostiene en el hecho de que en población coreana e hindú, se ha demostrado que el riesgo de presentar diabetes mellitus se ve incrementado o disminuido ante la expresión del polimorfismo rs2910164 para los portadores heterocigotos, lo que hace suponer que existen rutas metabólicas que pueden explicar la aparición y desarrollo de las complicaciones cardiovasculares asociadas, como la nefropatía diabética.⁽¹⁰⁾

En relación con las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs2291166 halladas en nuestro estudio son muy similares a las reportadas en otros estudios en población mestiza mexicana del occidente y con ancestría Chinanteca del sureste de México, sin embargo, en la población analizada no se encontraron genes homocigotos G(G/G), lo cual es muy frecuente para este marcador polimórfico como se ha reportado en otros estudios epidemiológicos y en el banco de SNPs.⁽¹¹⁻¹²⁾ En este sentido se ha postulado, que probablemente tenga un efecto de selección negativo y por lo tanto es inusual o poco común, por lo cual se propone que los pacientes con este genotipo ancestral desarrollen enfermedad renal terminal, por lo que será importante realizar un seguimiento continuo en sujetos de población general o diabéticos de reciente diagnóstico con este genotipo.

Finalmente el presente trabajo retoma a los GAGS como biomarcadores del daño renal de inicio temprano, lo que permitió detectar 26,64% de pacientes diabéticos de diagnóstico reciente con nefropatía temprana en estadio 1 y 2, previos a la micro albuminuria y macroalbuminuria (estadios 3 y 4), en este sentido es importante mencionar que entre mayor sea la hiperglucemia, mayor la expresión y actividad de heparanasa, lo que aumenta la excreción de GAGS urinarios, particularmente el HS, por lo cual es importante la detección urinaria tempranamente, ya que si progresa la mucopolisacariduria, aumentan los poros y tamaño de la lámina basal y diafragmas, favoreciendo la proteinuria.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ Por lo que a partir de los hallazgos, se propone incorporar la identificación cualitativa de GAGs (cribado de GAGs) en el laboratorio clínico de las unidades médicas de primer nivel de atención como una herramienta adicional por tratarse de un método simple, además de efectivo (por ejemplo las muestras de papel de filtro de orina seca), para la detección temprana de enfermedad renal en el diabético así como establecer la nefroprotección en estadios iniciales de la microangiopatía en el riñón.⁽¹⁶⁾

