



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
“DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA”
UNIDAD MÉDICA DE INVESTIGACION EN INMUNOLOGIA E INFECTOLOGIA.
DELEGACIÓN 2 NORTE DEL D.F.



TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN:

PEDIATRÍA MÉDICA

**“Participación del factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1)
en la regulación de Fas así como su correlación con el tipo
de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con
nefritis lúpica”**

P R E S E N T A:

DR. RUBEN MARQUEZ MARIN

ASESORES DE TESIS:

DRA. En C. SARA HUERTA YEPEZ.

DRA. EUNICE SOLIS VALLEJO

DR. JOSE LUIS MATAMOROS TAPIA



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. José Luis Matamoros Tapia.
Director de Educación e investigación en Salud
U.M.A.E. Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

Dr. Jorge E. Menabrito Trejo.
Jefe de División de Pediatría
U.M.A.E. Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

Dr. Mario González Vite
Coordinador General del curso de especialización en Pediatría
U.M.A.E. Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

Dra. En C. Sara Huerta Yopez.
Investigador Asociado B.
Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.
Hospital de Infectología
Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”
La Raza, México D.F. UMAE

Dra. Eunice Solís Vallejo
Jefe del servicio de Reumatología Pediátrica
U.M.A.E. Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

Dr. Rubén Márquez Marín
Médico residente de 4º año de la especialidad en Pediatría Médica
U.M.A.E. Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que intervinieron en la realización de este proyecto y a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología Centro Médico Nacional La Raza, México D. F. y a los que colaboraron con todo su cariño para completar el presente trabajo así como a todos los niños, motivo de mi empresa.

TESIS DE POSGRADO:

“Participación del factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) en la regulación de Fas así como su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica”

INVESTIGADORES PRINCIPALES:

Dra. En C. Sara Huerta Yépez. Investigador Asociado B.
Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.
Hospital de Infectología
Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”
La Raza, México D.F. UMAE

Dra. Eunice Solís Vallejo
Jefe del Servicio de Reumatología Pediátrica
Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”
La Raza, México D.F. UMAE

Dr. José Luis Matamoros Tapia
Jefe de Educación e Investigación.
Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”
La Raza, México D.F. UMAE

INVESTIGADORES ASOCIADOS

Dr. Cesar González Bonilla
Jefe De la Unidad de Investigación Médica
En Inmunología e Infectología.
Hospital de Infectología
Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”
La Raza, México D.F. UMAE

Dra. María. Consuelo Calleja Romero
Médico Patólogo.
Centro Médico Nacional “Dr. Antonio Fraga Mouret”
La Raza, México D.F. UMAE

Dra. María de los Ángeles Hernández Cueto
Médico Patólogo.
Hospital General Regional No. 25 IMSS
México D.F.

Colaboradora Especial: Q.F.B. Berenice Sánchez Arellano
Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.
Hospital de Infectología
Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”
La Raza, México D.F. UMAE

Dr. Rubén Márquez Marín
Residente de Pediatría Médica.
Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”
La Raza, México D.F. UMAE

1. RESUMEN

TITULO: Participación del factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) en la regulación de Fas así como su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

PLANTEAMIENTO O JUSTIFICACION: En los estudios actuales sobre Apoptosis en nefritis lúpica, se ha demostrado que ésta se encuentra disminuida o es inadecuada. Se ha establecido la importancia de Fas en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias así como en nefritis lúpica. Sin embargo, no existen trabajos publicados que expliquen quien regula la expresión de Fas. Por lo que se investigó si YY1 participa en la regulación de la expresión de Fas y si esta regulación correlaciona con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

OBJETIVOS DE TRABAJO: Determinar si el factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) regula la expresión de Fas y cual es su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

HIPOTESIS: El factor de transcripción YY-1 regula negativamente sobre la regulación de Fas, y esta regulación correlaciona con un grado severo de la clasificación histopatológica de nefritis lúpica en pacientes pediátricos.

IDENTIFICACION DE VARIABLES: Factor de transcripción YY-1, Fas, Lesión histopatológica renal.

DISEÑO DE INVESTIGACION: Tipo de estudio Observacional, transversal, analítico, retrolectivo.

METODOLOGÍA: Se obtuvieron los bloques de parafina de biopsias renales de pacientes pediátricos, con LES y nefropatía, provenientes de los archivos de Patología del CMN “La Raza” así como 3 controles sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran”. Con los bloques de parafina correspondientes se practicaron cortes de 4 a 8 μ de espesor para tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (H/E), y de 2 a 4 μ de espesor para las tinciones inmunohistoquímicas. Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes para valorar las condiciones clínicas al momento de la biopsia.

DESCRIPCION DEL ESTUDIO: Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas, se realizaron mediante ANOVA de una vía, considerándose como significativa $p \leq 0.05$

RESULTADOS. Se encontró que la distribución celular en relación a la intensidad de la expresión de YY1 y Fas fue de un 80 a 90% en los túbulos contorneados proximales y distales con una expresión menor a nivel glomerular en comparación a los túbulos. El análisis morfométrico demostró que existe una relación inversa entre la densidad de la expresión de YY1 y Fas, en las lesiones renales Tipo IV, cuando se agrupó a YY1 de acuerdo a la intensidad de la expresión en Bajo (1-30%), Mediano (31-70%) y Alto (71-100%), por tipo de lesión histopatológica y por su expresión entre túbulos y glomérulos, con una diferencia estadísticamente significativa, realizado mediante ANOVA de una vía con una $p \leq 0.05$. Los datos clínicos con las características generales del grupo así como el curso de la enfermedad se reportan en las tablas 1 y 2.

CONCLUSIONES. Nuestro estudio sugiere la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación de Fas encontrando que existe una relación inversamente proporcional de éste en la nefropatía lúpica con la mayor expresión en los túbulos contorneados proximales y distales y cuando YY1 se encontró alto con una densidad de la expresión de Fas menor, correlacionó con menores complicaciones clínicas, curso favorable, así como menores alteraciones en la función renal y un tipo menor de lesión histopatológica por lo que resultaría interesante el estudio de YY1 como factor pronóstico de la enfermedad.

INDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	7
2.2. PATOGENIA.....	8
2.3. APOPTOSIS.....	9
2.4. APOPTOSIS Y NEFRITIS LUPICA.....	11
2.5. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YIN-YANG-1 (YY-1).....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
6. HIPÓTESIS.....	21
7. VARIABLES.....	22
8. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO.....	24
9. UNIVERSO DE TRABAJO.....	25
10. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	26
11. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	27
12. RECURSOS.....	30
13. RESULTADOS.....	31
14. DISCUSIÓN.....	35
15. CONCLUSIONES.....	38
16. ANEXOS.....	39
17. BIBLIOGRAFÍA.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

LES	Lupus Eritematoso Sistémico
Fas	(Fas/APO-1) Antígeno de apoptosis 1
YY-1	Ying- Yang-1
HLA	Del inglés (human leukocyte antigen)
TNF R	Receptor del factor de necrosis tumoral
DR3/TNF	Receptor de muerte 3
DR5	Receptor de muerte 5
CARD	Del Inglés: Death Fol. Caspasa recruitment domain.
APAF-1	Del Inglés: Proteasa activating factor-1.
Bcl-2	Del Inglés B-CELL CLL/LYMPHOMA 2
FLIP	Del Inglés: FLICE inhibitory protein
IAP	Del inglés: Inhibitor of apoptosis proteins
TUNEL	Del inglés: Terminal-Deoxinucleotidyl-transferase mediated dUTP-digoxingenin nick end labelling.
P53	Proteína 53
IL- 1 B	Interleucina 1 Beta
IL-2	La interleucina 2
IFN-y	El interferón gama
NF Kappa B	Factor nuclear Kappa B
ON	Oxido nítrico
CXCR4	Coreceptores para la quimiocina alfa del virus de inmunodeficiencia humana.
CCR5	Coreceptores para la quimiocina beta del virus de inmunodeficiencia humana.

1. RESUMEN

TITULO: Participación del factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) en la regulación de Fas así como su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

PLANTEAMIENTO O JUSTIFICACIÓN: En los estudios actuales sobre Apoptosis en nefritis lúpica, se ha demostrado que ésta se encuentra disminuida o es inadecuada. Se ha establecido la importancia de Fas en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias así como en nefritis lúpica. Sin embargo, no existen trabajos publicados que expliquen quien regula la expresión de Fas. Por lo que se investigó si YY1 participa en la regulación de la expresión de Fas y si esta regulación correlaciona con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

OBJETIVOS DE TRABAJO: Determinar si el factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) regula la expresión de Fas y cual es su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

HIPÓTESIS: El factor de transcripción YY-1 regula negativamente sobre la regulación de Fas, y esta regulación correlaciona con un grado severo de la clasificación histopatológica de nefritis lúpica en pacientes pediátricos.

IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES: Factor de transcripción YY-1, Fas, Lesión histopatológica renal.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Tipo de estudio Observacional, transversal, analítico, retrospectivo.

METODOLOGÍA: Se obtuvieron los bloques de parafina de biopsias renales de pacientes pediátricos, con LES y nefropatía, provenientes de los archivos de Patología del CMN “La Raza” así como 3 controles sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran”. Con los bloques de parafina correspondientes se practicaron cortes de 4 a 8 μ de espesor para tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (H/E), y de 2 a 4 μ de espesor para las tinciones inmunohistoquímicas. Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes para valorar las condiciones clínicas al momento de la biopsia.

DESCRIPCION DEL ESTUDIO: Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas, se realizaron mediante ANOVA de una vía, considerándose como significativa $p \leq 0.05$

RESULTADOS. Se encontró que la distribución celular en relación a la intensidad de la expresión de YY1 y Fas fue de un 80 a 90% en los túbulos contorneados proximales y distales con una expresión menor a nivel glomerular en comparación a los túbulos. El análisis morfométrico demostró que existe una relación inversa entre la densidad de la expresión de YY1 y Fas, en las lesiones renales Tipo IV, cuando se agrupó a YY1 de acuerdo a la intensidad de la expresión en Bajo (1-30%), Mediano (31-70%) y Alto (71-100%), por tipo de lesión histopatológica y por su expresión entre túbulos y glomérulos, con una diferencia estadísticamente significativa, realizado mediante ANOVA de una vía con una $p \leq 0.05$. Los datos clínicos con las características generales del grupo así como el curso de la enfermedad se reportan en las tablas 1 y 2.

CONCLUSIONES. Nuestro estudio sugiere la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación de Fas encontrando que existe una relación inversamente proporcional de éste en la nefropatía lúpica con la mayor expresión en los túbulos contorneados proximales y distales y cuando YY1 se encontró alto con una densidad de la expresión de Fas menor, correlacionó con menores complicaciones clínicas, curso favorable, así como menores alteraciones en la función renal y un tipo menor de lesión histopatológica por lo que resultaría interesante el estudio de YY1 como factor pronóstico de la enfermedad.

2. INTRODUCCION

2.1 Epidemiología.

El lupus Eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, multisistémica, episódica, caracterizada por la inflamación de los vasos sanguíneos y tejido conectivo así como presencia de anticuerpos antinucleares (ANAs), y anticuerpos anti-DNA. Sus manifestaciones clínicas son extremadamente variables y su curso es progresivo. Es un padecimiento autoinmune crónico con un componente inflamatorio muy importante, que cursa con periodos de remisiones y exacerbaciones, causando daño tisular mediado por mecanismos inmunológicos en diferentes órganos, aparatos y sistemas. La expresión clínica de este padecimiento es muy variable como resultado del compromiso sistémico y posiblemente de una serie de factores relacionados entre sí: genéticos, inmunológicos y ambientales. (1)

El LES es una enfermedad con distribución mundial, afecta a todas las razas aunque es de mayor gravedad en la raza negra, tiene predominio por el sexo femenino en la proporción de 9:1, se manifiesta en cualquier edad siendo más frecuente en la etapa productiva y reproductiva de la vida entre los 20 y 40 años. (2)

Esta patología autoinmune ha tenido un creciente aumento en la cual se ha reportado su inicio en etapas pediátricas en 33% de los niños, los cuales inician su padecimiento antes de los 10 años de edad y el resto en la adolescencia. Aunque el LES se presenta en todos los grupos étnicos, es más frecuente y más grave en afroamericanos, asioamericanos e hispanoamericanos con un curso clínico más agresivo en el grupo de edad pediátrico. En Estados Unidos, se ha notificado una prevalencia de 14 a 50 casos por 100,000 en tanto que en México se desconoce exactamente su incidencia y prevalencia aunque es claro que hay un número alto de portadores de este padecimiento. (3) La población pediátrica afectada en el IMSS, y particularmente en la Unidad Médica de Alta Especialidad va en aumento, así como los costos sobre todo en el tratamiento.

Una de las manifestaciones comunes y graves es el daño renal (65-85%). Se ha encontrado que es causante de una morbilidad y mortalidad elevadas, más frecuente en pacientes con LES iniciada en la infancia. (4) Se han determinado diversas formas histológicas de nefritis lúpica y la clasificación más frecuente utilizada es la de la OMS, en donde la mayoría de los niños afectados presenta la forma más grave (tipo IV) por lo que todos los esfuerzos en el diagnóstico oportuno, control de la enfermedad y manejo adecuado deben realizarse en estos pacientes. (3)

2.2 Patogenia de LES

Hasta este momento, no se conoce bien la etiología del LES, la información disponible sugiere causas multifactoriales las cuales para expresarse requieren de predisposición genética, desregulación del sistema inmunitario, factores hormonales y ambientales.

2.2.1 Factores genéticos

A. Presentación más frecuente (hasta 10 veces) en los familiares de pacientes con LES que en la población general.

B. Mayor concordancia entre gemelos idénticos comparada con heterocigotos (60% vs 9%).

C. Asociación de LES con antígenos HLA clase II (HLA-DR2 y DR3) tanto en raza blanca como negra.

D. Asociación de LES con enfermedades hereditarias por deficiencia de complemento: C1r, C1s, C1, INH, C4, C2, C5 y C8, principalmente con deficiencia de C2.

