



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ"

**“Expresión de las proteínas WT1, 1135, Tie2 y ZHX3 en las
diferentes variedades morfológicas de la Enfermedad de
Células Epiteliales Viscerales”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN:
NEFROLOGIA
PRESENTA:

DR. SENEN LOPEZ KRAULETZ

TUTOR DE TESIS
DRA. MARIA DEL CARMEN AVILA CASADO

ASESOR DE TESIS
DR. FRANCISCO EUGENIO RODRIGUEZ CASTELLANOS



MEXICO, D.F.

OCTUBRE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. FERNANDO GUADALAJARA BOO
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
“IGNACIO CHAVEZ”

DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
“IGNACIO CHAVEZ”

DRA. MARIA DEL CARMEN AVILA CASADO
TUTOR DE TESIS
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
“IGNACIO CHAVEZ”

DR. FRANCISCO EUGENIO RODRIGUEZ CASTELLANOS
ASESOR DE TESIS
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE NEFROLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
“IGNACIO CHAVEZ”

DR. SENEN LOPEZ KRAULETZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
“IGNACIO CHAVEZ”

INDICE

	Pág.
1. Introducción	1
2. Pregunta de investigación	19
3. Justificación	19
4. Planteamiento del problema	20
5. Objetivo	21
6. Hipótesis	21
7. Pacientes, Material y métodos	22
8. Resultados	32
9. Discusión	42
10. Conclusión	46
11. Bibliografía	48
12. Anexos	56

RESUMEN

EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS WT1, 1135, TIE2 Y ZHX3 EN LAS DIFERENTES VARIEDADES MORFOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD DE CÉLULAS EPITELIALES VISCERALES.

Ávila Casado MC., Rodríguez Castellanos F., López Kraúletz S.

Servicio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Introducción

El término gloméruloesclerosis focal y segmentaria (EFyS), englobada actualmente dentro del grupo de las enfermedades de células epiteliales viscerales (ECEV) no se refiere a una entidad única sino a un síndrome clínico y anatomopatológico, que tiene múltiples causas, mecanismos patogénicos y patrones de lesión histológica.

Objetivo

Determinar si el patrón de expresión de los marcadores celulares de diferenciación se asocia con cada uno de los subtipos histopatológicos de la enfermedad de células epiteliales viscerales y si dicho patrón de inmunohistoquímica permite también diferenciar la enfermedad de células epiteliales viscerales del tipo cambios mínimos (ECM) con las diferentes variedades de EFyS primaria.

Material y métodos

Se incluyeron 37 pacientes del servicio de nefrología y patología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” que estuvieron en protocolo de estudio por síndrome nefrótico y que además contaban con biopsia renal con diagnóstico compatible con EFyS primaria y ECM mediante microscopía de luz, además tejido fresco congelado para inmunohistoquímica para las proteínas WT1, Tie2, 1135 y ZHX3 como marcadores de diferenciación celular.

Resultados

Del total de pacientes incluidos, 14 correspondieron a la variante periférica (NOS), 8 a colapsante (GC), 6 enfermedad de cambios mínimos (ECM), 3 a la variante de la punta y 1 a celular. Se encontró diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de 1 vía con prueba de Bonferroni post-hoc) en cuanto a la depuración de creatinina entre la variedad colapsante y ECM, (30.63 ± 12.78 vs 80.00 ± 31.16 ml/min). Al analizar la expresión de las diferentes proteínas mediante inmunohistoquímica encontramos diferencia estadísticamente significativa entre las siguientes: NOS vs GC, punta vs GC, ECM vs GC, ECM vs NOS, ECM vs punta al analizar WT1. En el análisis de Tie2 mostró diferencia significativa entre NOS y punta, NOS vs ECM, GC vs punta, GC vs ECM. En relación con la proteína 1135 hubo diferencia significativa entre NOS y GC, NOS vs ECM, punta vs GC, punta vs ECM, y ECM vs GC. Finalmente la expresión de la proteína ZHX3 mostró diferencia significativa entre NOS y GC, punta vs GC, ECM vs GC. Empleando un análisis de función discriminante encontramos que el modelo que incluye a las proteínas WT1 y 1135 fue el más adecuado para poder clasificar los casos analizados y poder discriminar entre casos nuevos (Lambda de Wilks 0.012, X^2 120.489, $p=0.000$). Usando el procedimiento de clasificación con validación cruzada encontramos una correcta clasificación de los casos en el 87.1 %.

Conclusión

Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los inmunomarcadores estudiados entre las diferentes variedades de ECEV, teniendo la expresión de las proteínas WT1 y 1135 la capacidad de predecir la pertenencia a algunas de las variantes de ECEV.

INTRODUCCIÓN.

El término gloméruloesclerosis focal y segmentaria (EFyS) no se refiere a una entidad única sino a un síndrome clínico y anatomopatológico, que tiene múltiples causas, mecanismos patogénicos y patrones de lesión histológica. La característica clínica omnipresente de este síndrome es la proteinuria, que puede ser en rangos nefróticos o no nefróticos y el dato anatomopatológico constante es la consolidación y cicatrización glomerular segmentaria y focal.¹

La primera imagen de la gloméruloesclerosis focal y segmentaria se encuentra publicada por Fahr en un atlas, titulada nefrosis lipoidea con degeneración. Se describió como una entidad clínico- patológica por Rich en 1957, con distribución predilecta de las lesiones esclerosantes segmentarias en el glomérulo yuxttaglomerular.

Estableció varios sinónimos como: gloméruloesclerosis con hialinosis focal y segmentaria, glomerulonefritis esclerosante focal, glomerulopatía esclerosante focal.²

El abordaje diagnóstico para la EFyS primaria es problemática porque el rasgo morfológico no es específico y puede ocurrir en una gran variedad de otras condiciones superimpuestas a otras enfermedades glomerulares, aunado a ello las diferencias en las cinco variedades descritas, la diferenciación con la forma secundaria se basa más en contexto clínico y la asociación y el reconocimiento de asociaciones etiológicas, incluyendo virus de la inmunodeficiencia primaria, asociado a nefropatía por heroína, formas familiares, toxicidad por drogas, y un gran grupo de

forma secundaria mediada por la adaptación estructural y funcional de las nefronas a la hiperfiltración glomerular.^{1,3}

Actualmente la EFyS forma parte de variantes morfológicas que incluyen a las enfermedades de células epiteliales viscerales y se caracteriza por la presencia de proteínuria, comúnmente en rango nefrótico. Estos cambios estructurales y funcionales son adaptaciones mediadas por vasodilatación intrarenal e incremento de la presión del capilar glomerular y del flujo plasmático. Los cambios hemodinámicos son secundarios a la reducción del número de nefronas funcionantes por agenesia renal, ablación quirúrgica, oligomeganefronia y enfermedades renales primarias crónicas, estos como otros mecanismos de estrés hemodinámico en la población de nefronas inicialmente normales, como se observa en obesidad y cardiopatías congénitas. Clásicamente las anormalidades anatomopatológicas afectan solo algún glomérulo (focal) con sólo una porción del penacho glomerular (segmentaria). Esta lesión histológica es producida por obliteración segmentaria del capilar glomerular con incremento de los depósitos de la matriz mesangial, depósitos hialinos intracapilares, subendoteliales (engrosamiento de la pared vascular), atrofia tubular e intersticial, infiltrado inflamatorio y sinequias focales. Además, por inmunofluorescencia es posible localizar depósitos de IgM y C3 en un patrón granular (hialinosis). Todos estos datos morfológicos se han empleado en un intento para establecer el diagnostico de certeza, debido a la limitante del diagnostico.⁴

Para establecer el diagnostico se requiere una muestra representativa que incluya glomérulos de la zona yuxtaglomerular. Con 10 glomérulos existe 65% de probabilidad de establecer un diagnostico y con 20 glomérulos aumenta hasta el 88%.

La propuesta de trabajo de la reunión de patología renal publicada en febrero del 2004 en el *American Journal of Kidney Diseases*, respeta la clasificación establecida por el consenso de patólogos en la universidad de Columbia, NY en noviembre del 2000, solo exceptuando la enfermedad de cambios mínimos. La gloméruloesclerosis focal y segmentaria primaria, se clasifican 5 variantes morfológicas, la glomérulo esclerosis focal y segmentaria inespecífica o periférica (NOS), la variante hilar, celular, de la punta y colapsante, cada una con diferente pronóstico e implicaciones clínicas.¹

De acuerdo a Habib y cols. los resultados observados en la biopsia renal quizás varían de acuerdo a los diferentes estadios de la enfermedad, es decir cambios mínimos y FSGS, así como proliferación mesangial podrán verse solos o en combinación en especímenes de biopsias subsecuentes de un mismo paciente. Ante esta situación nuevas técnicas en la evaluación del tejido biopsiado podrían dilucidar la relación entre las variantes histológicas observadas en el síndrome nefrótico primario. Aunado a técnicas como análisis morfométrico y escaneo con microscopia electrónica,^{5,6,7} se propone inmunohistoquímica de diferentes proteínas que forman parte del diafragma de filtración y que están implicadas en el funcionamiento normal de los podocitos.

Las variantes morfológicas tienen criterios positivos y negativos para su diagnóstico. Para la NOS los criterios positivos son: por lo menos un glomérulo con incremento segmentario de la matriz que oblitera la luz del capilar, puede haber colapso de la membrana basal glomerular (MBG) segmentaria sin hiperplasia de los podocitos. Los criterios negativos son exclusión de las otras variantes, esta constituye la lesión genérica de FSGS. La variante perihiliar requiere de al menos un glomérulo con hialinosis perihiliar, con o sin esclerosis, que involucre mas del 50% de la

gloméruloesclerosis segmentaria, con exclusión de la variante celular, de la punta y de la colapsante. En la variante celular es necesario por lo menos un glomérulo con hiper celularidad endocapilar segmentaria, que ocluye la luz con o sin células espumosas y cariorexis, así como exclusión de la variante de la punta y la colapsante. En la variante de la punta los criterios positivos son por lo menos una lesión segmentaria que involucra la punta, es decir menos del 25% del penacho glomerular cercano al origen del túbulo contorneado proximal. El polo del túbulo puede ser identificado en la lesión definitiva. La lesión puede tener adhesión o confluencia de los podocitos en las células tubulares y parietales a la luz tubular ó a la porción inicial del túbulo contorneado proximal. La lesión puede ser celular o esclerosante. Los criterios negativos son exclusión de la variante colapsante. Para la variante colapsante se requiere de por lo menos un glomérulo con colapso segmentario o global e hiperplasia o hipertrofia de los podocitos y no tiene criterios de exclusión. ⁸ **Fig. 1**

De acuerdo a los datos con los que actualmente contamos en donde se ha evaluado el comportamiento clínico de las distintas variedades, encontramos que la EFyS NOS ó periférica los pacientes tienen parámetros intermedios respecto a las otras variantes, y se asemeja más a la variante perihiliar. La frecuencia de asociación con hipertensión es cercana al 80%, síndrome nefrótico 67%, la remisión completa es baja y la sobrevida renal a 3 años oscila entre 50-60%. Algunos autores coinciden que puede ser una fase avanzada de las otras variantes y la proteínuria marca la pauta de la evolución. En la EFyS perihiliar la frecuencia del síndrome nefrótico es baja 55%, la hipertensión en un 80%, habitualmente no existe deterioro de la función renal, sin embargo tiene baja remisión tanto parcial como total, con una sobrevida renal de 75% a 3 años. La EFyS celular comúnmente se presenta con proteínuria mayor a 3g/día,

tiene inicio abrupto, síndrome nefrótico en un 70%, tiende a tener buena respuesta al tratamiento inmunosupresor, esto quizás relacionado a una etapa temprana de la enfermedad y en biopsias repetidas se ha mostrado evolución a FSGS periférica. La variedad de la punta generalmente se presenta con síndrome nefrótico severo con proteinuria que alcanza 9-10g/día, hipoalbuminemia menor 2.5g/día, función renal conservada, alto índice de remisión, adecuada respuesta a esteroides, supervivencia renal a 5 años alrededor del 80%. La EFyS colapsante que si bien se ha descrito con mayor predilección en afroamericanos, en hispanoamericanos también es frecuente. La presentación a menudo es con síndrome nefrótico severo, con proteinuria mayor a 10 g/día, se asocia en la mayoría de los casos con deterioro de función renal, pobre respuesta a tratamiento y la supervivencia renal a 3 años es de tan solo 33%.^{9,10} La frecuencia con la cual se presentan las variedades es la siguiente: El primer lugar lo ocupa la variante periférica (NOS) con un 42% de acuerdo a la publicación de JC Jennete, seguido por la variedad perihilar 26%, punta 17%, colapsante 11 y 3% celular. Datos similares encontramos en México (INCICH) en un análisis retrospectivo de 1984 a 2004, donde mostramos una prevalencia de EFyS del 7%. NOS ocupó 55%, perihilar 16%, colapsante 14,2%, punta 11%, 6% celular, (datos aun no publicados) mostrando gran similitud con los hallazgos antes referidos.^{9,10} **Fig. 2, 3 y**

tabla 1

Respecto a la microscopia electrónica el epitelio muestra células podocíticas, que están íntimamente relacionadas con el rango de proteinuria. Estos podocitos se adhieren a la MBG por uniones interdigitantes $\alpha 3\beta 1$ integrina, su citoesqueleto es rico en actina (sinaptopodina), tubulina y citoqueratina. Hay podocalixina y GLEPP-1 en la superficie apical y en sus vacuolas se encuentran con gp330 mesalina (antígeno de

Heymann).¹¹ Los depósitos electrodensos granulares paramesangiales y subendoteliales pueden ser observados.

