



Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Medicina  
División de Estudios de Posgrado  
Servicio de Dermatología, Hospital General  
"Dr. Manuel Gea González"

Expresión de marcadores Inmunohistoquímicos de Apoptosis (Bax, Fas, ligando de Fas) y de inmunofluorescencia (Caspasa 3, Interferón gama y Cistatina) en el Lupus Eritematoso Cutáneo Crónico.

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALIDAD DE DERMATOLOGÍA  
PRESENTA:  
CLAUDIA ILEANA SAENZ CORRAL



Tutor:  
*Dra. Alma Angelica Rodriguez Carreon*  
Dermatóloga e Investigadora titular "C" de la División de Dermatología.  
México, D.F. 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".  
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

1. TITULO.

Expresion de marcadores Inmunohistoquímicos de Apoptosis (Bax, Fas, ligando de Fas) y de inmunofluorescencia (Caspasa 3, Interferón gama y Cistatina) en el Lupus Eritematoso Cutáneo Crónico.

Tipo de investigación:

Básica  Farmacológica  Epidemiológica  Experimental  Otra

2. INVESTIGADORES:

2.1 Investigador Responsable:

Dra. Alma Angélica Rodríguez Carreón.

Dermatóloga e Investigadora titular "C" de la División de Dermatología.

Correo electrónico: [drardzcarreon@gmail.com](mailto:drardzcarreon@gmail.com)

Teléfono: 4000-3000 extensión 3057

Firma \_\_\_\_\_

2.2. Investigador Principal.

Dra. Claudia Ileana Sáenz Corral

Residente de tercer año de Dermatología

Correo electrónico: [saenz\\_claudia@hotmail.com](mailto:saenz_claudia@hotmail.com)

Teléfono: 4000-3000 extensión 3057

Firma \_\_\_\_\_

2.3. Investigador(es) asociado(s):

Dra. María Elisa Vega Memije

Dermatopatóloga y Subdirectora de Investigación Médica

Correo electrónico: [dra\\_elisa\\_vega@yahoo.com.mx](mailto:dra_elisa_vega@yahoo.com.mx)

Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Teléfono: 4000-3000 extensión 3217.

Firma \_\_\_\_\_

Dra. Eduwiges Martínez Luna

Dermatopatóloga adscrita a la División de Dermatología

Correo electrónico: [edwiges\\_ml@hotmail.com](mailto:edwiges_ml@hotmail.com)

Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Teléfono: 4000-3000 extensión 3057.

Firma \_\_\_\_\_

## INDICE

1. Título.....	1
2. investigadores.....	2
3. Sede.....	4
4. Antecedentes.....	4
5. Marco de referencia.....	9
6. Planteamiento del problema.....	9
7. Justificación.....	9
8. Objetivo.....	10
9. Hipótesis.....	10
10. Diseño.....	10
10.1 Número de muestras a estudiar .....	10
11. Materiales y Método.....	10
11.1 Universo de estudio.....	10
11.2 Tamaño de la muestra.....	10
11.3 Criterios de selección.....	10
11.3.1 Criterios de inclusión.....	10
11.3.2 Criterios de exclusión.....	10
11.3.3. Criterios de eliminación.....	10
11.4 Definición de variables de estudio.....	10
11.5 Descripción.....	11
11. 6 Hoja de captura de datos.....	12
11.7 Calendario.....	13
11.8 Recursos.....	13
11. 8.1 Recursos humanos.....	13
11.8.2. Recursos materiales.....	14
11.8.3 Recursos financieros.....	14
12. Validación de datos.....	14
13. Presentación de resultados.....	14
14. Consideraciones éticas.....	20
15. Bibliografía.....	21

### 3. SEDE.

División de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

### 4. ANTECEDENTES.

El lupus eritematoso es una enfermedad multisistémica, que se caracteriza por la producción de auto anticuerpos y complejos inmunes dirigidos contra varios órganos y tejidos , tales como mucosas, serosas, articulaciones, sistema nervioso central, estructuras de la piel, etc.<sup>1</sup> Afecta principalmente a mujeres en edad productiva (20-40 años),<sup>1</sup> que interfiere con aspectos sociales, económicos, laborales, etc. en especial el lupus eritematoso sistémico. Su prevalencia se reporta en la literatura con gran variabilidad; según la Sociedad Española de Reumatología a nivel mundial es de 1/2000, siendo mas frecuente en asiáticos e hispanos. Otras series reportan un caso de cada 2500 y en Estados Unidos de hasta 15-50/100,000 habitantes. En población hispana 94/ 100 000 habitantes. El lupus eritematoso cutáneo tiene una prevalencia de 14.6 a 68 casos por 100 000<sup>21</sup> habitantes y la mayoría de los lupus cutáneos en la consulta dermatológica son lupus eritematoso discoide (LED) y lupus profundo, que tienen mejor pronóstico en general que el lupus eritematoso sistémico (LES), y cuyo impacto en la calidad de vida se limita prácticamente al aspecto físico. Por otro lado, el 5% de los pacientes con LED que evolucionan a LES, suelen ser casos menos agresivos que aquellos que inician de manera abrupta con la enfermedad sistémica.<sup>8,11</sup>

Esta patología se manifiesta en huéspedes con susceptibilidad genética, expuestos a factores determinantes ambientales (radiación UV, infecciones, fármacos, etc.), que favorecen el desarrollo de la enfermedad.<sup>2</sup> Se desconoce exactamente la etiología, aunque el género también juega un papel determinante. El lupus eritematoso es el prototipo de la enfermedad autoinmune, sin embargo, la apoptosis juega un papel importante en su fisiopatogenia, en la que intervienen 3 vías distintas: la producción de autoantígenos, la inmunomodulación defectuosa y el mecanismo efector de daño a órgano blanco.<sup>17,18</sup>

El diagnóstico y la clasificación se basan en la correlación clínico serológica.<sup>3</sup> La afección cutánea se denomina lupus eritematoso cutáneo (LEC), el cual se clasifica en agudo, subagudo y crónico.<sup>4,5</sup>

Dentro del lupus eritematoso cutáneo crónico (LECC) se incluyen al lupus discoide y al lupus profundo.<sup>5,6,7</sup> El lupus discoide es el tipo más frecuente de lupus eritematoso cutáneo y se observa con mayor frecuencia en cara, piel cabelluda, orejas, V del cuello y superficies extensoras de los miembros torácicos. Clínicamente son placas constituídas por eritema, escama y atrofia.<sup>5,6,7</sup> (Fotografía 1). El lupus profundo se denomina así debido a que el infiltrado inflamatorio es más profundo, puesto que afecta tejido celular subcutáneo y dermis profunda, y clínicamente se manifiesta con nódulos subcutáneos.



Fotografía 1. Paciente que muestra lesiones de lupus eritematoso discoide con eritema, escama y atrofia formando placas en región preauricular y pabellón auricular.