E. La deficiencia parcial de C2 en heterocigotos es también más frecuente, del 6% en LES vs. 1% en normales. Esta anomalía congénita se asocia con HLA-A10 y HLA-B18. (2)

2.2.2 Factores hormonales

Predominio en mujeres, inicio con frecuencia en los periodos cercanos a la menarquia, durante el embarazo o en el periodo posparto y su relación con anticonceptivos orales y en particular con los que contienen estrógenos. Los estrógenos aumentan la producción de autoanticuerpos y son capaces de ocasionar depresión de la inmunidad celular. (2)

2.2.3 Factores ambientales

A. La relación entre la exposición a la luz solar y el inicio o la exacerbación del LES.

- B. Relación entre infección (virus y bacterias) y la exacerbación del LES.
- C. Exposición ocupacional a metales pesados como cadmio, mercurio, oro y otros elementos relacionados con la producción de anticuerpos antinucleares como sílice, pesticidas, polivinilo y otros.
- D. Participación de medicamentos en la inducción de anticuerpos antinucleares y lupus: procainamida, hidralazina, clorpromazina, isoniazida, propiltiouracilo y anticonvulsivantes.
- E. Relación entre LES e implantes de silicón y desnutrición proteicoalórica (2).

Una de las características de las enfermedades autoinmunes es una desregulación en los procesos de Apoptosis.

2.3 Apoptosis.

Las células pueden morir por cualquiera de dos mecanismos principales: necrosis o apoptosis. Necrosis es la muerte de células a través de daño extremo, usualmente mediada por destrucción de la membrana plasmática o del soporte bioquímico de su integridad, liberando sus componentes alrededor del tejido dañado y con atracción de células inflamatorias, llevando a destrucción del tejido, característico de la inflamación (5;6).

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es el proceso que se caracteriza por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos adyacentes, por lo que no provoca respuesta inflamatoria. Se trata de un mecanismo de eliminación ordenada de células y por tanto, participa en la morfogénesis, ontogenia y fisiología de las células, así como en la homeostasis de los tejidos y sistemas del organismo. Aunque el proceso de apoptosis se desarrolla en varias horas, la remoción de los fragmentos apoptóticos es tan rápida, que raramente se identifican células apoptóticas en condiciones normales (7).

Están descritas dos vías principales para la inducción de la apoptosis, la extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca depende de receptores celulares de la familia del TNFR, entre los que se incluyen el TNFR1, DR3/TNF y Fas. Estos receptores forman trímeros y contienen dominios intracitoplásmicos, llamados de muerte (DD). Cuando a estos receptores se unen sus ligandos en

el exterior de la célula, los DD se unen a proteínas adaptadoras FADD (Fas associated DD), a excepción del TNFR1 que primero se une a TRADD. Las proteínas FADD tienen un dominio efector (DED) que a su vez está unido a la pro-caspasa 8, formando el “complejo inductor de la señalización de muerte” que es capaz de activar a esas moléculas y formar la caspasa 8, la cual a su vez inicia la activación de la cascada de caspasas efectoras 7,6,8 y 3, (7).

Por otro lado, en la “vía intrínseca” o mitocondrial, la membrana de este organelo se permeabiliza por alteraciones celulares como hipoxia o disminución en el transporte de glucosa. Esta vía depende de caspasas iniciadoras (caspasa 9) que se unen mediante dominios denominados CARD (death-fold caspase recruitment domain) a APAF-1 (protease activating factor-1), el cual se encuentra como monómero en el citosol, pero que al activarse por acción del citocromo C, forma polímeros conocidos como apoptosomas. En condiciones normales APAF-1 se encuentra separado del citocromo C por la membrana mitocondrial externa; sin embargo, cuando por alguna razón esta membrana se permeabiliza la segunda molécula se libera al citosol y se inicia la cascada de eventos que llevan a la apoptosis. El proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) se encuentra regulado por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2; éstas pueden dividirse en dos grupos, antiapoptóticas y proapoptóticas; las primeras (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, A1, Bcl-w y Mcl-1), evitan la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C, en tanto que las proapoptóticas, que se clasifican de acuerdo al número de dominios BH (Bcl-2 homology domains) que contienen, pueden mediar la permeabilización de la membrana mitocondrial por si solas (Bax, Bak y Bok), o pueden activarse por otro subgrupo de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, denominadas BH3 (Bim, Bid, Bad, Bmf, BNIP-3, Puma y Noxa). Durante el proceso de apoptosis se presentan cambios morfológicos y fisiológicos celulares desde etapas tempranas, los cuales pueden ser detectados por diversas técnicas de laboratorio. Entre los primeros cambios se encuentran la exposición de la fosfatidil-serina en la superficie celular, la cual puede determinarse por su capacidad de unir Anexina V y el aumento de la permeabilidad celular que puede medirse por la captación de yoduro de propidio mediante citometría de flujo. La actividad de caspasas puede ser determinada directamente o mediante la detección con anticuerpos específicos contra los productos de su proteólisis. El rompimiento del DNA celular puede determinarse mediante electroforesis, técnicas

inmunohistoquímicas, o bien mediante TUNEL (terminal-deoxinucleotidyl-transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling) (7;8)

2.4 Apoptosis y nefritis lúpica.

En el Forum de Nefrología el Dr. Alberto Ortiz expuso acerca de la apoptosis y su participación en el daño renal, en donde la regulación extracelular esta inducida por citocinas letales de la familia del TNF, FasL, lípidos como tromboxano A2, así como radicales libres, drogas y otros. La regulación intracelular puede ser activada por los receptores para el estrés celular y son antagonizadas por moléculas como el Bcl-2/BclxL, FLIP, IAP, así como factores extracelulares de supervivencia. Se ha visto la expresión de factores letales como el TNF y FasL en el daño glomerular. (9) El incremento en la expresión de Fas, Bcl-2, y Bax ha sido observado en la glomerulonefritis proliferativa en humanos (10). La apoptosis contribuye al remodelamiento y recuperación de la estructura del tejido. Evidencia de modelos experimentales sugieren que la apoptosis coexiste con la proliferación celular renal. (9)

Por otro lado se ha propuesto que la apoptosis puede, dependiendo de la respuesta celular glomerular después del daño ocasionar una resolución del mismo por eliminación del exceso de células glomerulares, pero otras veces contribuye al progreso de la enfermedad renal y eventualmente concluye en una etapa glomerular hipocelular esclerótica. [11] Stollar y col. reportan una acumulación de células apoptóticas en los folículos germinales de los pacientes con LES. (12)

Makino y col. realizaron un estudio en 22 pacientes con nefritis lúpica, evaluando el porcentaje de apoptosis, y encontraron 93% de apoptosis en los pacientes con Glomerulonefritis clase IV. El porcentaje de apoptosis en el glomérulo, correlacionó significativamente con el nivel serológico de actividad lúpica, niveles de anticuerpos anti-DNA, y complemento. (13).

En contraste, en otro estudio en donde se evaluó el porcentaje de apoptosis en 25 biopsias de pacientes de nefropatía lúpica clase IV y otras glomerulonefritis, se encontró que los pacientes

con nefritis lúpica tenían menor porcentaje de apoptosis, con una correlación negativa en la depuración de creatinina, concluyendo que la apoptosis se encuentra disminuida en dicha enfermedad siendo posible que este mecanismo conduzca al daño renal crónico (14). De igual forma Soto y col. realizaron un estudio evaluando la intensidad de la apoptosis en nefropatía lúpica con otras nefritis, encontrando una correlación negativa de la apoptosis con la cronicidad de la nefritis lúpica, concluyendo que la apoptosis se encuentra disminuida en esta nefritis. En estudios hechos por Malgorzata y col. en donde se comparó la apoptosis de 13 pacientes con nefritis lúpica clase IV y glomerulonefritis mesangiocapilar tipo I no lúpica, encontraron una población de apoptosis más baja en la nefropatía lúpica que en los pacientes con glomerulonefritis mesangiocapilar, asociándose esta baja apoptosis con fibrosis en el intersticio renal. (15; 16)

En estudios realizados en el 2005 por Kirim y col. investigaron la relación entre el curso clínico y apoptosis en biopsias renales con nefritis lúpica encontrando una correlación entre las células nucleares de las biopsias renales con el índice de actividad en la nefritis lúpica, concluyendo que la apoptosis puede ser un indicador pronóstico en esta nefropatía. (17)

Sugiyama y col. investigaron el rol de la apoptosis en la esclerosis glomerular en humanos y en ratas. Estudiaron a 8 pacientes con Nefritis lúpica clase IV, un paciente clase V, así como 4 pacientes con nefropatía por IgA, identificando a través de microscopia electrónica fragmentación de DNA y TUNEL, las células apoptóticas en el glomérulo, túbulo e intersticio. El número de células apoptóticas positivas con TUNEL, correlacionó con el grado de esclerosis y deterioro de la función renal. También se demostró que la apoptosis ocurre en la matriz mitocondrial del mesangio pero no en las células glomerulares, sugiriendo la importante participación en las células mesangiales. (18)

Kodera y col. describen el caso de un paciente con nefritis lúpica en la cual encontraron cuerpos apoptóticos en las células glomerulares a la tercera biopsia, no así en la primera ni en la segunda, así como este hecho, se acompañó de incremento en la proteinuria, cilindros hialinos, y de una disminución en la función renal. (19)

En los trabajos de Berden se comenta que los nucleosomas han sido identificados como autoantígenos y son generados durante la apoptosis y participan en el daño renal. Tanto el incremento o una apoptosis disminuida (la cual no se excluyen mutuamente) conduce a un incremento en la exposición modificada o más inmunogénica de los nucleosomas al sistema inmune. Esto genera la formación de nucleosomas T específicos y anticuerpos antinucleosomas. Después de la formación del complejo antinucleosoma, o anticuerpos anti-DNA con nucleosomas, estos autoanticuerpos hacen blanco sobre la membrana glomerular. Este potencial nefritogénico es debido a que se ligan los componentes de la histona del nucleosoma, de carga positiva, con la carga negativa del heparan sulfato en la membrana celular. Esto inicia la inflamación. Se ha propuesto esta hipótesis para el desarrollo de la nefritis lúpica encontrando que una apoptosis anormal (en un microambiente equivocado o en un tiempo inadecuado) puede conducir a liberarse anticuerpos incluyendo los nucleosomas, especialmente si la capacidad fagocítica es inadecuada o extrema. Los nucleosomas son presentados por las células dendríticas a las células T, las cuales ayudan en este proceso a las células B. Por esta vía varios anticuerpos son formados, incluyendo los antinucleosomas, anti-DNA y antihistonas. El complejo anticuerpo antinucleosoma es ligado a la membrana glomerular. Esta unión es resultado de una atracción de cargas entre la histona dentro de los nucleosomas con la del heparan sulfato de la membrana glomerular iniciando la lesión renal. (20)

Kalled y col. estudiaron la autoinmunidad en el LES, en un modelo de ratones dependiente de la interacción CD40-CD144, revelando que la severidad de la enfermedad en los ratones correlacionó con un marcado incremento en la frecuencia de apoptosis en los esplenocitos, incluyendo una alta proporción de células dendríticas apoptóticas. Este desequilibrio en la homeostasis de las células dendríticas fue reducido o normalizado por el tratamiento con anti-CD154, demostrándose que el CD154 participa en la regulación de la apoptosis y la homeostasis de las células dendríticas. (21)

Hay reportes acerca de la deficiencia hereditaria en los componentes del complemento, en donde estas deficiencias son los factores hereditarios que predisponen a una inadecuada eliminación de las partículas apoptóticas. (22). Wang y col. demostraron que el óxido nítrico juega un rol

importante en la ocurrencia de la apoptosis en la nefritis lúpica y que ésta puede ser en parte modulado por p53 y Bcl-2. (23)

En relación a la caspasa 3, Yang y col. aplicaron un inhibidor para ésta en modelos animales determinando su efecto en la inflamación renal y la apoptosis, encontrando una apoptosis disminuida en el glomérulo e intersticio. Este estudio indicó que la inhibición de la caspasa reduce la apoptosis renal, aminora la inflamación, la fibrosis, y mejora la proteinuria. (24)

Así también Li y col. estudiaron a 31 niños con nefropatía lúpica evaluando la cantidad de caspasa 3, encontraron que estos pacientes tuvieron un incremento en el número de células apoptóticas, concluyen que aunque el número de células apoptóticas fue mayor que en el control, la apoptosis fue relativamente insuficiente comparado con la proliferación. (25)

En un estudio comparativo sobre la activación de la caspasa y su relación con la apoptosis en las células tubulares en pacientes con carcinomas renales, Davison y col. encontraron resistencia a la quimioterapia y que esta se puede explicar por una inactivación de la caspasa, principalmente caspasa 3. (26) Seery y col. probaron el efecto del inhibidor de pan-caspasa Carbobenzoxi-valil-alanil-aspartil- (beta-O-metil)- fluorometilcetona en ratones hembra, por un periodo de 3 semanas resultando en una mejoría en el daño renal, tanto glomerular como intersticial. Proponiendo así que los inhibidores de caspasas pueden ser benéficos en el tratamiento del lupus al bloquear la apoptosis. (27)

La participación de las citocinas inflamatorias ha sido estudiada, Kyung Jo y col. examinaron la apoptosis vía Fas y caspasa en células cultivadas del túbulo proximal renal bajo el estímulo de citocinas y lipopolisacaridos. TNF y IL-1B son producidas por los macrófagos y son responsables de la mayoría de las manifestaciones por choque séptico, pero en el daño renal su participación era desconocida. Este estudio demostró que el TNF- α incrementa la apoptosis de las células de túbulo proximal con una elevación significativa de la expresión de Fas, Fas ligando, y la activación de caspasa, sugiriendo su rol importante en inducir la apoptosis al igual que IL-1B y otros lipopolisacaridos, concluyendo que el daño renal puede ser desencadenado por estas citocinas en la endotoxemia. (28)

De igual forma Du y col. investigaron la participación de IL-2 e IFN- γ en un modelo de enfermedad renal a nivel tubular en ratones, encontrando que inducen la apoptosis por activación de caspasa 8. La IL-2 no induce apoptosis en la ausencia de Fas sugiriendo que la regulación de IL-2 y actividad de la caspasa 8 requieren de la expresión de Fas. (29) En relación a la proteína Bax, Hatton y col. realizaron estudios en ratones nefrectomizados para investigar la expresión de esta proteína. La proteína Bax se encontró que regula la actividad de Bcl-2 acelerando la apoptosis. En este estudio, tanto Bax como Fas se encontraron incrementados en el modelo de enfermedad renal. (30)