La patogénesis de la EFyS primaria es desconocida, al parecer existe una relación entre factores de permeabilidad circulantes, posiblemente linfocinas o citoquinas, que son las sustancias iniciadoras de la lesión celular del epitelio glomerular, lo que produce cicatrización segmentaria y posteriormente disfunción glomerular.¹²

Otros mecanismos que juegan un papel en el cambio del mesangio son las propias células mesangiales que producen un factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial, tromboxanos, prostaciclina así como factor de crecimiento transformante β (TGF- β) los cuales están íntimamente relacionados con angiotensina II (ANG II).¹³

Otro mecanismo a través del cual ANG II tiene un rol en la patogénesis es mediante la activación del inhibidor del activador de plasminogeno-1 (PAI-1). Dos sistemas de proteasas están involucradas en la degradación de fibrina y de la matriz glomerular: el sistema de plasmina y el sistema de metaloproteasas (MMP). Este activador del plasminogeno convierte el plasminógeno en plasmina, una proteasa que promueve la degradación de la matriz extracelular, por lo que se provoca su acumulación.¹⁴

Dos mecanismos de crecimiento autocrino han sido definidos:

1.- A través de interleucina 1 (IL-1). Las células mesangiales en cultivo secretan factores de crecimiento de células mesangiales, con características idénticas a la IL-1.

La IL-1 estimula a las células mesangiales para la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y actividad de la colagenasa tipo IV, quizás mediante la activación de la proteincinasa C.^{15,16}

2.- A través de interleucina 6 (IL-6). Esta IL estimula el crecimiento de las células mesangiales inVitro. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) incrementa la secreción de proteoglicanos por las células mesangiales cultivadas.¹⁷ La expresión de TGF- β , por los glomérulos cultivados, correlaciona con la severidad de la enfermedad en modelos animales, la cual se caracteriza por incremento en la síntesis de la matriz glomerular.

Los tromboxanos que son producidos por células glomerulares activadas estimulan la síntesis de laminina, fibronectina y colágeno tipo IV. Este efecto es independiente del efecto estimulador de la división celular.¹⁸

El papel de la patogénesis por infecciones virales se encuentra en estudio, sin embargo se han relacionado con esta patología al virus de la inmunodeficiencia humana y parvovirus B-19. Este último se encontró hasta en un 80% de los pacientes con FSGS idiopática, 90% con diagnóstico de glomerulopatía colapsante y un 54% con otras alteraciones.^{19,20} También se ha relacionado con el virus Simian 40, el cual se aplicó a través de vacunación en el año de 1963.²¹

Diversos componentes de la barrera de filtración glomerular han sido descubiertos. El primer marcador del segmento extracelular del diafragma de filtración (SD) fue el

anticuerpo monoclonal (Mab) 5-1-6 el cual al ser inyectado en ratas indujo proteinuria masiva en ausencia de borramiento significativo de los procesos podocíticos. Subsecuentemente fue localizada la zónula ocludens -1 (ZO-1) en un segmento citoplasmático del SD. Recientemente y utilizando los avances genéticos, llegamos a la era de la nefrina mediante el gen que lo codifica NPHS1 y consecutivamente se describieron otras proteínas como CD2AP, α -actina-4, podocina, el gen supresor del tumor de Wilm's (WT1), Neph 1, FAT 1 y P cadherina.²²

El gen (NPHS1) codifica a la nefrina, la cual es una proteína de 1241 aminoácidos miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas se expresa en riñón, cerebro y páncreas.^{22,23}

La nefrina se localiza específicamente en la hendidura diafragmática del podocito glomerular.²⁴ La inactivación del gen de nefrina en ratones produce proteinuria y muerte neonatal.²⁵ En humanos la mutación de este gen ha sido identificado en el síndrome nefrótico congénito tipo Finlandés y la expresión de la nefrina no se ha documentado en enfermedades renales pediátricas adquiridas, incluyendo cambios mínimos y esclerosis global y segmentaria.²⁶

La Podocina humana es una proteína de la membrana que contiene 383 aminoácidos, se ha encontrado que se expresa exclusivamente en podocitos, forma parte de la familia de las estomatinas muestra interacción in vivo con la nefrina y la CD2AP, un ligando citoplasmático asociado a la nefrina.^{27,28} La podocina se encuentra codificada por el gen NPHS2. La mutación de NPHS2 la cual se localiza sobre 1q25-q31, causa el síndrome nefrótico autosómico recesivo resistente a esteroides,²⁹ enfermedad que inicia entre 3 meses y 5 años de edad, con rápida progresión a insuficiencia renal

crónica terminal, observándose como una enfermedad de cambios mínimos (ECM) en la etapa inicial con cambios de EFyS en estadios tardíos.^{27,31}

CD2AP es una proteína de 639 aminoácidos, que interactúa con la nefrina de los podocitos y también interactúa directamente con el citoesqueleto de actina.³¹ En el riñón se expresa en podocitos, túbulo proximal y colector.³² En humanos no se han documentado mutaciones. En ratones produce síndrome nefrótico congénito y muerte por insuficiencia renal crónica.³³

ACTN4 es 1 de los 4 genes de actinina que codifican para una proteína que cruza para ligar actina la cual se expresa en gran cantidad en los podocitos. Se ha postulado que la α -actina-4 participa en la regulación del citoesqueleto del podocito y en el movimiento celular. Para conocer la función exacta de α -actina-4 en el riñón se requiere de futuras investigaciones. Típicamente se ha descrito mutaciones en el gen ACTN-4 dentro del exón 8 los cuales han sido identificadas recientemente en familias con formas autosómicas dominantes de EFyS. Esta varía en la edad de inicio, la severidad y la progresión a IRCT.^{34,35}

El producto del gen supresor del tumor de Wilm's WT1 se expresa principalmente en los podocitos. Mutaciones en el intrón 9 de este gen han sido reportadas en el síndrome de Frasier (EFyS, pseudohermafroditismo XY, gonadoblastoma), sin embargo rara vez están asociadas con EFyS primaria resistente a esteroides.³⁶ El producto del gen supresor del tumor de Wilm's (WT1) es un regulador esencial en el desarrollo del riñón, pero quizás tiene un papel crucial en mantener la diferenciación fenotípica del podocito y en reprimir la proliferación de estos podocitos.³⁷ La WT1 generalmente se expresa débilmente en todas las células glomerulares progenitoras, pero incrementa su expresión en los podocitos de los glomérulos maduros.³⁸ Cuatro reportes han

documentado la pérdida de la expresión de la WT1 en áreas de esclerosis glomerular, tanto en formas colapsante y no colapsante de esclerosis focal y segmentaria, pero no en la nefropatía de cambios mínimos.^{38,39,40}

La alteración de la expresión de la WT1 en focal y segmentaria puede tener un papel permisivo en revertir a los podocitos a un fenotipo de proliferación inmadura.

La sinaptopodina es una proteína asociada a actina que se expresa en los procesos podocíticos del podocito maduro y en los dendritos teleencefálicos que quizás modulan la motilidad y la forma del proceso podocítico.⁴¹

Durante el desarrollo renal la expresión de la sinaptopodina aparece principalmente en el asa capilar, concomitantemente con la formación de los procesos podocíticos. Se han publicado estudios que han demostrado que la expresión de sinaptopodina puede estar alterada en la enfermedad glomerular. Kemeny y cols.⁴² fueron los primeros en establecer la pérdida de la expresión de la sinaptopodina en pacientes con gloméruloesclerosis focal y segmentaria. Este hallazgo fue confirmado en un estudio de 13 niños con EFyS, en los cuales la expresión de sinaptopodina estuvo ausente en áreas de esclerosis y con una tinción débil en glomérulos no escleróticos.⁴³ Estos investigadores han demostrado que la disminución progresiva de la expresión de la sinaptopodina, se asocia con un aumento de la severidad del síndrome nefrótico.

En otro estudio que incluyó a 10 pacientes con gloméruloesclerosis focal y segmentaria idiopática colapsante, se demostró que existía pérdida importante de sinaptopodina, así como de otros marcadores en todos los glomérulos con esclerosis colapsante. Más interesante es la expresión de sinaptopodina, la cual se encuentra disminuída en los podocitos de los glomérulos remanentes no colapsados lo que sugiere

que esta alteración antecede al colapso glomerular.³⁸ Estos datos sugieren que el análisis cuantitativo de la expresión de sinaptopodina puede ser un predictor útil del grado de lesión del podocito.

La proteína epitelial glomerular- 1 (GLEPP-1) es una proteína receptora de tirosin-fosfatasa, expresada en las etapas iniciales del desarrollo del podocito; que se localiza en la superficie apical de los podocitos maduros.⁴⁴ La señal de transducción a través GLEPP-1 quizás tiene un rol en la regulación del podocito tanto en su estructura como en su función. La pérdida de la expresión de GLEPP-1 ha sido documentada tanto en formas de gloméruloesclerosis focal segmentaria colapsante como no colapsante, pero no en la nefropatía de cambios mínimos.^{40,45} La ausencia de GLEPP-1 ha sido evidente incluso en glomérulos no esclerosados, sugiriendo una disminución en la regulación de GLEPP-1, lo cual quizás puede preceder a un proceso de cicatrización.⁴⁰ GLEPP-1 puede representar un marcador fenotípico útil en la gloméruloesclerosis focal y segmentaria.

La podocalixina es la mayor sialoproteína sobre la superficie apical del podocito, la cual contribuye a la permeabilidad y selectividad glomerular así como a la arquitectura de los procesos podocíticos.^{46,47} La expresión de la podocalixina durante la glomerulogénesis coincide con la aparición de la hendiduras de filtración. En la gloméruloesclerosis focal y segmentaria colapsante, la expresión de podocalixina esta perdida de las áreas colapsadas de los podocitos, pero esta bien preservada en las células endoteliales, indicando que esta lesión del podocito es selectiva.³⁸ La expresión de podocalixina esta preservada en la enfermedad de cambios mínimos. El rol potencial

de la podocalixina en la glomerulosclerosis focal y segmentaria no colapsante esta en estudio.

La proteína de la zonula occludens (ZO-1) se ha encontrado a lo largo de la superficie citoplasmática en el diafragma de hendidura. Esta formada por 1736 aminoácidos y es una proteína de 225-kDa.^{48,49} La ZO-1 es miembro de la familia de proteínas de la guanilato cinasa asociada a membrana (MAGuK). ZO-1 quizás juega un papel en la organización de señales de transducción y en la formación de complejos de proteínas transmembrana.

