



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "DR. IGNACIO CHÁVEZ"

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BCL2 Y POSITIVIDAD PARA
PARVOVIRUS B19 EN BIOPSIAS RENALES DE PACIENTES MEXICANOS
CON GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN

NEFROLOGÍA

PRESENTA:

DRA. CARMINA PACHECO NAVARRETE

TUTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN ÁVILA CASADO



México DF, Agosto del 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Fernando Guadalajara Boo

Jefe del Departamento de Enseñanza

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

Dra. Martha Franco Guevara

Jefe del Departamento de Nefrología

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

Dra. María del Carmen Ávila Casado

Tutor de Tesis

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

DEDICATORIAS

A la Dra. María del Carmen Ávila Casado, por su guía y dirección para el desarrollo de esta investigación, especialmente por su gran disponibilidad y su capacidad de transmitir entusiasmo por el trabajo de investigación lo cual me ha resultado de lo más alentador

Al Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología, por la oportunidad que me brindaron para ingresar, realizar la subespecialidad de nefrología y transmitirme los conocimientos, habilidades y experiencias tan importantes para mi desempeño futuro dentro de esta especialidad

Al Dr. Francisco E. Rodríguez Castellanos por su asesoría y apoyo para el desarrollo estructural y metodológico de esta investigación, sin cuya colaboración no se hubieran alcanzado los objetivos planteados.

A mis compañeros residentes de nefrología, con quienes he convivido a lo largo de estos tres años, por su amistad, apoyo y convivencia haciendo este largo camino de aprendizaje más ameno y cálido.

Y especialmente a mis padres Juanita y Aquilino a quienes antes que todo les debo el hecho de existir, por su apoyo, comprensión y cariño.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

| | |
|--|--------|
| ABREVIATURAS | (5) |
| RESUMEN | (7) |
| DEDICATORIAS | (10) |
| CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO | |
| INTRODUCCIÓN | (11) |
| ESTRUCTURA DEL PODOCITO | (12) |
| CICLO CELULAR DEL PODOCITO | (13) |
| PATRONES MORFOLÓGICOS DE LAS PODOCITOPATIAS | (19) |
| GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE | |
| ANTECEDENTES | (21) |
| EPIDEMIOLOGIA | (22) |
| HALLAZGOS HISTOLÓGICOS | (22) |
| MANIFESTACIONES CLÍNICAS | (24) |
| PATOGENIA DE LA GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE | (24) |
| CAPÍTULO II.- DISEÑO DEL ESTUDIO, MATERIAL Y MÉTODOS | |
| JUSTIFICACIÓN | (35) |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | (36) |
| OBJETIVOS | |

| | | |
|---------------------------|-------|--------|
| OBJETIVO PRIMARIO | ----- | (36) |
| OBJETIVOS SECUNDARIOS | ----- | (36) |
| HIPÓTESIS | | |
| HIPÓTESIS NULA | ----- | (37) |
| HIPÓTESIS ALTERNATIVA | ----- | (37) |
| CRITERIOS DE INCLUSIÓN | ----- | (38) |
| CRITERIOS DE EXCLUSIÓN | ----- | (38) |
| MATERIAL Y MÉTODOS | | |
| SELECCIÓN DE LA MUESTRA | ----- | (38) |
| ANÁLISIS HISTOLÓGICO | ----- | (39) |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | ----- | (43) |
| CAPÍTULO III.- RESULTADOS | | |
| DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS | ----- | (45) |
| DISCUSIÓN | ----- | (58) |
| CONCLUSIONES | ----- | (63) |
| ANEXO.- TABLAS Y FIGURAS | ----- | (65) |
| BIBLIOGRAFÍA. | ----- | (74) |

ABREVIATURAS

GC: glomerulopatía colapsante

GEFyS: glomeruloesclerosis focal y segmentaria

ECM: enfermedad de cambios mínimos

EMD: esclerosis mesangial difusa

BUN: nitrógeno ureico sanguíneo

CrS: creatinina sérica

PrU: proteinuria

FG: filtrado glomerular

TAS: tensión arterial sistólica

TAD: tensión arterial diastólica

ALB: albúmina sérica

COL: colesterol total

TG: triglicéridos

FI: fibrosis intersticial

DV: daño vascular

BCL-2: proto-oncogen BCL-2 protector de apoptosis

BCL-2 G: expresión de BCL-2 a nivel glomerular (células epiteliales viscerales y parietales)

BCL-2 T: expresión de BCL-2 en células tubulares

BCL-2 I: expresión de BCL-2 en células inflamatorias del intersticio

PvB19: parvovirus B19

RESUMEN.

La glomerulopatía colapsante es una forma relativamente nueva de enfermedad glomerular clasificada como una entidad aparte y diferente de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria. Se caracteriza por disregulación y proliferación del podocito con decremento en la expresión de marcadores de maduración celular (como p21 y p27) y expresión a la alza de otros marcadores que usualmente solo predominan en las fases precoces de la nefrogénesis humana.

Una de las moléculas implicadas en el ciclo celular del podocito es la proteína BCL-2, esta es un proto-oncogen regulador protector de la apoptosis, el cual promueve la supervivencia celular a través del bloqueo de la muerte celular programada o apoptosis. Es expresada durante la fase de transición mesénquima-epitelio durante el fenómeno de la nefrogénesis humana, encontrándose marcadamente reducida después de la fase de asa capilar glomerular, conjuntamente con una regulación a la alza de la expresión de p27.

A partir de este conocimiento se ha establecido que el incremento en la expresión glomerular de BCL-2 parece jugar un papel importante como antiapoptótico y pro-proliferativo en algunas formas de glomerulonefritis en las cuales la hipercelularidad puede ser al menos en parte el resultado del incremento en la expresión de factores de supervivencia como BCL-2.

En base a lo anterior, planteamos la hipótesis de que BCL-2 también podría jugar un papel importante en la génesis de la glomerulopatía colapsante como promotor de la proliferación de los podocitos.

Por otro lado, la posible asociación entre infección por PvB19 y enfermedad glomerular ha sido sugerida por numerosos reportes que describen la aparición de síndrome nefrítico o nefrótico en el curso de la infección por parvovirus, de hecho, en algunas series se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de DNA de parvovirus B19 en pacientes que desarrollaron glomerulopatía colapsante, por lo que también planteamos la posibilidad de que existiese una mayor afección por parvovirus B19 en los pacientes portadores de glomerulopatía colapsante comparada con el resto de las podocitopatías estudiadas y los controles.

El objetivo de este estudio fue analizar tanto la expresión de la proteína BCL-2 como la positividad para parvovirus B19 en tejido renal de pacientes con el diagnóstico histológico de glomerulopatía colapsante, comparado con la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de cambios mínimos y controles.

Para ello se utilizaron biopsias renales analizadas en el departamento de Nefropatología del Instituto Nacional de cardiología con diagnósticos histológicos de GC, GEFyS, ECM y controles sanos entre el periodo de 1997-2008 a las cuales se les realizó inmunohistoquímica para BCL-2 y parvovirus B19.

Al finalizar el estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína BCL-2 en las células epiteliales viscerales, parietales, células tubulares e inflamatorias entre el grupo con diagnóstico histológico de glomerulopatía colapsante comparado con glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de cambios mínimos y controles ($p > 0.782$,

0.961 y 0.293 respectivamente), por lo que no parece haber una correlación significativa entre la expresión positiva para BCL-2 cuando se compara a la glomerulopatía colapsante con los otros grupos de estudio.

Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en la positividad para PvB19 a nivel glomerular, tubular y endotelial en el grupo de la GC al compararlo con el de GEFyS, ECM y controles ($p > 0.992$, 0.991 y 0.994 respectivamente), lo que sugiere participación de factores demográficos, medioambientales y susceptibilidad individual variable entre las distintas poblaciones para el desarrollo de esta infección.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades glomerulares comprenden cerca del 90% de las causas de enfermedad renal crónica avanzada y al año representan un costo de más de 20 millones de dólares en los Estados Unidos. Estas entidades pueden ser consideradas como una consecuencia de la disfunción del podocito causada por factores medioambientales y/o genéticos (3)

Los podocitos sufren diversos grados de lesión a través de múltiples mecanismos en las enfermedades glomerulares las cuales comprenden todo un espectro clínico-patológico que incluye a la esclerosis mesangial difusa, síndrome nefrótico congénito tipo Finlandés, síndrome de Alport, enfermedad de cambios mínimos, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, glomerulopatía colapsante, glomerulopatías inmunológicas e inflamatorias, nefropatía hipertensiva, nefropatía diabética y otras glomerulopatías relacionadas con la edad. (Figura 1).

El daño podocitario juega un papel fundamental en el mecanismo fisiopatogénico del síndrome nefrótico. Se ha demostrado que distintos eventos moleculares ocurren a diferentes niveles en la estructura del podocito, (especialmente a nivel del cuerpo celular, núcleo, procesos podocitarios y en particular en el diafragma de filtración) y pueden finalmente condicionar esfacelamiento de los procesos podocitarios con aparición subsecuente de proteinuria (9).

En el marco de estos descubrimientos en la biología del podocito, se ha propuesto una nueva clasificación de las enfermedades podocitarias (Tabla 1):

ESTRUCTURA DEL PODOCITO

Los podocitos son células post mitóticas altamente especializadas con toda una gama de funciones estructurales y metabólicas las cuales incluyen el mantenimiento de la barrera de filtración glomerular y la estructura normal del penacho glomerular, remodelamiento de la membrana basal glomerular, endocitosis de proteínas filtradas y participación en el mantenimiento de la presión hidrostática intracapilar (6).

Su estructura básicamente consiste de un cuerpo celular, procesos mayores con microtúbulos y filamentos intermedios y procesos menores con pedicelos con filamentos de actina en contacto con la membrana basal glomerular. Los procesos mayores están constituidos por filamentos intermedios y microtúbulos, los pedicelos están constituidos primordialmente por una red cortical de actina y haces contráctiles de actina F (9) (Figura 2).

El cuerpo celular está conectado a la pared del capilar glomerular por estructuras que finalmente se dividen formando los procesos podocitarios interdigitados en la superficie externa de la membrana basal glomerular, de tal forma que la barrera de filtración glomerular consiste de 3 componentes básicos: endotelio fenestrado, membrana basal glomerular y procesos podocitarios. (9)

El cuerpo celular contiene un núcleo prominente, lisosomas y múltiples mitocondrias, en contraste con el cuerpo celular, los procesos celulares contienen solo unos pocos organelos (9).

Se han identificado un conjunto de moléculas responsables del mantenimiento de la compleja estructura tridimensional del podocito. Los podocitos están

organizados de forma polarizada con un dominio de membrana luminal y un dominio basal interconectados entre sí, a partir de un citoesqueleto de actina de tal forma que estas moléculas están distribuidas entre estos dos dominios. (9).

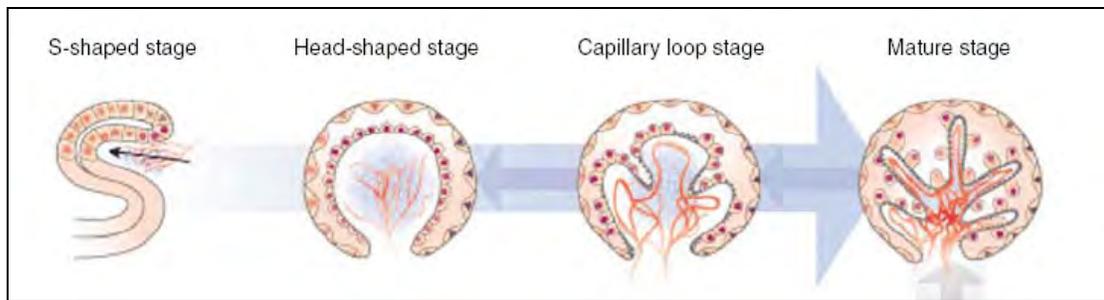
Así, el dominio apical (luminal) comprende el cuerpo celular del podocito y los procesos podocitarios mayores y menores por encima del diafragma de filtración. Este dominio contiene dos importantes proteínas, la podocalixina y el GLEEP-1. La primera es el mayor determinante de la carga negativa de la superficie del podocito y puede contribuir al mantenimiento de la arquitectura glomerular y la integridad de los procesos podocitarios

Para fines didácticos, estas proteínas constitutivas del podocito se han clasificado de acuerdo a su estructura y función en (Figura 3):

- a) proteínas que mantienen la arquitectura del podocito,
- b) proteínas de anclaje a la membrana basal, y
- c) proteínas de la barrera de filtración.

CICLO CELULAR DEL PODOCITO

Las nefronas de los riñones maduros se desarrollan a partir del blastema metanéfrico a partir del reborde ureteral. Al principio del desarrollo renal, este proceso se centra alrededor del desarrollo glomerular y es generalmente dividido en los siguientes estadios: vesícula, forma de coma, forma de S, asa capilar glomerular y glomérulo maduro (22), tal como podemos observar en el siguiente esquema:



Como consecuencia del alto grado de diferenciación de los podocitos, análogamente con las neuronas, son incapaces de proliferar. Durante la glomerulogénesis, los podocitos inmaduros o indiferenciados, entran al ciclo celular y comienzan a proliferar. Sin embargo una vez que adquieren el fenotipo maduro y diferenciado, los podocitos salen del ciclo celular y dejan de proliferar, adquiriendo el fenotipo quiescente del podocito maduro. (7) (Figura 4).

La planificación del ciclo celular se halla bajo el control de multiproteínas complejas constituidas por subunidades catalíticas (las Kinasas) y subunidades reguladoras (las Ciclinas). Estos complejos proteicos regulan secuencialmente el ciclo celular a través de la activación ciclina/ciclina-kinasa dependiente (CdK) incluyendo la progresión a la fase inactiva del ciclo celular denominada (Go), la síntesis del DNA (fase S) y la mitosis (fase M). (24) (Figura 5).

Cada una de estas fases está regulada por genes que expresan proteínas específicas. Durante la glomerulogénesis las células precursoras de los podocitos proliferan. En la fase S, los futuros podocitos son captados por el ciclo celular, a partir de este momento, se expresan marcadores de proliferación tisular y antígenos nucleares (PCNA, Ki67) los que asociados a las ciclinas A y B provocan síntesis del DNA. Las ciclinas B1 y Cdc2 inducen mitosis de los podocitos (22).

Los inhibidores de CdK (p27 y p57) en las fases iniciales de la glomerulogénesis se hallan ausentes. Cuando se forman los capilares del glomérulo la actividad mitótica cesa, se reorganiza el citoesqueleto y aparecen marcadores de maduración celular: sinaptopodina, proteína epitelial glomerular 1, y se desarrollan los procesos podocitarios (22).

Los cambios operados llevan a una disminución de los promotores del ciclo celular (ciclinas y CdK) y concomitantemente a una sobreexpresión de los inhibidores del ciclo celular: (p21, p27). El resultado final es: maduración de los podocitos, inactividad del fenotipo, y la detención de la proliferación. (2,22).