Ambas formas de lupus eritematoso cutáneo crónico suelen ser persistentes y de curso benigno, es decir, se limitan a la piel sin afectar a otros órganos y en estos pacientes el problema principal es el aspecto cosmético de las lesiones cutáneas, ya que suelen dejar cicatrices atróficas con cambios de pigmentación y, en el caso del lupus profundo, zonas deprimidas llamadas también foveas. (Fotografía 2) Estas formas de lupus eritematoso se caracterizan por no tener anticuerpos antinucleares y de tenerlos, estos se encuentran a títulos  $\leq 1:160$ . Está reportado que el 5% de los pacientes con LED evolucionan a LES, sobre todo en los primeros 5 años de la enfermedad, sin embargo estos casos suelen ser menos agresivos que aquellos que inician de manera abrupta con la afección multisistémica de LES.<sup>8,9,10,11.</sup>

A todo paciente con LEC se le debe solicitar una biometría hemática, determinación de proteinuria de 24 horas, anticuerpos antinucleares y anti-DNA de doble cadena basales, con vigilancia más estrecha en aquellos pacientes que, a

pesar de no manifestar síntomas en otros aparatos y sistemas, presenten linfopenia o tengan anticuerpos antinucleares a títulos por arriba de 1:160 o bien anti-DNA de doble cadena positivos, así como aquellos pacientes con LED disseminado, ya que seguramente corresponderán al grupo de pacientes que evolucionan a LES.<sup>5, 8, 9, 11, 12.</sup>



Fotografía 2. Presencia de foveas en región frontal de una paciente con lupus profundo.

Si un paciente con lupus eritematoso cutáneo es evaluado por médicos no entrenados en la distinción de las manifestaciones cutáneas de la enfermedad respecto a otros diagnósticos diferenciales, puede ser catalogado como LES, puesto que cuatro de estos once criterios son dermatológicos y desafortunadamente no se considera la confirmación histológica.<sup>5</sup>

El diagnóstico de lupus eritematoso sistémico se basa en la correlación clínico serológica y se recurre a la histopatología en aquellos casos en los que el diagnóstico no está claro; en tanto que en las formas de lupus cutáneo crónico es de suma importancia tanto la clínica como la histopatología. Se sabe que la apoptosis es parte importante de la fisiopatología, por lo que sería interesante determinar si existen diferencias en la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en las diversas presentaciones del lupus cutáneo. No obstante la notable diferencia en el comportamiento clínico del lupus eritematoso limitado a piel y el LES, es evidente que estas dos variantes del lupus eritematoso siguen mecanismos apoptóticos similares, sin embargo, la efectividad con la que se elimina el material apoptótico es distinta y por ello es posible que las concentraciones de proteínas proapoptóticas se expresen con mayor intensidad en el lupus cutáneo.<sup>1</sup>

El daño cutáneo local por factores físicos, químicos y biológicos, ya sean ambientales, infecciosos u hormonales, así como el estrés, inducen la apoptosis, durante la cual los antígenos y las moléculas intracelulares emigran en vesículas hasta la superficie celular (figura 1).<sup>1</sup>

Una enfermedad autoinmune se desarrolla cuando los individuos genéticamente predispuestos interactúan con agentes ambientales que desencadenan la enfermedad y, una vez desencadenada la respuesta inmune, ésta se propaga

hasta que entran en juego factores reguladores que limitan o favorecen el proceso. En resumen, las enfermedades autoinmunes tienen predisposición, una fase de inducción, una fase de propagación y una fase de regulación.<sup>8, 10, 11</sup>

## APOPTOSIS

En los pacientes con lupus, la remoción de los detritus derivados de la apoptosis es anormal. Estudios *in vitro* han demostrado que los fagocitos de los pacientes con lupus procesan menos material de apoptosis, por lo que suelen presentar antígenos propios a las células T.<sup>1</sup>

La apoptosis es el fenómeno controlado que ocurre de forma natural en células sanas de organismos multicelulares, mediante el cual se produce una muerte celular programada, que se caracteriza por encogimiento celular, condensación y vesiculación nucleares.<sup>20</sup> Esto es fundamental para diferenciarlo del proceso de necrosis en el cual la muerte celular se acompaña de inflamación y el proceso es desorganizado.<sup>34</sup> El mecanismo de apoptosis es de suma importancia en varios procesos, entre ellos las enfermedades autoinmunes, el cáncer y trastornos degenerativos. Existen 2 vías, la extrínseca por receptores (caspasas iniciadoras y efectoras) y la intrínseca. Este proceso se considera un factor disparador de la autoinmunidad, ya que se debe tener la susceptibilidad genética. Una vez que la célula presentadora de antígenos introduce el péptido extraño por endocitosis o fagocitosis, éste se localiza en un compartimiento de membrana que luego se fusiona con lisosomas, formando así endosomas o fagosomas. Como los endosomas son ricos en enzimas proteolíticas, el péptido es degradado a péptidos más pequeños y a aminoácidos.<sup>15,16</sup>

Una familia de proteínas llamadas caspasas son típicamente activadas en los estadios iniciales de la apoptosis. Activan componentes celulares claves para requeridos para el funcionamiento normal de las células, incluyendo proteínas estructurales en el citoesqueleto y proteínas nucleares como enzimas reparadoras del ADN.<sup>34</sup> El estímulo para la apoptosis en algunos casos se realiza mediante señales externas que provocan la unión de ligandos a sus respectivos receptores en la superficie celular (llamados receptores de muerte celular). Estos ligandos pueden ser factores solubles o pueden estar expresados en la superficie, como es el caso de los linfocitos T citotóxicos. Esto puede ser iniciado por factores como virus, en otros casos se puede iniciar la apoptosis mediante señalizaciones internas consecuencia del estrés celular, por ejemplo posterior a exposición a radiación o químicos o infecciones virales. También puede ser secundario a privación del factor de crecimiento o estrés oxidativo causado por radicales libres. Este tipo de apoptosis desencadenado por la vía intrínseca involucra a la mitocondria.<sup>34</sup>

La inmunohistoquímica corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los antígenos correspondientes. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.<sup>24</sup> La determinación de la activación de



las moléculas que disparan el proceso de apoptosis ha adquirido gran importancia en la detección de apoptosis.

Existen varios marcadores que nos ayudan a evaluar la etapa del lupus cutáneo en que se encuentra la apoptosis.<sup>19</sup> Dentro de estos marcadores se encuentran las caspasas (tanto iniciadoras como efectoras), el complejo Fas-Fas Ligando y la subfamilia del Bax. También se han determinado dichos marcadores en el lupus sistémico, con el receptor que reconoce a la fosfatidilcolina en las fases tempranas de la enfermedad y la proteína C reactiva que participa en la opsonización de las células apoptóticas tardías. Y se ha demostrado que tanto en el LED y en el lupus sistémico, hay un infiltrado inflamatorio predominantemente CD8.

Las caspasas, son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células (procaspasas).<sup>25</sup> En la vía intrínseca de la apoptosis la disrupción mitocondrial lleva a liberación de múltiples moléculas de señalización, disparando la muerte celular tanto dependiente como independiente de caspasas. La liberación del citocromo C induce la formación del apoptosoma, resultando en la activación de la caspasa 9 y posteriormente de otras múltiples caspasas.<sup>31</sup> Estas proteínas intracelulares pueden ser tanto iniciadoras (2, 8, 9, 10) como efectoras (3,6,7); existen también inhibidores de caspasas (IAPs, p35, CrmA, cFlip), miembros de la familia de Bcl-2, anti-apoptosis (subfamilia Bcl-2), pro-apoptosis (subfamilia Bax, subfamilia solo BH3) y DNAsas (I, II, CAD, etc).<sup>20</sup> Durante la apoptosis se producen altas cantidades de especies de oxígeno reactivo, lo que aumenta la inmunogenicidad de las células apoptóticas.<sup>14</sup>

La caspasa 3 activada, también llamada M30, es una caspasa efectora (proapoptótica) que inicia la degradación de la célula en los estadios finales de la apoptosis.<sup>30</sup> Las caspasas efectoras (ejemplo caspasa 3 y 6) son responsables de la activación de múltiples proteínas claves en el proceso de apoptosis tales como proteínas del citoesqueleto.