ZO-1 contiene 3 copias del dominio PDZ, esta concentrada en el diafragma de hendidura y esta bien demostrado que interactúa con los componentes de la unión célula-célula (occludina, α catenina) y con cadenas del citoesqueleto (espectrina, F-actina).^{49,50,51} ZO-1 esta localizada en los procesos podálicos del podocito en donde precisamente se expresa y se continúa en los puntos de inserción del diafragma de hendidura dentro de la membrana celular lateral. Durante el desarrollo ZO-1 aparece en forma temprana, cuando los complejos de unión apicales entre los podocitos están compuestos de una clase de unión intercelular atípica. ZO-1 esta conectado a estas uniones durante el tiempo que ellos migran hacia la superficie lateral de la célula. Estas uniones desaparecen y son remplazadas por el diafragma de hendidura, sugiriendo que el diafragma de hendidura es una variante de uniones ajustada.⁵² Existen 2 isoformas la $\alpha+$ y $\alpha-$ dependiendo de la presencia ó ausencia del dominio interno del aminoácido 80.⁵³ ZO-1 esta presente en las células del epitelio tubular, las células de endotelio glomerular y en las células de unión endotelial en el riñón, sin embargo la expresión de la variante $\alpha-$ se encuentra restringida al diafragma de filtración, al endotelio glomerular y a las uniones celulares de las células endoteliales del capilar peritubular.⁵⁴ En las

ratas ZO-1 y nefrina están estrechamente localizadas en los glomérulos maduros, probablemente ZO-1 y nefrina estén localizadas específicamente en uniones como estructuras de escalera, pero en contraste con la nefrina, la expresión de ZO-1 es más abundante en las uniones intercelulares durante el desarrollo.⁵⁵

Cuando se han inyectado anticuerpos contra nefrina existe una disminución progresiva en la expresión de la proteína ZO-1 en los podocitos en forma temprana. Una hora después de la administración del anticuerpo y 5 días después no se detecta la proteína ZO-1 en ratas proteinúricas, esto sugiere que este anticuerpo particularmente dirigido contra nefrina, induce alteraciones en las vías de señalización en podocitos regulando a la baja la proteína ZO-1.⁵⁶

Estudios publicados desde 1998 muestran que agrin, un proteoglicano heparan sulfato de la MBG, así como otros distrioglicanos fueron identificados en el riñón.⁵⁷ Existe la hipótesis de que los podocitos están ligados a la MBG en forma similar como los miocitos a la lamina basal. El podocito y la MBG junto con el endotelio fenestrado forma la barrera que impide el paso de proteínas del plasma al espacio urinario durante la ultrafiltración glomerular.

Algunos estudios sugieren que disfunción y el subsecuente aplanamiento del podocito contribuye al desarrollo de la proteinuria. En modelos experimentales se ha mostrado que agrin, α y β distrioglicano y utrofin están presentes en el asa capilar glomerular y sugiere el enlace entre el podocito y MBG.⁵⁸ Así, en 2 modelos de ratas con síndrome nefrótico caracterizado por una fusión externa del proceso y en nefritis pasiva de Heymann se observan cambios en la distribución de distrioglicano.

En el tejido renal humano sano, los anticuerpos anti N-Terminal de agrin (mAb MI-90), anti β distrioglicano (mAb 43-DAG) y anti-utrofin, muestran tinción granular a lo largo del asa capilar glomerular en la unión con el podocito, indicando que forman parte, o son componentes importantes en la barrera de filtración.⁵⁹

Esta cadena de heparan sulfato juega un rol importante en mantener una permeabilidad dependiente de carga en la MBG, además de sugerir que los distrioglicanos tienen implicaciones estructurales en la membrana basal.^{59, 60}

La proteína ZHX regula la expresión genética de podocitos durante el desarrollo de síndrome nefrótico. Esta proteína caracterizada y clonada en ratas (ZHX3) es un potente represor transcripcional. Forma parte de la familia de ZHX, en donde se han descrito otros dos miembros, ZHX1 y ZHX2 cuya función biológica en el desarrollo de la enfermedad del podocito esta en investigación. En Vivo la expresión de la proteína ZHX en el podocito es predominantemente no nuclear. In Vitro estudios de co-transfección indican que su localización es no nuclear y esta en gran medida relacionada a existencia de estas proteínas y otros heterodímeros. En modelo experimental de enfermedad de cambios mínimos (nefrosis por puromicina –PAN) se ha asociado con una relación a la baja en forma transitoria, seguido de una recuperación en la expresión de ZHX3 durante el curso temprano de la enfermedad. In vivo el perfil de expresión del gen durante la etapa temprana de PAN es fácilmente reproducible por caída transitoria seguido de una recuperación de la expresión de ZHX3 en cultivos GECs. En contraste la caída persistente de ZHX3 en GECs produce un perfil de expresión del gen diferente, que esta en gran forma mediada por la migración nuclear de ZHX2, lo cual incluye regulación a la baja de WT1, un factor transcripcional prominentemente

regulado a la baja en EFyS, pero no afectada en la enfermedad de cambios mínimos (MCD). Por lo tanto mientras exista una caída transitoria de ZHX3 se produce una enfermedad de cambios mínimos y una caída persistente de de ZHX3 produce cambios sugestivos de EFyS, en gran medida aunque no exclusivamente mediado por ZHX2. En resumen la familia de proteínas ZHX media cambios en forma importante en el perfil de expresión del gen en los podocitos en la enfermedad glomerular primaria. (Datos aun no publicados).

La proteína relacionada al clon 1135, un biomarcador urinario de la enfermedad de cambios mínimos, fue identificada mientras se investigaban los mecanismos proteínuria. La sobre regulación del clon 1135 comenzó justamente previo al inicio de la proteínuria, incrementando a partir de allí substancialmente (60 veces) y permaneciendo con regulación al alta durante la fase proteínurica. Usando un anticuerpo contra la proteína de longitud total se observó que el podocito secretaba la proteína 1135 por vía de los procesos podocíticos y proteínas ligadas a la MBG. En nefropatía membranosa (nefritis pasiva de Heymann), la expresión del RNAm de 1135 está incrementada, aunque no dramáticamente (4-8 veces) en estadios tardíos de la enfermedad después de que se establece la proteínuria. La expresión del gen 1135 es normal ó baja en EFyS establecida, en modelo experimental. El análisis de Western blot de la proteínas urinarias en pacientes con síndrome nefrótico debido a EFyS mostró niveles muy bajos de esta proteína. Por lo tanto, la proteína relacionada al clon 1135 es mecánicamente un biomarcador relacionado a ECM y quizás pueda ayudar a distinguir ECM de EFyS. (Datos aun no publicados).

En ratas inyectadas con suero de pacientes con glomerulopatía colapsante.⁶¹ Se ha evaluado en forma detallada los cambios moleculares y morfológicos en el desarrollo

de la enfermedad. En los días 1-3 las ratas tuvieron proteinuria moderada y ausencia ó aplanamiento de los procesos podocíticos. En este período hubo deterioro progresivo en la expresión de la proteína ZO-1 en el podocito y redistribución de múltiples proteínas en el diafragma de filtración (SD), evocando la lesión en SD descrita por Liu.⁶² Múltiples interacciones proteína-proteína están alteradas en la superficie del podocito. Sobre los días 4 y 5 en este modelo, incrementó la cantidad de la proteinuria, lo cual coincide con el borramiento del procesos podocíticos, aunado a ello regulación a la baja de WT1 y aparición del colapso glomerular. Entre los días 5 y 10, aproximadamente el 20% de los glomérulos desarrollaron colapso parcial o total. La cantidad de cambios en la expresión génica en los primeros 3 días es escasa indicando que la proteinuria en este estadio es consecuencia de la alteración de la interacción proteína-proteína. Los cambios críticos en la expresión de genes sobre el día 3 es la regulación al alta del factor transcripcional ZHX2, un potente supresor de WT1. La expresión incrementada de ZHX2 en el núcleo del podocito después del día 3 causa caída progresiva de WT1 para el día 5 en adelante. La suma total de estos cambios resulta en el desarrollo del colapso glomerular. Estos estudios aun no publicados ofrecen el primer mecanismo básico del colapso glomerular con una relevancia directa a la enfermedad humana. (datos aun no publicados).

Dentro de inmunomardores que aun no se han investigado en la enfermedad de células epiteliales viscerales tenemos Tie-2 un receptor tirocin-cinasa específico de la célula endotelial (también conocido como Tek) la cual esta implicada en la remodelación de los vasos sanguíneos y la interacción de la célula endotelial con la matriz extracelular y perivascular.⁶³

Actualmente conocemos 2 familias de factores de crecimiento. El factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF) y angiopoyetinas, esta segunda familia son factores angiogénicos esenciales para la maduración de los vasos sanguíneos. La angiopoyetina-1 es un agonista del receptor de tiorina-cinasa de la célula endotelial Tie-2, estudios en ratas que carecen de Tie-2 indican que esta juega un papel en el sistema de señalización en las vías de angiogénesis tardía, la mutación de Tie-2 en la línea germinal humana esta asociada a dismorfogénesis vascular.⁶⁴

El conocer que Tie-2 esta suprarregulado bajo condiciones patológicas como incremento tumoral, y lesión endotelial ha invocado interés en la biología de este receptor. Usando una tarjeta de hipoxantina fosforibosiltransferasa (Hprt) se ha demostrado que Tie-2 promueve la expresión específica de las células endoteliales en vasos no solo en el desarrollo embriogénico, sino también en el cerebro y el riñón del ratón adulto.⁶⁵

Las angiopoyetinas son factores que modulan la supervivencia endotelial y la morfogénesis, en estudios previos se ha demostrado que la angiopoyetina-2 (Ang-2) promueve la actividad in vivo de la maduración del músculo liso vascular del riñón y de la célula mesangial con la expresión de Tie-2 en el endotelio adyacente incluyendo capilares glomerulares.⁶⁶

Se ha documentado que bajo condiciones de hipoxia se estimula la sobre-expresión de Ang-2 otro miembro de la familia de ligandos, ligado a Tie-2 sin causar fosforilación en los cultivos de células endoteliales. Se ha especulado que la hipoxia induce Ang-2 y VEGF derivado de las células mesangiales y quizás tiene un papel paracrino que sinergiza el crecimiento del endotelio glomerular durante el desarrollo normal y en la enfermedad renal que implica lesión a nivel del endotelio vascular.⁶⁷

En forma colectiva, estos datos respaldan el concepto de que la lesión primaria en el podocito resulta en una disminución de los marcadores de diferenciación y en una alteración de la regulación del fenotipo del podocito en la gloméruloesclerosis focal y segmentaria.

Otra importante consecuencia de la disregulación de los podocitos puede ser que induzcan la apoptosis y la muerte celular. La apoptosis tiene un rol central durante el desarrollo del riñón y ha sido implicada recientemente en una variedad de enfermedades renales. La apoptosis puede constituir un mecanismo directo patogénico, bien documentado en la pérdida de podocitos en la EFyS.^{68,69}

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Es posible que las variantes morfológicas de enfermedad de células epiteliales viscerales se puedan separar por presentar un patrón de expresión de marcadores moleculares diferente?

JUSTIFICACION

El emplear nuevos marcadores inmunohistoquímicos puede permitir establecer diagnóstico de certeza entre los diferentes subtipos de la enfermedad de células epiteliales viscerales y distinguir de otras entidades que condicionan síndrome nefrótico como enfermedad de cambios mínimos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de células epiteliales viscerales de acuerdo a los subtipos de la clasificación tiene un comportamiento y pronóstico diferente que va desde las formas más benignas, con un curso indolente y adecuada respuesta a tratamiento, hasta el subtipo con mal pronóstico, pobre respuesta a la terapia y evolución a corto plazo a insuficiencia renal avanzada. De allí la gran importancia desde el punto de vista histológico de contar con nuevas técnicas histopatológicas para la evaluación de la biopsia renal. El empleo de nuevos marcadores como: El producto del gen supresor de Wilm's (WT1), ZHX, Tie 2 y la proteína relacionada al clon 1135 pueden ayudar a establecer el diagnóstico con mayor precisión y certeza dentro de las diferentes variedades de la enfermedad de células epiteliales viscerales e incluso distinguir un caso de una enfermedad de cambios mínimos de la EFyS, que sabemos bien tiene una respuesta diferente a la terapia y también diferente pronóstico.

OBJETIVO

1.- Determinar si el patrón de expresión de marcadores celulares de diferenciación se asocia con cada uno de los subtipos histopatológicos de enfermedad de células epiteliales viscerales y si dicho patrón de inmunohistoquímica permite diferenciar enfermedad de cambios mínimos con las diferentes formas de enfermedad de células epiteliales viscerales.

HIPOTESIS

1. Los marcadores de diferenciación celular tiene un patrón de expresión diferente en los subtipos de enfermedades de células epiteliales viscerales y permite distinguir de otras glomerulopatías que condicionan síndrome nefrótico como la enfermedad de cambios mínimos.

PACIENTES MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio transversal comparativo.

UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluyeron a todos los pacientes del servicio de nefrología y patología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” que estuvieron en protocolo de estudio por síndrome nefrótico y que además contaban con biopsia renal con diagnóstico compatible con enfermedad de células epiteliales viscerales y enfermedad de cambios mínimos mediante microscopia de luz.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

VARIABLES DEPENDIENTES

Expresión inmunohistoquímica de los diferentes marcadores de diferenciación celular.

Para la inmunofluorescencia se efectuaron cortes del tejido congelado en cryostato en cortes de 2µM de tejido de la biopsia renal de pacientes en quienes, de acuerdo a la microscopía de luz mostraba alteración en las células epiteliales viscerales. Se efectuó la cuantificación cualitativa de los diferentes marcadores:

- 1.-El producto del gen supresor de Wilm's (WT1),
- 2.-ZHX 3,
- 3.- Tie2,
- 4.-la proteína relacionada al clon 1135.