Luego de una agresión, los podocitos retornan al ciclo celular. En la mayoría de las glomerulopatías: nefropatía diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de cambios mínimos y nefropatía membranosa, a pesar del ingreso al ciclo celular, los podocitos no proliferan pues predominan los marcadores p21, p27, p57 que son inhibidores de CdK. (2,7).

Las fases G/S que preceden a la detención del ciclo celular limitan la síntesis del DNA y la mitosis; por consiguiente, no hay proliferación, pero los cambios operados provocan apoptosis o desprendimiento de los podocitos de la membrana basal glomerular (2).

En ciertas Glomerulopatías sin embargo, se puede observar cierto grado de proliferación. En la Glomerulopatía colapsante, el número de podocitos aumenta pero son des-diferenciados pues pierden marcadores de maduración: el fenotipo se disregula y la sinaptopodina desaparece. Estos aspectos proliferativos se superponen con áreas colapsantes como se puede observar en la nefropatía por HIV. Por otro lado, la proliferación no es reparativa resultando en un rápido deterioro de la función renal (Figura 6 y 7).

Laura Barisoni y cols analizaron el patrón de expresión de los marcadores de maduración WT-1, CALLA, el receptor C3b, GLEPP-1, podocalixina y sinaptopodina y el marcador de proliferación Ki-67 en pacientes portadores de glomerulopatía colapsante y nefropatía asociada al VIH (NAVIH) comparados con aquellos portadores de enfermedad de cambios mínimos, glomerulopatía membranosa y controles sanos. Encontraron que en la enfermedad de cambios mínimos y en la nefropatía membranosa, todos los marcadores de maduración se encontraban expresados normalmente a pesar de la proteinuria severa y el esfacelamiento y fusión de los procesos podocitarios, no observándose tampoco proliferación celular. En contraste, en la glomerulopatía colapsante y en la NAVIH hubo desaparición de todos los marcadores de maduración en todos aquellos glomérulos colapsados y desaparición de la sinaptopodina en 16% de todos los glomérulos no colapsados. Esta disregulación en el fenotipo del podocito fue asociada con proliferación celular en ambas enfermedades, concluyendo que la pérdida de marcadores específicos de maduración celular define a un nuevo fenotipo disregulado sugiriendo un mecanismo fisiopatogénico común tanto para la glomerulopatía colapsante como la nefropatía asociada al VIH (5).

Una de las moléculas implicadas en el ciclo celular del podocito es la proteína BCL-2, esta es un proto-oncogen regulador protector de la apoptosis, el cual promueve la supervivencia celular a través del bloqueo de la muerte celular programada o apoptosis. Es expresada durante la fase de transición mesénquima-epitelio durante el fenómeno de la nefrogénesis humana, encontrándose marcadamente reducida después de la fase de asa capilar

glomerular, conjuntamente con una regulación a la alza de la expresión de p27 (11).

El principal producto del gen BCL-2 es una proteína de 26 kD que reside primariamente en el interior de la membrana mitocondrial, membrana nuclear y partes del retículo endoplásmico. El gen BCL-2 normalmente es expresado en células de supervivencia prolongada o en zonas de proliferación celular de tejidos apoptóticos como el timo, piel, intestino y cerebro. Estudios usando líneas celulares de leucemia o linfoma han mostrado que la proteína BCL-2 interfiere con el proceso apoptótico mediado por el antígeno FAS y el receptor de TNF, por otra parte, estudios de inmunohistoquímica han mostrado que la expresión de BCL-2 está regulada a la alza en riñones fetales humanos (14).

La migración celular, proliferación, diferenciación y apoptosis juegan un papel importante durante el desarrollo embrionario fetal. BCL-2 está altamente expresado en el reborde ureteral y mesénquima metanéfrico en etapas tempranas de la morfogénesis humana y gradualmente va declinando su expresión en los riñones posnatales. La pérdida del BCL-2 durante el desarrollo renal temprano afecta el ambiente en el cual las células epiteliales renales necesitan para sobrevivir, diferenciarse y madurar (14).

A partir de este conocimiento se ha establecido que el incremento en la expresión glomerular de BCL-2 parece jugar un papel importante como antiapoptótico y pro-proliferativo en algunas formas de glomerulonefritis en las cuales la hiper celularidad puede ser al menos en parte el resultado del incremento en la expresión de factores de supervivencia como BCL-2 (16).

Recientemente se ha reportado un incremento en la expresión de la proteína BCL-2 en la nefritis lúpica, nefropatía por IgA y glomeruloesclerosis focal y

segmentaria, la cual ha sido correlacionada con el número de células que expresan el antígeno de proliferación celular (PCNA) o células intraglomerulares positivas para el marcador Ki-67, con el grado del incremento de proliferación mesangial así como con la magnitud de la proteinuria, indicando una asociación entre la expresión de BCL-2 y la proliferación celular glomerular (12,15,16). En base a lo anterior, creemos que BCL-2 también podría jugar un papel importante en la génesis de la glomerulopatía colapsante como promotor de la proliferación de los podocitos.

N.A. Fathi y cols. estudiaron la expresión glomerular del antígeno FAS y BCL-2 en pacientes con nefritis lúpica, para lo cual estudiaron 36 pacientes con nefritis lúpica y 10 controles determinándose la expresión glomerular del antígeno FAS y BCL-2 mediante inmunohistoquímica evaluándose además los niveles séricos de ambos marcadores mediante la técnica de ELISA, encontrando que en glomérulos normales tanto el antígeno FAS como BCL-2 estuvieron completamente ausentes en comparación con los pacientes portadores de nefritis lúpica, la expresión glomerular tanto de FAS como BCL-2 fue observada en células mesangiales. Igualmente, se encontró que los niveles séricos de BCL-2 (217.1 ± 85.9) y FAS (767.9 ± 271) en estos pacientes con nefritis lúpica eran significativamente más altos comparados con los controles sanos (148.6 ± 87 , y 550.3 ± 91 para Bcl-2 y Fas respectivamente) con $p < 0.05$

Se encontró además, una correlación entre los niveles séricos de FAS y BCL-2 con los índices de cronicidad. Comparados con los controles sanos, los pacientes con nefritis lúpica se asociaron con una expresión glomerular incrementada y mayores niveles séricos de FAS y BCL-2, estos hallazgos

sugieren un posible rol de BCL-2 y FAS en el daño glomerular durante la evolución de la nefritis lúpica.

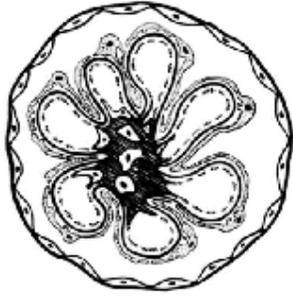
La expresión de BCL-2 en riñones normales no es un hallazgo consistente, el mRNA de BCL-2 ha sido identificado dentro del glomérulo, en las células mesangiales y algunos leucocitos que ocasionalmente pueden infiltrar el glomérulo (14).

Los mecanismos subyacentes para la apoptosis tanto renal como no renal incluyen al gen supresor de tumores p53, la familia de proteínas relacionadas al BCL-2 la cual comprende tanto moléculas proapoptóticas (BAD, BAX) como antiapoptóticas (bcl-2, bcl-XL), de tal forma que la manipulación genética de la expresión de BCL-2 en las células glomerulares podría revelar exactamente el rol de este gen en la patogénesis de diversas formas de glomerulonefritis (16).

PATRONES MORFOLÓGICOS DE LAS PODOCITOPATIAS.

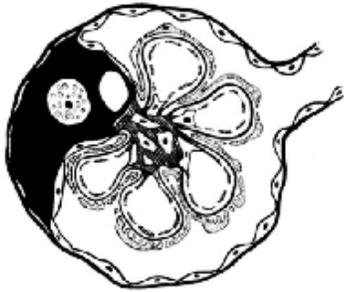
Se conocen 4 patrones histológicos mayores de las podocitopatias (esclerosis mesangial difusa, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, glomerulopatía colapsante y enfermedad de cambios mínimos), los cuales son morfológicamente distintos pero todos ellos tienen grados variables de esfacelamiento podocitario (9).

La histología de cada una de estas variedades es muy diferente y específica, la cual podemos observarlo en los siguientes esquemas:



A

Enfermedad de cambios mínimos: los glomerulos se aprecian normales a la microscopia de luz. A la microscopia electrónica la membrana basal glomerular es normal en sus contornos y espesor, los podocitos revelan esfacelamiento además de condensación del citoesqueleto basado en actina contra la superficie del podocito así como transformación microvellosa.



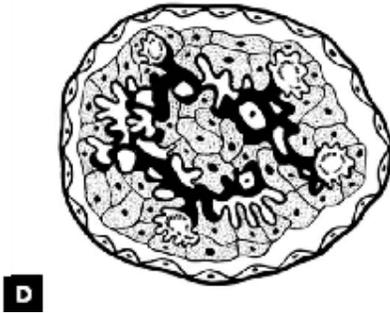
B

Esclerosis focal y segmentaria: los glomerulos se encuentran parcialmente obliterados por esclerosis segmentaria y hialinosis. El penacho glomerular puede encontrarse parcialmente adherido a la cápsula de Bowman, además de existir un decremento en el número de podocitos (podocitopenia).



C

Esclerosis mesangial difusa: definida por la presencia de esclerosis mesangial con o sin proliferación mesangial, e incremento moderado en la actividad proliferativa de los podocitos



Glomerulopatía colapsante donde por definición el daño glomerular causa colapso segmentario o global de las paredes de los capilares glomerulares, el número de podocitos se encuentra sustancialmente incrementado con formaciones pseudocrescencicas.

GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE.

ANTECEDENTES

La glomerulopatía colapsante es un tipo de lesión glomerular descrito de manera relativamente reciente en la literatura medica. En 1986, Weiss informo de 6 casos con síndrome nefrótico, insuficiencia renal progresiva y cambios histopatológicos caracterizados por colapso de los capilares glomerulares y alteraciones en las células epiteliales viscerales. En este trabajo se sugirió que esta lesión podría representar una nueva entidad clínica y patológicamente distinta de la esclerosis focal y segmentaria y de la nefropatía asociada al virus de la inmunodeficiencia Humana (4).

En el informe original de Weiss, uno de los pacientes desarrollo SIDA y se desconocía el status con respecto al VIH del resto. Esta omisión produjo cierta especulación acerca de que si los pacientes descritos originalmente por Weiss tenían una nefropatía asociada al SIDA (5,6).

La controversia terminó cuando a partir de los años 90s se informa en la literatura de casos de pacientes con GC primaria, VIH negativos incluyendo una serie de 43 pacientes de la Universidad de Columbia (4).

EPIDEMIOLOGÍA

La GC afecta principalmente a personas jóvenes pero puede presentarse a cualquier edad. Existe cierta predominancia por el sexo masculino y en algunos países hay predilección por ciertas razas. En los Estados Unidos la prevalencia de la enfermedad es mayor en la raza negra, sin embargo, existe una mayor susceptibilidad de la raza negra para la incidencia y progresión de las enfermedades renales en general, sobre todo, daño renal por hipertensión (3).

Con respecto a la frecuencia de la GC se ha informado que la prevalencia de la GC ha ido en aumento en los centros de concentración de biopsias renales en los últimos años. En México, un estudio multicéntrico retrospectivo mostro una prevalencia de GC del 15% entre las biopsias renales diagnosticadas como esclerosis focal y segmentaria en 1985 a 1995. Este porcentaje se aproxima al informado en la literatura mundial que es de alrededor del 10% (4).

HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Las alteraciones glomerulares son características. Los glomérulos presentan colapso y retracción de los capilares glomerulares que puede ser segmentario o global y generalmente focal (afección de menos de 40% de los glomérulos observados) y que es más evidente con la tinción del ácido peryódico de Schiff

(PAS). Las células epiteliales viscerales son muy prominentes, se agrupan y rodean a los capilares colapsados llenando el espacio de Bowman (3,4).

Estas células presentan vacuolas y depósitos en forma de gotas hialinas que al estudio de inmunofluorescencia directa muestran positividad para albúmina. Esta acumulación de células epiteliales viscerales se debe distinguir de la proliferación extracapilar (medias lunas celulares) por la presencia en esta última de células fusiformes con matriz intercelular (4).

Al estudio de inmunofluorescencia directa en los segmentos colapsados se pueden observar depósitos irregulares positivos para IgM, C3 o C1q atrapados en la luz capilar. Algunos glomérulos con lesión más avanzada pueden mostrar cicatrización de zonas segmentarias con el aspecto morfológico a la microscopia de luz de esclerosis focal y segmentaria y es por esto que en muchas ocasiones, la GC avanzada se diagnostica como GEFyS primaria (4).

Los cambios intersticiales también son característicos, los túbulos presentan dilataciones quísticas con aplanamiento del epitelio tubular y fibrosis. En los glomérulos aparentemente normales a la microscopia de luz se pueden observar capilares glomerulares con áreas denudadas de procesos podocíticos u obliteración de los mismos (4).

Ultraestructuralmente, los podocitos muestran además esfacelamiento, edema o desaparición de los procesos primarios y pérdida del citoesqueleto basado en la actina además se observan los cambios degenerativos que presentan las células epiteliales viscerales como son la presencia de vacuolas y lípidos en los glomérulos afectados (4) (Figura 8).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Al inicio de la enfermedad los pacientes refieren síntomas de una infección como son: malestar general, fiebre, adenomegalias y pérdida de peso que preceden a las manifestaciones renales por algunas semanas. El signo clínico más constante y característico de la GC es la presencia de síndrome nefrótico con proteinuria masiva (usualmente mayor a 10 gr/día) con una evolución muy rápida hacia enfermedad renal avanzada a pesar de cualquier forma de tratamiento o a la muerte por complicaciones de síndrome nefrótico (3,4). Otras manifestaciones clínicas son hipertensión arterial, diarrea, mialgias y/o artralgias y erupciones cutáneas (Tabla 2).

Los hallazgos bioquímicos suelen ser muy diversos y generalmente incluyen aparición de dislipidemia, proteinuria en rangos nefróticos, elevación de azoados, hipoalbuminemia y disminución del filtrado glomerular, entre otros (4) (Tabla 3).

La proteinuria es el resultado del daño producido en las células epiteliales viscerales, las cuales al degenerar abruptamente pierden su capacidad de filtración, produciendo colapso capilar glomerular y proteinuria (3).

PATOGENIA DE LA GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE

En la patogénesis de la glomerulopatía colapsante se han implicado diversos factores. Una de las teorías mas apoyadas anteriormente es que se trataba de una infección viral por un retrovirus como por ejemplo, el del VIH. Esta infección viral seria la responsable de los síntomas que refieren los pacientes con glomerulopatía colapsante al inicio de su enfermedad como son malestar general,

fiebre, adenomegalias y pérdida de peso, otra situación que apoyaba esta suposición es el hecho de que puede aparecer de novo en el injerto renal. En un estudio en el que se revisaron 892 biopsias de injertos renales entre 1978 y 1998 se encontró un porcentaje de presentación de la GC de novo de 3.2 %.