El Bax es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, que juega un papel muy importante en la regulación de señalización intrínseca.<sup>30</sup> Es una proteína clave para este proceso, que reside en el citoplasma de las células de una forma inactiva. Se activa en estadios tempranos de la apoptosis y se asocia a la mitocondria mediante mecanismos no bien conocidos. Una familia de lípidos bioactivos (prostaglandinas o PG) regula la apoptosis dependiente de Bax, específicamente la PGE2 que se une a Bax e induce cambios conformacionales desencadenando la muerte celular programada. Crítica para esta activación es la cisteína 126 (Cys126) que está presente en el asa localizada en las dos hélices transmembrana del Bax. La PGD2 inhibe a la PGE2 mediante su unión a Bax y a la apoptosis inducida mediante PGE2, al igual que la muerte celular programada inducida por staurosporina y radiación UV-B en varias líneas celulares. Esto es consistente con el hecho de que la apoptosis inducida mediante estos tratamientos se acompaña de un aumento en la PGE2.<sup>33</sup>

El ligando de Fas (CD95) es un inductor de apoptosis miembro de la familia de citocinas del Factor de Necrosis Tumoral. Este ligando y su receptor juegan un papel crítico en la respuesta inmunológica crónica y desarrollo de la

autoinmunidad. Se sabe que mutaciones en sus genes son causa de linfadenopatía severa y autoinmunidad tanto en humanos como en ratones. La función del ligando de Fas es regulada por su acción en la membrana celular y desprendimiento mediante metaloproteasas.<sup>32</sup> La unión del ligando de Fas promueve el reclutamiento de receptores, la formación de DISC y la activación de la vía de las caspasas. Sin embargo, la señalización mediante el ligando de Fas es mucho mas simple que la que se realiza mediante el Factor de Necrosis Tumoral. El receptor de Fas solo activa apoptosis y no tiene otras funciones en la señalización como lo hace el FNT.<sup>34</sup>

Existen otras técnicas y marcadores que se encuentran alterados en procesos autoinmunes, tales como la inmunofluorescencia, que pueden presentar ciertos patrones de acuerdo al nivel cutáneo de afección.

## 5. MARCO DE REFERENCIA.

Se ha demostrado que el mecanismo de apoptosis se encuentra alterado en los pacientes con lupus eritematoso sistémico,<sup>26</sup> sin embargo, según nuestro conocimiento, existen escasos reportes que evalúan la apoptosis en las formas limitadas a piel. No hay marco teórico fundamentado en artículos en los cuales se reporten estudios de inmunohistoquímica con los anticuerpos propuestos en este trabajo, ya que un estudio publicado en el 2001 por Baima y Sticherling<sup>19</sup> menciona la expresión de proteínas apoptóticas predominantemente bcl-2, como un marcador a la baja y un aumento de Fas y ligando de Fas, sin embargo, en el presente trabajo evaluaremos así mismo la expresión de caspasa 3 como otro marcador importante implicado en la fisiopatología de la muerte celular programada.

Otros estudios han revisado el rol de las histonas y de las caspasas en la patología de la apoptosis en el Lupus eritematoso, pero predominantemente en la forma sistémica.<sup>27,28</sup> Un estudio realizado por Kuhn y Bijl concluye que dentro de la patología del lupus eritematoso cutáneo se ven implicados a la baja las células reguladoras y se ven elevadas citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral, así como una proteína inducible por interferon.<sup>29</sup>

## 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Con qué intensidad se expresan tres marcadores inmunohistoquímicos de apoptosis (Bax, Fas y ligando de Fas) y tres de inmunofluorescencia (Caspasa 3, interferón gama y cistatina) en los diferentes tipos de lupus eritematoso cutáneo crónico diagnosticados en la división de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González?

## 7. JUSTIFICACIÓN.

En este estudio se pretende comparar la expresión de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas en los distintos tipos de lupus eritematoso cutáneo crónico debido a las notables diferencias de comportamiento clínico.

Debido a que no existen muchos estudios que evalúen estas características, deseamos identificar la intensidad en la expresión de algunos marcadores

inmunohistoquímicos proapoptóticos y de uno antiapoptotico (cistatina) en el lupus eritematoso, que es importante como herramienta diagnóstica complementaria para diferenciar aquellos casos en los que la clínica, microscopía de luz y serología no sean suficientes. Además, si conocemos cuales marcadores están presentes y cuales se expresan con mayor intensidad en estas formas de lupus eritematoso, podemos enfocarnos en buscar otras líneas terapéuticas que tengan a dichos pasos como su objetivo.

#### 8. OBJETIVO.

Describir la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax, Caspasa 3, Interferon gama Fas y ligando de Fas) y antiapoptotica (cistatina) en los diferentes tipos de lupus eritematoso cutáneo crónico diagnosticados en la división de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

#### 9. HIPÓTESIS.

No aplica por el tipo de diseño del estudio.

#### 10. DISEÑO.

Estudio transversal, observacional y descriptivo.

##### 10. 1. Número de muestras a estudiar

Todos los bloques de parafina con muestra suficiente de piel con el diagnóstico de lupus eritematoso cutáneo crónico.

#### 11. MATERIALES Y MÉTODO.

##### 11.1. Universo de estudio.

Bloques de parafina del archivo de Dermatopatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

##### 11.2. Tamaño de la muestra.

Se incluirán todos los bloques de parafina, archivados entre 1980 y el 2010, que contengan muestras suficientes de piel con el diagnóstico de lupus eritematoso cutáneo crónico.

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio: Secuencial

##### 11.3. Criterios de selección:

11.3.1. Criterios de Inclusión: Bloques de parafina con una cantidad suficiente de piel correspondiente a lupus eritematoso cutáneo crónico.

11.3.2. Criterios de exclusión: Bloques de parafina con muestra de piel de pacientes con lupus eritematoso cutáneo crónico y que además tuvieran algún tipo de cáncer cutáneo.

11.3.3 Criterios de eliminación. No aplica por tratarse de un estudio transversal.

##### 11.4. Definición de variables de estudio:

-Tipo de lupus eritematoso cutáneo crónico (independientes)

-Intensidad de la expresión de las proteínas proapoptóticas (dependientes)

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO VARIABLE	DEVALORES
Tipo de lupus eritematoso cutáneo crónico	Variedad de lupus eritematoso cutáneo crónico según morfología clínica de la lesión y los hallazgos histológicos	<b>Lupus discoide</b> Presencia clínica de eritema, atrofia, escama, telangiectasias y al estudio histológico, atrofia epidérmica, tapones córneos, vacuolización de la capa basal, engrosamiento de la membrana basal e infiltrado inflamatorio perianexial por linfocitos.  <b>Lupus profundo:</b> Presencia clínica de nódulos subcutáneos o foveas e histológicamente paniculitis lobulillar predominantemente por linfocitos.	Cualitativa dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lupus eritematoso discoide = 0</li> <li>Lupus profundo = 1</li> </ul>
BAX Caspasa 3 Fas Ligando de Fas	Cada una de las proteínas proapoptóticas evaluadas por inmunohistoquímica	BAX: parte de una familia proapoptótica Caspasa 3: proteasas efectoras de apoptosis. Fas: proteína transmembrana que participa en la muerte celular. Ligando de Fas (receptor de Fas)	Ordinal	Ausente=0 Leve=1 (+) Moderado=2 (++) Intenso=3 (+++)