Se han hecho estudios midiendo la proporción de RNA mensajero para Fas soluble y Fas expresado en la membrana de células mononucleares en sangre periférica y cuantificando la apoptosis en el LES, encontrando que los niveles de RNA mensajero y Fas, se encuentran significativamente mayores en relación a los pacientes que no tenían nefritis. (31) Badillo y col. estudiaron la expresión de FasL y Bax en 24 biopsias de pacientes con nefritis lúpica y 30 controles normales, encontrando que el 70% de las biopsias renales mostraron una expresión de FasL o Bax mRNAs, no así en los controles sanos, indicando su rol importante en la patogenia de esta enfermedad. (32)

Uguz y colaboradores evaluaron la correlación entre la expresión de Fas, Bcl-2 y p53 en tejidos humanos y controles, encontrando un número significativamente incrementado de células glomerulares en las glomerulonefritis proliferativas, comparado con las glomerulonefritis no proliferativas existiendo una correlación significativa solo con p53 y los niveles de nitrógeno ureico en sangre. (33)

De igual forma, dentro del espectro de presentaciones clínicas de la mutación en el CD95 (Fas/APO-1) se estudió a una familia portadora del síndrome Canele-Smith, uno de los cuales desarrollo nefritis lúpica clase V, concluyéndose que las mutaciones del CD95 están asociadas a la pérdida en la regulación de los linfocitos B, lo cual predispone a la autoinmunidad incluyéndose al LES. (34)

Se ha estudiado la expresión de la apoptosis inhibiendo la expresión de Bcl-2 en los glomérulos de varias glomerulonefritis. Se evaluaron por Inmunohistoquímica a través de la proteína asociada a la proliferación celular (KL-67) y la alfa SMA, encontrando una correlación positivamente significativa entre la expresión de Bcl-2 y la proliferación celular siendo mayor la expresión de Bcl-2 en la glomerulonefritis por IgA o Tipo IV de la OMS. Estos resultados sugieren que el mantenimiento de una hiper celularidad glomerular en estas enfermedades renales es debido a la inhibición de la apoptosis de células mesangiales por la expresión de Bcl-2. (35)

Lorz y cols demostraron mediante inmunohistoquímica e hibridación In Situ que FasL está presente en el riñón de ratones normales, principalmente en el epitelio de los túbulos proximales de riñones sanos. Sin embargo los niveles estuvieron elevados en los riñones de ratones con nefritis lúpica, demostrando el rol en la homeostasis por la expresión de FasL tanto en riñones sanos como en los dañados. (43)

Tsukinoki y col. investigaron la expresión renal de FasL mediante inmunohistoquímica y su localización en varias formas de glomerulonefritis, evaluando la expresión de FasL vía factor nuclear (NF) kappa B en cultivo de células mesangiales humanas, en donde la frecuencia de casos positivos para FasL en el glomérulo fue significativamente mayor para los casos de nefritis lúpica que en otras formas de glomerulonefritis y esto correlacionó con las manifestaciones clínicas severas de la enfermedad, demostrando que los fenotipos con mayor prevalencia para las células FasL-positivas son a nivel de las células mesangiales contribuyendo esto a la inflamación y proliferación glomerular, y que las citocinas proinflamatorias, en particular IL1 beta producida en la nefritis lúpica puede sobreregular a FasL vía el factor de transcripción NF K B en las células mesangiales de humanos. (44).

La mayoría de estos estudios demuestran la importancia que tiene Fas en la patogenia de LES. Sin embargo no existen trabajos publicados que expliquen quien regula la expresión de la proteína Fas durante el desarrollo de esta enfermedad.

2.5 Factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1).

YY-1 es una proteína de 68-kDa que contiene dedos de zinc, que posee la propiedad inusual de regular la transcripción en diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción (36; 37). Entre los genes que activa se incluyen IFN- α , β -caseína, *c-fos* y *c-myc*. Así como también los promotores de diversos virus en los cuales se incluyen el CMV, virus de la leucemia murina, virus del papiloma humano, y el VIH (38; 39).

YY-1 es un factor de transcripción el cual participa en la regulación positiva y negativa de diversos genes en mamíferos (40). Recientes estudios demostraron que YY1 reprime la transcripción del gen Fas uniéndose a la región silenciadora de su promotor. El tratamiento de líneas celulares tumorales con óxido nítrico (ON) induce una sobre expresión de Fas, ya que el ON inactiva al factor de transcripción YY-1 que funciona como represor de Fas. (41). La manera en que ON inactiva a YY-1 es mediante S-nitrosilación de esta proteína y la subsecuente inhibición de la actividad de unión al DNA (42). La sobre expresión de Fas, induce la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor.

Diversos estudios muestran que va en aumento el número de genes celulares y virales en los cuales se han encontrado sitios de unión para YY1 en sus regiones promotoras, lo que refleja la importancia de este factor como regulador en la transcripción. Recientes estudios en nuestro laboratorio en colaboración con la Universidad de California, Los Angeles (UCLA), muestran que YY1 regula de manera negativa la expresión de Fas y de DR5 uniéndose a sus respectivos promotores e inhibiendo así su transcripción esto en líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer de próstata. Diversos trabajos reportan que YY1 también regula de manera negativa la expresión de CXCR4 y CCR5 (coreceptores para el virus de la inmunodeficiencia humana “VIH”), induciendo una disminución en la expresión de estos receptores en la superficie celular y por tanto la infección por VIH. (42)

Betty y col encontraron algunos alelos de cromosomas asociados con LES, dentro de los cuales PARP, la cual es una polimerasa poli (ADP-ribosa) codifica la proteína Dedos de Zinc

relacionada con la reparación en el DNA y la apoptosis, sugiriendo que PARP, puede ser el gen susceptible dentro del cromosoma 1q41-q42, la cual está relacionada a esta enfermedad. (45)

Gronroos E y col demostraron que YY1 regula la transcripción, acetilación y ubiquitinación de p53, el cual es un supresor de tumor y regulador del ciclo celular así como de la apoptosis en respuesta a estrés genotóxico, siendo YY1 un regulador negativo de p53. (46)

Estudios recientes en nuestro laboratorio demostraron que YY-1 regula de manera negativa a Fas. No se tienen reportes hasta la fecha de la participación de YY1 en la fisiopatogenia de la nefritis lúpica. Estudios preliminares en nuestro laboratorio en donde se detecto la expresión de YY-1 por métodos inmunohistoquímicos en un tejido proveniente de un paciente con nefritis lúpica (tipo IV), mostraron que la expresión de YY-1 se encuentra predominantemente a nivel tubular en las células epiteliales viscerales y parietales del túbulo distal y de manera muy tenue se tiñe a nivel tubular proximal mientras que en los glomérulos la tinción fue negativa. Por otro lado la inmunohistoquímica para detección de Fas en el mismo paciente, mostró que la expresión fue principalmente a nivel tubular proximal, aunque también los túbulos distales fueron moderadamente positivos. Así mismo, se presento una tinción positiva importante de esta proteína en las membranas y citoplasma de las células epiteliales del glomérulo.

Por lo anterior es razonable pensar que YY1 este regulando de manera negativa la expresión de Fas y esto tenga una importante participación en la patogenia de la nefritis lúpica.

3. JUSTIFICACION

El lupus Eritematoso Sistémico es el prototipo de enfermedad autoinmune. A través de un mejor entendimiento de la patogénesis de este desorden, se han hecho grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de otros problemas inmunológicos.

Una de las manifestaciones comunes y graves es el daño renal. Se han determinado diversas formas histológicas de nefritis lúpica en donde la mayoría de los niños afectados presenta la forma más grave (Tipo IV de la OMS) por lo que todos los esfuerzos en el diagnóstico oportuno, control de la enfermedad y manejo adecuado deben realizarse en estos pacientes.

Hasta este momento, no se conoce bien la etiología del LES, donde la información disponible sugiere causas multifactoriales las cuales para expresarse requieren de predisposición genética, desregulación del sistema inmunitario, factores hormonales y ambientales.

Con los conocimientos actuales sobre apoptosis, el presente estudio se realizó para contribuir en la investigación del proceso fisiopatológico que ocurre en la nefropatía lúpica en niños y determinar si existe participación de YY1 en la regulación de Fas, y su correlación con el tipo de lesiones histopatológicas en estos pacientes, así como avanzar en los conocimientos disponibles para un mejor manejo y control de la enfermedad.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los estudios actuales sobre la apoptosis en la nefritis lúpica en niños, se ha demostrado que ésta se encuentra disminuida o es inadecuada.

Se ha establecido la importancia de Fas en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias así como en nefritis lúpica. Sin embargo, no existen trabajos publicados que expliquen quien regula la expresión de Fas.

Por lo que se planteó la siguiente pregunta de Investigación:

¿YY1 participa en la regulación de la expresión de Fas y esta regulación correlaciona con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica?

5. OBJETIVOS

General:

Determinar si el factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) regula la expresión de Fas y cual es su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

Específicos:

Determinar si el factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) regula la expresión de Fas y cual es su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

Determinar la expresión del factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY-1) y su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

Determinar la expresión de Fas y su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica.

Evaluar las condiciones clínicas de la enfermedad al momento de la Biopsia renal.

6. HIPÓTESIS

El factor de transcripción YY-1 regula negativamente la expresión de Fas, y esto correlaciona con un grado severo de la clasificación histopatológica de nefritis lúpica en pacientes pediátricos.

7. VARIABLES

Factor de transcripción YY-1

Definición Conceptual:

Es una proteína de 68-kDa que contiene dedos de zinc, que posee la propiedad inusual de regular la transcripción en diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción.

Esta proteína participa en la regulación positiva y negativa de diversos genes en mamíferos (Shi, Y. 1997. Biochim. Biophys. Acta). YY1 reprime la transcripción del gen Fas uniéndose a la región silenciadora de su promotor.

Definición operacional:

Se evaluará en biopsias renales de niños, preparando los cortes histológicos para su manejo con soluciones químicas y se evaluará a través de técnicas de inmunohistoquímica.

Indicador: Del 0 al 100%

Escala de Medición: Escalar discreta (%)

Fas

Definición conceptual:

Es una citosina que actúa como factor letal sobre membranas celulares.

Induce apoptosis en las células mesangiales, en el epitelio tubular activando receptores celulares específicos de muerte.

Definición Operacional:

Se evaluará en biopsias renales de niños, preparando los cortes histológicos para su manejo con soluciones químicas y se evaluará a través de técnicas de inmunohistoquímica.

Indicador: Del 0 al 100%

Escala: Escalar discreta (%)

Lesión histopatológica renal.

Definición Conceptual:

Daño renal autoinmune caracterizado por severa proliferación celular a nivel glomerular con un curso progresivo y de difícil tratamiento. Complicación renal más frecuente con presencia de proteinuria persistente mayor a 0.5 g/ día, así como cilindros celulares y otras alteraciones en el examen general de orina. (1)

Definición Operacional: Tipo I (patrón normal, sin sitio específico en el depósito de complejos inmunitarios), Tipo II (Patrón mesangial, con depósito de complejos inmunes únicamente a nivel mesangial), Tipo III (Patrón proliferativa focal y segmentaria, con depósito de complejos inmunes en mesangio, subendotelio y subepitelio), Tipo IV (Patrón proliferativo difuso, depósitos de complejos igual que el previo), Tipo V (patrón membranoso, con depósito de complejos inmunes en mesangio y subepitelio).

Indicador: I-V

Escala: Nominal De clase

8. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

Tipo de estudio Observacional, transversal, analítico, retrolectivo realizado en una muestra de 22 biopsias con nefritis lúpica de pacientes pediátricos en etapa escolar y adolescente, manejados en el servicio de Reumatología Pediátrica del Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza” La Raza México D.F. UMAE, de enero del 2000 a julio 2005 así como 3 controles sanos de tejido renal de nefrectomías otorgados por el servicio de patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

9. UNIVERSO DE TRABAJO

Se estudiaron 22 biopsias de pacientes pediátricos de 6 a 15 años, masculinos o femeninos, con diagnóstico de nefritis lúpica corroborado por la Dra. María. Consuelo Calleja Romero, patóloga experta en Riñón del mismo hospital, de los cuales se tuvo reporte histopatológico siendo 18 biopsias renales Tipo IV, 2 Tipo II y 2 Tipo III, según la clasificación de la OMS, los cuales fueron protocolizados en el servicio de Reumatología Pediátrica del Centro Médico Nacional “Dr. Gaudencio González Garza”, La Raza, México D.F. UMAE, de enero de 2000 a julio del 2005, así como 3 controles de tejido renal sano de nefrectomías otorgados por el servicio de patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. El tamaño de la muestra representa un 95% de confiabilidad del total de pacientes con biopsias en ese periodo.

10. CRITERIOS DE SELECCION

Criterios de inclusión:

- Biopsias renales de pacientes con nefritis lúpica de ambos sexos, en edad de 6 a 15 años que tengan este diagnóstico valorado por patólogo experto.

Criterios de exclusión:

- Biopsias renales que no capten el material empleado en la inmunohistoquímica
- Biopsias renales en las cuales se encuentre dañado el material a estudiar.

11. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.

11.1 Muestras.

Se obtuvieron 22 biopsias de pacientes pediátricos de 6 a 15 años, masculinos o femeninos, con diagnóstico de nefritis lúpica corroborado por la Dra. María. Consuelo Calleja Romero, patólogo experto en Riñón del mismo hospital, de los cuales se tuvo reporte histopatológico siendo 18 muestras con nefritis lúpica Tipo IV, 2 Tipo II y 2 Tipo III, según la clasificación de la OMS, los cuales fueron protocolizados por el servicio de Reumatología Pediátrica y archivados en el servicio de Patología del Hospital CMN La Raza. Se incluyeron aquellos que tuvieron mejor calidad y cantidad de tejido.

Con los bloques de parafina correspondientes se practicaron cortes de 4 a 8 μ de espesor para tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (H/E), y de 2 a 4 μ de espesor para las tinciones inmunohistoquímicas.

11.2 Reactivos para H/E

- Para la tinción de H/E:
- Grenetina Bacteriológica CTR SCIENTIFIC (Monterrey N.L. México).
- Hematoxilina de Harris, Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Méx.).
- HCl 1%-Alcohol amoniacal al 1%.
- Eosina B Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Méx.).
- Xileno.
- Eosina Y Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Méx.).
- Resina sintética Goleen Bell (Zapopan Jal. México).