Estudios recientes sugieren la idea de que tanto la glomerulopatía colapsante idiopática y la asociada a infección por VIH tienen un mecanismo fisiopatogénico similar el cual fomenta la disregulación del fenotipo del podocito. Este concepto está basado en el hecho de que ambas entidades muestran idénticos cambios en el fenotipo del podocito manifestado por la pérdida de marcadores específicos de maduración. Igualmente existe un número comparativamente similar de podocitos que son reclutados en el ciclo celular, y las alteraciones morfológicas en la citoarquitectura del podocito son indistinguibles entre ambas formas de glomerulopatía colapsante (5).

Esta disregulación del fenotipo del podocito se encuentra asociada con la proliferación celular en ambas enfermedades. Por lo tanto en estudios previos se ha concluido que la pérdida de marcadores de maduración específicos del podocito define un nuevo fenotipo disregulado y sugiere un mecanismo fisiopatogénico en ambas variantes de la glomerulopatía colapsante (idiopática o asociada a VIH) (5).

Los podocitos enfermos exhiben una pérdida y una ganancia de marcadores de diferenciación y proliferación respectivamente. Recientes estudios indican que las células epiteliales parietales también pueden ser reclutadas en el proceso de proliferación a nivel visceral local, lo cual sugiere que distintos mecanismos fisiopatogénicos pueden inducir el mismo patrón de daño a nivel glomerular en la glomerulopatía colapsante (2).

En cuanto al desarrollo de esta entidad de novo en el periodo postrasplante, se han propuesto varios factores de riesgo de entre los que destacan los siguientes (23):

1.- Trasplante renal de donador cadavérico: se ha sugerido que el injerto procedente de donante cadáver tiene una vulnerabilidad incrementada para el desarrollo de cambios glomerulares compatibles con Glomerulopatía colapsante, sin embargo se necesitan estudios subsecuentes de estas anomalías histológicas en el injerto para la confirmación de esta posible asociación.

2.- Factores en el periodo post trasplante como medicación inmunosupresora, daño inmunológico, enfermedad microvascular e infección:

- Tanto el rechazo agudo celular o humoral como la disfunción retardada del injerto ocurren comúnmente en injertos diagnosticados subsecuentemente de GC de novo (40 y 70% respectivamente) pero esto no es menos frecuente en otros pacientes con diagnóstico subsecuente de GEFyS de otras variedades no colapsantes.

- Inmunosupresión basada en ciclosporina fue más frecuentemente empleada en injertos diagnosticados posteriormente de GC comparados con aquellos con GEFyS no colapsante.

- En el riñón trasplantado, anomalías histológicas crónicas ocurren frecuentemente en ausencia de una lesión primaria siendo catalogadas bajo el término de "Nefropatía crónica del injerto" las cuales pueden ser consideradas como una vía final común de daño mediado por mecanismos inmunológicos y no inmunológicos a los cuales el injerto puede ser susceptible.

En este contexto es importante notar que en algunas series de pacientes, la nefropatía crónica del injerto han sido identificada en la mayor parte de los pacientes que han desarrollado GC post trasplante encontrándose con mayor grado de severidad en la GC con respecto a otras formas de GEFyS primaria. También la combinación de daño arterial y arteriolar ha sido más frecuentemente asociado con el desarrollo subsecuente de GC. Recientemente Nadasdy et al mostró una distribución de lesiones glomerulares colapsantes en territorio con evidencia de cambios vasculares obliterativos sugiriendo un posible rol del daño vascular en la patogénesis de la GC.

De tal forma que existe la posibilidad de que el desarrollo pre-existente de enfermedad microvascular contribuye a los cambios histológicos característicos que distinguen a la GC de otras formas de GEFyS en el periodo post trasplante.

Dentro de la patogenia de la enfermedad, también se ha citado la posible participación de agentes virales. Inicialmente esta fue asociada con el VIH mas sin embargo posteriormente se comprobó que puede desarrollarse en pacientes seronegativos, como ya se menciona anteriormente. Otro agente infeccioso viral asociado a la patogenia de la GC es el parvovirus B19 (1).

Tanawattanacharoen y cols estudiaron la asociacion existente entre infeccion por parvovirus B19 y glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopatica, para lo cual estudiaron 40 biopsias renales de pacientes con los diagnosticos de GEFyS idiopatica, GC, nefropatia membranosa, enfermedad de cambios minimos y controles sanos, a partir de la amplificacion de DNA de PvB19 del tejido renal mediante PCR, encontrando que la prevalencia PvB19 fue mayor en el grupo de pacientes con GEFyS idiopatica y en las formas colapsantes comparadas con

los otros diagnósticos ($p > 0.05$), lo cual podría indicar un posible rol para el virus en la patogenia de la GEFyS (25).

En un estudio subsecuente Asha Moudgil y cols estudiaron la asociación entre la infección por parvovirus B19 con el desarrollo de glomerulopatía colapsante idiopática, para lo cual analizaron biopsias renales de pacientes con el diagnóstico de GC, GEFyS, NAVIH y controles en búsqueda de DNA de PvB19 mediante inmunohistoquímica, además, también se determinó la presencia de DNA de PvB19 en suero de pacientes mediante PCR.

Ellos encontraron presencia de DNA de PvB19 en el 78.3% de los pacientes con el diagnóstico de GC, 15.8% de aquellos con NAVIH, 22.2% con GEFyS y en 25.9% de los controles, el DNA de PvB19 a nivel sérico fue detectado en el 87.5% de los pacientes con GC, 13.6% con GEFyS y en 3% de los controles sanos ($p < 0.001$ en GC vs GEFyS, NAVIH y controles). PvB19 fue identificado a nivel de células epiteliales viscerales y parietales así como en células tubulares. Al final del estudio concluyeron que existe una prevalencia elevada y estadísticamente significativa de DNA de PvB19 en tejido renal y a nivel sérico de pacientes con el diagnóstico de GC comparado con los otros grupos de estudio, sugiriendo una asociación específica entre la infección por PvB19 y el desarrollo de GC, del tal forma que en individuos susceptibles la infección viral a nivel de células epiteliales renales podría inducir los cambios característicos de la glomerulopatía colapsante (1).

Finalmente, un estudio más reciente mostró que la erradicación de PB19 con terapia basada en inmunoglobulina intravenosa fue asociada con ausencia de recurrencia de la enfermedad en pacientes con GC documentada al recibir un

segundo trasplante. Con toda esta evidencia se ha sugerido que es posible que una infección intrainjerto con este virus pueda participar en la patogénesis de la Glomerulopatía colapsante (1).

Sin embargo, otros estudios no han encontrado una asociación significativa entre el desarrollo de la GC y la presencia de PVB19, lo cual implica la posible participación de factores regionales y/o étnicos, como en el estudio publicado por Sundararaman Swaminathan y cols. en 2001, quienes estudiaron 29 biopsias de tejido renal de pacientes con GEFyS (N=19) y GC (N=10), en el cual todas las biopsias fueron negativas en la determinación de DNA de PVB19 (22).

Parvovirus B19 es un miembro de la familia *Parvoviridae* y es el único miembro de esta familia con capacidad para infectar a los humanos. Ese virus fue descubierto en 1975 en la sangre periférica de un donador sano. El genoma consiste en una estructura simple de DNA de 5596 nucleótidos. El genoma de PVB19 está contenido en una cápside constituida básicamente por dos proteínas virales (proteína viral VP1 y proteína viral VP2) así como otras proteínas no estructurales (NS1). Las partículas virales de PVB19 poseen una simetría icosaédrica de 20 lados consistente en 60 capsómeros compuestos predominantemente por VP2. Esta proteína viral parece facilitar la invasión a las células huésped a través de su extremo amino terminal la cual protruye a través de la superficie del virión. NS1 es una proteína multifactorial, ya que tiene funciones regulatorias en el ciclo vital del virus permitiendo por un lado la replicación de DNA viral y por otro inhibiendo las vías de apoptosis de las células hospederas (21) (Figura 9).

La infección por parvovirus es muy común, presentándose con una distribución cosmopolita. La adquisición del virus ocurre usualmente en la infancia y continúa con una prevalencia más baja en la juventud y la edad adulta, de tal forma que entre el 70 y el 85% de los adultos muestran evidencia serológica de infección previa (21).

La capacidad de infectividad del virus muestra una variación estacional siendo más común en invierno y primavera. La transmisión de la infección usualmente ocurre a través de inhalación del virus a través de las gotitas de "flugge". Sin embargo, la infección también puede adquirirse en forma vertical de la madre al feto y menos comúnmente a través de transfusiones sanguíneas, trasplante de medula ósea y de órganos sólidos (21).

El Parvovirus humano B19 es el agente causal del eritema infeccioso o quinta enfermedad, sin embargo también se ha visto asociado con una amplia variedad de desórdenes, especialmente con anemia aplásica, anemia crónica en huéspedes inmunocomprometidos, hidrops fetalis en mujeres embarazadas, artropatía aguda o crónica y hepatitis (21).

La posible asociación entre infección por PvB19 y enfermedad glomerular ha sido sugerida por numerosos reportes que describen la aparición de síndrome nefrítico o nefrótico en el curso de la infección por parvovirus. Las lesiones glomerulares han sido caracterizadas por la presencia de proliferación endocapilar, incluyendo infiltrado por células polimorfonucleares y linfocitos además de lesiones vasculares caracterizadas por la presencia de infiltrado leucocitario con edema alrededor de las arterias interlobulares y arteriolas (Figura 10).

En todos los pacientes, el estudio de inmunofluorescencia muestra depósitos granulares de C3 en el glomérulo, arteriolas y arterias interlobulares. El microscopio electrónico revela la presencia de pequeños depósitos electrón-densos en el mesangio y/o subendotelio, de ahí que se haya especulado que las lesiones renales pueden ser inducidas por el depósito de complejos inmunes circulantes o por formación local de complejos inmunes (17) (figura 8).

Parvovirus B19 también se ha asociado con el desarrollo de vasculitis como la Purpura de Henoch Schönlein involucrando venas de pequeño calibre, arteriolas y capilares así como también se ha asociado con vasculitis necrotizante en la poliarteritis nodosa (21).

La presencia de un receptor celular específico parece ser necesario para la susceptibilidad a la infección viral. El antígeno P eritrocitario P es el receptor celular para PvB19. El virus se une al antígeno del sistema del grupo sanguíneo P conocido como antígeno P o globósido (18).

El antígeno eritrocitario P no solo está presente en los eritrocitos o eritroblastos, sino también en los megacariocitos, células endoteliales, placenta, hígado fetal, células cardíacas y tejido renal por lo que este tropismo tan específico determina los sitios potenciales de afección en el humano (18).

El antígeno eritrocitario P fue descubierto en el año 1927 por Landsteiner y Levine y está constituido por tres antígenos glicolípidicos PI, PyP2 y PC, de cuya combinación resultan fenotípicamente personas Pi o P2 como se muestra en la siguiente tabla (19):

Tabla. Grupos sanguíneos

| Fenotipo | Frecuencia | Antígeno presente en los GRs | Anticuerpos en el suero |
|-----------------------------|------------|------------------------------|------------------------------------|
| P1 | 20-90 % | P1, p ^k , P | Ninguno |
| P2 | 10-80 % | p ^k , P | Anti-P1 |
| P ₁ ^k | Raro | p1, p ^k | Anti-P |
| P ₂ ^k | Raro | p ^k | Anti-PP1 |
| P | Raro | Ninguno | Anti-PP1P ^k (anti .Tja) |

Más del 99 % de la población pertenece a los fenotipos P1 o P2. Ambos expresan los antígenos P y P^k en sus células y se diferencian entre sí por la expresión del antígeno P1 (19).

Los 3 fenotipos restantes, p, P₂^k y P₁^k, son extremadamente raros, aproximadamente 1:200 000 individuos y se ha descubierto que la gente que no tiene antígenos P en sus células son naturalmente resistentes a la infección con este patógeno (19).

Por otro lado, los receptores de trasplante renal son especialmente susceptibles a muchas infecciones virales primarias o reactivación de virus latentes. Las infecciones virales más relevantes en el periodo postrasplante son aquellas causadas por el grupo Herpesviridae, virus respiratorios y virus de hepatitis B y C. El primer reporte de infección por parvovirus B19 en un receptor de trasplante renal fue publicada en 1986, y a partir de esta fecha se ha reconocido su importancia como agente infeccioso en el trasplante de órganos sólidos. A la fecha de acuerdo a diferentes estudios longitudinales, entre el 1 y el 12% de los

pacientes sometidos a trasplante renal, presentan infección sintomática por PVB19 durante el primer año postrasplante.

Está bien demostrado que en individuos sanos, el mecanismo de infección predominante es a través de las vías respiratorias, sin embargo en los receptores de órganos sólidos esto no está bien definido. La aparición de los síntomas desde unos pocos días hasta varios años posterior al trasplante sugieren que en este caso el virus presenta diferentes vías de transmisión en donde participe tanto la vía respiratoria, como reactivación viral en el contexto de inmunosupresión intensa postrasplante, infección a partir del injerto renal e incluso a través de transfusiones sanguíneas.

Una vez establecida la infección, existe una inhabilidad para montar una respuesta inmune humoral y celular eficiente para combatir al virus, por lo que en algunos casos la infección puede ser persistente

Independientemente de la etiología, el curso clínico de la Glomerulopatía colapsante es marcadamente uniforme y la mayoría de los casos progresan rápidamente a enfermedad renal avanzada.

En cuanto al tratamiento de la Glomerulopatía colapsante, los diferentes reportes en la literatura sugieren un beneficio sustancial con el empleo de plasmaféresis en el decremento de la proteinuria y mejoramiento de la función renal, en algunas de ellas, hasta un 50% de los pacientes sometidos a esta modalidad de tratamiento han respondido satisfactoriamente, siempre y cuando esta terapia inicie tempranamente en el periodo post trasplante en aquellos pacientes que experimenten recurrencia temprana o bien su empleo profiláctico y terapéutico (plasmaféresis pre y post trasplante) en aquellos pacientes a los que se les haya documentado la enfermedad en los riñones nativos.

Más recientemente se han obtenido resultados alentadores con el empleo de inmunoadsorción y rituximab para la prevención y el tratamiento de la recurrencia de la enfermedad de base.

CAPÍTULO II.- DISEÑO DEL ESTUDIO, MATERIAL Y MÉTODOS

JUSTIFICACIÓN.

La glomerulopatía colapsante es una forma relativamente nueva de enfermedad glomerular clasificada como una entidad aparte y diferente de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria. Se caracteriza por que el número de podocitos aumenta pero son des-diferenciados pues pierden inmunomarcadores de maduración celular, presentando una expresión a la alza de otros inmunomarcadores característicos de las fases inmaduras del desarrollo podocitario. Por otro lado, se ha visto que una expresión a la alza de la proteína BCL-2, juega un papel fundamental como antiapoptótico y promotor de proliferación en algunas formas proliferativas de glomerulonefritis, por lo que creemos que puede tener un papel importante como promotor de la disregulación y proliferación del podocito contribuyendo a la patogenia de la glomerulopatía colapsante

Además de lo anterior, en diversos estudios, se ha sugerido la participación de agentes virales en la patogenia de la GC, específicamente PvB19. Su identificación y posterior replicación en células epiteliales viscerales, parietales y tubulares podrían inducir los cambios histológicos característicos de la GC, principalmente en cuanto al desarrollo de hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales viscerales y parietales.