El análisis de los inmunomarcadores analizados se realizó por medio de microscopía confocal evaluando lo siguiente:

Presencia o ausencia de la expresión del inmunomarcador y el análisis cualitativo subjetivo, estratificado en grados de acuerdo a la intensidad del anticuerpo.

0 en nulo, 1 débil, 2 moderado y 3 muy intenso.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Clínicas

Histológicas

Bioquímicas

DESCRIPCIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

1.- Se estableció como variables independientes a:

Edad, genero, nivel de creatinina sérica, depuración de creatinina en orina de 24 hrs., excreción de proteínas en orina de 24 hrs.

a) Edad: se estableció en años, desde la fecha de nacimiento.

Tipo de variable: cuantitativa continua

Escala de medición: años

b) Género: se expresó en masculino ó femenino.

Tipo de variable: Nominal

c) Nivel de creatinina sérica: fue cuantificada en mg/dL; previo a la realización de biopsia renal.

Tipo de variable: cuantitativa continua

d) Depuración de creatinina en orina de 24 hrs., se cuantificó en ml/min. Mediante la formula de Cockcroft y Gault⁷⁰ previo a la realización de la biopsia renal.

Tipo de variable: cuantitativa continua

e) Excreción de proteínas en orina de 24 hrs. se cuantificó en miligramos/decilitro, posteriormente se calculó el resultado en gramos/día de acuerdo al volumen urinario.

Tipo de variable: cuantitativa continúa

f) Histología

Fue evaluada de acuerdo a los hallazgos histopatológicos documentados en la biopsia renal, de acuerdo a definiciones estrictas ya establecidas.¹

Los elementos valorados se efectuaron mediante las siguientes tinciones: tricrómica de Mallory; ácido peryódico de Schiff, y metenamina de plata.

Se tomó en cuenta el número de glomérulos abiertos, número de glomérulos esclerosados, proliferación mesangial, usando la definición de más de 3 núcleos por área de observación mesangial y lesiones vasculares incluyendo engrosamiento fibroso de la íntima así como valoración aproximada de esclerosis luminal.

El daño tubulointersticial y la fibrosis fue evaluado por parámetros ya establecidos por Wakai y Magil;⁷¹ sin fibrosis cuando sea menor al 5%, fibrosis grado I del 5 al 25%. Grado II mayor de 25% y fibrosis grado III mayor del 50%.

También se tomó en cuenta las lesiones celulares que correspondían a hiperplasia y vacuolización de las células epiteliales viscerales, manifestado por un claro halo entre la MBG y los podocitos, hialinosis y colapso de las asas capilares con ó sin sinequias.

Estudios de inmunofluorescencia con inmunomarcadores específicos:

-En tejido conservado a menos 80 grados Celsius, se efectuaron cortes en cryostato 2µM de tejido de biopsia renal en pacientes en quienes de acuerdo a microscopia de luz mostraba alteración en las células epiteliales viscerales, una vez colocados en las laminillas se dejan secar durante 30 minutos protegidas de la luz, se marcan

de manera individual, en orden como regresaron a secado y a la temperatura del cuarto.

-Se colocaron las laminillas en un vaso que contenía PBS por 15 minutos en el orden como se rehidrató por sección.

- Se secó alrededor del corte con papel, marcando un círculo alrededor del tejido con Pap Pen (esta es una película hidrofóbica que permite el uso de muy pequeño volumen del anticuerpo diluido en la solución) y se puso alrededor de 100 μ l de solución para marcar (suero de la misma especie y un segundo anticuerpo diluido 1/20 en PBS/ azida de sodio al 0.02%) sobre el corte por 30 minutos a temperatura de la sala en una cámara húmeda.
- se enjuagó el corte en 2 ml de PBS (en forma lenta se traspasa con una pipeta de plástico).
- Se lavó cada laminilla por 5 minutos en un vaso que contenía PBS.
- Se puso alrededor de 100 μ l para diluir la solución del primer anticuerpo (en PBS/ azida de sodio al 0.02%/ BSA al 1%) sobre el tejido por 90 a 120 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- Se enjuaga el tejido con 2 ml de PBS (en forma lenta se paso con una pipeta de plástico).
- Esta laminilla 2 se lavó por 10 minutos en un vaso que contenía PBS
- Se puso 100 μ l de solución del segundo anticuerpo diluido (en PBS/ azida de sodio al 0.02%/BSA al 1%) sobre los cortes por 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda y en la oscuridad.

De aquí se trabajó en la sala con luz baja para la tinción por fluorescencia

- Se enjuagaron los cortes en 2 ml de PBS (se pasó lentamente con una pipeta de plástico) se lavó la laminilla 2 por 10 minutos en un vaso que contenía PBS.

- Se puso alrededor de 100ul de solución para marcar (suero de la misma especie y un segundo anticuerpo diluido 1/20 en PBS/ azida de sodio al 0.02%) sobre el tejido por 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda y en la oscuridad
- Se enjuagó con 2 ml de PBS (se paso lentamente con una pipeta de plástico)
- Se lavó la laminilla 1 por 5 minutos en un vaso que contenía PBS
- Se puso cerca de 100ul del anticuerpo diluido en solución (en PBS/ azida de sodio al 0.02%/BSA al 1%) sobre el corte por 90-120 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda y en la oscuridad.
- Luego se enjuagó el corte con alrededor de 2 ml de PBS (se pasó lentamente con una pipeta de plástico).
- Se lavó la laminilla 2 por 10 minutos en un vaso que contenía PBS
- Se agregó cerca de 100ul del segundo anticuerpo diluido en solución (en PBS/ azida de sodio al 0.02%/BSA al 1%) sobre el tejido por 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda y bajo la oscuridad.
- Luego se enjuago el corte en 2 ml de PBS (se pasó lentamente con una pipeta de plástico)
- Se lavó la laminilla 2 por 10 minutos en un vaso que contenía PBS
- Con pedazos de papel se removió y se seco PBS alrededor del tejido luego se puso 20ul de un medio de soporte (PBS/glycerol; 3:1 v/v), y se puso cubreobjetos en cada corte.
- Se dejaron las laminillas en una cámara húmeda durante la noche a 4°C.
- Al día siguiente se colocó sobre las laminillas esmalte al borde del cubreobjetos, se esperó que se secara el esmalte por un par de minutos.

- Se conservaron las laminillas a 4 grados Celsius hasta su revisión en el microscopio confocal (en los próximos dos días)

Super Pap Pen, Cat. # IM3580, Becman Coulter.

Ejemplo de la tinción de inmunofluorescencia

- 1er. Bloque Suero bovino diluido 1/20
- 1er. Anticuerpo Anti-acuaporina de ratón diluido 1/100
- 2do. Anticuerpo FITC antiratón diluido 1/100
- 2do. Bloque Suero de burro diluido 1/20
- 2do del 1er Anticuerpo Anti ZHX3 conejo diluido 1/30
- 2do. Del 2do. Anticuerpo Anti Cy3 conejo diluido 1/100

Para el control de estas laminillas se tiñó mediante el mismo procedimiento con suero de conejo preinmunizado diluido 1/50 en lugar del anticuerpo antiZHX3 de conejo.

Como se debe analizar en forma inmediata los anticuerpos FITC y Cy3 se trabajó en el cuarto oscuro con ellos y se tiñó en forma inicial con Cy3 que es mas resistente a la luz que FITC.

De acuerdo a los anticuerpos analizados se expresaron de la siguiente manera, cada inmunomarcador estratificado en grados de acuerdo a la intensidad del anticuerpo.

0 en nulo, 1 débil, 2 moderado y 3 muy intenso.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se estudiaron la características clínicas de los pacientes con síndrome nefrótico, registrados tanto en el servicio de nefrología así como en servicio de patología del Instituto Nacional de Cardiología “ Ignacio Chávez”; en quienes se estableció el diagnóstico de enfermedad de células epiteliales viscerales y enfermedad de cambios mínimos. De acuerdo a la disponibilidad como un ensayo piloto.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Se incluyeron todos los pacientes que se encontraban registrados en el servicio de nefrología y patología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, que desarrollaron síndrome nefrótico en quienes por estudios histopatológicos se estableció el diagnóstico de enfermedad de células epiteliales viscerales y enfermedad de cambios mínimos de enero del 2001 a julio del 2006.

Se excluyeron todos los pacientes con evidencia de enfermedades sistémicas, como lupus eritematoso sistémico, neoplasias, evidencia clínica y/o bioquímica de glomeruloesclerosis focal y segmentaria secundaria.¹

PROCEDIMIENTO

Se revisaron las características de laboratorio y clínicas en una sola determinación previa a la realización de la biopsia, así como la valoración morfológica e inmunohistoquímica del tejido renal.

ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Los resultados de los inmunomarcadores se analizaron utilizando un microscopio confocal con tres tipos de filtro:

- 1.- Para análisis de material asociado a FITC (Isotiocianato de fluoresceína)
- 2.- Para Rhodamina
- 3.- Cry 5

La utilización de tres diferentes filtros permitió analizar tres diferentes anticuerpos en la misma muestra que presentaros tres colores diferentes:

- 1.- Verde
- 2.- Rojo
- 3.-Azul

El análisis se realizó por tres personas: un nefropatólogo, un nefrólogo investigador y un estudiante en estancia postdoctoral.

Los resultados se analizaron en una computadora con un software específico para análisis morfométrico (Image – Pro) que permite a la computadora distinguir los colores y de acuerdo a esta capacidad permite de manera sistemática aportar valores numéricos a la cantidad o expresión del anticuerpo localizado en la muestra

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se expresaron como promedio \pm SD, o proporciones según corresponda, la comparación de proporciones se efectuó con prueba de X^2 cuadrada. La comparación de medias con anova de una vía. Se obtuvieron coeficientes de correlación por método no paramétrico (rho de Spearman). Se empleo el paquete estadístico SPSS versión 10 para Windows.

Empleando un análisis de función discriminante se evaluó la clasificación de las diferentes variedades de enfermedad de células epiteliales viscerales (ECEV) y se obtuvo una función discriminante que permitiera separar nuevos casos en grupos previamente definidos. Como variable para definir grupos se utilizó el diagnóstico histológico por microscopia de luz de ECEV, tomando en cuenta sólo cuatro variedades (NOS, punta, colapsante y ECM) ya que la variedad celular se excluyó por contar con información de sólo un caso. Como variables independientes se incluyeron edad, depuración de creatinina, proteinuria y la expresión inmunohistoquímica de cuatro proteínas (WT1, Tie2, 1135 y ZHX3). Como método de selección de variables se utilizo el stepwise.

RESULTADOS:

De un total de 129 pacientes, se realizó la inmunomarcación de 37 especímenes que contaban con tejido congelado a menos 80°C guardado en el ultracongelador desde enero del 2001 a Julio del 2006.

Enfermedad de cambios mínimos (ECM)

De **8** pacientes con diagnóstico de ECM, se inmunomarcaron **6** especímenes.

Glomerulopatía colapsante (GC)

De **17** pacientes con diagnóstico de GC se inmunomarcaron **8** especímenes.

Variante de la punta

De **5** pacientes con diagnóstico de enfermedad de células epiteliales viscerales variedad de la punta, se inmunomarcaron **3** especímenes.

Variante celular

De **3** pacientes con este diagnóstico solo se logró inmunomarcarse **1** solo espécimen.

La Variante no específica (NOS)

De un total de **92** pacientes se inmunomarcaron **14** especímenes.

La variante del Hilio

De los **2** pacientes catalogados con esta entidad, como glomerulopatía primaria no se obtuvo tejido fresco congelado para inmunomarcación.