11.3 Para el método de inmunohistoquímica:

- Silane (Sigma, CA. USA).
- Citrato de sodio (0.01 M pH 6.0).
- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Bloqueador Suero de Cerdo 2% (DAKO corporation, CA. USA).

- Biotina (Link, DAKO LSAB + kit, DAKO Corporation).
- Sustrato DAB (diamino benzidina) (DAKO LIQUID DAB + Substrate-Chromogen Solution. (DAKO corporation).

11.4 Anticuerpos.

- Anti-YY-1 (Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-Fas. (Santa Cruz, Biotechnology.)
- Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR) (DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).

11.5 Tinción de H/E.

En los portaobjetos con grenetina bacteriológica se montaron los cortes del tejido para la tinción de rutina H/E. Las laminillas fueron desparafinadas en un horno a 60° C e hidratadas mediante un tratamiento con alcohol a concentraciones decrecientes. Posteriormente el tejido fue teñido por 8 minutos con Hematoxilina de Harris, se enjuagó con agua corriente y el color fue virado con HCl 1%-Alcohol amoniacal al 1% en agua. Después el tejido fue contrateñido con Eosina, finalmente deshidratado en alcohol a concentraciones crecientes y xileno e inmediatamente cubiertos con resina sintética. Las muestras enseguida fueron analizadas mediante microscopia de campo claro.

11.6 Inmunohistoquímica.

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un solo tiempo en todos los grupos. Los cortes se montaron en laminillas cubiertas con silane. Se mantuvieron en una estufa bacteriológica a 62°C por 1 hora, para desparafinar, con el siguiente procedimiento se procedió a hidratar la muestra: 3 baños en xileno, con duración de 8 minutos cada uno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 5 minutos.

Se hizo la recuperación de antígeno con citrato de sodio, por 20 min. en baño Ma. y se hicieron lavados para eliminar el exceso de citrato.

Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos dos veces. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en Suero Normal de Cerdo al 2%.

Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-YY-1 1:250 y anti-FAS 1:1000. Después se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a Biotina link, con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR), por último el color se generó mediante la adición del substrato DAB (diamino benzidina) durante 3 minutos 30 segundos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina 15 seg.

Después el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y Xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

11.7 Análisis morfométrico

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes con el programa Imagen-Pro® Plus de Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA.

11. 8 Procesamiento de los datos.

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizó mediante ANOVA de una vía. Fue utilizado análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre grupos. $p \leq 0.05$ fue considerada como significativa.

12. RECURSOS

Los recursos fueron los siguientes:

Biológicos: 22 biopsia renales de niños en etapa escolar y adolescente atendidos en el servicio de reumatología pediátrica, así como 3 controles de tejidos renales de nefrectomías otorgados por el servicio de patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Físicos: Microscopios de luz, Kit para la técnica de inmunohistoquímica y analizador de imágenes.

Humanos: 1 Reumatólogo Pediatra, 1 Reumatólogo, 1 especialista en Apoptosis, 1 Residente de pediatría médica de 4o año, 1 Químico farmacobiólogo. 1 Patólogo experto en biopsias renales 1 cortador de muestras de parafina.

Químicos: Soluciones químicas para lavar y preparar los tejidos renales y anticuerpos para la inmunohistoquímica.

13. RESULTADOS

13.1 Análisis clínico

Se revisaron los expedientes de 22 niños con diagnóstico de LES de acuerdo a los Criterios de Clasificación del Colegio Americano de Reumatología los cuales presentaron afección renal, posteriormente se les realizó biopsia, se revisó a través de microscopia de luz y se hizo la clasificación morfológica de acuerdo a la OMS. En la distribución por género 19 fueron del sexo femenino (87%), 3 del masculino (13 %), la edad promedio fue 14.1 años y el rango de 6 a 15 años. La nefritis Tipo IV representó el 82% con 18 pacientes, y de estos 2 llegaron con falla renal aguda, 2 pacientes tuvieron Tipo II y 2 Tipo III (9% respectivamente). Las características clínicas se muestran en la Tabla 1 y 2. El 100% de los pacientes presentó alteraciones en el sedimento urinario: 72 % presentó microhematuria, 27.7% tuvo hematuria macroscópica que correspondieron a nefritis tipo IV. La proteinuria <1 gr /24 horas fue 16.6%, de 1-2 gr /24 horas fue 61.1% y >3 gr/ 24 horas fue 22.2%. El 55.5% presentó hipertensión arterial sistémica y 61.1% cursó con síndrome nefrótico. Un paciente curso con trombocitopenia, sangrados y choque hipovolémico que requirió manejo en la terapia intensiva. La depuración de creatinina fue menor de 50 ml/min./1.73m²sc en 88.8%. Se presentó anemia (Hb<11.3) en 83.3%, leucopenia en 55.5%, linfopenia en 83.3% trombocitopenia en 44.4%, complemento bajo (C3 y C4) en 61.1%, y elevación de azoados en 77.7% (Cr \geq 2 DE para la edad) ver Tabla 2 y gráficos adjuntos.

13.2 Morfología de los hallazgos Inmunohistoquímicos.

YY1

Después de la tinción con Inmunohistoquímica, la distribución celular en relación a la intensidad de la expresión de YY1 en las biopsias mostraron que en las Tipo II, III y IV existe una expresión principalmente de un 80 a 90% en los tubulos contorneados proximales y distales tanto de la medula como en la corteza renal (Fig. 2A y B, 3A y B, 4A y B, 5A y B, 6A y B). Los controles renales sanos se expresaron en los mismos sitios (Fig. 7A y B). YY1 se expresó principalmente en el epitelio tubular distal, con grados variables de intensidad en relación a la proliferación celular, con expresión leve (1-30%) moderada (31-70%) e intensa (71-100%). La expresión en

los glomérulos de esta proteína fue menor al 30% en relación a la expresión de Fas (Fig. 1A, 4A y 6A).

Fas

Después de la tinción de inmunohistoquímica encontramos que Fas se expresa principalmente en los tubulos contorneados proximales y distales tanto de la medula como de la corteza renal en un 90% (Fig.1C y D, 2C y D, 3C y D, 4C y D, 5C y D, 6C y D). Los controles renales sanos se expresaron en los mismos sitios (Fig. 7C y D) Se observó tinción en la membrana apical de todo el citoplasma en los túbulos contorneados distales (Fig. 3C). También se expresó hasta un 90% de intensidad en los tubulos contorneados proximales en donde hubo mayor proliferación celular (Fig. 3D). En algunas lesiones en la membrana basal y media de los tubulos contorneados distales la intensidad de la expresión fue menor (Fig. 3C). En el glomérulo las lesiones con mayor proliferación celular mostraron mayor tinción en las células mesangiales y en las células parietales de la capsula de Bowman así como en la matriz mesangial (Fig. 2C, 6D). Algunas células endoteliales en la luz capilar, mostraron tinción moderada (60%) con borde teñido en las células parietales (Fig.2C). En otros glomérulos en donde la lesión fue menor, la expresión de Fas fue negativa (Fig. 1C, 4C).

13.3 Análisis morfométrico de los hallazgos inmunohistoquímicos.

Después que se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la densidad de la expresión de YY1 y Fas en las biopsias renales, se realizaron diversos experimentos para probar la concentración adecuada del anticuerpo anti-YY1 y anti- Fas así como la preparación adecuada del tejido para la inmuntinción. Las graficas de la densidad de expresión se procesaron utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y la densidad de la expresión fue medida en pixeles.

En la figura 8A se muestra la densidad de la expresión de YY1 y Fas en todas las biopsias renales de acuerdo a la clasificación de la OMS, en la cual se encuentra una relación inversamente proporcional entre la expresión de YY1 y Fas ($p < 0.0001$)

La figura 8B representa al total de las lesiones Tipo IV con una densidad de la expresión de YY1 menor a la de Fas, lo cual guarda una relación inversamente proporcional ($p < 0.0001$)

En la figura 9 se muestra la densidad de expresión de YY1 y Fas y se compara la expresión de estas dos proteínas en todos los casos analizados, agrupando a YY1 de acuerdo a la intensidad de la expresión en Bajo (1-30%), Moderado (31-70%) y Alto (71-100%) y observamos una relación inversa que muestra YY1 alto y Fas bajo (ultimas columnas). La escala de medición fue mediante ANOVA de una vía, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0053$)

La figura 10 muestra la densidad de expresión de YY1 comparada con Fas de acuerdo a la lesión renal. En las lesiones Tipo II la densidad de la expresión fue similar a los controles, en la Tipo III se observa mayor expresión de YY1 comparada con Fas y en la Tipo IV se observa a YY1 con una expresión menor a la de Fas, en lo cual no hubo diferencia estadísticamente significativa.

En la figura 11 se muestra la densidad de expresión de YY1 comparada con Fas en los tubulos y glomérulos. Hay una menor densidad de la expresión de YY1 en túbulos y glomérulos, pero la expresión de Fas es alta en ambos sitios ($p < 0.03$)

14. DISCUSION

De acuerdo a los reportes de la literatura es bien conocido el papel de la apoptosis en la autoinmunidad (5,6,7,8) y la participación de ésta así como Fas esta bien definida en la producción del daño glomerular pues se ha encontrado tanto en tejido renal sano como dañado pero con mayor intensidad de la expresión en la nefropatía lúpica (9,18,31,32,43,44).

YY1 se conoce que regula la transcripción en diversos genes celulares y virales mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción (36,37). Hay trabajos publicados acerca de éste como es en líneas celulares tumorales tratadas con ON, algunos genes celulares y virales tales como el VIH y ciertos alelos de cromosomas relacionados a LES (38, 39, 41, 42,45). Estudios recientes muestran que YY1 regula de manera negativa la expresión de Fas en un modelo de cáncer de ovario y próstata (42).

No existen reportes previos de la participación de YY1 en la fisiopatogenia de nefritis lúpica y si este factor de transcripción pueda estar regulando de manera negativa la expresión de Fas, molécula que como ya se comentó juega un papel central en el daño glomerular.

Nuestra población estudiada con lupus de inicio en la infancia (22 pacientes) no mostró diferencias clínicas de acuerdo a lo reportado previamente. Se encontró en nuestra población que la nefritis Tipo IV es la predominante y en el sexo femenino, con una edad promedio de 14 años sin afectar a niños menores de 5 años. Nuestra población solo se estudia hasta los 16 años y posteriormente entran al control con la población de los adultos (IMSS). Todos nuestros pacientes presentaron grados variables de hematuria, 63% se presentaron con datos que apoyaron síndrome nefrótico, con depuración de creatinina baja y elevación de azoados en 73%, leucocitopenia 60%, trombocitopenia 40%. Corroboramos el diagnóstico de LES con la presencia de anticuerpos en el 100% y se presentó consumo del complemento en 64%. En la mayoría de nuestros pacientes (72%) la biopsia renal se tomó en la fase aguda de la enfermedad, en el resto después de los 6 meses de haberse realizado el diagnóstico, en todos los casos ya se había administrado al menos bolos de metilprednisolona. El 9% llegaron a nuestro servicio con falla renal por lupus que ameritaron manejo con diálisis. En cuanto a la función renal actual únicamente el 4% evoluciono a falla renal terminal correspondiendo al Tipo IV.

Si bien es conocido en la literatura actual que la expresión de Fas esta principalmente a nivel de túbulos contorneados, encontramos expresión de YY1 y Fas tanto en túbulos como en los glomérulos, sobre todo en las lesiones con mayor grado de proliferación celular, conservando una densidad en la expresión menor para YY1 y mayor densidad de expresión para Fas en estos sitios. Llama la atención la distribución celular de YY1 y Fas a nivel tubular en particular a nivel de los túbulos contorneados distales en la membrana apical, dato importante para la lesión renal pues sabemos que aquí existe una gran actividad de bombas ATP asa dependientes en donde actúan algunos factores hormonales como la aldosterona, la hormona antidiurética así como la regulación del Na y K los cuales se ven alterados en el proceso inflamatorio. La actividad mitocondrial propia de esta región nos habla de una mayor cantidad de caspasas. En los túbulos contorneados proximales en donde también expresaron tinción en grados variables de intensidad hubo un porcentaje mayor en las lesiones con mayor proliferación celular. Es en este sitio donde corresponde la mayor reabsorción del filtrado glomerular, solutos y solventes y comprobamos su afección clínicamente con la depuración de creatinina baja, daño renal agudo y elevación de azoados en la nefritis mas frecuente. (Tipo IV).

Se demostró en el análisis morfométrico que en las lesiones Tipo IV que la densidad de la expresión de YY1 es inversamente proporcional a la expresión de Fas, encontrando menor densidad en la expresión de YY1 y mayor para Fas con una correlación clínica más agresiva de la enfermedad. Esto lo observamos porque encontramos una mayor prevalencia de este tipo de lesiones y en nuestro servicio representa un 85% (datos aún no publicados). Queremos mencionar que las lesiones diferentes a este tipo son pocas y encontramos que la densidad en la expresión no mostró diferencia significativa en la Tipo II, debido que el tamaño de la muestra es pequeño por la prevalencia en niños, en donde los pacientes no mostraron alteraciones en la depuración de creatinina, y las manifestaciones renales fueron menores a las presentes en la Tipo IV, recuperando la función renal a 5 años. En la Tipo III, observamos una diferencia en la expresión donde YY1 es mayor si se compara con la expresión de Fas y por clínica no hubo falla renal aguda, depuración de creatinina ni elevación de azoados. Siendo interesante ver que cuando YY1 se encontró con una densidad elevada, la expresión de Fas fue menor, lo cual correlacionó con

menores complicaciones clínicas, curso favorable de la enfermedad, así como menores alteraciones en la función renal y un grado menor de lesión histopatológica.

Nuestro estudio sugiere que YY1 tiene un papel importante en la regulación negativa de la expresión de Fas en este tipo de lesiones, lo que indica que puede jugar un papel relevante en la fisiopatogenia, dato que no se había explorado con anterioridad. Este trabajo aporta bases muy importantes para un estudio más extenso de YY1 y valorar su utilidad como factor pronóstico en esta enfermedad.