El poder definir el patrón de afección en cuanto a la variabilidad de la expresión de BCL-2, así como la posible participación viral en la inducción de las alteraciones fenotípicas del podocito abre las puertas al entendimiento de la

fisiopatología de esta enfermedad tan devastadora a fin de crear estrategias futuras de tratamiento con la finalidad de modificar el curso natural de la misma.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existen diferencias en la expresión del inmunomarcador BCL2 y en la positividad para la determinación de DNA de parvovirus B19 en muestras de tejido renal de pacientes portadores de síndrome nefrótico secundario a glomerulopatía colapsante con respecto a los controles sanos y a aquellas otras patologías estudiadas causantes de síndrome nefrótico, que permitan establecer un patrón específico y diferente que defina a la glomerulopatía colapsante del resto de las podocitopatías?

OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMARIO:

Determinar la expresión del inmunomarcador BCL2 y la presencia de parvovirus B19 en tejido renal de pacientes portadores de glomerulopatía colapsante, comparándola con enfermedad de cambios mínimos, esclerosis focal y segmentaria y en controles sanos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Correlacionar la expresión de BCL2 con los parámetros clínicos estudiados

- Correlacionar la expresión de BCL2 con el grado de severidad de los cambios histológicos en las diferentes patologías
- Determinar si existe una correlación entre el hecho de tener el diagnóstico de glomerulopatía colapsante con una expresión a la alza del inmunomarcador BCL2
- Identificar si presencia de parvovirus B19 está relacionada con el hecho de tener el diagnóstico de glomerulopatía colapsante.

HIPÓTESIS.

HIPÓTESIS NULA:

a).- Existen diferencias en el patrón de expresión del inmunomarcador BCL2 y la positividad para parvovirus B19 en la glomerulopatía colapsante comparada con otros tipos de podocitopatías y en controles sanos

HIPÓTESIS ALTERNATIVA:

a).- No existen diferencias en el patrón de expresión del inmunomarcador BCL2 y la positividad para parvovirus B19 en muestras de tejido renal con diagnóstico histológico de glomerulopatía colapsante comparada con otro tipo de podocitopatías y en controles sanos

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1.- Pacientes de ambos sexos de todas las edades sometidos a biopsia renal en la que se haya documentado los diagnósticos de glomerulopatía colapsante, glomeruloesclerosis focal y segmentaria o enfermedad de cambios mínimos, en el Departamento de Nefropatología del Instituto Nacional de Cardiología en el periodo comprendido de 1997 a 2008.

2.- Se establecerá un grupo control constituido por pacientes sanos sometidos a nefrectomía para donación con estudio histológico renal normal.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1.- Pacientes cuyas secciones de tejido renal sean suficientes para el análisis con microscopia de luz, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

2.- Pacientes quienes no cuenten con un resumen y datos clínicos suficientes.

3.- En el caso de los controles sanos se excluirán aquellos cuyo reporte histológico presente alguna enfermedad glomerular ya sea primaria o secundaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se realizó un muestreo probabilístico al azar de biopsias renales de pacientes de todas las edades y ambos sexos, que hayan contado con el diagnóstico histológico de glomerulopatía colapsante, glomeruloesclerosis focal y

segmentaria, enfermedad de cambios mínimos así como controles sanos constituidos por los donadores renales, analizadas en la Sección de Nefropatología del Instituto Nacional de Cardiología dentro del periodo comprendido de 1997 a 2008.

Los datos demográficos investigados al tiempo de tomar la biopsia fueron la edad, sexo, tensión arterial, función renal definida por determinación de creatinina sérica, nitrógeno ureico sanguíneo, proteínas en orina de 24 hrs y determinación del filtrado glomerular, (estimado por la formula de Levey). Niveles séricos de colesterol, triglicéridos y albúmina.

Estos datos fueron obtenidos a partir del expediente clínico de los pacientes y del archivo del departamento de Nefropatología. En cuanto al estudio histológico se considero el numero de glomérulos de la biopsia, el grado de fibrosis intersticial, la presencia de daño vascular así como la expresión positiva o negativa del inmunomarcador estudiado (BCL2) y la detección (positiva o negativa) de DNA de parvovirus B19.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

De cada muestra seleccionada, previamente se estudiaron 1 a 3 fragmentos cilíndricos de corteza renal procesados para microscopía de luz e inmunofluorescencia. Los tejidos se procesaron de acuerdo a las técnicas estandarizadas de rutina y fueron incluidos en parafina para la realización de cortes de 4 μ . Los cortes para microscopía de luz se tiñeron con hematoxilina y

eosina, ácido periódico de Schiff (PAS), metenamina de Jones y tricrómico de Masson.

El diagnóstico de Glomerulopatía colapsante se fundamentó en la presencia de: colapso y/o retracción de los capilares glomerulares, ya sea de manera focal y segmentaria o global; prominencia de las células epiteliales viscerales con hipertrofia e hiperplasia, presencia de gotas hialinas PAS positivas intracitoplasmáticas; y cambios túbulo-intersticiales caracterizados por dilatación tubular y fibrosis intersticial.

La enfermedad de cambios mínimos se definió como aquella glomerulopatía primaria en la cual no se observaron lesiones glomerulares a la microscopia de luz, sin evidencia de presencia de depósitos de complejos inmunes para los diferentes antisueros (IgG, IgM, IgA, C3, C4 o C1q) en la inmunofluorescencia, siendo su característica sine qua non la presencia de esfacelamiento de los procesos podocitarios a la microscopia electrónica.

En la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, se consideró a la esclerosis como aquella que involucra algunos pero menos del 50% de los glomérulos (focal) y afecta una porción, pero no toda del penacho glomerular (segmentaria). La esclerosis se definió como un incremento en la matriz con obliteración en grados variables del lumen capilar.

Se estableció un grupo control constituido por individuos sometidos a biopsia renal tras nefrectomía por donación quienes presentaran al momento del estudio función renal normal, con reporte histológico sin alteraciones.

Además del estudio por microscopia de luz, las muestras fueron sometidas a tinción por inmunofluorescencia directa en búsqueda de los siguientes marcadores; IgG, IgM, IgA, C3, Kappa, Lambda, fibrinógeno y albumina. Los

casos fueron analizados y catalogados dentro de los diagnósticos estudiados en base a la evaluación de la morfología glomerular, tubular, intersticial.

La evaluación cualitativa y cuantitativa del daño tubular e intersticial fue también evaluada utilizando una escala de 0 a III, en donde de 0-I comprende aquella fibrosis intersticial inferior al 25%, II corresponde a una fibrosis del 25 al 50% del tejido y III a una fibrosis superior a 50% del tejido renal analizado.

El daño vascular fue estimado en forma cuantitativa, considerando un grado 0 para aquellos vasos sanguíneos sin alteraciones histológicas, grado 1, se considero a la presencia de hialinosis, engrosamiento de la íntima y/o media, grado 2 a la presencia de arteriolonefrosclerosis moderada y grado 3 a la presencia de arteriolonefrosclerosis severa.

Posteriormente se empleó la técnica de inmunohistoquímica para determinar la expresión del inmunomarcador BCL2 en todas las muestras seleccionadas así como también, se realizó estudio de hibridación in situ para la detección de PVB19 las muestras de tejido renal seleccionadas.

Técnica para la realización de Inmunohistoquímica:

El procesamiento de las muestras fue a través del método Avidina-Biotina-Peroxidasa. Se utilizaron muestras de tejido renal obtenido mediante biopsia, fijadas en formalina e incluidas en un bloque de parafina.

Se utilizó el Kit LSAB2 (Dako, Kyoto, Japón). Se cortaron secciones de tejido renal con un espesor de 4 μ . Posteriormente se desparafinaron y se irrigaron con una solución salina buffer de fosfato (PBS) y agua pura, siendo después

incubadas por 30 minutos en una solución al 3% de H₂O₂ para el bloqueo de las peroxidases endógenas.

Posteriormente son sometidas a irrigación con PBS y agua pura así como con suero no inmune de cabra para bloquear las uniones no específicas. Posteriormente, el anticuerpo primario fue aplicado (incubación nocturna a 4°C) y al día siguiente las muestras fueron irrigadas con PBS y fue aplicado el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se aplicó como sustrato 3,3-diaminobenzidina y posteriormente hematoxilina de Mayer

Como anticuerpo primario se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón para la proteína BCL-2. Como control positivo se utilizaron especímenes de cáncer de vejiga conocidos por ser BCL-2 positivos. Los controles negativos fueron empleados para remplazar al anticuerpo primario con otros.

La evaluación de la expresión de BCL-2 fue realizada por el nefropatólogo quien no tuvo en ese momento ninguna información clínico-patológica acerca de los pacientes.

En cuanto a la expresión de BCL-2 se consideraron positivas aquellas laminillas que mostraron depósitos color amarillo-oro en la superficie de los núcleos y/o citoplasma de las células epiteliales viscerales, parietales, células tubulares y células inflamatorias en el intersticio.

Técnica de hibridación in situ para la identificación de DNA de parvovirus B19:

La demostración del virus en tejido renal se realizó mediante inmunohistoquímica utilizando 1 a 2 secciones de 4 micras de tejido renal

desparafinadas, rehidratadas y fijadas en buffer de formalina neutro (BSA) a las cuales se les aplico el anticuerpo monoclonal R92F6 (NCL-Parvo, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) contra las proteínas de la cápside viral VP1 y VP2 durante la noche a 4 °C, siendo posteriormente aplicado en anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente

Al término fueron teñidas con verde de metilo. Se usaron como controles positivos tejido de médula ósea proveniente de fetos con PVB19 el cual indujo hidrops fetalis. Los controles negativos incluyeron un pretratamiento con DNAsas y sustitución de PVB19 con Citomegalovirus y Ebstein Barr.

La positividad para PVB19 se considero en aquellas laminillas que mostraron tinción verde de metilo en la superficie de las células epiteliales viscerales, parietales, células tubulares y endoteliales. Tanto para BCL-2 como PVB19 los resultados se expresaron en forma cualitativa como positividad o negatividad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

DISEÑO DEL ESTUDIO: transversal, analítico.

UNIVERSO DE TRABAJO: Pacientes mexicanos de todas las edades y ambos sexos cuyo estudio histopatológico se haya realizado en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología en el periodo comprendido de 1997 a 2008, cuyo diagnostico histológico sea compatible con glomerulopatía colapsante, glomeruloesclerosis focal y segmentaria y enfermedad de cambios mínimos. El grupo de controles sanos estuvo constituido por aquellos pacientes sometidos a nefrectomía para donación.

DESCRIPCION DE LAS VARIABLES:

DEPENDIENTES: expresión de BCL-2 en el tejido renal, detección de PvB19 en tejido renal.

INDEPENDIENTES: edad, sexo, niveles séricos de CrS (mg/dl), BUN (mg/dl), Col (mg/dl), TG (mg/dl) y Alb (mg/dl), PrU (gr/día), FG (ml/min), TAS (mmHg), TAD (mmHg), No. Glomérulos en las biopsias, grado de fibrosis intersticial y daño vascular.

El análisis de datos se llevó a cabo con el programa SPSS versión 15.0 para Windows.

Las variables se expresan como promedio \pm DS o bien como proporciones, según corresponda. La comparación de proporciones se llevó a cabo con la prueba X^2 y la comparación de medias mediante ANOVA de 1 factor, empleando como prueba de comparación múltiple de medias la prueba T de Dunnet. Se consideró un valor significativo a una $p < 0.05$.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS.

Se estudiaron un total de 88 biopsias renales (45 hombres y 43 mujeres) con diagnóstico de glomerulopatía colapsante (N=29), glomeruloesclerosis focal y segmentaria (N=30), enfermedad de cambios mínimos (N=10) y controles sanos (N=14).

La edad media al momento de la toma de biopsia fue de 30.3 ± 13.7 años para glomerulopatía colapsante (rango 8-65), 34.36 ± 18.17 años para glomeruloesclerosis focal y segmentaria (rango 2-74), 28.1 ± 15.65 años para enfermedad de cambios mínimos (rango 5-60) y 29.68 ± 5.91 años para los controles sanos (rango 29-46). No hubo diferencias significativas en cuanto a los grupos etáreos y la distribución por sexos entre la población estudiada ($p > 0.53$ y $p > 0.73$ respectivamente).

El número total de glomérulos analizados por sección para cada una de las entidades estudiadas fue de 13.2 ± 6.43 en glomerulopatía colapsante, 14.93 ± 11.3 en esclerosis focal y segmentaria, 11.5 ± 6.7 en enfermedad de cambios mínimos y 15.47 ± 6.31 en controles sanos, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p > 0.67$, 0.56, 0.71 y 0.62 respectivamente).

TABLA 1. RESULTADOS

| | GC (N=29) | GEFyS (N=30) | ECM (N=10) | Controles (N=19) | Valor de P |
|------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|------------|
| SEXO H:M | 15:14 | 15:15 | 4:6 | 11:8 | NS |
| EDAD | 30.3±13.7 | 34.3±18.1 | 28.1±15.6 | 29.6±5.9 | NS |
| BUN | 39.8±25.7 | 23.4±15.7 | 13.2±6.5 | 11.26±1.8 | 0.001 |
| CrS | 2.98±3.27 | 1.1.58±0.78 | 1.00±0.27 | 0.91±0.10 | 0.002 |
| PrU | 6.66±4.98 | 5.2±2.76 | 5.7±2.27 | 0.19±0.005 | 0.001 |
| FG | 46.9±29.64 | 68.5±30.78 | 81.3±19.41 | 98.82±8.75 | 0.001 |
| TAS | 152.57±27.54 | 138.68±12.68 | 133.75±11.05 | 114.5±7.6 | 0.001 |
| TAD | 96.42±16.39 | 87±12.20 | 82.25±10.48 | 79.38±5.67 | 0.001 |
| COL | 283±141.2 | 312.7±127.5 | 386±113.5 | 175.2±36.2 | 0.000 |
| TG | 275±154.4 | 268.5±152.8 | 269±130.5 | 181±34.9 | 0.091 |
| ALB | 2.7±0.6 | 2.8±0.8 | 2.5±0.7 | 4.2±0.2 | 0.000 |
| No.G | 13.2±6.4 | 14.9±11.3 | 11.5±6.7 | 15.4±6.3 | 0.000 |
| FI | 1.2±1 | 1.6±0.9 | 0.4±0.8 | 0.05±0.2 | 0.000 |
| DV | 1.13±0.91 | 1.26±1.08 | 0.7±0.69 | 0.10±0.3 | 0.000 |
| BCL-2 G % | 33.9(20) | 22(13) | 13.6(8) | 30.5(18) | NS |
| BCL-2 T % | 23.5(4) | 11.8(2) | 11.8(2) | 52.9(9) | NS |
| BCL-2 I % | 0(0) | 4(28.6) | 7.1(1) | 64.3(9) | NS |
| PvB19 % | 20(2) | 50(5) | 20(2) | 10(1) | NS |

PvB19. Se detecto en las células epiteliales viscerales, células epiteliales parietales, túbulos y endotelio.