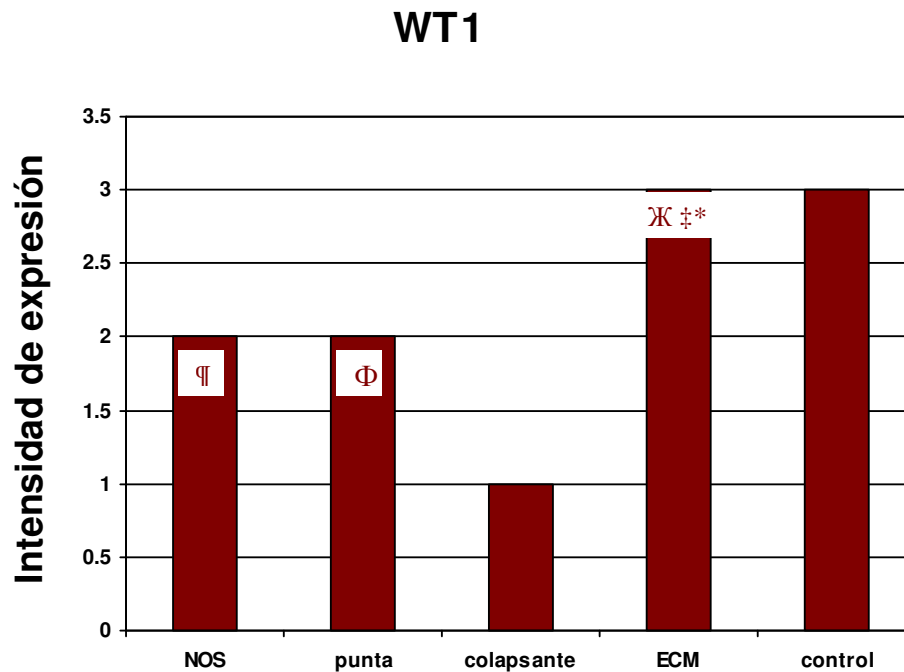
Se efectuó inmunomarcación a 5 controles sanos, de biopsia inmediata (tiempo cero) de paciente nefrectomizados como donadores sanos de riñón.

Del total de pacientes que se incluyeron para inmunomarcación, el género femenino predominó con 54%. El promedio de edad fue de 28.5±13.2 años.

De 37 tejidos analizados, 14 correspondían a NOS, 3 a la variedad de la punta, 8 a colapsante, 6 a enfermedad de cambios mininos, sólo 1 correspondió a la variedad celular y 5 controles.

No se observó diferencia de edad entre los grupos analizados. Se encontró diferencia significativa (ANOVA de 1 vía con prueba de Bonferroni post-hoc) en cuanto a la depuración de creatinina entre la variedad colapsante y ECM, (30.63 ± 12.78 Vs 80.00 ± 31.16 ml/min).

Al analizar la expresión de las diferentes proteínas mediante inmunohistoquímica encontramos los siguientes datos, que muestra la expresión de WT1 en cada variante histológica analizada, (grafica 1).



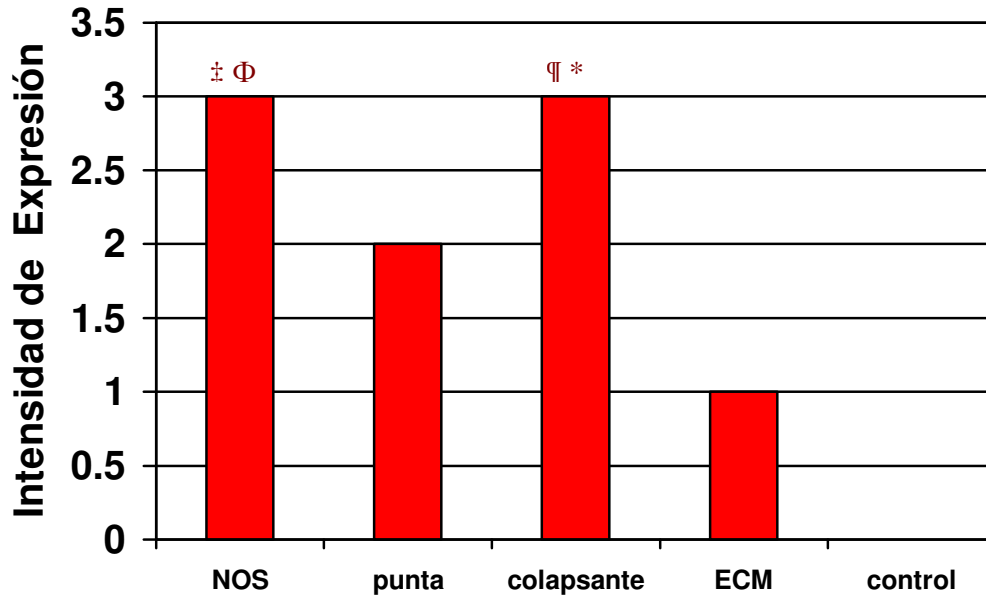
Grafica 1.

¶ $p < 0.05$ NOS vs colapsante. Φ $p < 0.05$ punta vs colapsante. Ж $p < 0.05$ ECM vs colapsante. ‡ $p < 0.005$ ECM vs NOS. * $p < 0.05$ ECM vs Punta.

Como se muestra gráficamente encontramos diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la proteína WT1 entre la variante periférica y ECM ($p=0.047$), con mayor expresión de WT1 en ECM. En el análisis de expresión de WT1 entre las variantes de la punta y colapsante se encontró mayor expresión de WT1 en la variante de la punta con diferencia estadísticamente significativa ($p=0.001$), lo cual confirma menor afección de la célula epitelial visceral comparado con la afección observada en la variedad colapsante. También se encontró diferencia estadísticamente significativa al efectuar el análisis entre las variantes de la punta y ECM ($p=0.002$), donde ECM mostró mayor expresión de la proteína WT1. Así mismo se observó diferencia estadísticamente significativa entre la variante Periférica y colapsante ($p=0.000$), mostrando mayor expresión de la proteína en la variedad periférica. Finalmente se observó diferencia estadísticamente significativa entre ECM y colapsante ($p= 0.000$), siendo mayor la expresión de la proteína WT1 en ECM.

Expresión mediante inmunohistoquímica de Tie2 en cada variante histológica analizada.

Tie 2

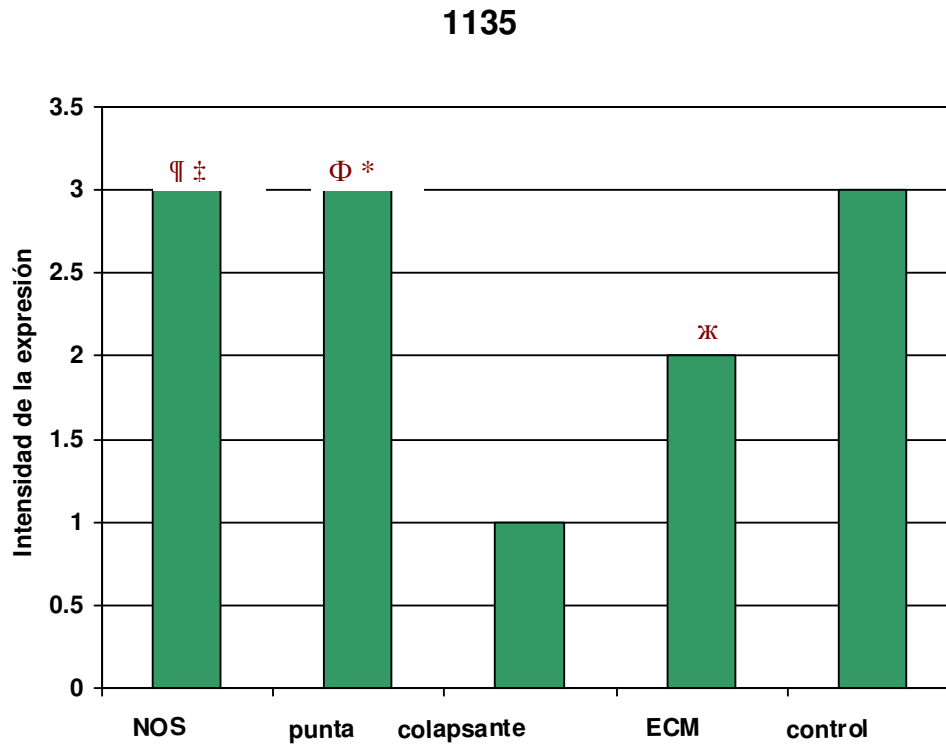


Grafica 2.

‡ p<0.05 NOS vs punta. Φ p<0.05 NOS vs ECM. ¶ p<0.05 colapsante vs punta. * p<0.05 colapsante vs ECM.

Cuando se analizó la proteína Tie2 se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la variante de la punta y colapsante ($p=0.001$), teniendo menor expresión de la proteína la variante de la punta. Encontramos también diferencia estadísticamente significativa entre las variedades NOS y punta ($p=0.000$), donde también mostró menor expresión la proteína la variedad de la punta. Al comparar las variedades NOS y ECM se encontró menor expresión de Tie2 en ECM con diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$). También se encontró diferencia estadísticamente significativa al efectuar el análisis entre las variantes colapsante y ECM ($p=0.000$), mostrando menor expresión de Tie2 en ECM.

Expresión mediante inmunohistoquímica de la proteína 1135 en las variantes histológicas analizadas.



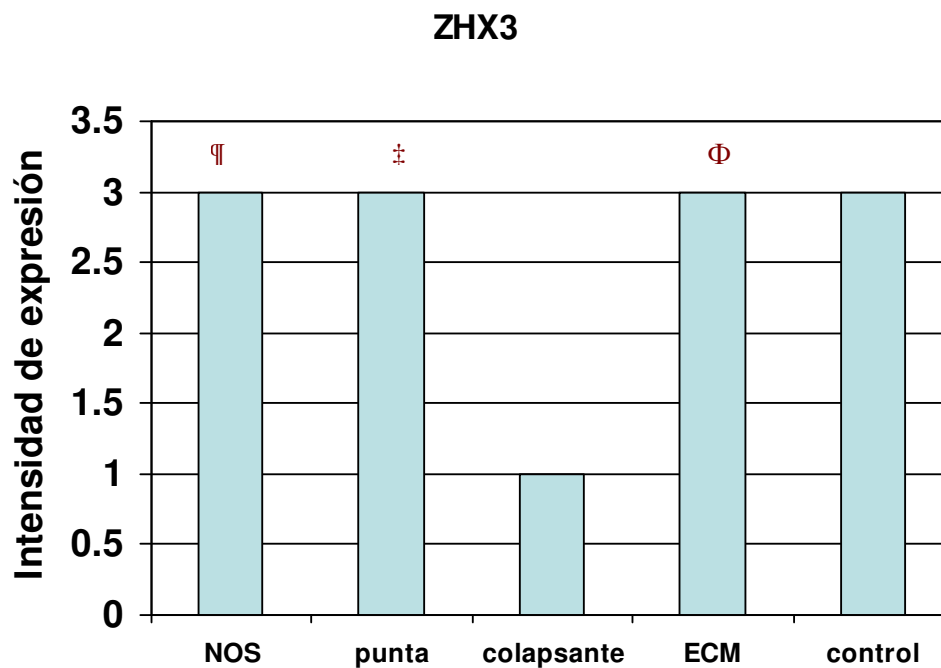
Grafica 3.

¶ $p < 0.05$ NOS vs colapsante. ± $p < 0.05$ NOS vs ECM. Φ $p < 0.05$ punta vs colapsante. * $p < 0.05$ punta vs ECM. Ж $p < 0.05$ ECM vs colapsante.

Al efectuar el análisis de la proteína 1135 mostró diferencia estadísticamente significativa entre la variedad periférica y colapsante ($p=0.000$), se mostró mayor expresión de la proteína en la variante periférica. De igual forma el análisis entre la variante periférica y ECM ($p=0.000$), se mostró mayor expresión de la proteína nuevamente en la variante periférica. Encontramos diferencia estadísticamente significativa entre las variantes Punta y colapsante ($p=0.000$), con mayor expresión de

la proteína en la variante de la punta. Al comparar las variantes punta y ECM ($p=0.000$), la mayor expresión de la proteína 1135 se encontró en la variante de la punta. En el análisis entre las variantes colapsante y ECM hubo diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.000$), con mayor expresión de la proteína 1135 en ECM.

Expresión mediante inmunohistoquímica de la proteína ZHX3 en cada variante histológica analizada.



Grafica 4.

¶ $p<0.05$ NOS vs colapsante. ‡ $p<0.05$ punta vs colapsante. Φ $p<0.05$ ECM vs colapsante.

Al analizar la expresión de la proteína ZHX3 se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre la variante NOS y colapsante ($p=0.000$), teniendo mayor expresión de la proteína en la variante NOS, de igual manera el análisis entre la variedad punta y colapsante mostró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$), con mayor expresión de la proteína en la variante de la punta. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la variante colapsante y ECM ($p=0.000$), con mayor expresión en ECM.

Al buscar asociación entre la expresión de las diferentes proteínas con las variables clínicas medidas encontramos correlación significativa positiva entre la expresión de WT1 y la depuración de creatinina ($r=0.45$, $p=0.006$), sugiriendo que a mayor expresión de la proteína WT1 mayor nivel de función renal, evaluada mediante la depuración de creatinina. Encontramos una tendencia de asociación negativa entre la expresión de la proteína WT1 y la magnitud de la proteinuria ($r=-0.31$, $p=0.063$) sugiriendo que a menor expresión de la proteína WT1 mayor excreción urinaria de proteínas.