15. CONCLUSIONES

1.- Nuestro estudio sugiere fuertemente la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación de Fas encontrando que existe una relación inversamente proporcional de este en la nefropatía lúpica en niños

2.- Se encontró la mayor expresión de ambas proteínas en los tubulos contorneados proximales y distales y en menor proporción en los glomérulos.

3.- Cuando YY1 se encontró alto la densidad de la expresión de Fas fue menor con una evolución de la enfermedad fue favorable, y menores complicaciones clínicas.

4.- De la misma forma, cuando la densidad de la expresión de YY1 fue mayor, correlacionó con menor daño histopatológico.

5.- YY1 puede ser un factor pronóstico de la enfermedad pues puede estar implicado en la autoinmunidad.

6.- Es necesario ampliar los estudios en la población pediátrica ya que por primera vez se muestra en el escenario de la fisiopatogenia de esta nefritis al factor de transcripción YY1, abriendo la posibilidad a proyectos encaminados en dilucidar mas afondo su participación en la nefritis lúpica, tanto en niños como en adultos y en otro tipo de enfermedades autoinmunes.

16. ANEXOS

RESULTADOS

DATOS CLÍNICOS

NUMERO	CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA	EDAD	SEXO	MESES DE EVOLUCION AL INICIO DE SINTOMAS	FALLA RENAL AGUDA	CURSO CLÍNICO	FUNCION RENAL* A 5 AÑOS
1	II B	12 ^a	F	5 MESES	-	-	NORMAL
2	II A	15 ^a	F	4 MESES	-	-	NORMAL
3	III	13 ^a	F	+ DE 6 M	-	-	NORMAL
4	III A	14 ^a	F	5 MESES	-	-	NORMAL
5	IV C	13 ^a	F	+ DE 6 M	-	CRISIS HIPERTENSIVA	IRC
6	IV C	14 ^a	F	1 MES	-	-	NORMAL
7	IV C	14 ^a	F	+ DE 6 M	-	-	NORMAL
8	IV C	15 ^a	F	+ DE 6 M	-	-	NORMAL
9	IV B	14 ^a	F	2 MESES	SI	SINDROME UREMICO/ VARICELA	NORMAL
10	IV C	15 ^a	M	3 MESES	-	CHOQUE HIPOVOLEMICO/ LES HEMATOLOGICO	NORMAL
11	IV C	14 ^a	F	2 MESES	SI	SINDROME UREMICO- PERITONITIS- ALTERACIONES METABOLICAS- HEMODIALISIS	NORMAL
12	IV C	14 ^a	F	3 MESES	-	PURPURA VASCULAR	NORMAL
13	IV C	14 ^a	F	1 MES	-	IVU POR STAPH COAG (-)	NORMAL
14	IV B	14 ^a	M	2 MESES	-	-	NORMAL
15	IV C	10 ^a	F	+ DE 6 M	-	-	NORMAL
16	IV C	14 ^a	F	+ DE 6 M	-	-	NORMAL
17	IV C	12 ^a	F	2 MESES	-	-	NORMAL
18	IV C	13 ^a	F	1 MES	-	-	NORMAL
19	IV	12 ^a	F	2 MESES	-	DERRAME PERICARDICO SEVERO	NORMAL
20	IV C	6 ^a	F	4 MESES	-	-	NORMAL
21	IV C	12 ^a	M	3 MESES	-	-	NORMAL
22	IV C	12 ^a	F	+ DE 6M	-	-	NORMAL

*NORMAL = Creatinina <1, urianálisis y sedimento urinario normales.

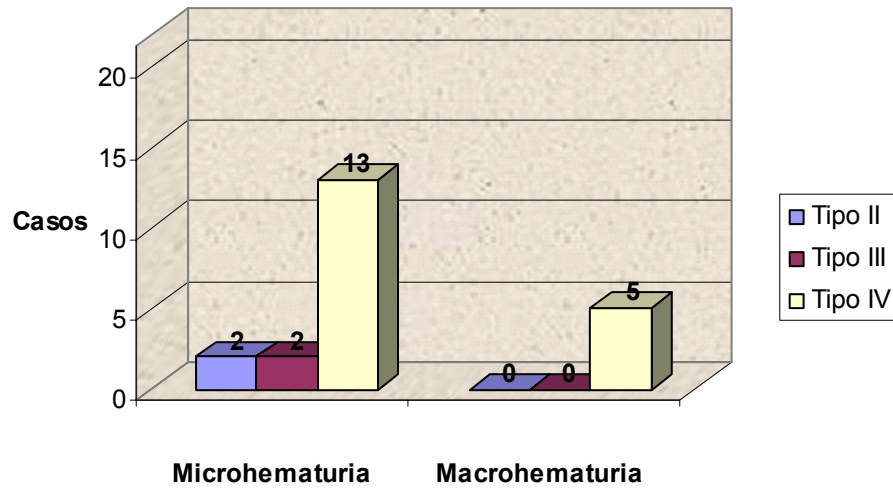
TABLA No. 1 Características generales del grupo de estudio así como curso clínico durante el estudio de la biopsia renal.

RESULTADOS
DATOS CLÍNICOS

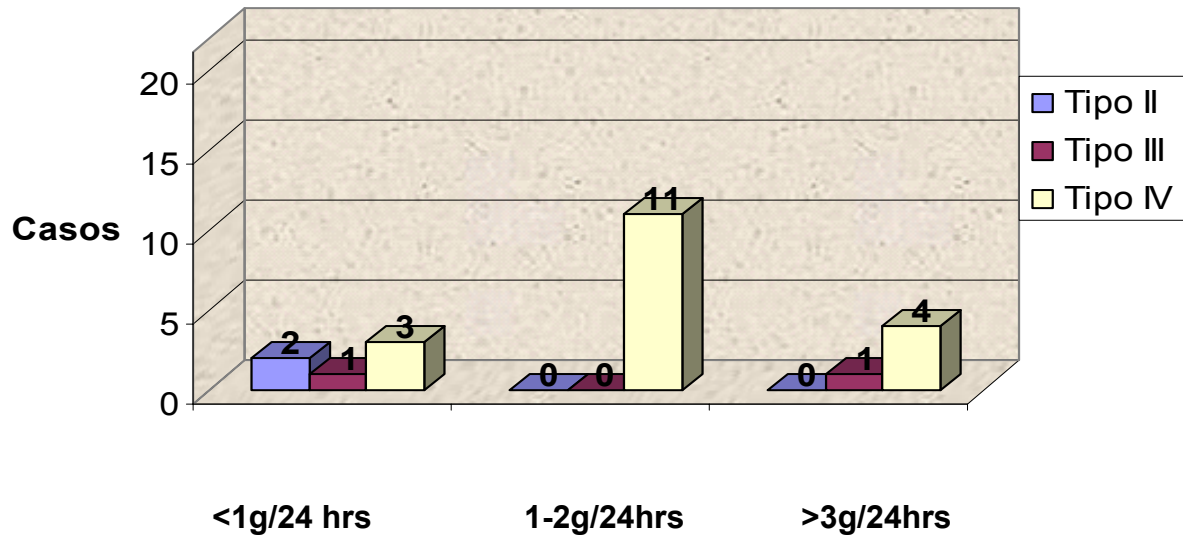
CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA	TIPO II	TIPO III	TIPO IV	TOTAL n =22
ALTERACIONES DEL SEDIMENTO URINARIO	2 (100%)	2 (100%)	18 (100%)	100%
MICROHEMATURIA	2 (100%)	2 (100%)	13 (72.2%)	77.2%
MACROHEMATURIA	0	0	5 (27.7%)	22.7%
PROTEINURIA < 1 GR/24H	2 (100%)	1 (50%)	3 (16.6%)	27.2%
PROTEINURIA 1-2 GR/24H	0	0	11 (61.1%)	50%
PROTEINURIA + 3 GR/24H	0	1 (50%)	4 (22.2%)	22.7%
HIPERTENSION	1 (50%)	1 (50%)	10 (55.5%)	54.5%
SINDROME NEFROTICO/NEFRITICO	2 (100%)	1 (50%)	11 (61.1%)	63.6%
DEPURACION DE CREATININA < 50MLmin/1.73m2sc	0	0	16 (88.8%)	72.7%
ANEMIA	2 (100%)	1 (50%)	15 (83.3%)	81.8%
LEUCOPENIA	0	0	10 (55.5%)	45.4%
LINFOPENIA	1 (50%)	0	15 (83.3%)	72.7%
PLAQUETOPENIA	1 (50%)	0	8 (44.4%)	40.9%
COMPLEMENTO BAJO C3 (80-120), C4 (18-25)	2 (100%)	1 (50%)	11 (61.1%)	63.6%
AZOADOS ELEVADOS	2 (100%)	0	14 (77.7%)	72.7%
TOTAL DE LA MUESTRA	N=2	N=2	N=18	N=22

TABLA No. 2 En la que se muestra el comportamiento clínico de los niños al momento de la toma de biopsia renal

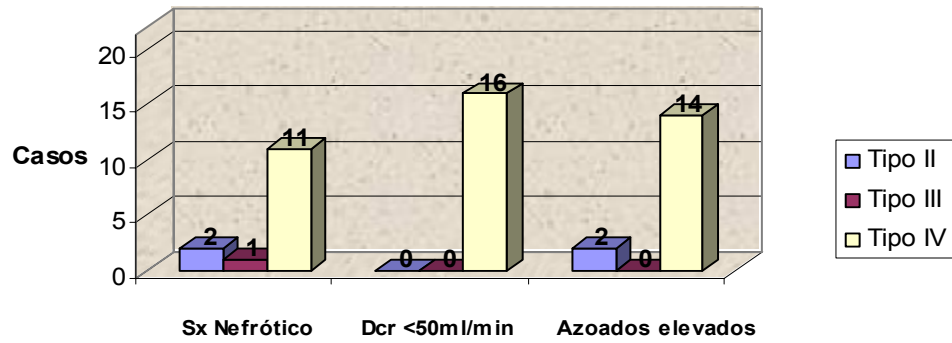
HEMATURIA



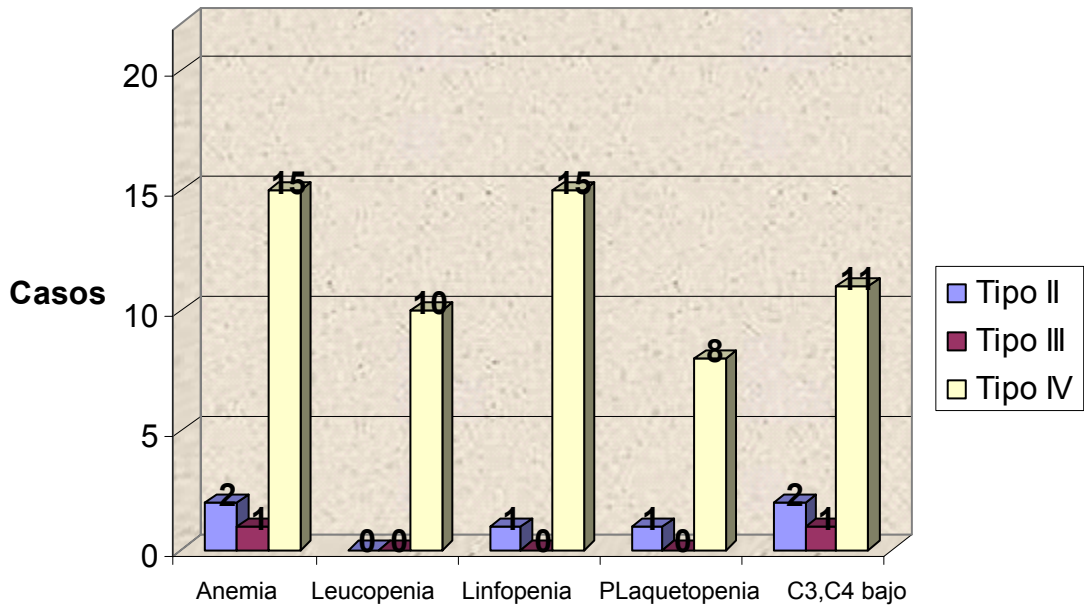
PROTEINURIA



ALTERACIONES DE LA FUNCION RENAL



ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS E INMUNOLÓGICAS



MORFOLOGÍA DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

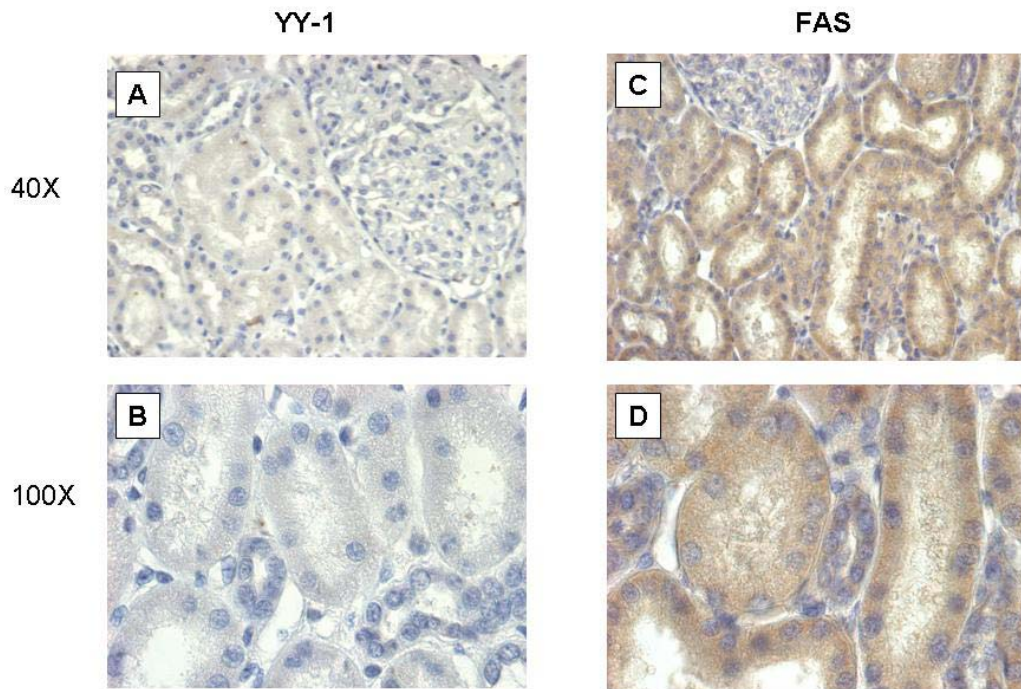


Figura 1. Inmunotinción de tejido con nefritis lúpica Tipo IV. **A.** La expresión de YY-1 se observa negativa (40x), **B.** Expresión negativa de YY1 (100X). **C.** Intensa expresión para Fas en los túbulos colectores proximales y se observa negativo en el glomérulo (40x). **D.** Se observa que la expresión de Fas es en el citoplasma de las células de los túbulos colectores proximales y distales, así como también en la membrana de estas células. (100X)