Tabla 2. Comparaciones múltiples entre las variables estudiadas y los grupos de estudio. (Valor de P)

| DX | DX | EDAD | BUN | CrS | PrU | FG | TAS | TAD | COL | TG | ALB | FI | DV | BCL-2 G | BCL-2 T | BCL-2 I | PvB19 |
|-----------|-----------|------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|----|---------|---------|---------|-------|
| GC | GEFYS | NS | 0.033 | NS | NS | 0.048 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| | ECM | NS | 0 | 0.018 | NS | 0.002 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | | NS | NS |
| GEFYS | Controles | NS | 0 | 0.012 | 0 | 0 | 0 | 0.002 | 0.007 | NS | 0 | 0 | 0 | NS | | NS | NS |
| | GC | NS | 0.033 | NS | NS | 0.048 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| ECM | GEFYS | NS | NS | 0.008 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | 0.006 | NS | NS | NS | NS | NS |
| | Controles | NS | 0.003 | 0 | 0 | 0 | 0 | NS | 0 | 0.042 | 0 | 0 | 0 | NS | NS | NS | NS |
| Controles | GC | NS | 0 | 0.018 | NS | 0.002 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | | NS | NS |
| | GEFYS | NS | NS | 0.008 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | 0.006 | NS | NS | NS | NS | NS |
| GEFYS | Controles | NS | NS | 0.883 | 0 | NS | 0.006 | NS | 0.005 | NS | 0 | NS | NS | NS | | NS | NS |
| | GC | NS | 0 | 0.012 | 0 | 0 | 0 | 0.002 | 0.007 | NS | 0 | 0 | 0 | NS | | NS | NS |
| Controles | GEFYS | NS | 0.003 | 0 | 0 | 0 | 0 | NS | 0 | 0.042 | 0 | 0 | 0 | NS | NS | NS | NS |
| | ECM | NS | NS | NS | 0 | NS | 0.006 | NS | 0.005 | NS | 0 | NS | NS | NS | | NS | NS |

Glomerulopatía colapsante

Todos los pacientes con el diagnóstico de glomerulopatía colapsante mostraron la presencia de colapso de los capilares glomerulares (segmentaria o global) y retracción del ovillo glomerular con obliteración de la luz capilar en ausencia de proliferación mesangial y endotelial.

En los glomérulos colapsados, las células epiteliales viscerales se observaron prominentes y numerosas (con hipertrofia e hiperplasia) conteniendo gotas de reabsorción proteica.

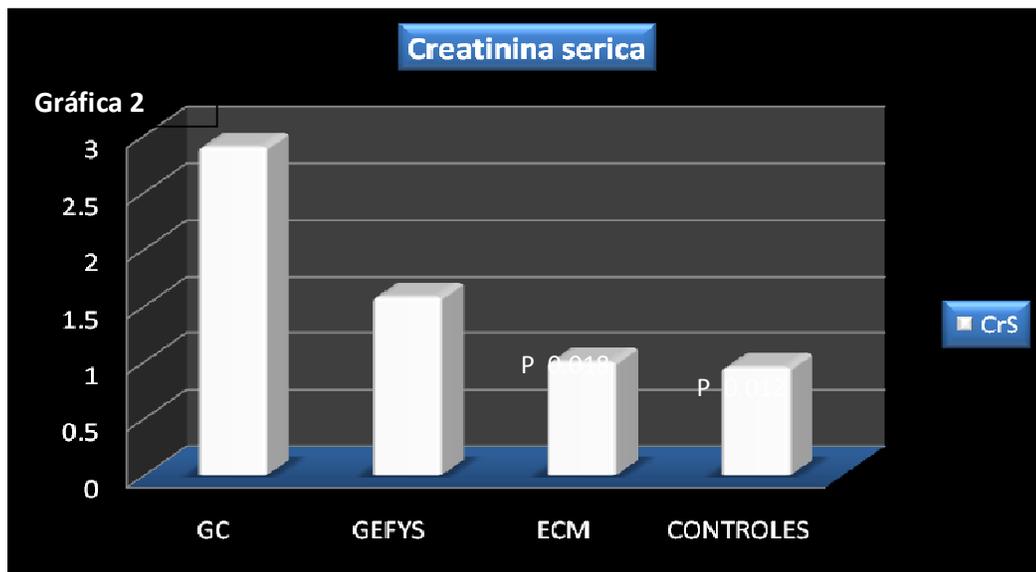
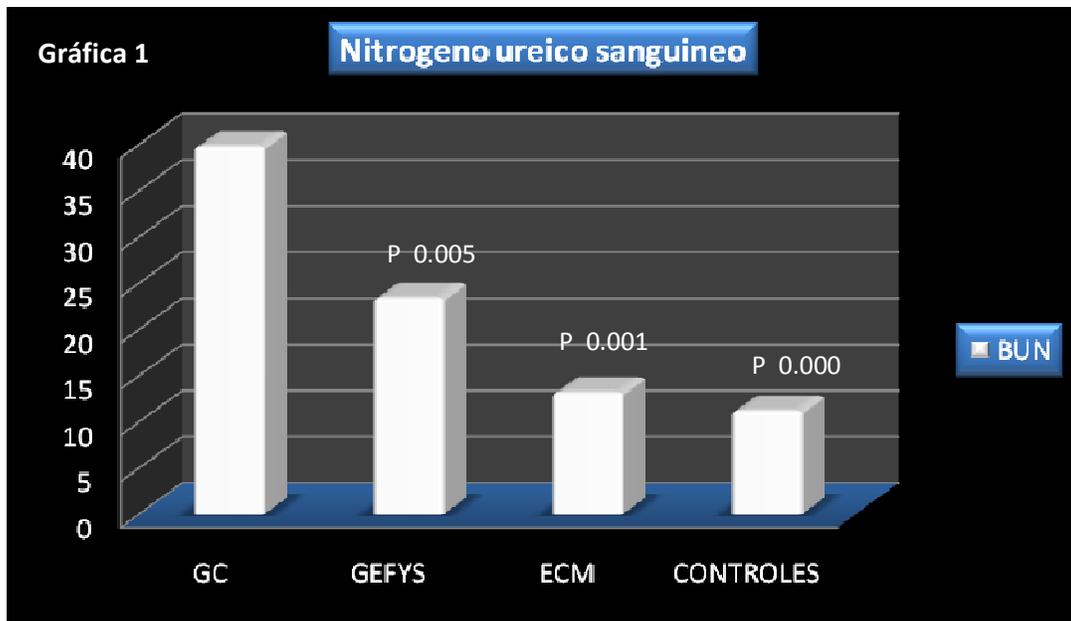
Tres casos (10.3%) mostraron fibrosis intersticial grado III, 10 casos (34.5%) mostraron fibrosis intersticial grado II y 7 casos (24.1%) mostraron una fibrosis

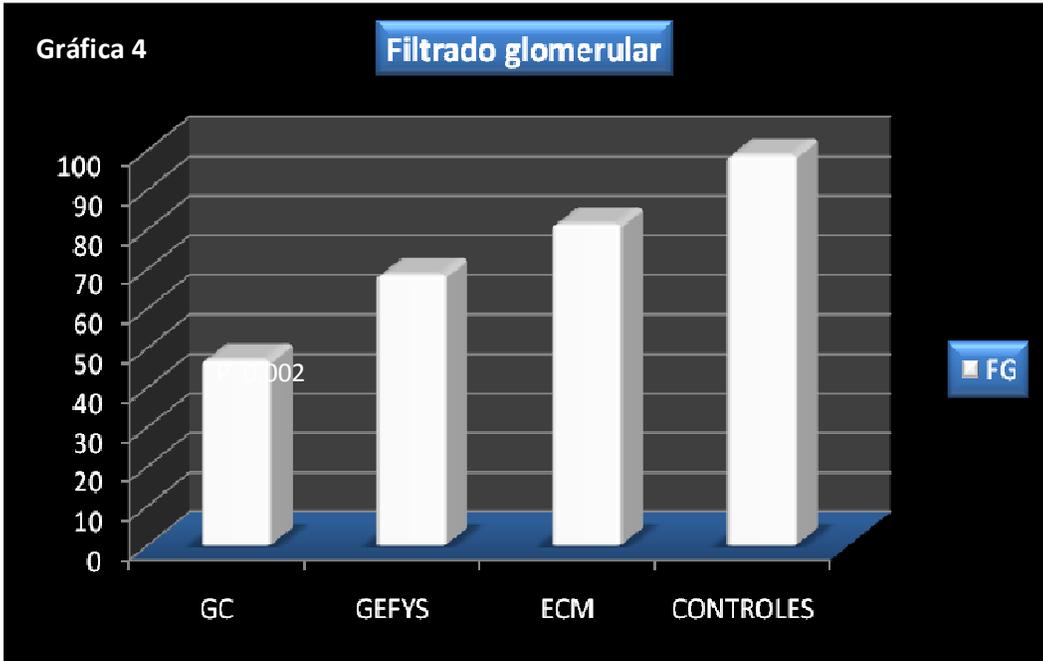
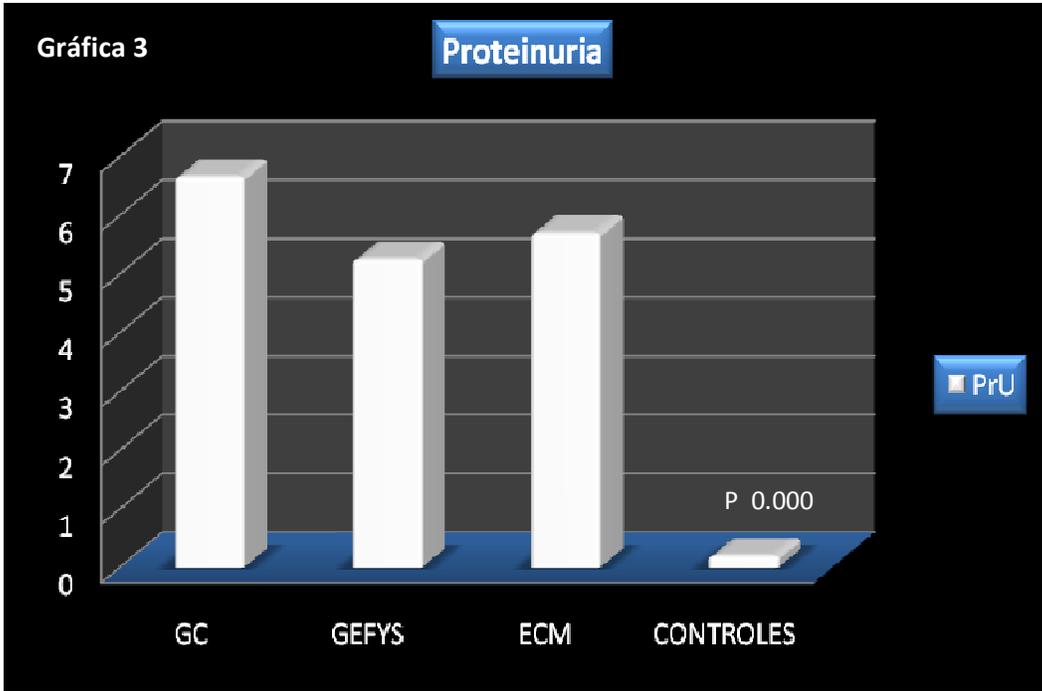
grado 1. Es importante destacar que 9 casos (un 10.2%) no tenían fibrosis intersticial, probablemente debido a que 7 de ellos correspondieron a enfermedad de novo en los primeros 3 meses posterior al trasplante renal por lo que aun no habían desarrollado un porcentaje significativo de fibrosis intersticial. El daño vascular grado 3 se observó en el 10.3% (N=3) de los casos, el grado 2 en el 17.2% (N=5), el grado 1 en el 48.3% (N=14) y en el 24.1% (N=7) no se encontraron lesiones vasculares.

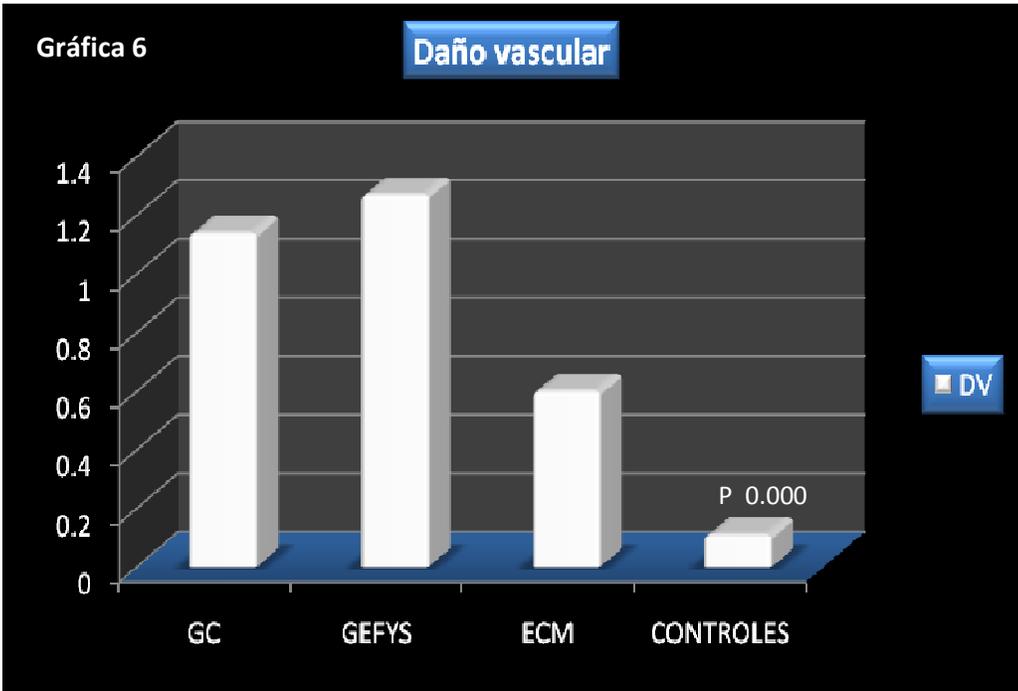
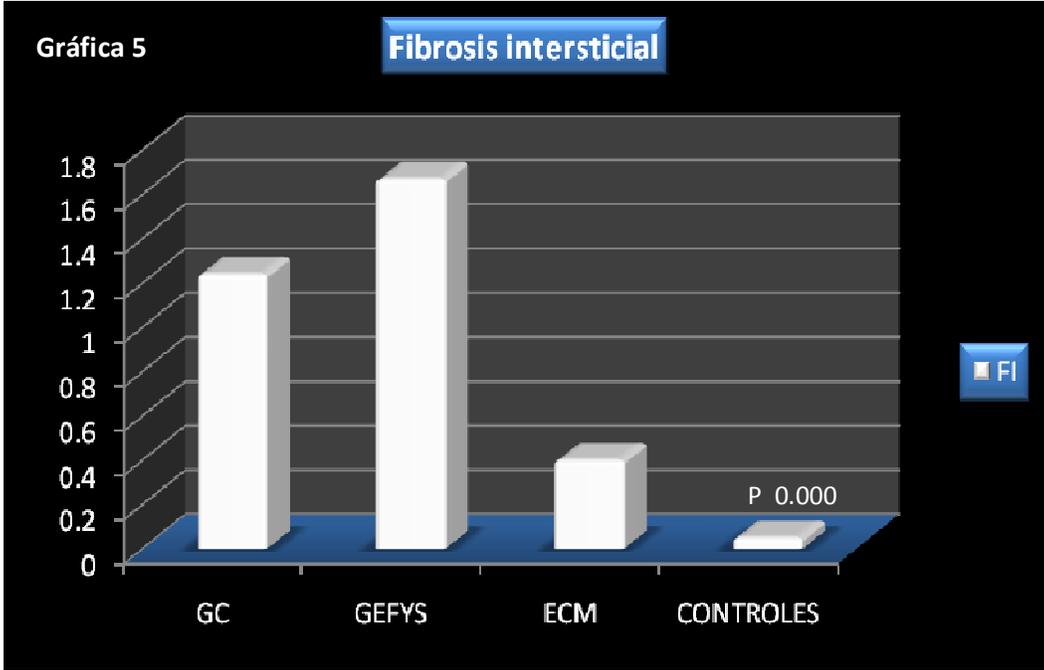
La función renal al momento del diagnóstico estimado por la determinación de nitrógeno ureico sanguíneo y filtrado glomerular se encontró con mayor deterioro entre los pacientes con el diagnóstico histológico de GC comparado con la GEFyS, ECM y controles. Igualmente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de creatinina entre la glomerulopatía colapsante con la enfermedad de cambios mínimos y los controles.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la determinación de proteinuria, fibrosis intersticial y daño vascular entre los grupos de GC, GEFyS y ECM tal y como se puede apreciar en la tabla 2 y las gráficas 1-6