### 11.5. Descripción de procedimientos.

1. Búsqueda de los casos de lupus eritematoso cutáneo crónico en el archivo de Dermatopatología.
2. Búsqueda y selección de los bloques de parafina disponibles y con material suficiente para ser incluidos en el estudio.
3. Búsqueda de las laminillas correspondientes a los bloques seleccionados, las cuales contienen los cortes de piel teñidos con hematoxilina y eosina.
4. Creación de la base de datos, con el número de biopsia, el nombre del paciente, número de registro, el género y el tipo de lupus eritematoso cutáneo crónico por correlación clínico-patológica.
5. Realización de la técnica de inmunohistoquímica:

- a. Mantener en estufa bacteriológica a 62° C por una hora. Desparafinar mediante tres baños de Xileno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno por 8 minutos. Eliminación de actividad de peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 25 minutos. Enjuague por 60 minutos en albúmina sérica bovina al 1% como bloqueador universal no inmunológica de anticuerpos.
- b. Incubar con el anticuerpo monoclonal primario correspondiente durante 30 minutos a las siguientes diluciones: Bax 1/20, Caspasa 3 1/20, Fas 1/20, Ligando de Fas 1/20. Después de tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS, incubar con el anticuerpo secundario: Ig antirabbit biotinada durante 20 minutos y después con el anticuerpo terciario: estreptoavidina conjugada con peroxidasa durante 20 minutos más. Finalmente se realizará revelación con diaminobencidina (DAB), se contrasta con hematoxilina y se procede a montar cada muestra para su evaluación morfológica.



6. Obtención de resultados: Lectura de laminillas con HyE y descripción de características morfológicas y evaluación de presencia de marcadores de inmunohistoquímica.

7. Análisis estadístico (ver sección de validación de datos).

8. Reporte final.

11.6. Hoja de captura de datos.

No. Biopsia	Paciente	Registro	Tipo de LECc	Género	Expresión de BAX	Expresión de Caspasa 3	Expresión de Fas	Expresión de Fas-L
-------------	----------	----------	--------------	--------	------------------	------------------------	------------------	--------------------

--	--	--	--	--	--	--	--	--

### 11.7. Calendario.

- 1.- Revisión bibliográfica: Junio-Agosto de 2010 (3 meses).
- 2.- Elaboración del protocolo: Agosto-Octubre 2010 (3 meses).
- 3.- Obtención de la información: 6 meses.
- 4.- Procesamiento y análisis de los datos: Mayo-Julio 2011 (2 meses).
- 5.- Elaboración del informe técnico final: Julio-Agosto 2011 (2 meses).
- 6.- Divulgación de los resultados: Agosto 2011 (1 mes).

Fecha de inicio: junio 2010

Fecha de término: Agosto 2011

### 11.8. Recursos.

#### 11.8.1 Recursos Humanos

Investigador: Dra. Claudia Ileana Sáenz Corral.

Actividad: Revisión bibliográfica, elaboración del protocolo, creación de la base de datos, búsqueda de bloques, realización supervisada de técnica de inmunohistoquímica, análisis de resultados y reporte final.

Número de horas por semana: 15 horas

Tiempo: 1 año

Investigador: Dra. Alma Angélica Rodríguez Carreón.

Actividad: Elaboración de base de datos, diseño del estudio, revisión bibliográfica, elaboración del protocolo, análisis de resultados y reporte final.

Número de horas por semana: 5

Tiempo: 1 año

Investigador: Dra. Eduwiges Martínez Luna

Actividad: Revisión de laminillas teñidas en H y E, así como por inmunohistoquímica, análisis de resultados y reporte final.

Número de horas por semana: 3 horas

Tiempo: 3 semanas

Investigador: Dra. María Elisa Vega Memije.  
 Actividad: Análisis de resultados y reporte final.  
 Número de horas por semana: 2  
 Tiempo: 2 semanas

Investigador: Dra. Esperanza Avalos.  
 Actividad: Auxiliar en la realización de las técnicas de inmunohistoquímica, revisión de laminillas.  
 Número de horas por semana: 3  
 Tiempo: 2 semanas

### 11.8.2. Recursos materiales.

Los recursos que se requiere adquirir son:

Se solicitara apoyo para la realización de estudios de inmunohistoquímica.

A laboratorio de Inmunología y Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

### 11.8.3. Recursos financieros.

Cargo	Sueldo * Neto mensual	Sueldo por hora /160	Multiplique por núm hrs a la semana (1)	Multiplique por núm de semanas (2)
Dra. Maria Elisa Vega Memije Subdirectora Recursos Humanos	39650	247	494	988
Especialista	28509	178	890	46,280
Especialista	28509	178	534	1,602
Residente III	14078	87	1,305	67,860
				Total Recursos humanos \$ 116,730

\*Sueldo a octubre 2009

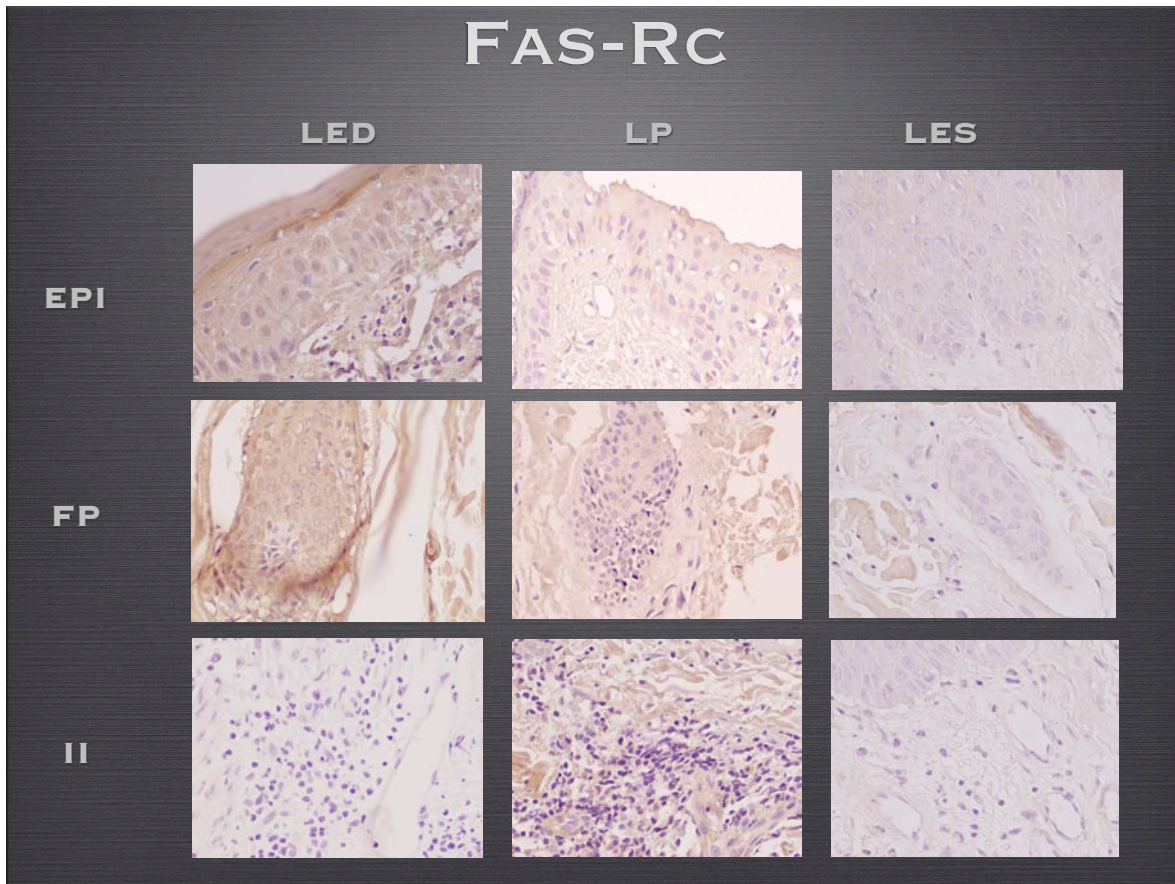
La Universidad Autónoma de Zacatecas nos apoyará con la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

## 12. VALIDACIÓN DE DATOS.

Por tratarse de un estudio descriptivo, sólo se resumirán las variables de estudio en frecuencias absolutas y proporciones.