MORFOLOGÍA DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

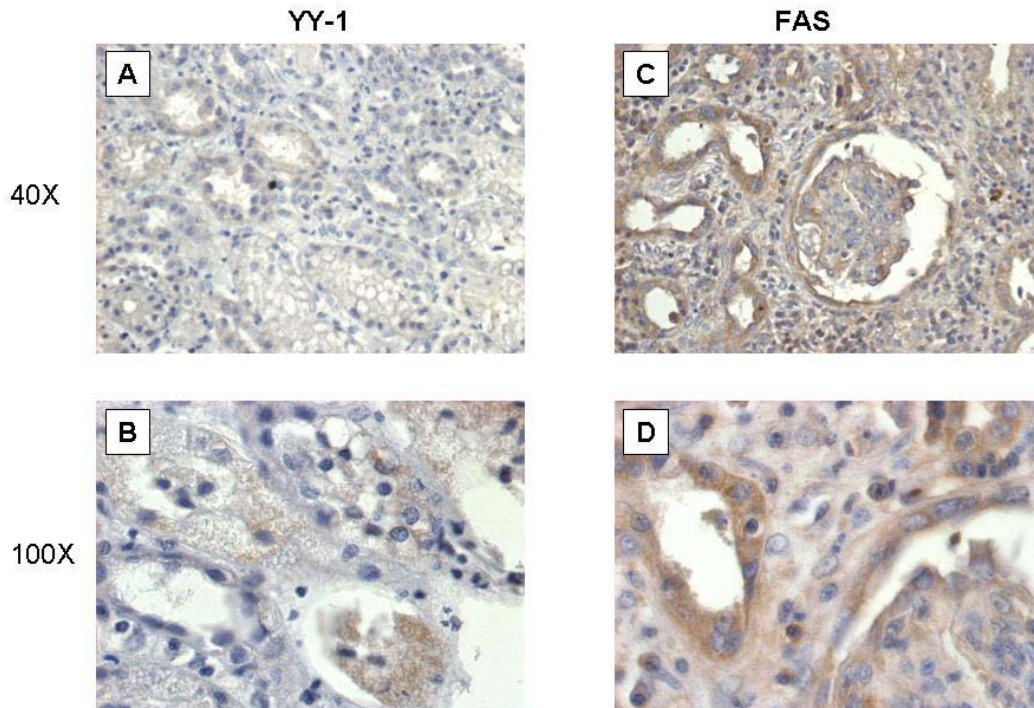


Figura 2. Inmunotinción de tejido con nefritis lúpica Tipo IV. **A.** Expresión leve (30%) de YY-1 con predominio en los túbulos contorneados proximales (40X). **B.** Expresión de YY-1 se muestran algunos núcleos en apoptosis (100X). **C.** Se observa una mayor expresión de Fas a nivel de túbulos contorneados proximales, con una tinción moderada en un 60%, a nivel glomerular en podocitos y mesangio. (40x) **D.** Se observa intensa expresión en un 71-100% para Fas en las células mesangiales de los túbulos contorneados proximales así como en las células epiteliales viscerales glomerulares. (100X)

MORFOLOGÍA DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

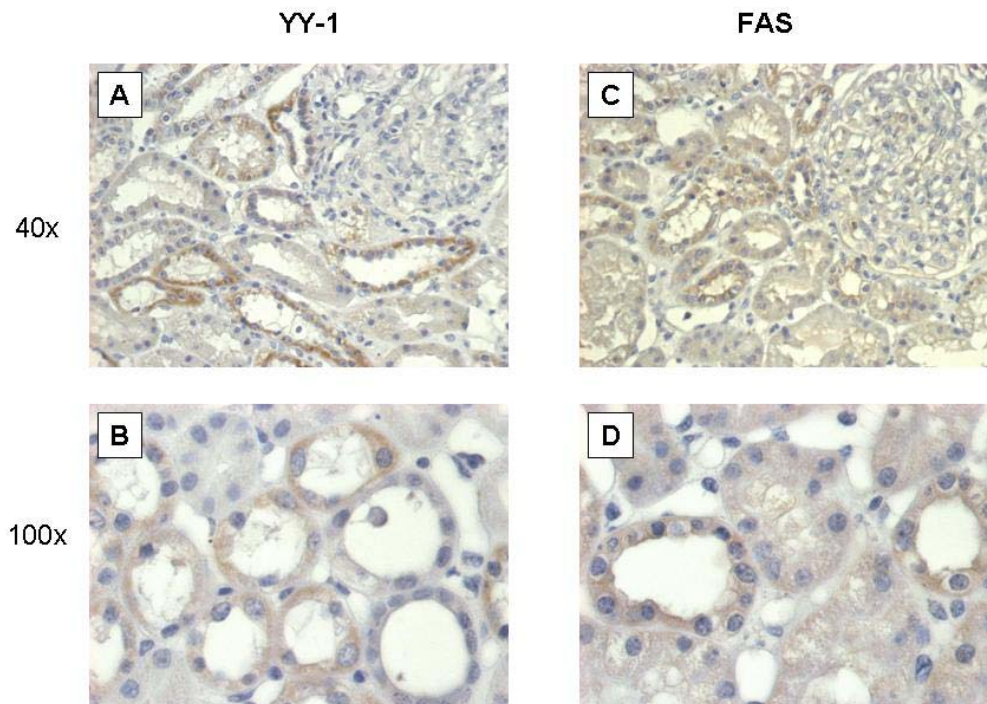


Figura 3. Inmunotinción de tejido con nefritis lúpica Tipo II. **A.** Expresión moderada en un 60% de YY1 a nivel de túbulo contorneado proximal y distal. Se muestra negativo el glomérulo (40X). **B.** Clara expresión de YY1 con una tinción moderada (60%) en los túbulo contorneado proximal (100X). **C.** Se observa expresión moderada en un 60% de Fas a nivel de túbulo contorneado proximal y distal siendo de menor intensidad en el glomérulo (40X). **D.** Expresión de Fas principalmente en membrana celular y citoplasma en la parte basal y media de los túbulo contorneado proximal y capilar (100X).

MORFOLOGÍA DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

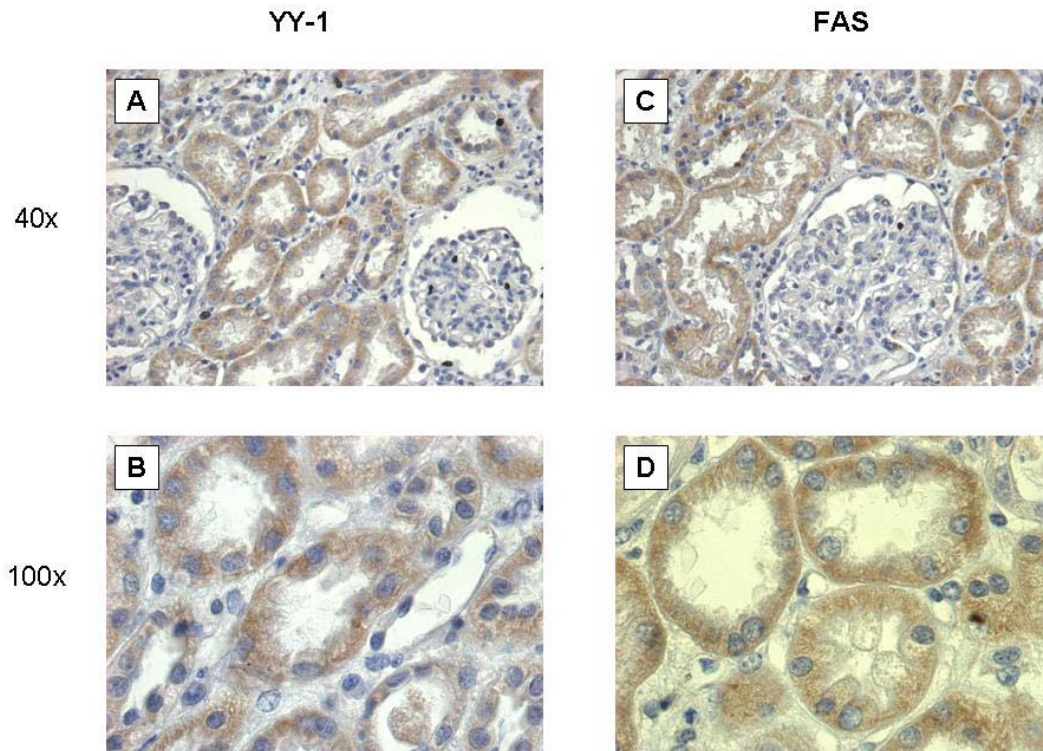


Figura 4. Inmunotinción de tejido nefritis lúpica Tipo IV. **A.** Tinción moderada de un 60-70% de YY1 a nivel tubular tanto en tubulos proximales, como en distales, siendo negativa en los glomérulos (40X). **B.** Expresión moderada en un 70% de YY1 en el citoplasma de túbulos contorneados proximales y distales. **C.** Se observa una mayor expresión en un 90-100% para Fas tanto en túbulos contorneados proximales y distales siendo negativo en el glomérulo (40X). **D.** Expresión de moderada intensidad de un 70% a nivel de las células mesangiales de los túbulos contorneados proximales y distales con algunos linfocitos teñidos en el intersticio. (100X).

MORFOLOGÍA DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

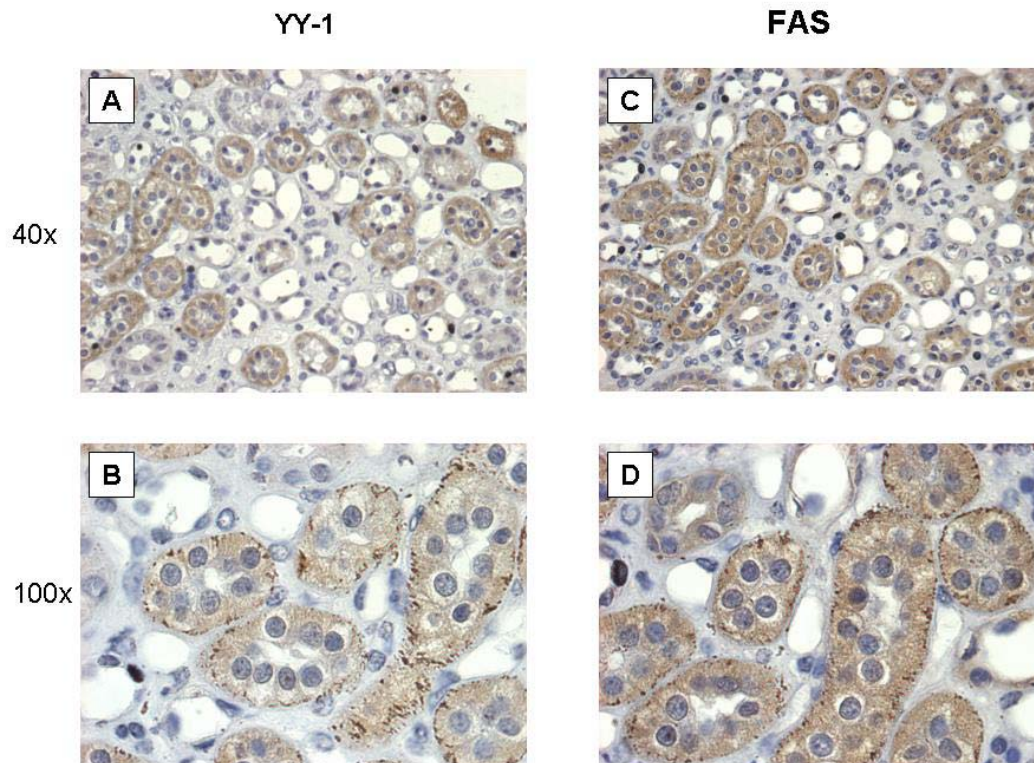


Figura 5. Inmunotinción de tejido nefritis lúpica Tipo II. **A.** Se observa una intensa expresión en un 90-100% de YY-1 a nivel de túbulo contorneado proximal y distal (40X). **B.** Tinción citoplásmica intensa en un 90-100% de YY-1 en células mesangiales de ambos tubulos (100X). **C.** Expresión intensa en un 90-100% de Fas en ambos túbulo renales (40X). **D.** Se observa una expresión intensa en un 90-100% de Fas en la parte basal y media de los tubulos contorneados proximal y distal (100X).