GRAFICAS 1-6. Correlación de las variables clínicas e histológicas entre los grupos de estudio

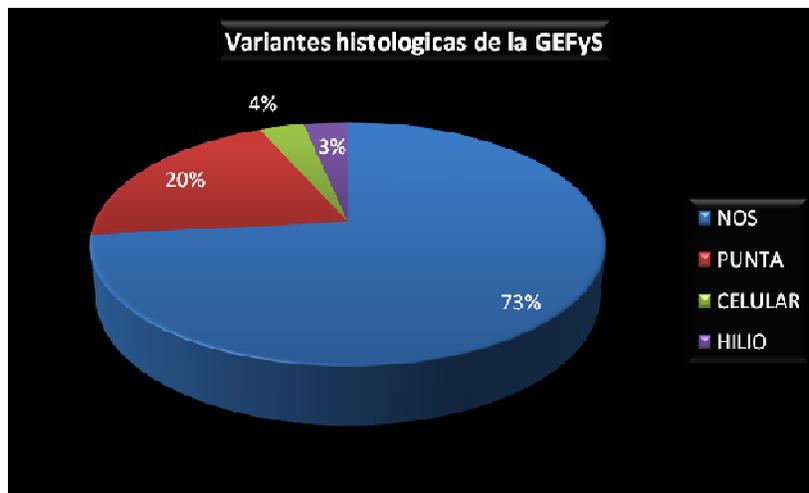






Esclerosis focal y segmentaria no colapsante

En las muestras con diagnostico histológico de GEFyS, 73.33% (N=22) correspondieron a la variante no especificada, seguida de la variante de la punta con un 20 % (N=6) y finalmente las variantes del hilio y celular, ambas en un 3.3% (N=1). Se observó fibrosis intersticial grado III en el 20% (N=6) de los casos, fibrosis intersticial grado II en el 43.3% (N=13) de los casos y fibrosis intersticial grado I en el 20% (N=6) de los casos



El daño vascular grado 3 se observó en el 16.7% (N=5) de los casos, el grado 2 en el 23.3% (N=7), el grado 1 en el 30% (N=9) y en el 30% (N=9) no se encontraron lesiones vasculares.

Enfermedad de células epiteliales sin esclerosis (cambios mínimos)

En el grupo de enfermedad de cambios mínimos el hallazgo predominante fue el esfacelamiento difuso y obliteración de los procesos podocitarios así como la

presencia de múltiples vacuolas de reabsorción proteica a la microscopia electrónica. El grado de fibrosis intersticial no fue mayor de 1 y este se encontró en un 40% de los tejidos estudiados, igualmente el daño vascular solo alcanzo el grado I en un 5.3%.

Grupo control

Los controles mostraron una histología normal y ausencia de positividad en la inmunofluorescencia, destacando únicamente un caso con presencia de arteriolonefroesclerosis moderada

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el grado de fibrosis intersticial del grupo de GC comparado con el de GEFyS ($P>0.496$) así como entre el grupo de ECM con el grupo control ($p>0.738$)

TABLA 2. Hallazgos morfológicos (fibrosis intersticial y daño vascular) en los grupos de estudio

| | GC N (%) | GEFYS N (%) | ECM N (%) | Controles N (%) |
|------------------------------|----------|-------------|-----------|-----------------|
| Fibrosis intersticial | | | | |
| Grado 0 | 7(24.1) | 9(30) | 5(50) | 17(89.5) |
| Grado I | 14(48.3) | 9(30) | 4(40) | 2(10.5) |
| Grado II | 5(17.2) | 7(23.3) | 1(10) | 0(0) |
| Grado III | 3(10.3) | 5(16.7) | 0(0) | 0(0) |
| Daño vascular | | | | |
| Grado 0 | 9(31) | 5(16.7) | 8(80) | 18(94.7) |
| Grado 1 | 7(24.1) | 6(20) | 0(0) | 1(5.3) |
| Grado 2 | 10(34.5) | 13(43.3) | 2(20) | 0(0) |
| Grado 3 | 3(10.3) | 6(20) | 0(0) | 0(0) |

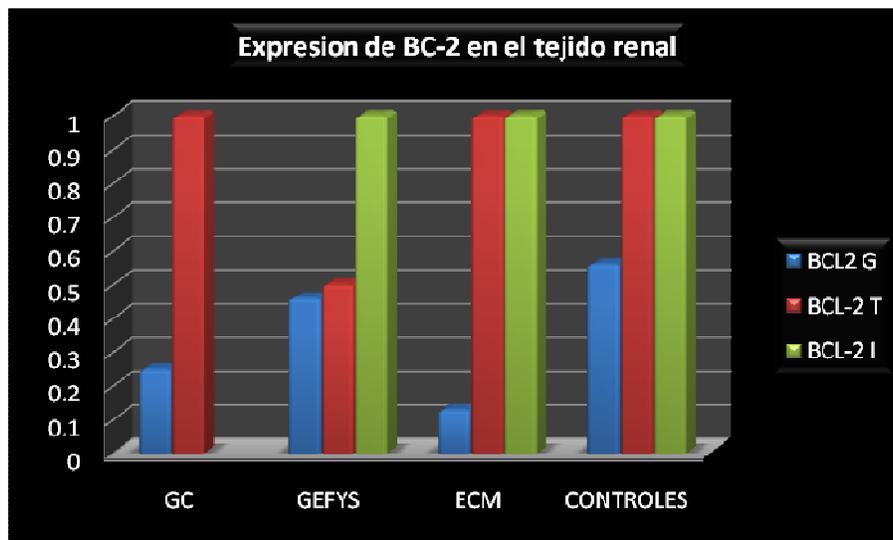
Expresión de BCL-2 y detección de PvB19 en los grupos de estudio.

Se encontró positividad para BCL2 a nivel de células epiteliales viscerales y parietales en el 33.9% (N=20) en el grupo de glomerulopatía colapsante, 22% (N=13) en el grupo de GEFyS, 13.6% (N=8) en el grupo de enfermedad de cambios mínimos y en el 30.5% (N=18) de los controles.

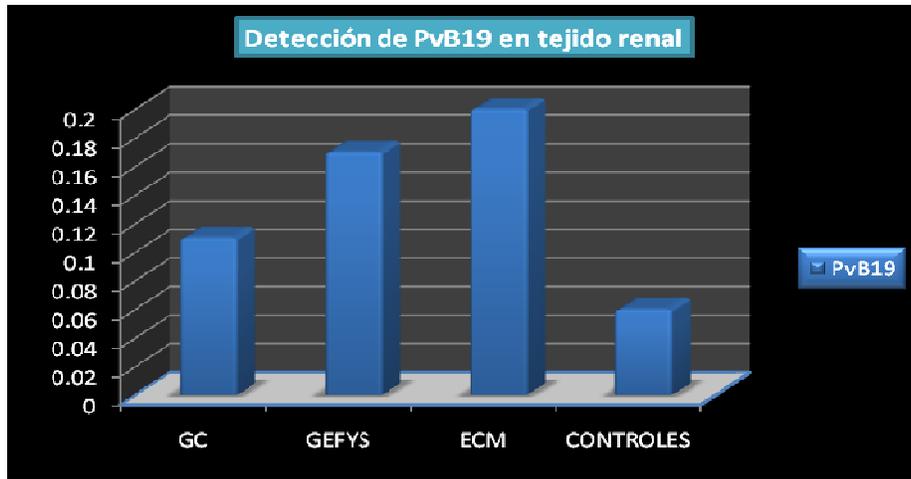
La expresión positiva de BCL-2 a nivel tubular fue de 23.5% (N=4) para el grupo de GC, 11.8% (N=2) para el grupo de GEFyS, 11.8% (N=2) para ECM y en 52.9% (N=9) de los controles

Finalmente, la expresión a nivel de células inflamatorias e intersticio fue de 0% (N=0) para GC, 28.6% (N=4) en GEFyS, 7.1% (N=1) en ECM y 64.3% (N=9) de los controles.

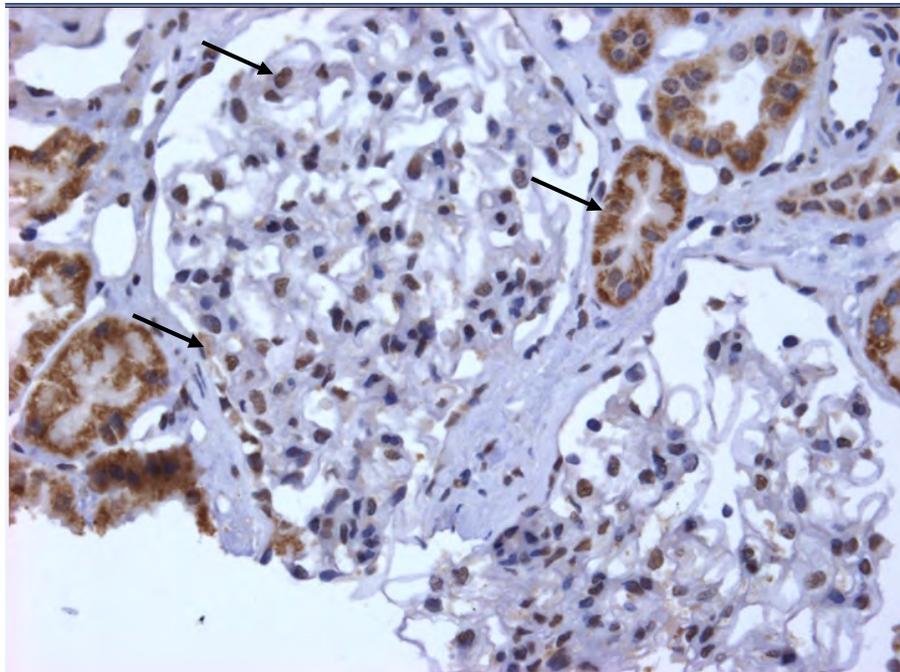
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína BCL-2 en las células epiteliales viscerales, parietales, células tubulares e inflamatorias entre el grupo con diagnóstico histológico de glomerulopatía colapsante comparado con glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de cambios mínimos y controles ($p > 0.782$, 0.961 y 0.293 respectivamente).



PvB19 se detectó en el 11.1% (N=2) en el grupo de GC, 17.2% (N=5) en el grupo de GEFyS, 20% (N=2) en el grupo de ECM y en el 5.9% (N=19) de los controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la positividad para PvB19 a nivel glomerular, tubular y endotelial en el grupo de la GC al compararlo con el de GEFyS, ECM y controles ($p > 0.992$, 0.991 y 0.994 respectivamente).

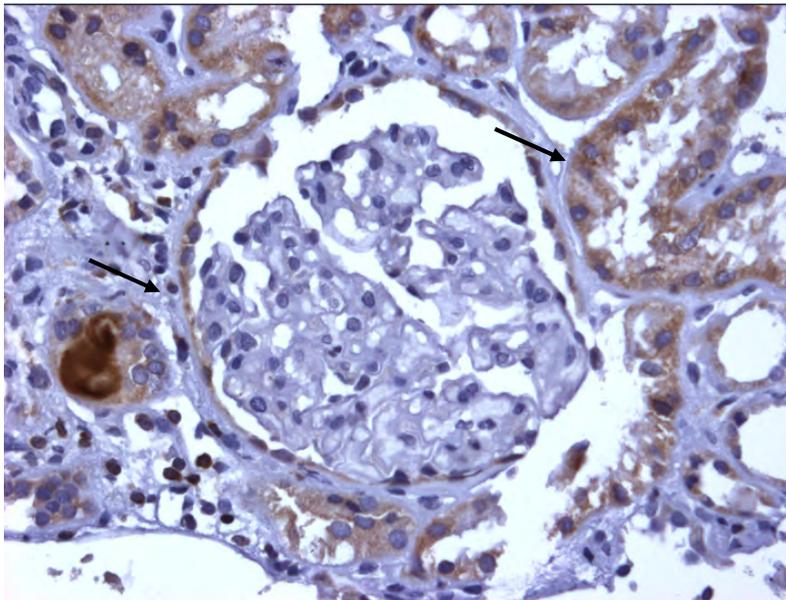


Positividad para PvB19 a nivel glomerular y tubular. Magnificación 40x



Expresión de BCL-2 a nivel de células epiteliales parietales y epitelio tubular.

Magnificación 40x



DISCUSIÓN.

La glomerulopatía colapsante es un tipo de lesión glomerular descrito de manera relativamente reciente en la literatura médica. Afecta principalmente a personas jóvenes pero puede presentarse a cualquier edad con cierta preponderancia por el sexo masculino. En nuestra serie de casos, esta se presentó en un rango de edades de 8 a 65 años, sin encontrar preponderancia por alguno de los sexos.