La expresión de Tie2 mostró correlación negativa significativa con la depuración de creatinina ($r=-0.58$, $p=0.000$), siendo menor la expresión de la proteína en el grupo que preservó mejor función renal. Cabe comentar que estos datos concuerdan con el análisis del tejido control, en el que la expresión de Tie2 fue nula o débil. Encontramos una correlación positiva significativa entre la expresión de Tie2 y la creatinina sérica ($r=0.38$, $p=0.020$) lo cual concuerda con los hallazgos previamente comentados.

Se encontró además una correlación positiva significativa entre la expresión de Tie2 y la intensidad de la proteinuria ($r=0.42$, $p=0.011$) sugiriendo que a mayor expresión de Tie2 mayor proteinuria.

La expresión de la proteína 1135 mostró una correlación positiva significativa con la depuración de creatinina ($r=0.45$, $p=0.005$), lo que sugiere que a mayor expresión de esta proteína la función renal se encuentra mejor preservada, lo cual se observó predominantemente en las variantes de la punta, ECM, y NOS. Además, como se esperaba, se encontró una correlación negativa significativa entre la expresión de la proteína 1135 y la creatinina sérica ($r=-0.38$, $p=0.021$).

La expresión de ZHX3 mostró una correlación significativa positiva con la depuración de creatinina ($r=0.60$, $p=0.000$) sugiriendo nuevamente que a mayor expresión de ZHX3 existe un mejor filtrado glomerular y en forma esperada hubo una correlación significativa negativa con la creatinina sérica ($r=-0.53$, $p=0.001$). No se encontró asociación significativa entre la expresión de ZHX3 y la excreción urinaria de proteínas.

Al buscar asociación entre la expresión de las diferentes proteínas se encontró una correlación significativa negativa entre la expresión de WT1 y Tie2 ($r=-0.51$, $p=0.001$) lo cual fue más acentuado en el grupo de ECM, mostrando débil expresión de Tie2 y una expresión más intensa de WT1. Se encontró una correlación significativa positiva en la expresión entre las proteínas WT1 y 1135 ($r=0.54$, $p=0.001$), dicha asociación observada en las variantes periférica y punta así como en ECM. Hubo asociación

significativa positiva en la expresión de las proteínas WT1 y ZHX3 ($r=0.78$, $p=0.000$), hallazgos encontrados en la variante de la punta, NOS y ECM.

Tie2 mostró una correlación significativa negativa con ZHX3 ($r=-0.39$, $p=0.019$), hallazgos acentuados en ECM y en la variedad colapsante, teniendo esta última mayor expresión de Tie2 y débil expresión de ZHX3, a diferencia de ECM la cual mostró nula ó mínima expresión de Tie2 y una expresión intensa de ZHX3.

La asociación entre la proteína 1135 y ZHX3 mostró una correlación significativa positiva ($r=0.84$, $p=0.000$), hallazgos encontrados en la variedad de la punta y NOS.

Empleando un análisis de función discriminante, se evaluó la clasificación de las diferentes variedades de enfermedad de células epiteliales viscerales (ECEV) y se obtuvo una función discriminante que permitiera separar nuevos casos en grupos previamente definidos. Encontramos que el modelo que incluye a las proteínas WT1 y 1135 fue el más adecuado para poder clasificar los casos analizados y poder discriminar entre casos nuevos (Lambda de Wilks 0.012, X^2 120.489, $p=0.000$). En base a lo anterior y tomando en cuenta los coeficientes de la función de clasificación se obtuvieron las siguientes funciones para poder predecir la pertenencia a un grupo, tomando en cuenta el valor más alto de los scores calculados:

Classification Function Coefficients

	DX. HISTOL			
	periférico o no específica	punta	colapsante	ecm
WT1_40X	27.000	23.143	15.429	30.857
1135_40X	129.600	129.600	64.800	102.600
(Constant)	-307.245	-296.250	-81.583	-225.807

Fisher's linear discriminant functions

Score 1 (periférica) = $-307.245 + (27 * WT1) + (129.6 * 1135)$

Score 2 (punta) = $-296.250 + (23.143 * WT1) + (129.6 * 1135)$

Score 3 (colapsante) = $-81.583 + (15.429 * WT1) + (64.8 * 1135)$

Score 4 (ECM) = $-225.807 + (30.857 * WT1) + (102.6 * 1135)$

A partir de los valores de las proteínas incluidas en el modelo, el análisis de nuestros casos nos permitió obtener los siguientes scores para cada variante histológica de la ECEV: variante periférica 305.655 ± 14 , variante de la punta 292.155 ± 0 , variante colapsante 78.875 ± 0 y variante de cambios mínimos 222.521 ± 41.88 , los cuales nos permiten tener una idea de la probabilidad de pertenecer a un grupo. Usando el procedimiento de clasificación con validación cruzada encontramos una correcta clasificación de los casos en el 87.1 %, habiendo clasificado correctamente los 14 casos de la variante periférica. Los casos clasificados originalmente como variante de la punta fueron predichos como variante periférica. Los 8 casos de la variante colapsante fueron adecuadamente clasificados y finalmente de los 6 casos clasificados como ECM 5 fueron correctamente clasificados y uno se predijo como variante periférica, datos que podemos observar en la siguiente tabla:

Classification Results^{b,c}

		Predicted Group Membership				Total	
		periférico o no específica	punta	colapsante	ecm		
Original	Count	periférico o no específica	14	0	0	0	14
		punta	3	0	0	0	3
		colapsante	0	0	8	0	8
		ecm	1	0	0	5	6
		Ungrouped cases	5	0	0	0	5
	%	periférico o no específica	100.0	.0	.0	.0	100.0
		punta	100.0	.0	.0	.0	100.0
		colapsante	.0	.0	100.0	.0	100.0
		ecm	16.7	.0	.0	83.3	100.0
		Ungrouped cases	100.0	.0	.0	.0	100.0
Cross-validated ^a	Count	periférico o no específica	14	0	0	0	14
		punta	3	0	0	0	3
		colapsante	0	0	8	0	8
		ecm	1	0	0	5	6
		Ungrouped cases	5	0	0	0	5
	%	periférico o no específica	100.0	.0	.0	.0	100.0
		punta	100.0	.0	.0	.0	100.0
		colapsante	.0	.0	100.0	.0	100.0
		ecm	16.7	.0	.0	83.3	100.0
		Ungrouped cases	100.0	.0	.0	.0	100.0

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 87.1% of original grouped cases correctly classified.

c. 87.1% of cross-validated grouped cases correctly classified.

DISCUSIÓN

La primera descripción de la esclerosis focal y segmentaria se realizó en 1925, en un esquema realizado al observar los datos histológicos de un niño que murió de una Glomerulopatía.² Desde esa fecha el concepto de EFyS se ha redefinido. Como se mencionó en la introducción, la EFyS, englobada actualmente desde la reunión de patólogos en la ciudad de Nueva York en el 2000 dentro del grupo de enfermedades de células epiteliales viscerales (ECEV), representa la causa más frecuente de síndrome nefrótico en el adulto a nivel mundial y en nuestro país. La causa de este aumento no se conoce con certeza, lo que obliga a estudiar los factores implicados en su etiopatogenia. Este creciente interés en la enfermedad ha generado numerosas investigaciones de la etiología y la redefinición histológica de las variantes: gloméruloesclerosis focal y segmentaria inespecífica o periférica (NOS) la cual constituye la lesión genérica de EFyS, le sigue en frecuencia la variante del hilio, posteriormente la variante colapsante, la cual cabe mencionar que es la variedad que ha mostrado peor pronóstico de acuerdo con múltiples publicaciones.^{9,10} En este orden decreciente se encuentra la variante de la punta y finalmente la variante celular. Como ya se comentó en la introducción cada una de las variantes tiene sus propios criterios de inclusión y exclusión.⁸

Es muy importante mencionar que la enfermedad de células epiteliales viscerales del tipo cambios mínimos se considera una enfermedad totalmente diferente de la EFyS por su etiología, patogénesis y pronóstico.

La identificación histológica de las diferentes variedades de EFyS requiere de una muestra representativa que muchas veces no es posible tener por diferentes factores

clínicos. Debido a lo anterior es indispensable contar con alguna tecnología que nos permita identificar de manera específica las variedades con un número limitado de glomérulos. En este estudio utilizamos inmunomarcación mediante la expresión inmunohistoquímica de diversas proteínas (WT1, 1135, Tie2, ZHX3), como un método alternativo útil que permitirá identificar y clasificar las diferentes variantes morfológicas de enfermedad de células epiteliales viscerales con un espécimen pequeño y esa es una aportación muy importante de este estudio.

Con respecto a la ECM, nuestros hallazgos permiten sugerir que se trata de una enfermedad que lesiona a las células epiteliales viscerales de manera transitoria, ya que mantiene la expresión de los marcadores originales de los podocitos como WT-1 de manera homogénea, de acuerdo a los hallazgos encontrados al efectuar el análisis en la expresión de WT1, esta mostró mayor expresión en ECM en comparación con las otras variantes, en los podocitos nunca disminuyó o desapareció la expresión de WT1 cuando se comparó con los controles. La morfología del glomérulo se mantiene, ya que la arquitectura normal de asas capilares abiertas no se pierde, al analizar el tejido con microscopía de luz. Los heterodímeros de las diferentes variedades de ZHX3 se expresan de manera similar al control normal, sin migrar al núcleo como en la GC. Cabe mencionar que los pacientes con ECM cuyos tejidos se estudiaron, tenían síndrome nefrótico al momento de la toma de biopsia y todavía no recibían tratamiento con esteroides. La expresión de Tie-2 fue menos intensa en los pacientes con ECM que en las otras variedades, nosotros proponemos que el daño se produce porque el endotelio de los pacientes con ECM se encuentra alterado y quizá el sitio primario de daño en estos pacientes sea el endotelio y este produzca factores que lesionan de manera secundaria y transitoria al podocito. Al respecto cabe mencionar que en los controles

normales Tie2 es negativo. El 1135 se observó con menor intensidad que en el control y presentó fragmentación de la positividad lineal mostrando líneas separadas por espacios negativos al marcador tanto en las membranas basales de los capilares glomerulares como en las membranas basales tubulares. Esto correlacionó también con lo observado en los modelos experimentales de ECM secundaria a la administración de puromicina.⁷² **(Fig. 4).**

En contraste, la glomerulopatía colapsante mostró un daño importante en los podocitos los cuales estaban muy disminuidos en número y la expresión normal de WT-1 que fue muy débil o estuvo ausente. La morfología del glomérulo se puede observar con ZHX3 que marca los contornos de las asas capilares mostrando las áreas de colapso. Una aportación muy importante en nuestro estudio es la observación de que la afección de WT-1 y la expresión de ZHX3 están alteradas aún en los glomérulos no colapsados, por lo que estos inmunomarcadores sobre todo WT1 y la proteína 1135 al efectuar el análisis de función discriminante, permiten la probabilidad de una clasificación correcta del 87.1% de pertenecer al grupo de la variante colapsante y la posibilidad de que estos inmunomarcadores puedan ser utilizados con confianza para emitir diagnósticos en muestras pequeñas. Otra aportación es que el Tie2 se observa también en las proteínas depositadas de manera intraluminal que están comúnmente presentes en los tejidos de los pacientes con GC. Este hallazgo también se observa en los modelos experimentales de GC lo cual concuerda con nuestros resultados.⁶⁷ Es importante mencionar que estos cambios no se deben a proteinuria masiva ya que no se observan en las lesiones de la punta o en ECM en donde los pacientes cursan con proteinurias importantes. Es importante mencionar que en los tejidos de los pacientes con GC se observa una disminución de la expresión de *BCl2*, un protector de apoptosis.⁶⁶ Este hallazgo sugiere

que la pérdida de podocitos como lo demuestra la expresión de la proteína WT1 se debe a muerte celular por apoptosis. En el modelo experimental de GC se demostró la presencia de apoptosis mediante la técnica de Túnel.⁷³ Por último, también dentro de las proteínas intraluminales se pueden identificar fragmentos de laminina en el modelo experimental, indicando la pérdida de la integridad de la membrana basal en la GC.⁶⁶

En cuanto a la lesión de la punta, los podocitos están conservados pero la expresión de WT1 está disminuida con respecto al control. Los contornos de las asas capilares pueden observarse débilmente con Tie2 lo que sugiere que el endotelio vascular de las asas capilares no es normal pero no está tan dañado como en cambios mínimos. Esto implica seguramente un mecanismo de lesión diferente al de esta entidad, lo que explicaría por qué las lesiones de la punta tienen mejor pronóstico o mayor capacidad de recuperación y lento deterioro de la función renal.