MORFOLOGÍA DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

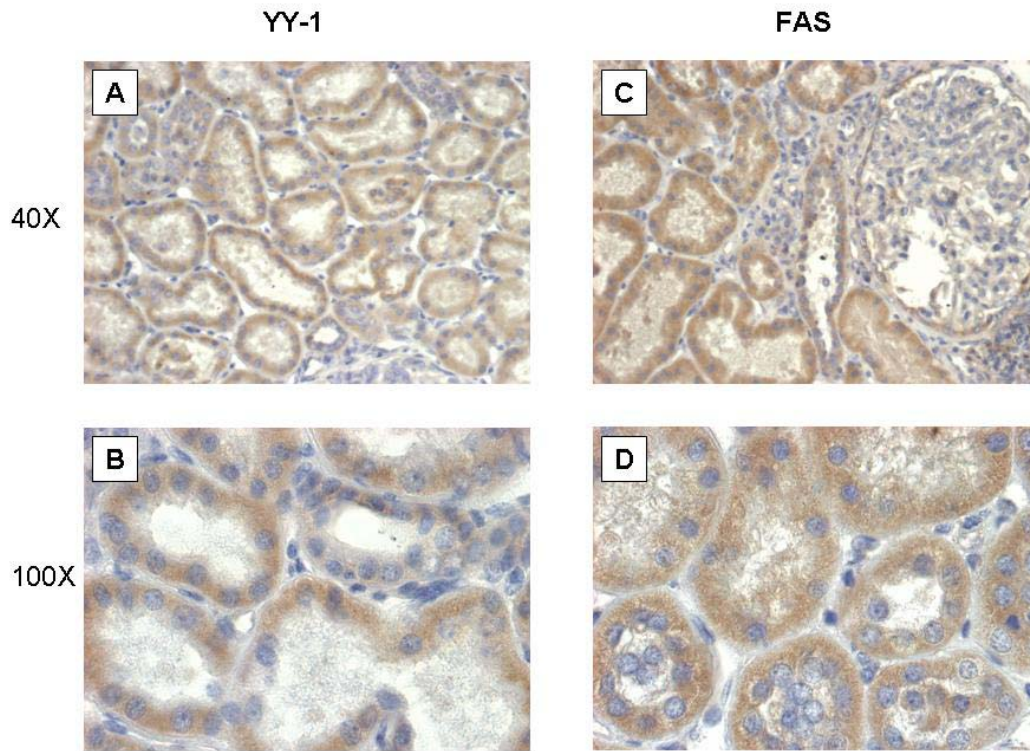


Figura 6. Inmunotinción de tejido nefritis lúpica clase IV. **A.** Se observa una expresión intensa en un 90-100% para YY-1 en los túbulos contorneados distales y proximales con algunos linfocitos teñidos en el intersticio (40X). **B.** Se observa una clara expresión de YY1 en el mesangio de los tubulos (100X). **C.** Expresión intensa en un 90-100% de Fas a nivel de membrana de los tubulos contorneados proximales y distales con menor intensidad el citoplasma glomerular. **D.** Fas expresado intensamente en un 90-100% en la parte basal y media de los tubulos contorneados proximales y distales. (100X).

MORFOLOGÍA DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

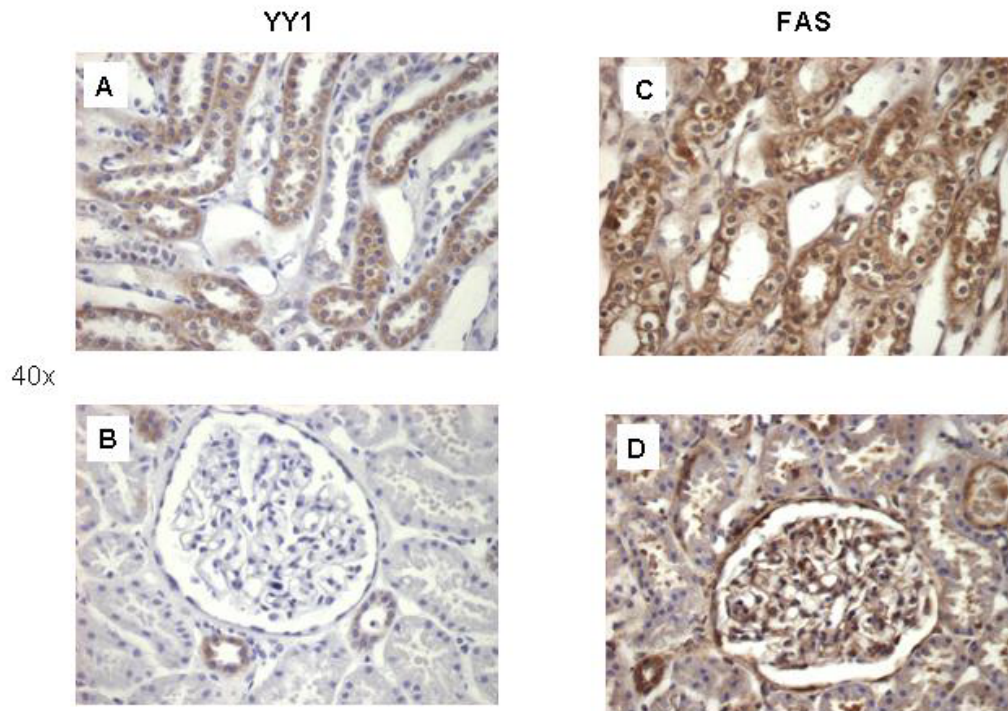


Figura 7. Inmuntinción de tejido renal sano. **A.** Se observa una expresión moderada en un 60% de YY1 a nivel de túbulo contorneados proximales y distales. **B.** Se observa una leve expresión menor al 30% de YY1 en túbulo contorneados proximales. Negativo en glomérulos. **C.** Expresión intensa en un 90-100% de Fas a nivel de membrana de los tubulos contorneados proximales y distales. **D.** Fas expresado intensamente en un 90-100% en la parte basal y media de los tubulos contorneados proximales y distales así como en el mesangio glomerular.

**ANALISIS MORFOMETRICO DE LA EXPRESION DE YY1 Y FAS
EN PACIENTES PEDIATRICOS CON NEFRITIS LUPICA
(TUBULOS)**

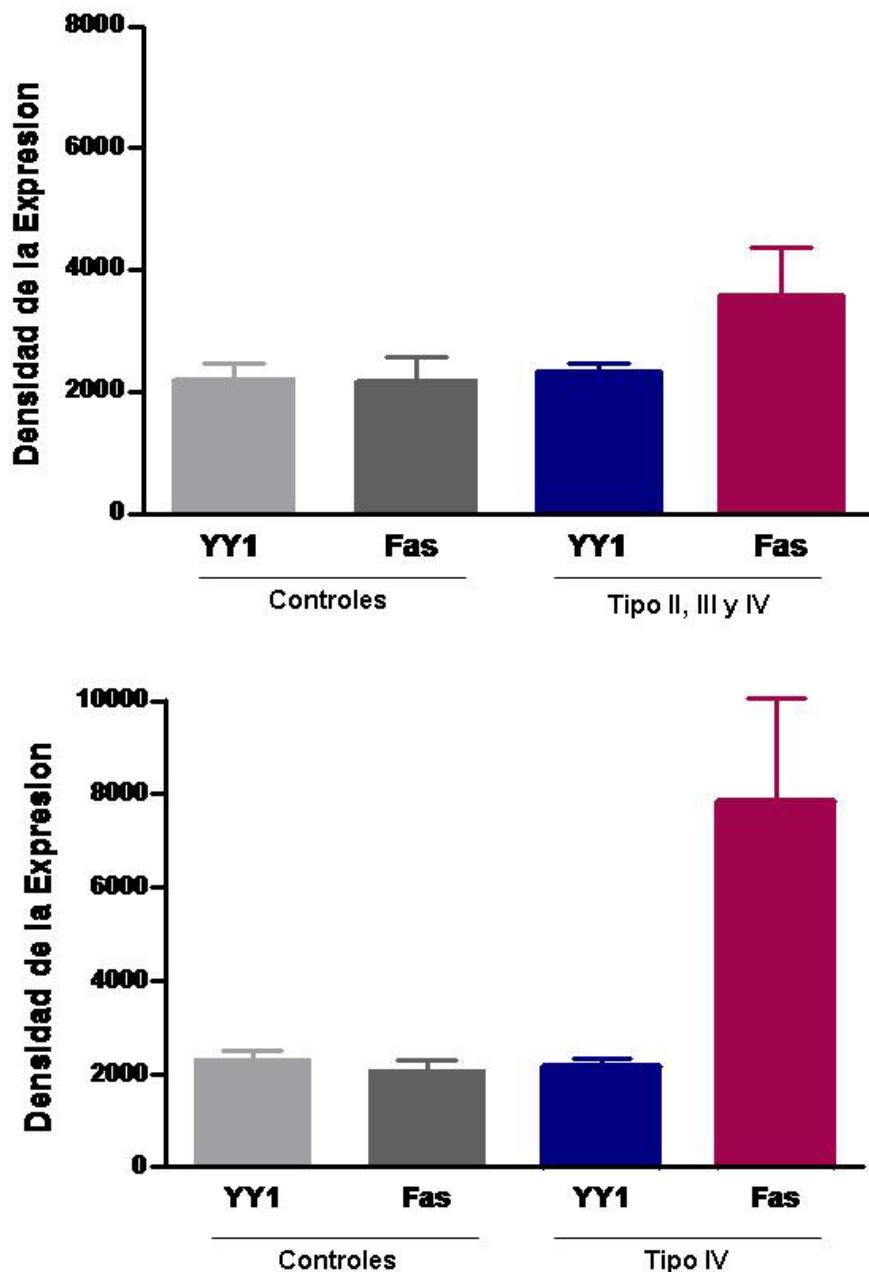


Figura 8. La gráfica muestra la densidad de expresión de YY1 comparada con Fas. A. Se observa un aumento significativo de la expresión de Fas inversamente a YY-1 en todos los tipos de nefritis lupica evaluadas con $p < 0.0001$ B. Expresión inversamente proporcional de YY1 y Fas en la nefritis lupica Tipo IV con una $p < 0.0001$.

ANALISIS MORFOMETRICO DE LA EXPRESION DE YY1 Y FAS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON NEFRITIS LUPICA (TUBULOS)

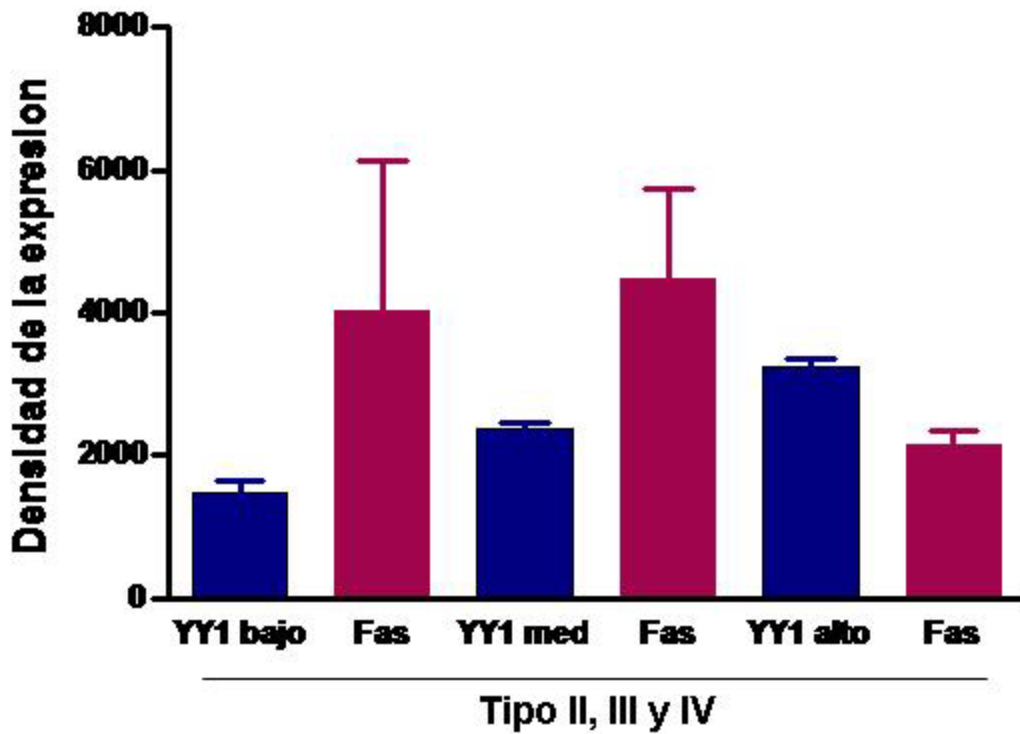


Figura 9. La gráfica muestra la densidad de expresión de YY1 comparada con Fas. Se compara la expresión de YY 1 y Fas en todos los casos, agrupando a YY 1 de acuerdo a la intensidad de la expresión en Bajo (1-30%), Mediano (31-70%) y alto (71-100%), con una relación inversa mostrada en las dos ultimas columnas con YY1 alto y Fas bajo.

ANALISIS MORFOMETRICO DE LA EXPRESION DE YY1 Y FAS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON NEFRITIS LUPICA (TUBULOS)

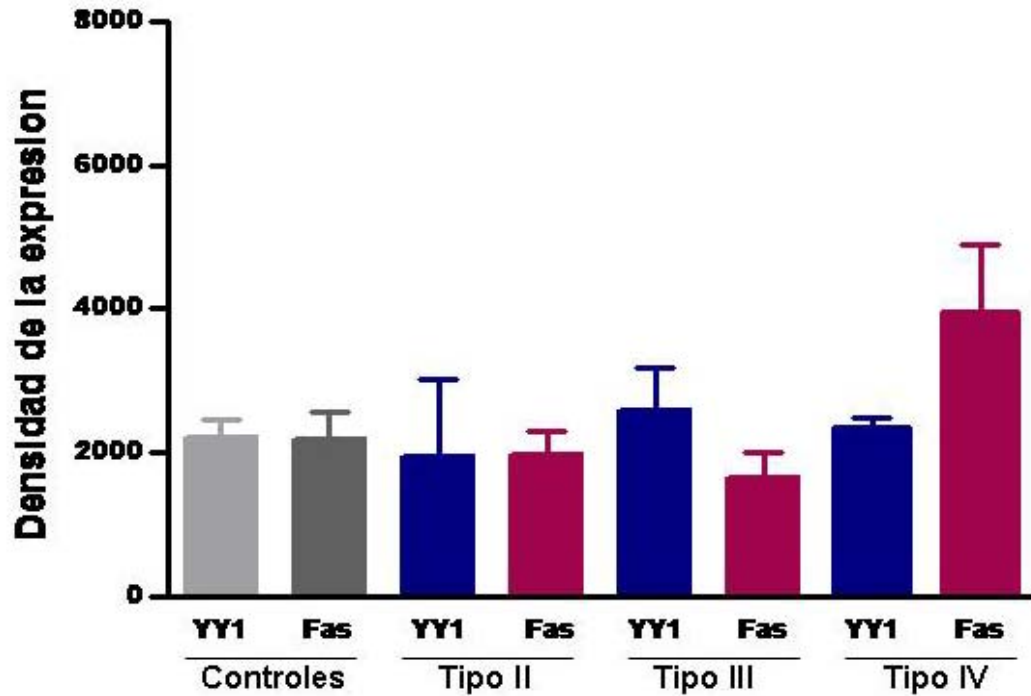


Figura 10. La gráfica muestra la densidad de expresión de YY1 comparada con Fas en los diferentes tipos de Nefritis Lúpica de pacientes pediátricos. En las lesiones Tipo II no hubo diferencias significativas, en la Tipo III se observa mayor expresión de YY1 comparada con Fas, y en la Tipo IV se observa YY1 con una expresión menor a la de Fas.