El signo clínico más constante y característico suele ser la presencia de síndrome nefrótico con proteinuria masiva incluso superior a 10 gr/día, observándose grados variables de insuficiencia renal al momento del diagnóstico, pudiéndose presentarse como enfermedad primaria en riñones nativos o bien como enfermedad recurrente o de novo tras el trasplante renal. En nuestro estudio en el grupo con GC se presentó en un 24.1% (7/30) como enfermedad de novo tras el trasplante renal, la proteinuria osciló desde los 2.3 gr/ día hasta los 22 gr/día, sin embargo esta no tuvo diferencias significativas con el nivel de proteinuria con el grupo de GEFyS y el de ECM. Es importante hacer notar que si se observó mayor deterioro de la función renal con niveles mayores de BUN y disminución mayor del FG comparada con los grupos antes mencionados, lo cual concuerda con la literatura en el sentido de que usualmente los pacientes con el diagnóstico de glomerulopatía colapsante debutan con deterioro de la función renal, proteinuria y síndrome nefrótico con mayor gravedad con respecto a los otros grupos de estudio.

Las alteraciones glomerulares son características, los glomérulos presentan colapso y retracción de los capilares glomerulares que puede ser global o segmentario. Las células epiteliales viscerales son muy prominentes,

presentando vacuolas y depósitos en forma de gotas hialinas. Los cambios tubulointersticiales también son característicos con dilataciones quísticas, aplanamiento del epitelio tubular y fibrosis intersticial así como también puede existir daño a la microvasculatura en grados variables desde engrosamiento de la íntima, proliferación de la media o arteriolonefroesclerosis, tal y como se observo en este estudio.

En la patogenia de la enfermedad se han implicado una serie de factores sin que hasta el momento se haya demostrado completamente la participación de alguno de ellos. Dentro de los agentes infecciosos sugeridos como agentes causales o promotores del desarrollo de glomerulopatía colapsante destacan el virus de la inmunodeficiencia humana y parvovirus B19. Recientemente Asha Moudgil y cols reportaron una prevalencia incrementada de PvB19 en tejido renal obtenido de pacientes con glomerulopatía colapsante comparada con nefropatía membranosa y enfermedad de cambios mínimos ($p > 0.001$). Ellos reportaron positividad para PvB19 a nivel de las células epiteliales viscerales, parietales y células tubulares. Interesantemente nosotros no pudimos demostrar esta diferencia.

Sin embargo en otras series no se ha demostrado claramente esta asociación lo que sugiere participación de factores demográficos, medioambientales y susceptibilidad individual variable entre las distintas poblaciones. En este sentido es importante mencionar que no existen hasta la fecha reportes en la literatura sobre la prevalencia de los diferentes fenotipos del antígeno eritrocitario P en población mexicana lo cual pudiese explicar una resistencia natural al desarrollo de esta infección viral en nuestra población.

En la literatura, se ha mencionado el hecho de que individuos inmunosuprimidos como los receptores de trasplante renal pueden tener defectos específicos en la inmunidad celular resultando en la incapacidad para generar una respuesta celular y humoral adecuada y suficiente para eliminar al virus, permitiendo la persistencia de las partículas virales, posterior a lo cual el virus puede entrar a una fase productiva pudiendo ser responsable de los cambios histológicos iniciales observados en la glomerulopatía colapsante, especialmente en cuanto a la disregulación del podocito.

En este estudio no se encontró una asociación significativa para la positividad para el PVB19 entre los diferentes grupos de estudio lo cual revela una baja prevalencia de infección por parvovirus B19 en nuestra población comparado con otras series, de tal forma que parece no tener participación en la patogenia de la glomerulopatía colapsante.

La familia del proto-onco gen BCL-2 que incluye moléculas proapoptóticas (BAD y BAX) y antiapoptóticas (BCL-2 y BCL.XI), promueve la supervivencia celular a través del bloqueo de la muerte celular programada. Se ha postulado que los niveles relativos de estas dos moléculas podrían jugar un papel importante en la proliferación celular durante el curso de algunas enfermedades glomerulares humanas.

Tsukasa Takemura y cols en 1995 demostraron que el número de células positivas para BCL-2 fue más alta en pacientes portadores con nefritis lúpica, glomeruloesclerosis focal y segmentaria y nefropatía por IgA y previamente Harrison y cols describieron la presencia de cuerpos apoptóticos en los glomérulos de los pacientes con glomerulonefritis proliferativa. También se ha documentado que la población con células glomerulares positivas para BCL_2

correlacionaron en forma significativa con el número de células intraglomerulares positivas para el antígeno de proliferación nuclear PCNA ($p > 0.001$), con el grado de incremento en la celularidad mesangial ($p > 0.005$) y con la magnitud de la proteinuria.

Si bien no se ha estudiado hasta la fecha, la proteína BCL-2 podría también jugar un rol importante en la génesis de la glomerulopatía colapsante al promover la proliferación de las células epiteliales parietales y viscerales y la disregulación del podocito con expresión a la alza de marcadores de proliferación celular y a la baja de marcadores de maduración celular. Sin embargo en este estudio, no parece haber una correlación entre la expresión positiva para BCL-2 cuando se compara a la glomerulopatía colapsante con los otros grupos de estudio.

Incluso, se encontró positividad en el interior del glomérulo tanto en células epiteliales viscerales y parietales, así como en el túbulo en glomérulos sanos por lo que en nuestra serie, la función de BCL-2 como protector de apoptosis no parece jugar un rol en el desarrollo de glomerulopatía colapsante.

Sin embargo creemos que se requieren mayores estudios a este respecto, especialmente ante las discrepancias de expresión de BCL-2 tanto en controles sanos como en diversas glomerulopatías con patrón proliferativo para determinar exactamente el papel de esta proteína en estas enfermedades glomerulares, además de las limitantes observadas durante el desarrollo de este estudio como son el tamaño de la muestra dado que se descartaron muchas muestras dada la baja calidad y cantidad del tejido renal, por otro lado, tampoco se determinó la serología (PCR) para PVB19 en los casos positivos por lo que no podemos asegurar que por el solo hecho de encontrar positividad para parvovirus B19 en tejido renal, implique necesariamente la presencia de

enfermedad activa o únicamente el hecho de haber estado en contacto con el virus previamente.

Otro aspecto importante es el hecho de haber reportado la expresión del marcador BCL-2 y la presencia de parvovirus B19 en el tejido renal únicamente en forma cualitativa, es decir como positivo o negativo y no de manera cuantitativa mediante el uso de histomorfometría lo cual nos brindaría información más objetiva y precisa sobre la presencia de estas dos sustancias estudiadas en el tejido renal.

Tampoco tuvimos una muestra homogénea en cuanto a las diferentes variedades de la GEFyS por lo que no podemos asegurar si existiera alguna diferencia significativa en la expresión de BCL-2 y la presencia de PvB19 entre las diferentes variedades histológicas de esta glomerulopatía.

CONCLUSIONES

1.- Encontramos positividad para PVB-19 en todas las variantes de enfermedad de células epiteliales viscerales e incluso en controles por lo que podemos concluir que en nuestro grupo de pacientes no hubo una mayor asociación de PVB-19 y glomerulopatía colapsante como se ha descrito en la literatura.

2.- No se pudo demostrar de forma estadísticamente significativa, el papel protector de apoptosis de BCL-2 y eventualmente condicionante de supervivencia celular y proliferación entre una glomerulopatía con rápido deterioro histológico y clínico como es la glomerulopatía colapsante y las otras variedades.

3.- Hubo mayor daño tubulointerstitial en las biopsias de pacientes con glomeruloesclerosis focal y segmentaria no colapsante al momento del diagnóstico, lo que probablemente refleja mayor cronicidad, comparadas con el grupo de GC en la cual la forma de presentación y curso clínico suele ser mas agudo y severo lo que probablemente condicionaría una detección mas temprana y por ende menor cronicidad.

4.- No hubo diferencias estadísticamente significativas en el género en la glomerulopatía colapsante a pesar de lo reportado en la literatura en donde se menciona discreto predominio por el sexo masculino

5.- El grupo etario de pacientes con enfermedad de células epiteliales viscerales sin esclerosis (enfermedad de cambios mínimos) predominante se observó alrededor de la tercera década de la vida, lo que difiere con respecto a la literatura en donde se ha reportado dos picos de incidencia en los extremos de la vida como causante de síndrome nefrótico

ANEXO. TABLAS Y FIGURAS.



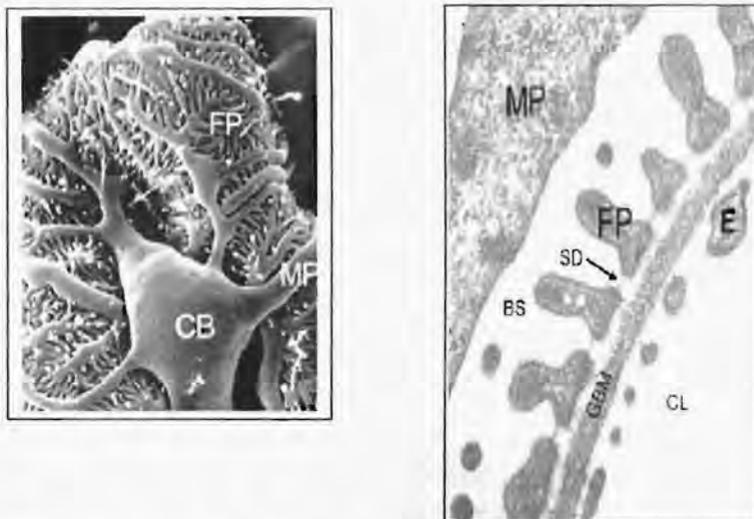
ECM: enfermedad de cambios mínimos. GEFyS: glomeruloesclerosis focal y segmentaria. GC: Glomerulopatía colapsante. EMD: escleriosis mesangial difusa. HTA: nefropatías asociadas a hipertensión. DM2: nefropatía diabética. INM/INF: glomerulopatías relacionadas a enfermedades inflamatorias y/o infecciosas. Alport: síndrome de Alport. SNCF: síndrome nefrótico congénito tipo Finlandés

TABLA 1. TAXONOMÍA DE LAS PODOCITOPATIAS.

| Formas idiopáticas | Formas genéticas | Formas reactivas | |
|--------------------|--|--|---|
| ECM | ECM idiopática Sensible a esteroide Resistente a esteroide | No sindrómica NPHS2 Sindrómicas DYSF (limb- girdle distrofia muscular 2B) | Enfermedad de Hodgkin Estimulo inmunogenico Asociadas a medicación: AINES, oro, penicilamina, litio, interferon a y g, bifosfonatos |
| GEFyS | GEFyS idiopática | No Sindrómicas NPHS1 + NPHS2 NPHS2 ACTN4 CD2AP TRP6C WT1 mDNA tRNA ^{leu} mDNA tRNA ^{lys} PLCE1 Sindrómicas WT1 (Fraser) mDNA tRNA ^{leu} (MELAS) PAX2 (síndrome renal-coloboma con oligomeganefronia) LMX1B (uña-patela) COQ2 COQ6 PDSS2 (Leigh) ITGB4 COL4A3, A4, A5 (Alport) GLA (Fabry) | GEFyS post adaptativa Reducción de masa nefronal (displasia arenal, reducción de masa renal quirúrgica, nefropatía por reflujo, nefritis intersticial crónica) Perdida inicial de masa nefronal : obesidad, incremento en masa muscular, hipertensión, cardiopatía congénita cianógena. Asociadas a medicación: ciclosporina, tacrolimus, interferón gama y bifosfonatos. |
| EMD | EMD idiopática | No Sindrómica NPHS1 (CNF) WT1 NPHS2 PLCE1 LAMB2 Sindrómica LAMB2 (Pierson) WT1 (Denys-Drash) COQ6 | |
| GC | GC idiopática | No Sindrómica COQ2 Sindrómica SCARB2/Limp2 (falla renal-mioclonus) ZMPSTE24 (displasia mandibuloacral) | Infección: Virus: (VIH, PVB19, CMV) Otros: (Campylobacter enteritis, Filariasis Loa Loa, leishmaniasis visceral, Mycobacterium tuberculosis) Asociación con otras enfermedades: Enfermedades autoinmunes, síndrome de Guillain Barre, microangiopatía trombótica, malignidades hematológicas Medicación: interferón gama, bifosfonatos, ácido valproico, inhibidores de calcineurina Otros: factor de permeabilidad Arteriopatía hialina severa |

NPHS2 podocina, DYSF dysferlina, NPHS1 nefrina, ACTN4, α -actinina, CD2AP proteína asociada a CD2, TRPC6 receptor transitorio de canales iónicos tipo 6, WT1 Tumor de Wilms 1, PLCE1 fosfolipasa C ϵ 1, MELAS miopatía mitocondrial/encefalopatía, acidosis láctica y episodios de accidente vascular cerebral like, PAX2 proteína pareada homeobox 2, LMX1B factor de transcripción 1 β LIM homeobox, COQ2 coenzima Q sintetasa 2, COQ6 coenzima Q sintetasa 6, PDSS2 decaprenilina difosfato sintasa, ITGB4 integrina β 4, COL4 colágeno tipo IV, GLA α α -galactosidasa A, LAMB2 cadena laminina β 2, ZMPSTE24 gen de la zinc metaloproteínasa, CNF síndrome nefrótico congénito tipo Finlandés, VIH virus de la inmunodeficiencia humana, CMV citomegalovirus

FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL PODOCITO.



CB: cuerpo celular, MP: procesos mayores con microtúbulos y filamentos intermedios, FP: procesos menores con pedicelos

FIGURA 3. CITOARQUITECTURA DEL PODOCITO

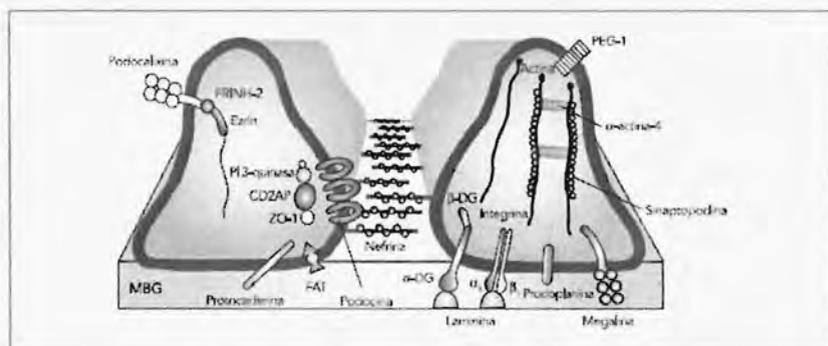


FIGURA 4. PROTEINAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR.