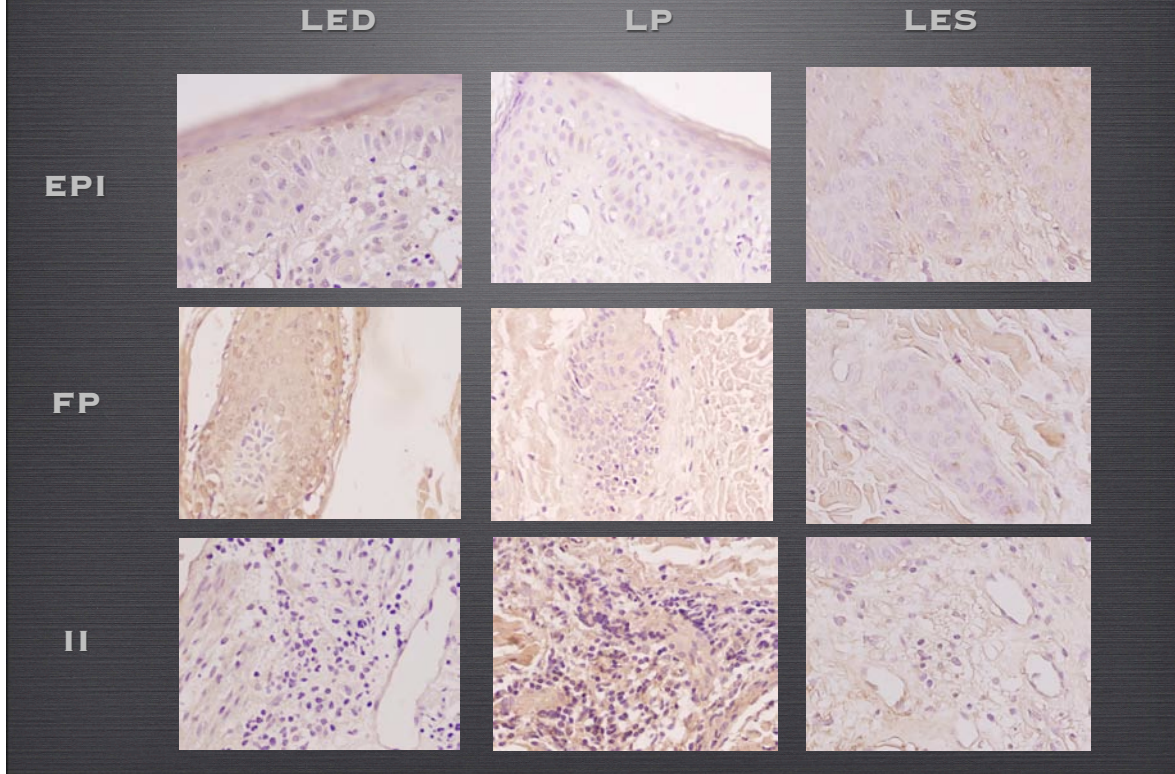
## 13. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Hasta el momento tenemos resultados preliminares con inmunohistoquímica (Bax, Ligando de Fas y Receptor de Fas) e inmunofluorescencia (Caspasa 3, Interferon gama y Cistatina), contando con 10 casos de lupus eritematoso discoide y 10 casos de lupus profundo.