Por último, la variante de tipo no especificada (NOS) podría tener una expresión variable debido a que podría ser la vía final común de las otras entidades. Sin embargo para el análisis y selección de estos casos se descartó a todo hallazgo histológico que las pudiera catalogar en otras variantes como colapso, celularidad y localización selectiva de la lesión glomerular exclusiva en la punta o en el hilio. Quizá la variante con la que se deba hacer un mayor diagnóstico diferencial sea con la del hilio, ya que las lesiones inicialmente del hilio pueden extenderse a las áreas periféricas y las lesiones avanzadas no pueden ser separadas histológicamente; sin embargo cabe mencionar que no se contó con tejido fresco de la variante del hilio para el análisis. La expresión de los inmunomarcadores para la variante NOS mostró que son útiles para separarla de una lesión colapsante y de la ECM no solo por la morfología. En las lesiones NOS hay

disminución en la brillantez de la expresión de WT1 en el núcleo de los podocitos comparado con ECM, cabe mencionar que este hallazgo fue similar con el control y además esta positividad es menos homogénea y más granular. En comparación con la GC, el número de podocitos parece estar conservado mientras que en esta última la desaparición de podocitos es muy evidente con el WT1.

Las células mesangiales parecen estar aumentadas (marcadas con tinción nuclear de contraste) en los casos de NOS. En el análisis con Tie2 esta mostró mucho mayor expresión en la variante periférica al comparar con la variante de la punta y en ECM, quizás esto como ya se refirió previamente sugiere mayor daño al endotelio en ECM comparado con las otras variantes. Por lo tanto, confirmamos nuevamente la utilidad de los inmunomarcadores en la definición de los casos que pudieran ser NOS u otras variantes.

Los hallazgos encontrados en el único caso de la variante celular, mostraron de manera sorprendente que los podocitos se encontraban preservados, según se mostró con la expresión de WT1 la cual fue similar al control normal y a la enfermedad de cambios mínimos. La diferencia con esta última sería únicamente la expresión de Tie2 encontrando una expresión muy débil en ECM comparado con la variante celular.

En conclusión, los inmunomarcadores utilizados en este estudio muestran de acuerdo a los resultados del análisis de función discriminante, que la expresión mediante inmunohistoquímica de la proteína WT1 y 1135 mostró un poder suficiente para clasificar los casos analizados y poder discriminar los casos nuevos, lo cual fue

confirmado al realizar el procedimiento de la clasificación con validación cruzada, encontrando una correcta clasificación de los casos en un 87.1% sobre todo en la variante periférica, colapsante y enfermedad de cambios mínimos. Estos inmunomarcadores ayudaron a definir el tipo de variante de EFyS, los casos que corresponden a EFyS pero que no tienen glomérulos esclerosados en la muestra, así como aquellos casos con verdadera enfermedad de cambios mínimos. No sólo se definieron las variantes, sino que ayudaron a realizar implicaciones en la patogenia de la enfermedad confirmando que las entidades son diferentes desde su inicio y no meramente el espectro de una misma entidad en estadios tempranos o avanzados.

REFERENCIAS

- 1.- Pathologic Classification of Focal segmental glomerulosclerosis: A Working Proposal. *Am. J Kidney Dis* 43(2): 368-282, 2004
- 2.- Rich AR: A hitherto undescribed vulnerability of the juxta-medullary glomeruli in lipoid nephrosis. *Bull Johns Hopkins Hospital* 100:173-186, 1957
- 3.- D' Agati V: The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 46: 1223-1241, 1994
- 4.- Rennke H, Klein PS: Pathogenesis and significance of non-primary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 13:443-445, 1989
- 5.- Rosen S, Galvanek E, Levy M, Et-al. Glomerular disease. *Human Pathol* 12:964-977, 1981
- 6.- Coughi D, Evangelista A, Baraldi A, Et-al. Relapse of nephrotic Syndrome Following remission for 20 years. *Int J Pediatr Nephrol* 4:211-214,1983
- 7.- Baak JP, Wehner H. A multivariate morphometric analysis of the glomeruli in the normal and pathologically changed human kidney. *Virchows arch [A] [Pathol Anat]* 399;1:105-114, 1983
- 8.- D'Agati V: pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 23; 117-134, 2003
- 9.- JC Jennette, Et-al. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int* 69; 920-926,2006
10. C Kitiyakara, JB Koop, P Eggers. Trends in the epidemiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Seminars Nephrol* 23(2);172-182, 2003
- 11.- Mundel P, Reiser J, Zuñiga Mejia BA, Pavesstadt H, Davidson GR, Kriz W, and Zeller R. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process

formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236: 248-258, 1997.

12.-Virginia J, et-al. circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 334;14: 878-883, 1996

13.- Mozes MM, Bottinger EP, Jacot TA, and KoppJB. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms in TGF- β transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 10:271-280, 1999

14.- Ma LJ Nakamura S, Whitsitt JS, Fogo AB, Et-al. Regression of sclerosis in again by an angiotensin inhibition-induced decrease in PAI-1. *Kidney Int* 58: 2425-2436, 2000

15. Kriz W, and Lemley KY. The role of podocytes in the development of glomerulosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8: 489-497, 1999

16.- Niemer ZI, Stein H, Mundel P, Et-al. Podocytes are the major source of IL-1 alpha and IL-1 beta in human glomerulonephritides. *Kidney Int* 52(2): 393-403, 1997

17.- Kriz W, Hackenthal E, Nobiling R, Et-al. A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney Int* 45:369-376,1994

18.- Betsholtz C and Raines EW. Platelet-derived growth factor a key regulator of connective tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. *Kidney Int* 51: 1361-1369, 1997

19.-Elizabeth S Herman and Paul E Klotman. HIV associated nephropathy: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Semin Nephrol* 23(2); 200-208, 2003

20.- D' Agati V, Appel GB. Renal pathology of human immunodeficiency virus infection. *Semin Nephrol* 18: 406-421,1998

- 21.- Li RM, Branton MH, Kopp JB, et-al. Molecular identification of SV40 infection in human subjects and possible association with kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 2320-22330, 2002
- 22.- Sumant S Chugh, Beenu Kaw, Yashpal S Kanwar. Molecular structure-function relationship in the slit diaphragm. *Semin Nephrol* 23 (6); 544-555, 2003
- 23.- Kestila M, Et-al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin is Mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1:575-582, 1998
- 24.-Rousaleinen V, Et-al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7962-7967, 1999
- 25.- Putaala H, Et-al. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 10: 1-8, 2001
- 26.- Beltcheva O, Et-al. Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome. *Hum Mutat* 17: 368-373, 2001
- 27.- Fuchshuber A, Jean G, Grivoubal O, Et-tal. Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet* 4: 2155-2158, 1995
- 28.- Schwarz K, Simons M, Reiser J, Et-al. Podocin a raft associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108 : 1621- 1629, 2001
- 29.- Carraro M, Caridi G, Bruschi M, Et-al. Serum glomerular permeability activity in patients with podocin mutations (NPHS2) and Steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc nephrol* 13: 1946-1952, 2002

- 30.- Boute N, Gribouval O, Roselli S, Et-al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24: 349-354,2000
- 31.- Lehtonen S, Zahro F, Lehtonen E. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 283:F734-F743, 2002
- 32.- Li C, Rouustalainen V, Shaw AS, and Minner JH. Cd2ap is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F785-F792, 2000.
- 33.- Shin NY, Et-al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286: 312-315, 1999
- 34.- Kaplan JM, Kim SH, North K, Et-al. Mutations in ACT4, encoding α -actin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24: 251-256, 2001
- 35.- Daskalakis N, Winn MP. Focal and segmental glomerulosclerosis: Varying biologic mechanisms underlie a final histopathologic end point. *Semin Nephrol* 26:89-94, 2006
- 36.- Denamur E, Bocquet N, Baudouin V, Et-al. WT1 splice site mutations are rarely associated with primary steroid-resistant focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 57: 1868-1872, 2000
- 37.- Mrowka C, Schedl A. Wilm's tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. *J Am Soc Nephrol* 11: S106-S115, 2000 (suppl)
- 38.- Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. The dysregulated podocyte phenotype: A novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 10:51-61, 1999
- 39.- Kemeny E, Durmuller U, Nickeleit V, Et-al. Distribution of podocyte protein (44 kd) in different types of glomerular diseases. *Virchows Arch* 431: 425-430,1997

- 40.- Bariety J, Bruneval P, Hill G, Et-al. Post transplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* 12:261-274,2001
- 41.- Mundel P, Heid HW, Mundel TM Et-al. Synaptopodin: An actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139: 193-204, 1997
- 42.- Kemeny E, Et-al. podocytes lose their adhesive phenotype in focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* 43: 71-83,1995
- 43.- Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 59; 118-125,2001
- 44.- Wharram BL, Goyal A, Gillespie PJ, Et-al. Altered Podocyte structure in GLEPP1 (Ptpo)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest* 106: 1281-1290,2000
- 45.- Sharif K, Goyal M, Kershaw D, Et-al. Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of GLEPP1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CFN, and FSGS. A dedifferentiation hypothesis for the nephrotic syndrome. *Exp Nephrol* 6:234-244, 1998
- 46.- Kerjaschki D, Sharkey DJ Farquhart MG. Identification and characterization of podocalyxin---The major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 98:1591-1596, 1994
- 47.- Takeda T, Go WY, Orlando RA, Farquhart MG. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in MDCK cells. *Mol Biol Cell* 11: 3219- 3232, 2000
- 48.- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Et-al. Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766,1986

- 49.- Mitic LL, and Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60: 121-142, 1998
- 50.- Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 269: G647-G675, 1995
- 51.- Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Et-al. Clustering of shaker-type K⁺ Channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kienases. *Nature* 378: 85-88, 1995
- 52.- Schnabel E, Anderson JM, and Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 111: 1255-1263, 1990
- 53.- Willott E, Balda MS, Heitzelman M, Et-al. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junctions protein ZO-1. *Am J Physiol* 262: C1119-C1124, 1992
- 54.- Kiruhara H, Anderson JM, Farquhar MG. Diversity among tight junctions in rat kidney: Glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junctions protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7075-7079,1992
- 55.- Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P. Et-al. Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol* 157: 1905-1916, 2000
- 56.- Kawachi H, Kirihara H, Topham PS, Et-al. Slit diaphragm –reactive nephritogenic MAb 5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 273:F984-F993,1997
- 57.- Raats CJI, Bakker MAH, Van den Born J, Et-al. Differential expression of agrin in renal basement membrane as revealed by domain specific antibodies. *J Cell Biol* 130: 79-91, 1998

- 58.- Laurens W, Battaglia C, Foglieni C, Remuzzi G, Et-al. Direct podocyte damage in the single nephron leads to albuminuria in vivo. *Kidney Int* 47: 1078-1086, 1995
- 59.- Raats CJI, Jacob Van den Born, Et-al. Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 156: 1749-1765, 2000
- 60.- Durbeej M, Henry MD Ferletta M, Et-al. Distribution of dystroglycan in normal adults mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 46: 449-457, 1998
- 61.-Avila-Casado MC, Perez Torres I, Auron A, Soto V, Fortui T and Herrera-Acosta J. Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 66:133-143,2004
- 62.- Lui G, Kaw B, Chugh S, Et-al. Nephl and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 112:209-221,2003
- 63.- Lin P, Buxton JA, Acheson A, Et-al. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8829-8834, 1998
- 64.- Park EH, Lee JM, Blais JD, Et-al. Internal translation initiation mediated by the angiogenic factor Tie2. *J Biol Chem* 280; 22: 20945-20953,2005
- 65.- Evans V, Hatzopoulos A, Aird WC, Et-al. Targeting the Hprt locus in mice reveals differential regulation of Tie2 gene expression in the endothelium. *Physiol Genomics* 2:67-75, 2000
- 66.- Loughna S, Hardman P, Landels E, Et-al. A molecular and genetics analysis of renal glomerular capillary development. *Angiogenesis* 1:84-101,1997
- 67.- Hai Tao Yuan, Su Ping Yang and Adrian Spencer Woolf. Hipoxia up-regulated angiopoietin-2, a Tie-2 ligand in mouse mesangial cells. *Kidney Int* 58: 1912-1919, 2000