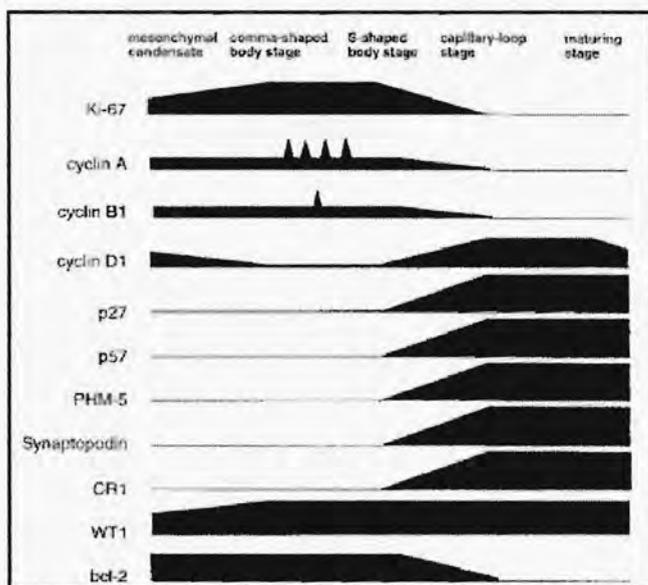
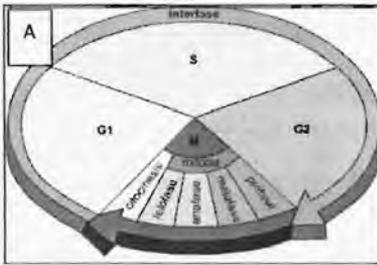
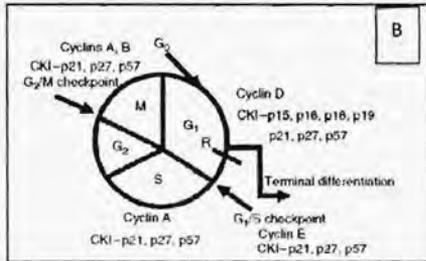


FIGURA 5. FASES DEL CICLO CELULAR



A. Fases del ciclo celular: G1, S, G2 y M (mitosis: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis)



B. Proteínas reguladoras del ciclo celular del podocito en cada una de las fases del ciclo celular

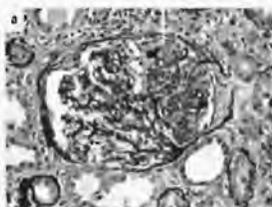
FIGURA 6. PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR Y RESPUESTA A LA AGRESIÓN



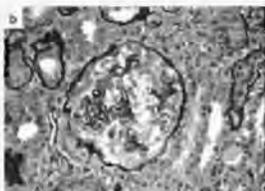
FIGURA 7. DIFERENTES VIAS PARA EL DAÑO PODOCITARIO



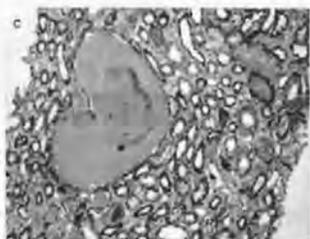
FIGURA 8. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA GC



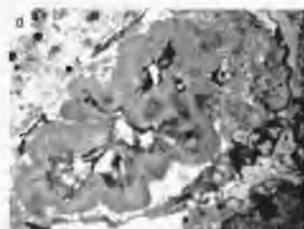
a.- Colapso segmentario con hipertrofia podocitaria temprana e hiperplasia. El resto del glómulo aparece intacto (Tinción de plata magnificación 40x).



b.- Colapso global con obliteración casi completa de la luz del capilar glomerular. Los podocitos son marcadamente hipertrofos e hiperplásicos y existe formación de seudosemilunas que obliteran parcialmente el espacio urinario (Tinción de plata magnificación 40x).



c.- Pueden estar presentes microquistes en el intersticio y contener cristales proteináceos alargados (Tinción de plata, magnificación 20x).



d.- Al análisis ultraestructural, se aprecia la membrana basal glomerular. El lumen capilar glomerular esta obliterado. Los podocitos se encuentran alargados con pérdida de los procesos primarios y los procesos podocitarios (Microscopía electrónica magnificación 10 000x).

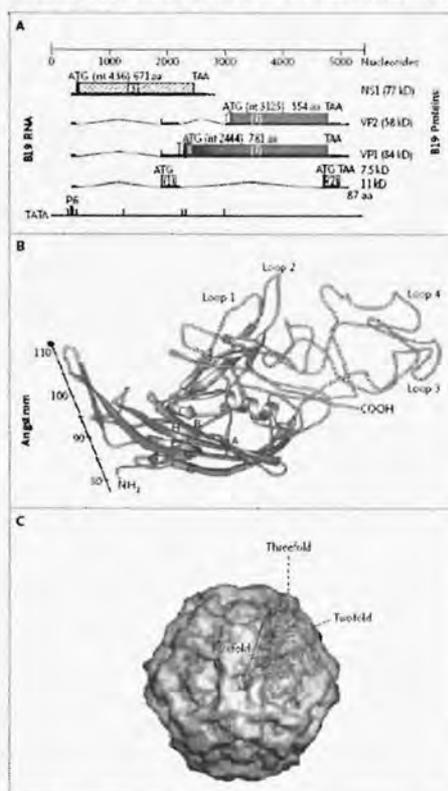
TABLA 2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS MÁS COMUNES DE LA GC

| Manifestaciones clínicas | Frecuencia (%) |
|---------------------------------|----------------|
| Síndrome nefrótico | 100 |
| Edema periférico | 70 |
| Hipertension arterial sistémica | 59 |
| Fiebre | 55 |
| Mialgias/o artralgias | 22 |
| Erupciones cutáneas | 15 |

TABLA 3. HALLAZGOS BIOQUÍMICOS COMUNES EN LA GC

| Hallazgo de laboratorio | Frecuencia (%) |
|---------------------------|----------------|
| Hipercolesterolemia | 100 |
| Proteinuria > 3.5 gr/día | 85 |
| Proteinuria > 10 gr/día | 74 |
| CrS > 2 mg/dl | 55 |
| Anticuerpos antinucleares | 15 |

FIGURA 9. ESTRUCTURA DE PARVOVIRUS B19

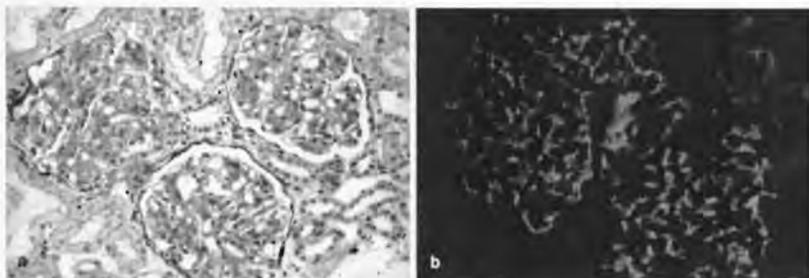


A.- Mapa genómico de PvB19

B.- Proteínas estructurales de la cápside viral de PvB19

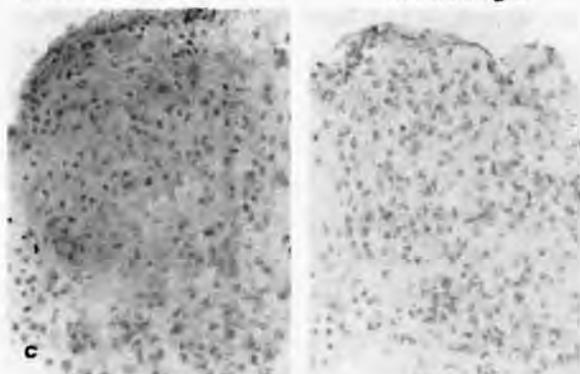
C.- Topografía de PvB19 mediante microscopia electrónica

Figura 10. Infección por parvovirus B19 asociada a síndrome nefrótico por glomerulonefritis proliferativa mesangiocapilar en un niño de 8 años (26).



Anti-Parvovirus B19

Mouse IgG



Hallazgos de la biopsia renal: a.- microscopía de luz (Tinción de PAS) mostrando un glomérulo con proliferación focal mesangial y adelgazamiento de las paredes de los capilares glomerulares. B.- inmunofluorescencia mostrando depósitos prominentes de IgM en el mesangio y en áreas subendoteliales y subepiteliales. C.- localización del antígeno de PvB19 humano con el anticuerpo monoclonal de raton para el antígeno de PvB19

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. Asha Mougdil, Cynthia C. Nast, Arvind Bagga, Lin Wei, Amet Nurmamet, Arthur H. Cohen, Stanley C. Jordan, y Mieko Toyoda. *Kidney International*, Vol. 59. Año 2001, pp. 2126–2133
- 2.- Cell-cycle regulatory proteins in the podocyte in collapsing glomerulopathy in children. T Srivastava, RE Garola y HK Singn. *Kidney International*, Vol. 70. Año 2006, p.p. 529–535
- 3.- Collapsing Glomerulopathy. Mamdouh Albaqumi, Timothy J. Soos, Laura Barisoni, y Peter J. Nelson. *Journal of American Society of Nephrology*, Vol 17. Año 2006, p.p 2854–2863
- 4.- Familial collapsing glomerulopathy: Clinical, pathological and immunogenetic features. M. Carmen Ávila-Casado, Gilberto Vargas-Alarcón, María E. Soto, Guadalupe Hernández, Pedro A. Reyes, y Jaime Herrera-Acosta. *Kidney International*, Vol. 63. Año 2003. pp. 233–239
- 5.- The Dysregulated Podocyte Phenotype: A Novel Concept in the Pathogenesis of Collapsing Idiopathic Focal Segmental Glomerulosclerosis and HIV-Associated Nephropathy. Laura Barisoni, Wilhelm Kriz, Peter Mundel y Vivette D'Agati. *Journal of American Society of Nephrology* No 10. Año 1999, p.p. 51–61.
- 6.- Podocyte cell cycle regulation and proliferation in collapsing glomerulopathies. Laura Barisoni, Michele Mokrzycki, Leonada Sablay, Michio Nagata, Harold Yamase y Peter Mundel. *Kidney International*, Vol. 58. Año 2000, pp. 137–143.
- 7.- Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: Role in podocyte proliferation and maturation. Stuart J. Shankland, Frank Eitner, Kelly L. Hudkins, Tracy Goodpaster, Vivette D'Agatu, y Charles E. Alpers. *Kidney International*, Vol. 58. Año 2000, pp. 674–683.
- 8.- Cell-cycle regulatory proteins in podocyte cell in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. Tarak Srivastava, Robert E. Garola, Joan M. Whiting y Uri S. Alon. *Kidney International*, Vol. 63. Año 2003, pp. 1374–1381.
- 9.- Cell Biology of the Glomerular Podocyte. Hermann Pavensta, Wilhelm Kriz y Matthias Kretzler. *Physiology Reviews*. Vol 83 . Enero 2003, Pag 253-307.

- 10.- Advances in the Biology and Genetics of the Podocytopathies. Implications for Diagnosis and Therapy. Laura Barisoni, H. William Schnaper, Jeffrey B. Kopp. Archives of Pathology Laboratory Medicine. Vol 133, Febrero 2009.
- 11.- Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. Tsukasa Takemura, Katsumi Muicmi, Hirofu Miyazato, Kazuro Yagi y Kazuo Yoshioi. Kidney international, Vol. 48. Año 1995, pp. 1886 —1892.
- 12.- Glomerular expression and elevated serum Bcl-2 and Fas proteins in lupus nephritis: preliminary findings. N. A. Fathi, M. R. Hussein, H. I. Hassan, E. Mosad, H. Galal, Y N. A. Afifi. Clinical and Experimental Immunology, No. 146: 339–343. 2006
- 13.- Downregulation of Bcl-2 by Podocytes Is Associated with Progressive Glomerular Injury and Clinical Indices of Poor Renal Prognosis in Human IgA Nephropathy. Lian-Quin, Raya Sinniah y Stephen I-Hong Hsu. Journal of the American Society of Nephrology. No. 15. Año 2004, p.p 79–90.
- 14.- Cell turnover in normal and abnormal kidney development. Adrian S. Woolf y Simon J. M. Welham. Nephrology Dialysis and Transplantation Año 2000. No. 17. Suplemento 9.
- 15.- Immunohistochemical Study of bcl-2, p53 and Ki-67 Expressions in Collecting Duct Carcinoma of the Kidney. Kazumi Suzuki Akihiko Tokue. Urology International. Año 2002; pp 69:57–62
- 16.- Glomerular expression of cell-cycle-regulatory proteins in human crescentic glomerulonephritis. Kosaku Nitta, Shigeru Horita, Kazuho Honda Keiko Uchida, Teruo Watanabe, Hiroshi Nihei, Michio Nagata. Virchows Archives. Año 1999, p.p 422–427.
- 17.- Parvovirus B19 and the Kidney. Meryl Waldman y Jeffrey B. Kopp. Clinical Journal of American Society of Nephrology. No. 2, S47–S56. Año 2007.
- 18.- Erythrocyte P Antigen: Cellular Receptor for B19 Parvovirus. Kevin E. Brown, Stacie M. Anderson, Neal S. Young. Science. Vol. 262. Octubre 1993.
- 19.- Recombinant Human Parvovirus B19 Vectors: Erythrocyte P Antigen Is Necessary but Not Sufficient for Successful Transduction of Human Hematopoietic Cells. Kirsten A. Weigel-Kelley, Mervin C. Yoder y Arus Srivastava. Journal Of Virology, Mayo 2001, p.p 4110–4116.

- 20.- Productive Infection by B19 Parvovirus of Human Erythroid Bone Marrow Cells In Vitro. Keiya Ozawa, Gary Kurtzman y Neal Young. Blood, Vol 70, No 2 (Agosto). Año 1987, pp 384-391.
- 21.- Parvovirus B19. Neal S. Young, M.D., and Kevin E. Brown. The New England Journal of Medicine. Año 2004, No 350, p.p 586-597
- 22.- Cell Cycle Regulation and Differentiation in the Human Podocyte Lineage. Michio Nagata, Kei-ichi Nakayama, Yoshio Terada, Sachi Hoshi, and Teruo Watanabe. American Journal of Pathology, Volumen 153, No. 5, Noviembre 1998.
- 23.- Collapsing and non-collapsing focal segmental glomerulosclerosis in kidney transplants. Sundararaman Swaminathan, Donna J. Lager, Xiang Qian, Mark D. Stegall, Timothy S. Larson and Matthew D. Griffin. Nephrology Dialysis and Transplantation. Año 2006, Vol 21, p.p 2607–2614.
- 24.- Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. Sián V.Griffin, Arndt T.Petermann, Raghu V. Durvasula y Stuart J.Shankland. Nephrology Dialysis and Transplantation. Año 2003, No 18. Suppl 6, p.p vi8–vi13.
- 25.- Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis. Tanawattanchaoen S, Falk RJ, Jennette JC, Kopp JB. American Journal of Kidney Diseases. Año 2000. No.35, p.p 1166-1174.
- 26.- Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection. Yoshiyuki Ohtomo, Risako Kawamura, Kazunari Kaneko, Yuichiro Yamashiro, Nobutaka Kiyokawa, Tomoko Taguchi, Kenichi Mimori, Junichiro Fujimoto. Pediatrics Nephrology Año 2003. No. 18, p.p.280–282.