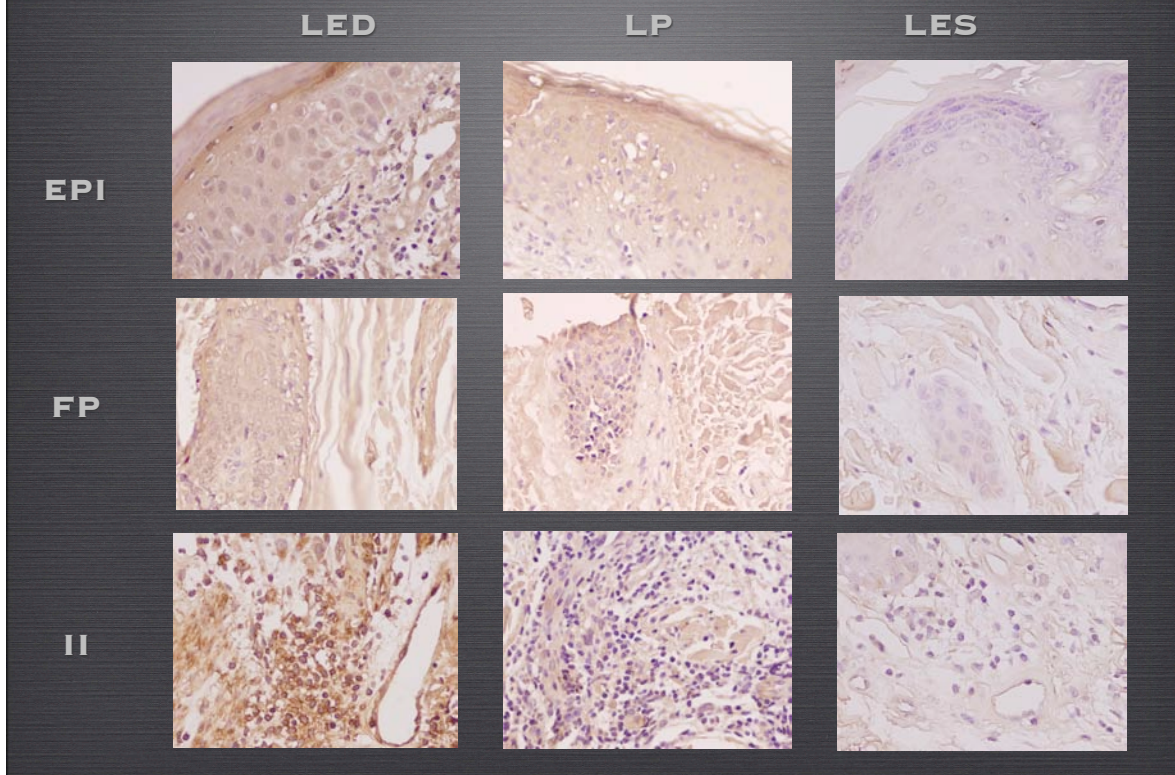




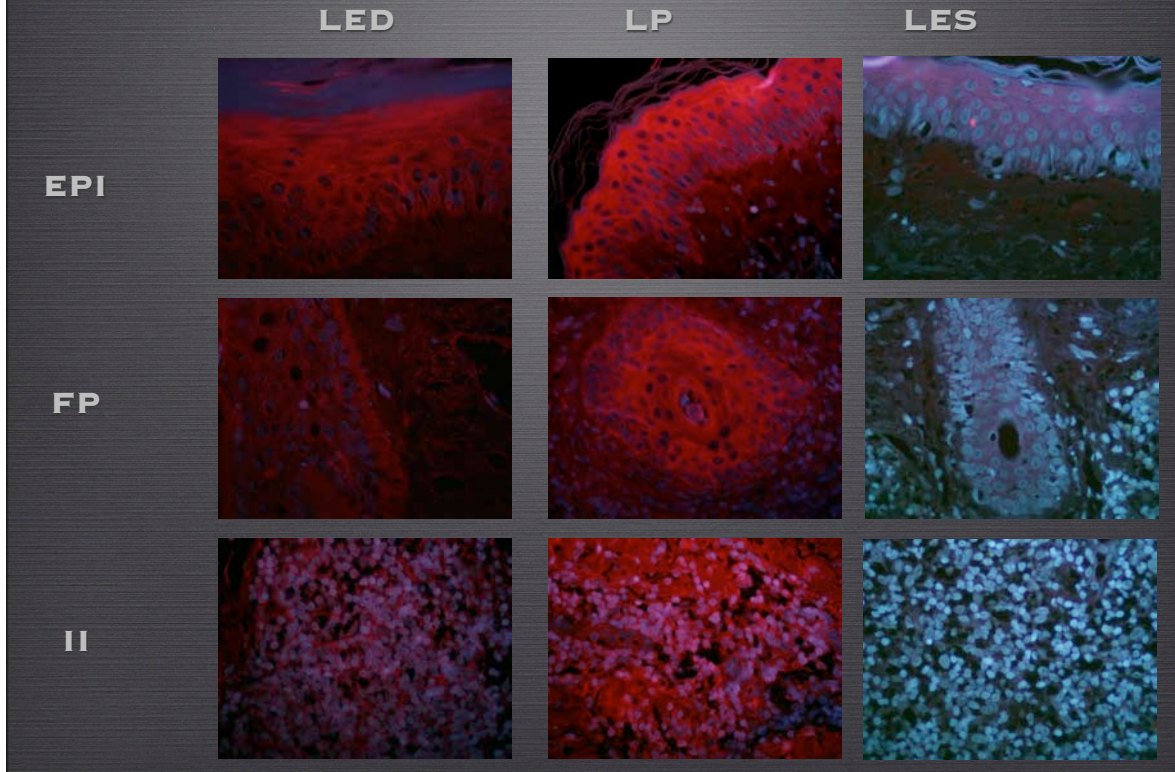
# FAS-L



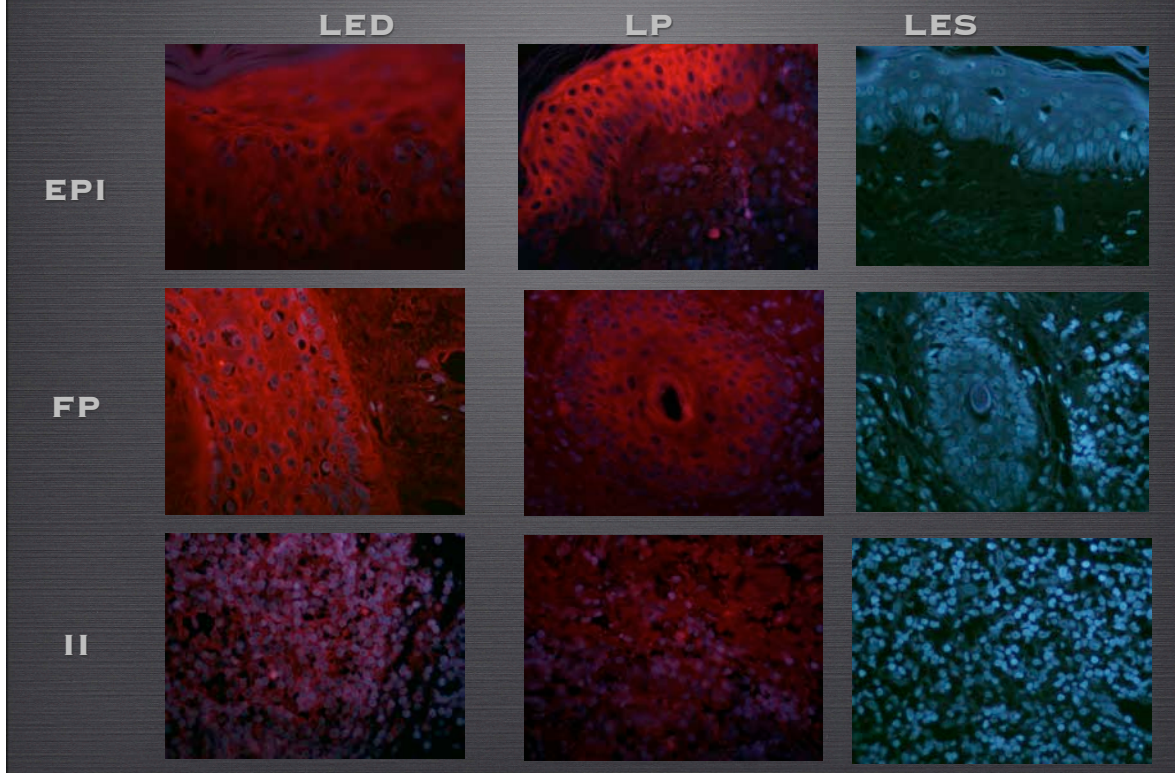
# BAX



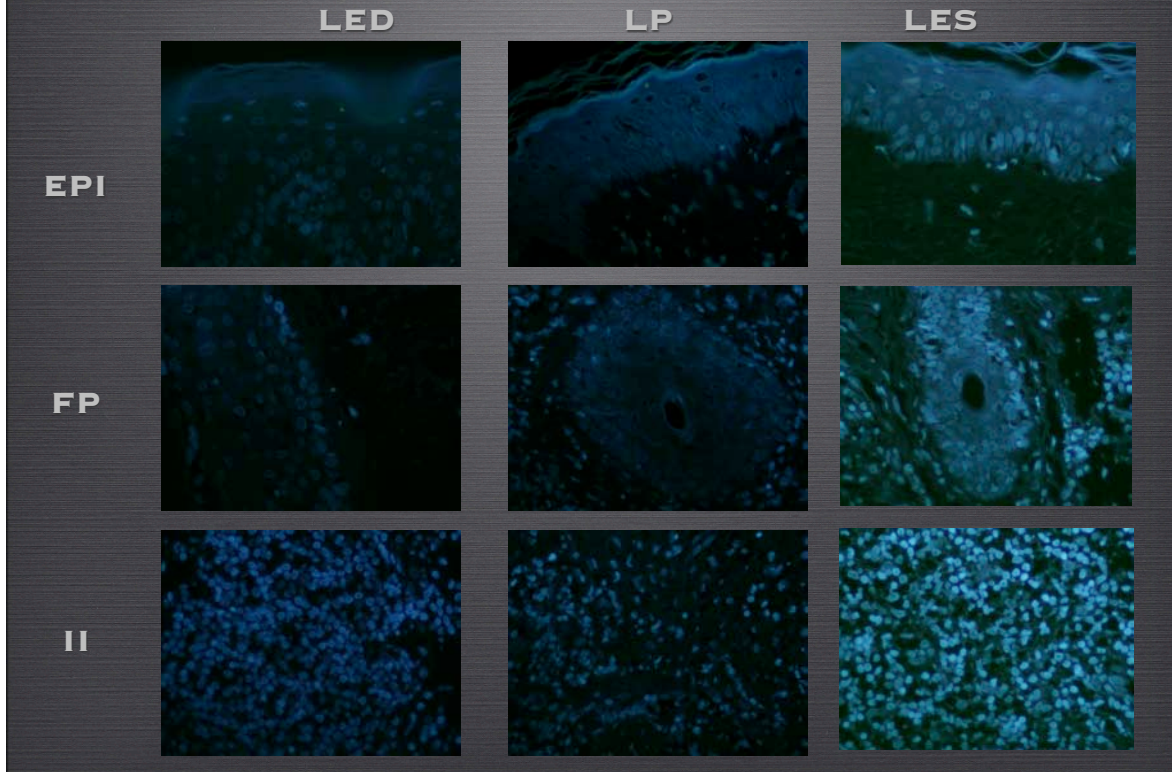