CONCLUSIÓN

En conclusión, el presente estudio muestra que el polimorfismo rs2291166 del gen *TJPI* influye en la mucopolisacariduria en pacientes diabéticos tipo 2, por lo que se sugiere que podría ser utilizado como un marcador genético/bioquímico válido para el tamiz temprano de enfermedad renal en estadios iniciales, junto con la detección de GAGS urinarios, sobre todo considerando los GAGS se excretan en el estadios 1 y 2 de la nefropatía diabética. Además, los métodos utilizados en el presente estudio son muy importantes, como los utilizados para la detección de GAGS urinarios, porque son sencillos de realizar en los laboratorios del primer nivel de las unidades médicas de atención de los ministerios de salud, lo cual en términos de salud pública es crucial porque permitiría detectar el daño renal en los primeros estadios para establecer la nefro-protección temprana. Sin embargo, dada la diversidad genética, la cual afecta la variabilidad metabólica, en futuros estudios será necesario ampliar los resultados en otras poblaciones mediante estudios epidemiológicos de réplica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Organización Mundial de la Salud. Notas Descriptivas, Diabetes [Internet]. Disponible en: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>> (consulta: junio 2020).
- 2) Ni WJ, Tang LQ, Wei W. Research progress in signalling pathway in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015;31(3):221-33. doi: 10.1002/dmrr.2568.
- 3) Rodríguez Fernández LM. Morfología y función renal. *Pediatr Integral.* 2013;17(6):433-40.
- 4) Arrizabalaga P. El diafragma de filtración glomerular. Orientación diagnóstica y terapéutica en el síndrome nefrótico. *Nefrología.* 2005;25(4):361-8.
- 5) Lehman DM, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Fowler S, Almasy L, et al. Evaluation of tight junction protein 1 encoding zona occludens 1 as a candidate gene for albuminuria in a Mexican American population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006;114(8):432-7. doi: 10.1055/s-2006-924328.
- 6) Sánchez-Corona J, Gallegos-Arreola MP, Contreras-Sánchez O. Determinación cualitativa y cuantitativa de glucosaminoglucanos urinarios en pacientes con osteocondrodisplasias. *Arch Invest Med (Mex).* 1990;21(4):353-6.
- 7) Ramírez-García SA, Charles-Niño C, Mazariegos-Rubí M, Topete-González LR, Topete-González R, Flores-Alvarado LJ, et al.; Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral de las Enfermedades Metabólicas e Infecciosas en población Mexicana. Asociación del gen ELMO1 (snp rs1345365) con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en población mestiza Mexicana. *Invest Clin.* 2015;56(4):341-55.
- 8) Ramírez-García SA, Flores-Alvarado LJ, Topete-González LR, Charles-Niño C, Mazariegos-Rubi M, Dávalos-Rodríguez NO; Multidisciplinary Group for the Integral Study of Metabolic and Infectious Diseases in Mexican Population. Alta frecuencia del alelo ancestral del polimorfismo rs2291166 de TJP1 en población mexicana, efecto conformacional así como las aplicaciones en cirugía y medicina. *Cir Cir.* 2016;84(1):28-36. doi: 10.1016/j.circir.2015.06.033.
- 9) Itoh M, Nakadate K, Horibata Y, Matsusaka T, Xu J, Hunziker W, et al. The structural and functional organization of the podocyte filtration slits is regulated by Tjp1/ZO-1. *PLoS One.* 2014;9(9):e106621. doi: 10.1371/journal.pone.0106621.
- 10) Gholami M, Asgarbeik S, Razi F, Esfahani EN, Zoughi M, Vahidi A, et al. Association of microRNA gene polymorphisms with Type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *J Res Med Sci.* 2020;25:56. doi: 10.4103/jrms.JRMS_751_19.
- 11) Madrigal P, Dávalos NO, Ramírez-García SA, Topete LR, Mazariegos MR, Flores LJ, et al. Polymorphism P.D1134a of the TJP1 in population with Zapotec ancestry. *Rev Méd MD.* 2015;7(1):2026.
- 12) Aguilar Aldrete ME, López-Toledo S, Caballero Avendaño A, Villa Ruano N, Navarro Hernández RE, Flores Alvarado LJ, et al. Association between nutritional risk markers and polymorphisms rs2291166 in TJP1 and VNTR (CAG)_n in ATXN2 in an obese adolescent Mexican population. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed).* 2021;68(2):99-108. doi: 10.1016/j.endinu.2020.02.008.
- 13) Ramírez-García SA, Carrillo C. Detección molecular de una variante en la secuencia del gen hps2 que codifica para el dominio del sitio activo de heparanasa y el desarrollo de insuficiencia renal en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Bioquímica.* 2009;34(S1):58.
- 14) Rops AL, van den Hoven MJ, Veldman BA, Salemink S, Vervoort G, Elving LD, et al. Urinary heparanase activity in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(7):2853-61. doi: 10.1093/ndt/gfr73
- 15) van der Vlag J, Buijsers B. Heparanase in kidney disease. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:647-667. doi: 10.1007/978-3-030-34521-1_26.
- 16) Civallero G, Bender F, Gomes A, Marasca G, Guidobono R, De Mari J, et al. Reliable detection of mucopolysacchariduria in dried-urine filter paper samples. *Clin Chim Acta.* 2013;415:334-6. doi: 10.1016/j.cca.2012.11.009.