ANALISIS MORFOMETRICO DE LA EXPRESION DE YY1 Y FAS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON NEFRITIS LUPICA

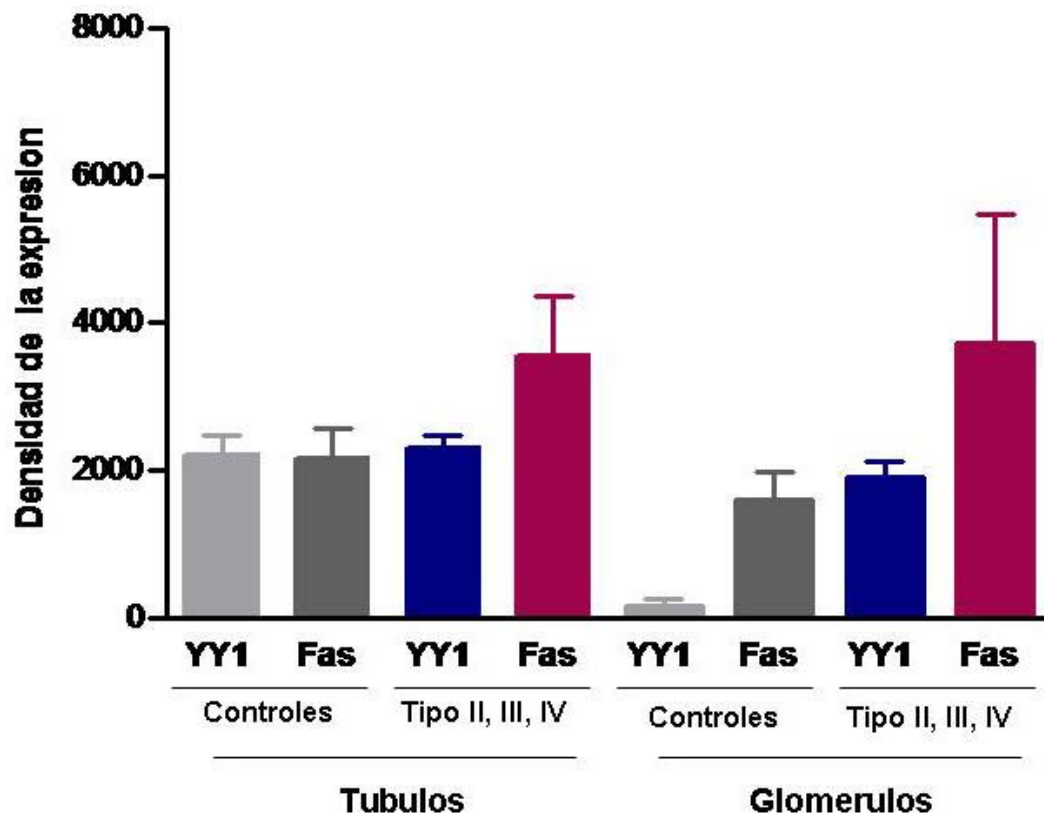


Figura 11. La gráfica muestra la densidad de expresión de YY1 comparada con Fas en tubulos y glomérulos. Se muestra una menor expresión de YY1 tanto en tubulos como en glomérulos pero la expresión de Fas es alta en ambos con una diferencia estadísticamente significativa.

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

“Participación del factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY1) en la regulación de Fas así como su correlación con el tipo de lesión histopatológica en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica”

No. _____

NOMBRE -----
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Afiliación _____

Fecha de toma de Biopsia (día/mes/año): _____

Complicaciones: _____

Edad (años / meses) _____ Sexo: Hombre () Mujer ()

Antecedentes Personales Patológicos: Inicio (años / meses) Tratamiento (Medicamento tiempo de uso)

Infecciones (Urinarias, respiratorias, otras) Si () No () _____

Otra (s) enfermedad (es) Si () No () _____
Dx específico

Hematuria:

Microscópica () Macroscópica ()

Proteinuria:

Proteinuria Menor de 1 gr. /24hr Prot. 1-2gr/24hr Prot. 2-3gr/24h

Hipertensión.

Mayor de 140/90mmhg.

Datos relevantes de Laboratorio:

Hb: Leucocitos: Linfocitos: Plaquetas VSG:
CH50 _____ C3 _____ C4 _____ Anti-DNA _____ ANA:
Otros:

Observaciones:

BIBLIOGRAFIA

1. James T. Cassidy, Ross E. Petty Textbook of Pediatric Rheumatology. Fifth edition. WB Saunders. Pp 286. 2005
2. <http://www.drscope.com.Pacgenerales/reumatologia/wps.htm>
3. Javier Orozco Alcalá. Reumatología en niños. Primera edición 2003. Masson. pp 69-80.
4. Yang LY, Chen WP, Lin CY. Lupus nephritis in children. A review of 167 patients. Pediatrics 94(3):335-340.1994
5. Andersen MH, Reker S, Kvistborg P, Becker JC, Straten PT. Spontaneous Immunity against Bcl-xL in Cancer Patients. J Immunol 2005; 175(4):2709-2714.
6. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. Clin Cancer Res 2005; 11(9):3155-3162.
7. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. Blood 1996; 88(2):386-401.
8. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. Nature 2000; 404(6773):99-103.
9. Alberto Ortiz. Apoptotic regulatory proteins in renal injury. Nephrology forum. Kidney International, Vol. 58 (2000), pp 467-485
10. Takemura T, Murakami K, Miyazato H, Yagi K, Yoshioka K: Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. Kidney Int 48:1886-1892.1995
11. John Savill. Regulation of glomerular cell number by apoptosis. Review. Kidney international, Vol 56. (1999), pp 1216-1222.
12. BD Stollar, F Stephenson. Apoptosis and nucleosomes. Report. Lupus (2002) 11, 787-789
13. Makino H, Sugiyama H, Yamasaki Y, Maeshima Y, Wada J, Kashiara N. Glomerular cell apoptosis in human lupus nephritis. Virchows Arch. 2003 Jul;443(1):67-77
14. Fuming, Shen Wen, Zhang Xiurong, GUO Muiyi, Lin Shanyan. Dysregulation of apoptosis: a posible mechanism leading to chronic progressive renal histological changes in Lupus Nephritis. Chin Med J 2000; 113(12):1082-1086.
15. H. Soto, J. Mosquera, B. Rodríguez-Iturbe, C. Henriquez La Roche, A. Pinto. Apoptosis in proliferativen glomerulonephritis: decreased apoptosis expresión in lupus Nephritis. Nephrol Dial Transplant (1997) 12: 273-280.

16. Malgorzata Wagrowska-Danilewicz, Marian Danilewicz. Apoptosis in Lupus (SLE-N IV) and non-lupus mesangiocapillary glomerulonephritis type I (MCGN I). A comparative study. *Journal of Nephrology*. Vol. 11 No. 1 1998 pp 44-49.
17. Kirim S. Tammer T, Saime P, Gonlusen G. Apoptosis and proliferating cell nuclear antigen in lupus nephritis (class IV) and membranoproliferative glomerulonephritis. *Ren Fail*. 2005;27(1):107-113.
18. Hitoshi Sugiyama, Naoki Kashihara, Hirofumi Makino, Yasushi Yamasaki, Zensuke Ota. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney internacional*, Vol 49 (1996), pp 103-111.
19. Kodera S, Tashiro K, Ohmuro H, Shirato I, Tomino Y. A case of lupus nephritis showing good clinical course and apoptosis in glomerular cells detected by the nick end labeling method. *Am J Nephrol* 1997;17(5):466-70
20. Berden J.H.M. Lupus nephritis: consequence of disturbed removal of apoptotic cells?. *Netherlands The Journal of medicine*, Vol 61 (2003), pp 233-238.
21. Susan L. Kalled, Anne H. Cutler, Linda C. Burkly. Apoptosis and altered dendritic cell Homeostasis in Lupus Nephritis are limited by Anti-CD154 treatment. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 1740-1747.
22. Tinaztepe K, Ozen S, Cascer S, Ozdamar S. Apoptosis in renal disease: A Brief review of the literature and report of preliminary finding in childhood lupus nephritis. *Turk J Pediatr* 2001 Apr-Jun 43(2):133-8
23. Wang JS, Tseng HH, Shih DF, Jou HS, Ger LP. Expression of inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human lupus nephritis. *Nephron* 1997; 77(4):404-11
24. Bin Yang, Timothy S. Jonson, John L. Taylor, Bart Wagner, Phil F. Watson, Mohsen M.H. El kossi, Peter N. Furness, A. Meguid El Nahas. Effects of caspase inhibition on progression of experimental glomerulonephritis. *Kidney Internacional*, Vol. 63 (2003), pp 2050-2064.
25. Li X, Huang JP, Ding J. Apoptosis and expressions of PDCD5 and Caspase-3 in renal tissues of children with lupus nephritis. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2005 Jul; 43(7): 517-20
26. Keryn Davidson, Christine Percy, Alina J. Rennick, Betty K. Pat, Jun Li, David Nicol, David W. Johnson, Glenda C. Gobe. Comparative analysis of Caspase activation and Apoptosis in Renal Tubular Epithelial Cells and Renal Cell Carcinomas. *Nephron Exp Nephrol* 2005; e112-e120.
27. Seery JP, Cattell V, Watt FM. Cutting Edge: Amelioration of kidney disease in a transgenic mouse model of lupus nephritis by administration of the caspase inhibitor

- Carbobenzoxy-valyl-alanyl-asparthyl (beta-o-methy) fluoromethylketone. *J Immunol* 2001 Sep 1;167(5):2452-5
28. Sang Kyung Jo, Dae Ryong Cha, Won Yong Cho, Hyoung Kyu Kim, Kyung Hyun Chang, Su Young Yun, Nam Hee Won. Inflammatory Cytokines and Lipopolysaccharide induce Fas-Mediated Apoptosis in Renal Tubular Cells. *Nephron* 202; 91:406-415.
 29. Caigan Du, Qiunong Guan, Ziqin Yin, Robert Zhong, Anthony M. Jevnikar. Il-2-Mediated apoptosis of kidney tubular epithelial cells is regulated by the caspase-8 Inhibitor c-FLIP. *Kidney International*, Vol. 67 (2005), pp 1397-1409.
 30. Tomohisa Hattori, Shoichiro Shindo, Hideki Kawamura. Apoptosis and expression of Bax Protein and Fas Antigen in glomeruli of a Remnant-kidney model. *Nephron* 1998;79:186-191
 31. T. Papo, C Parizot, M Ortova, J-C Piette, C Frances, P Debre, P Godeau, G Gorochov. Apoptosis and expression of soluble Fas mRNA in systemic lupus erythematosus. *Lupus* (1998) 7, 455-461.
 32. Badillo-Almaraz I, Daza L, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R. Glomerular expression of Fas ligand and Bax mRNA in lupus nephritis. *Autoimmunity* 2001;34(4):238-9
 33. Uguz A, Gonlusen G, Ergin M, Tuncer I. Expression of Fas, Bcl-2, and p53 molecules in glomerulonephritis and their correlations with clinical and laboratory findings. *Nephrology* 2005 Jun 10(3) 311-6.
 34. Akshay K. Vaishnav, Elias toubi, Satomi Ohsako, Jorn Drappa, Sandra Buys, Jaime Estrada, Anneliese Sitarz, Larry Zemel, Jia-Li Chu, Keith B. Elkon. *Arthritis Rheum* Vol 42, No.9 1999, pp 1833-1842.
 35. Uda S, Yoshimura A, Sugeno Y, Inu K, Taira T, Ideura T. Mesangial proliferative nephritis in man is associated with increased expression of the cell survival factor, Bcl-2. *Am J Nephrol* 1998;18(4):291-5
 36. Shi, Y. E. Seto, L.S. Chang, and T. Shenk. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 1991, 67:377
 37. Flanagan, J.R., K.G. Becker, D. L. Ennist, S. L. Gleason, P.H. Driggers, B.Z. Levi, E. Apella, and K. Ozato. Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12:38
 38. Shrivastava, A., and K. Calame. An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator yin yang-1. *Nucleic Acid Res.* 1994, 22:5151
 39. Thomas, M.J., and E. Seto. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY-1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 1999, 236:197

40. Shy Y, Lee JS, Galvain KM. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1.....
Biochim Biophys Acta. 1997 Apr 18;1332(2):F49-66. Review. No abstract available.
PMID: 9141463 [PubMed - indexed for MEDLINE]
41. Hermes J. Garban, Benjamin Bonavida. Nitric Oxide Inhibits the Transcription Repressor Yin-Yang 1 Binding Activity at the Silencer Region of the Fas Promoter: A Pivotal Role for Nitric Oxide in the Up-Regulation of Fas Gene Expression in Human Tumor Cells. The Journal of Immunology, 2001, 167: 75-81.
42. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-x1 expression. Oncogene. 2004 Jun 24;23(29):4993-5003.
43. Iorz C; Ortiz A; Justo P; González-Cuadrado S; Duque N; Gómez-Guerrero C; Egido J. Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli. J Am Soc Nephrol. 2000 Jul; 11(7): 1266-77
44. Tsukinoki T; Sugiyama H; Sunami R; Kobayashi M; Onoda T; Maeshima Y; Yamasaki Y; Makino H. Mesangial cell Fas ligand: Upregulation in human lupus nephritis and NF-kappaB-mediated expression in cultured human mesangial cells. Clin Exp Nephrol. 2004 Sep; 8(3):196-205.
45. Betty P. Tsao, Rita M. Cantor, Jennifer M. Grossman, Nan Shen, Nickolay T. Teophilov, Daniel J. Wallace, Frank C. Arnett, Klaus Hartung, Rose Goldstein, Kenneth C. Kalunian, Bevra H. Hahn and Jerome I. Rotter. PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest, april 1999, volume 103, number 8, 1135-1140.
46. Gronroos E; Terentiev AA; Punga T; Ericsson J. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor supresor in response to genotoxic stress. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Aug 17;101(33):12165-70.