# CASPASA 3



# IFN-GAMMA

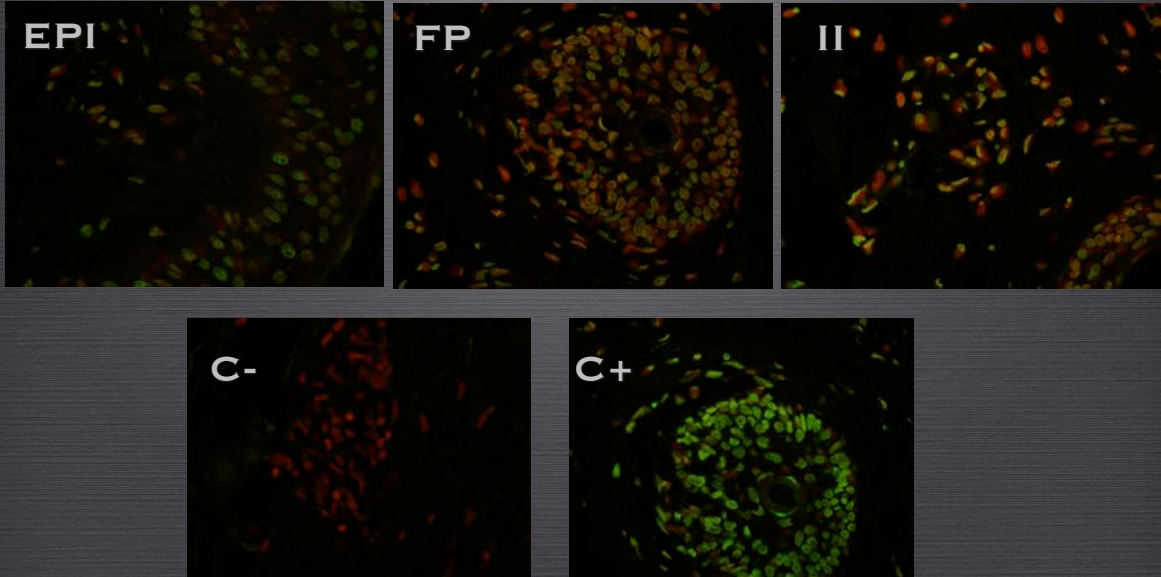


# CISTATINA

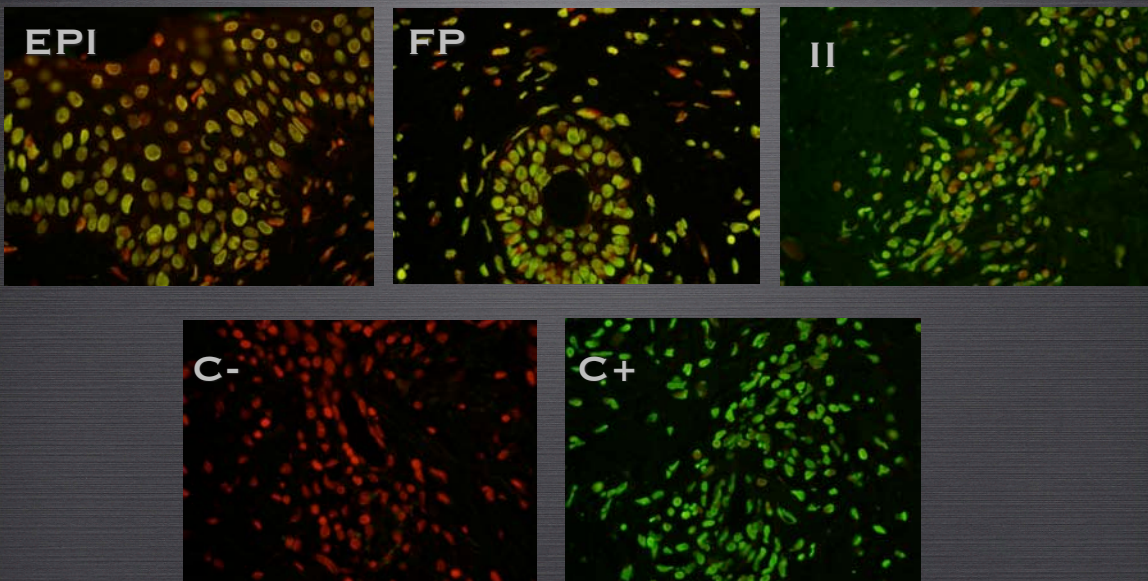


Tambien se realizo la técnica de TUNEL para corroborar la presencia de apoptosis.