- 68.- Marsahall CB, Shankland SJ. Cell cycle and glomerular diseases: A minireview. *Nephron Exp Nephrol* 102: e39-e48,2006
- 69.- Shirato I, Sakai T, Kimura K, Et-al. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in masugi nephritis. *Am J Pathol* 148: 1283-1296, 1996
- 70.- Cockcroft D, Gault MD. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41,1976.
- 71.- Wakai S, Magil AB. Focal glomerulosclerosis in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Kidney Int* 41; 2: 428-434, 1992
- 72.- Muchitsch EM, Pichler L, Schwarz HP, Ulrich W. Effects of humans alpha-1 acid glycoprotein on aminonucleoside-induced minimal change nephrosis in rats. *Nephron* 81; 2: 194-199, 1999
- 73.- Yang Y, Gubler MC, Beaufils H. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV- associated nephropathy. *Nephron* 91: 416-423, 2002

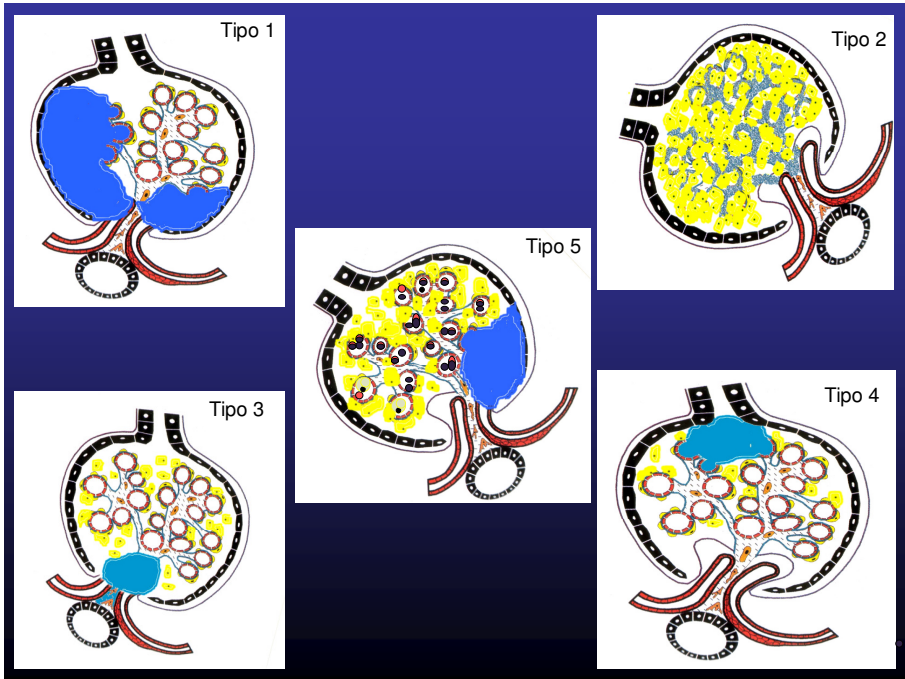


Fig. 1
1 NOS, 2 GC, 3 Hilio, 4 punta y 5 celular.

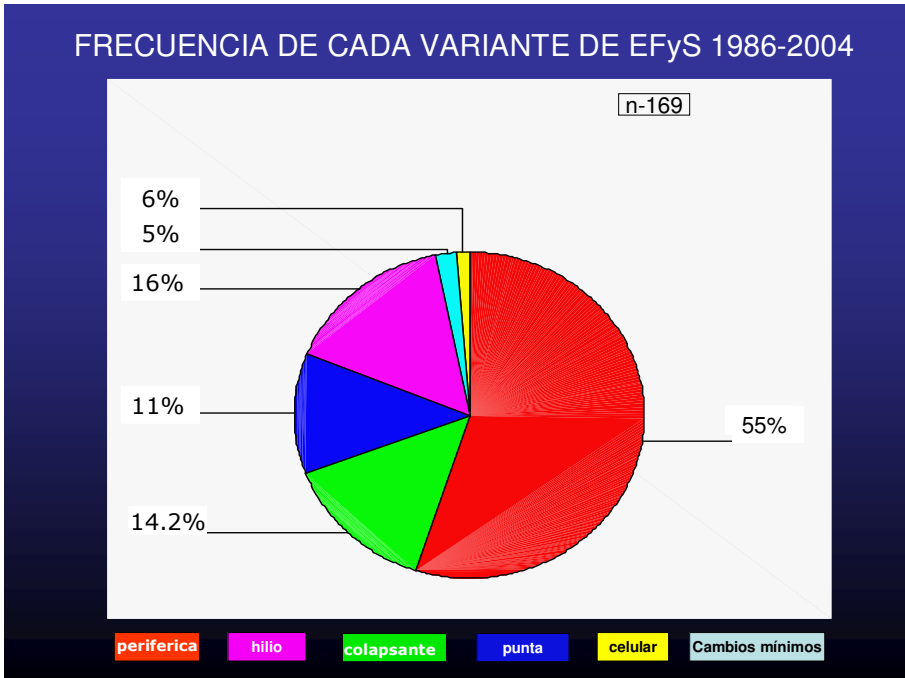


Fig. 2

DISTRIBUCION POR EDAD PARA EL TOTAL DE CASOS DE EFyS

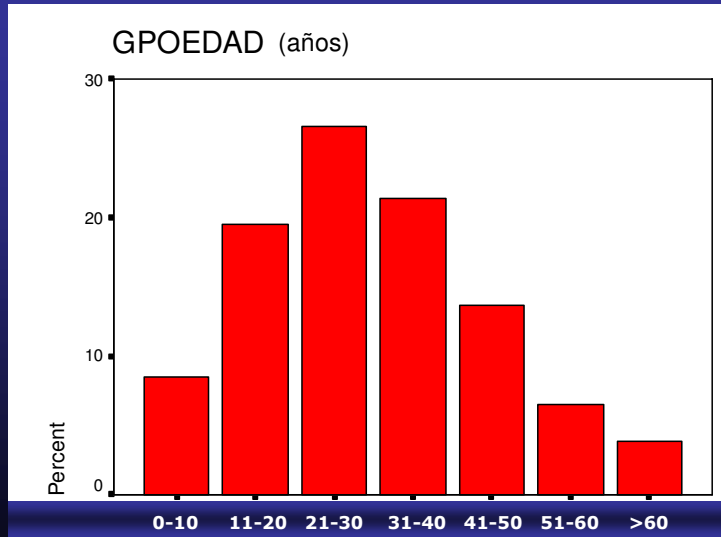


Fig 3

CAMBIOS HISTOLOGICOS EN CADA VARIANTE DE EFyS

Variante histológica	glomerulo megalia	Daño CEV	Fibrosis intersticial	Esclerosis segmentaria (promedios)	Aumento mesangial	Arteriolo nefroes	Nef int
1 N=93	N= 55 (59%)	N= 39 ^a (42%)	N=76 ^c (81.7%)	2.4 [*]	N= 40 (43%)	N= 77 ^e (82%)	N= 44 ^f (47%)
2 N=24	N=12 (50%)	N= 24 ^a (100%)	N= 20 ^c (83.3%)	3.2	N= 8 (33%)	N= 14 ^a (58%)	N= 17 ^c (70%)
3 N=20	N= 13 (65%)	N= 4 ^b (20%)	N= 18 ^b (90%)	2.4	N=9 (45%)	N= 19 ^b (95%)	N= 10 (50%)
4 N=27	N= 15 (55%)	N= 18 (66%)	N= 15 (55%)	2	N= 11 (40%)	N= 10 (37%)	N= 4 (14%)
5 N=2	N= 3 (100%)	N= 3 (100%)	N= 3 (100%)	2.5	N= 2 (66%)	N= 2 (66%)	N= 1 (33%)
6 N=2	N= 0	N= 0	N= 1 (50%)	0	N= 0	N=0	N= 0

ANOVA 1 via: * p<0.05 1 vs 2, & p<0.05 2 vs 3, β p<0.05 3 vs 4, € p<0.05 1 vs 4, £ p<0.05 2 vs 4

Tabla 1

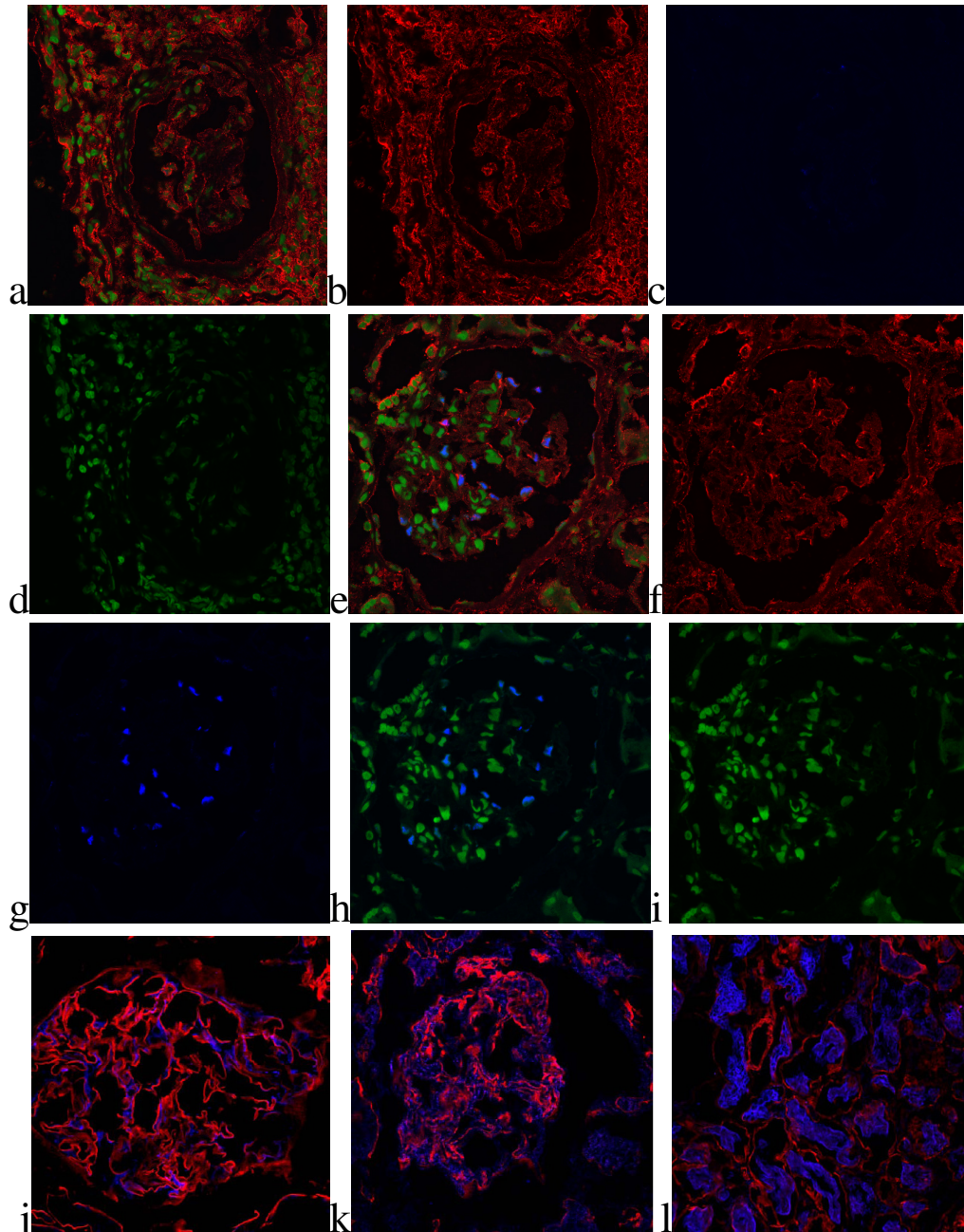


Fig. 4

- a. Laminina y tinción nuclear de contraste (se observa colapso glomerular ausencia y ausencia de núcleos en el ovillo glomerular).
- b. Colapso con Tie-2 (GC. Tie-2 marca el endotelio del ovillo glomerular y capilares peritubulares).
- c. WT1 (muestra ausencia de podocitos y pérdida de la expresión de WT1 en glomérulo correspondiente a GC).
- d. Tinción nuclear de contraste
- e. MCD (muestra colocalización de células mesangiales en verde, de podocitos en morado y segmentos podocíticos marcados con ZHX3
- f. Expresión normal de ZHX3 en MCD
- g. Expresión de WT1 en control normal. (mostrando un número normal de podocitos con expresión nuclear homogénea).
- h. La colocalización de células mesangiales y podocitos en control normal.
- i. La tinción nuclear en control normal.
- j. Expresión del RNAm de la proteína relacionada al clon 1135 muestra positividad intensa en capilares glomerulares en control.
- k. 1135 en MCD se observa fragmentación de la positividad y disminución de la intensidad en MBG.
- l. A 40X se observa fragmentación de la positividad de 1135 en membranas basales tubulares.