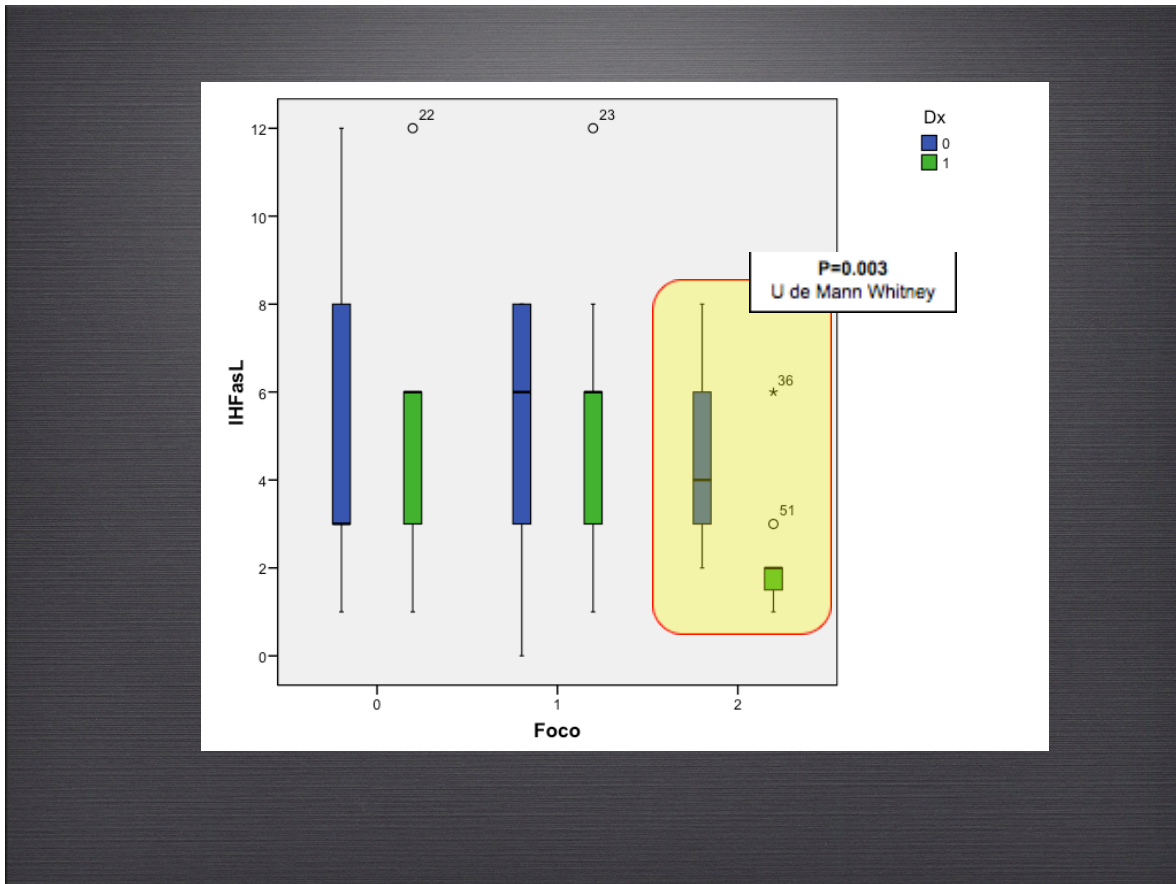
TUNEL  
(TERMINAL TRANSFERASE DUTP NICK  
END LABELING) LED



TUNEL LP



Hasta el momento solo la inmunohistoquímica del Ligando de Fas se encontró con diferencia estadísticamente significativa en el foco del infiltrado inflamatorio y se presenta la grafica a continuación.



Aun esta pendiente completar 30 pacientes en cada grupo y realizar la comparación a través de la prueba de Kruskal Wallis.

Esperamos probar nuestra hipótesis acerca de las diferencias que existen en la expresión de marcadores proapoptóticos y antiapoptóticos en el lupus eritematoso cutáneo crónico.

#### 14. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

"Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

16.Rahman A. Systemic Lupus Erythematosus. N Engl J Med 2008; 358 (9): 929-39.

17.Hahn, B.H. An Overview of Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace D, Hanh B. Dubois' Lupus Erythematosus. USA: Lippincott Williams and Wilkins; 1997. Chapter 5.

18.Crowson AN. Superficial and deep perivascular dermatitis. In: Barnhill RL and Crowson AN. Textbook of Dermatopathology. 2<sup>nd</sup> edition. USA: McGraw-Hill; 2004. p. 89-92.

19.Gilliam JN. The cutaneous signs of lupus erythematosus. Cont Educ Fam Physician 1977; 6: 34-70.

20.Sontheimer RD. Lupus-Specific Skin Disease (Cutaneous LE). In: Wallace D, Hannahs B. Dubois' Lupus Erythematosus. 7<sup>th</sup> edition. USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 576-613.

21.Obermoser G. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. Lupus 2010; 19(9):1050-70.

22.Arenas R. Dermatología atlas, diagnóstico y tratamiento. 4<sup>a</sup> edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2009.

23.Tebbe B. Clinical course and prognosis of cutaneous lupus erythematosus. Clin Dermatol. 2004; 22 (2): 121-4.

24.Albrecht J. Clinical outcome measures for cutaneous lupus erythematosus. Lupus 2010; 19 (9): 1137-43.

25. Le Bozec P. Chronic lupus erythematosus in lupus disease. Retrospective study of 136 patients. Presse Med 1994; 23 (35): 1598-602.

26. Tebbe B. Markers in cutaneous lupus erythematosus indicating systemic involvement. A multicenter study on 296 patients. Acta Derm Venereol 1997; 77 (4): 305-8.

27. Rosen A. Mechanisms of autoimmunity. In: Rose N. The autoimmune diseases. 4<sup>th</sup> edition. USA: Elsevier; 2006. p. 739-47.

28. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (9): 1725.

29. Ramirez F. Patogénesis del lupus eritematoso sistémico. *Revista Colombiana de Reumatología*. VIII Congreso Colombiano de Reumatología Cartagena 2001. [www.encolombia.com/medicina/reumatologia/reuma82-01](http://www.encolombia.com/medicina/reumatologia/reuma82-01).

30. Klein J, Sato A. The HLA system. *N Engl J Med* 2000; 343 (10):702-9.

31. Nairn R. *Immunology for medical students*. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2007.

32. Carmen Luz Navarrete S., Carolina Ibáñez G. Rol de la apoptosis en la fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista Chilena de Reumatología* 2008; 24(1):30-38.

33. Greidinger L. Erick. Apoptosis in Lupus Pathogenesis. *Frontiers in Bioscience* 6, November 1, 2001.

34. Baima B., Stircherling M. Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *BJM Br J Dermatol*. 2001 May;144(5):958-66.

35. Elkon, B.K. (1997) Apoptosis. In Duboi's *Lupus Erythematosus*, 5th Ed. (Wallace, D.J. and Hahn, B.H. Eds.), Williams & Wilkins, USA., pp.133-142.

36. Callen JP. Update on the management of cutaneous lupus erythematosus. *British Journal of Dermatology* 2004; 151: 731–736.

37. Shankarkumar U. HLA-DRB1\*03 and DQB1\*0302 associations in a subset of patients severely affected with systemic lupus erythematosus from western India. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 92-3.

38. Martín-Villa JM. Differential contribution of HLA-DR, DQ and TAP2 alleles to systemic lupus erythematosus susceptibility in Spanish patients: role of TAP2\*01 alleles in Ro autoantibody production. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 214-9.

39. *Manual de Patología General*. Universidad Católica de Chile.

40. Ernesto Alfaro Moreno, Claudia García Cuéllar, Alfonso Dueñas González. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Artículo de revisión. Vol. 46, Núm. 4 Octubre-Diciembre 2000. pp 275-280.

41. Chung JH, Kwon OS, Eun HC, Youn JI, Song YW, Kim JG, Cho KH. Apoptosis in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Am J Dermatopathol*. 1998 Jun;20(3):233-41.

42. van Bavel CC, Dieker JW, Kroeze Y, Tamboer WP, Voll R, Muller S, Berden JH, van der Vlag J. Apoptosis-induced histone H3 methylation is targeted by autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2010 Aug 10.

43. Midgley A, Mayer K, Edwards SW, Beresford MW. Differential expression of factors involved in the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010 Nov 15.

44. Kuhn A, Bijl M. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17(5):389-93.

45. Zarnescu, O. Immunohistochemical localization of caspase-3, caspase-9 and Bax in U87 glioblastoma xenografts. *J Mol Histol* - 01-DEC-2008; 39(6): 561-9.

46. Alan D. Guerrero, Min Chen and Jin Wang. Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis*. Volume 13, Number 1, 177-186.

47. O' Reilly LA. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* 1-OCT-2009; 461(7264): 659-63.

48. Lalier, L. Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. *Cell Death Differ* - 01-MAR-2011; 18(3): 528-37.

49. Phil Dash. Apoptosis. Basic Medical Sciences, St. George's, University of London. [www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash](http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash).