

**“DEMOSTRACIÓN DE LA PRESENCIA DE FACTORES CIRCULANTES EN
PACIENTES CON GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE. CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS DE UNA SERIE DE PACIENTES MEXICANOS”.**

TESIS

Que para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS
Presenta: María del Carmen Avila Casado

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Ramón Paniagua Sierra

COMITÉ TUTORAL

Dra. Teresa Fortoul Van der Goes
Dr. Edmundo Chávez Cossío

Enero de 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ÍNDICE

Introducción -----	2
Planteamiento del Problema -----	12
Hipótesis -----	13
Objetivos -----	14
Capítulo I.	
Demostración de la presencia de factores circulantes en pacientes con GC.	
Estudio experimental en ratas Sprague-Dawley	
Resumen del estudio experimental-----	15
Material y Métodos.	
Selección de pacientes-----	16
Estudio de las biopsias renales de pacientes con GC-----	17
Análisis del suero-----	19
Fraccionamiento de sueros. Cromatografía de exclusión--	20
Electroforesis en gel de poliacrilamida-----	21
Bioensayo-----	22
Protocolo de administración de los sueros-----	24
Protocolo de medición de proteinuria-----	24
Estudios morfológicos -----	25
Estudios de inmunohistoquímica-----	26
Análisis estadístico-----	27
Resultados.	
Pacientes-----	28
Resultados del fraccionamiento por cromatografía-----	28
Efectos sobre la excreción de proteínas-----	28
Hallazgos histopatológicos en grupos experimentales---	30
Discusión.	
Discusión general -----	31
Conclusiones-----	34
Tablas.	
1A Características de pacientes con GC -----	35
1B Biopsias de pacientes con GC -----	36
2A Características de pacientes con EFyS -----	37
2B Biopsias de pacientes con EFyS -----	38
3 Creatinina sérica, urinaria y depuración -----	39
4 Hallazgos histopatológicos en los 11 grupos-----	40
Figuras.	
1 Resultados fraccionamiento de los sueros-----	41
2 Gráficas de proteinuria en los 11 grupos-----	42
3 Imágenes histológicas de los 11 grupos-----	43
4 Imágenes ultraestructurales de ratas con GC-----	44
Explicación de las figuras-----	45
Bibliografía-----	46

Capítulo II.

Estudio histopatológico de las biopsias de los pacientes con diagnóstico de glomerulopatía colapsante y datos cénicos de una serie de pacientes mexicanos. Estudio inmunogenético de una familia con glomerulopatía colapsante.

Introducción -----	15
Selección de los casos-----	53
Resultados	
Estudio histopatológico-----	54
Conclusiones-----	56
Glomerulopatía colapsante familiar.	
Pacientes y métodos	
Pacientes -----	57
Diagnóstico -----	57
Extracción de DNA-----	58
Tipificación del HLA-----	59
Resultados	
Pacientes-----	59
Análisis histopatológico-----	61
Inmunogenética-----	63
Discusión.	
Discusión general-----	64
Conclusiones-----	68
Tablas.	
5 A Manifestaciones clínicas de pacientes con GC	69
5B Hallazgos de laboratorio en pacientes con GC	70
6 Datos clínicos y de laboratorio de la familia con GC	71
Figuras.	
5 Pedigree de la familia con GC-----	72
6 Imágenes de lesión pulmonar en GC-----	73
Explicación y pies de figura -----	74
Bibliografía -----	75

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: M. CRISTINA AVILA

ESTADO: ESTADO

FECHA: 9/01/04

FIRMA: [Firma]

Sin más preámbulo dedico este trabajo a mi esposo, mis hijos y mis padres, esperando exista alguna manera de compensar el tiempo que les he robado con mis proyectos personales y mi continuo deseo de crecimiento y superación....

INTRODUCCION

La enfermedad de células epiteliales viscerales comprende un síndrome clínico-patológico que cursa con proteinuria secundaria al daño de los podocitos. Aunque las diferentes variantes morfológicas de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (EFyS) comparten algunas características patológicas, cada vez se conoce más acerca de sus diferencias en el curso clínico, lo cual ha sugerido que estas enfermedades son diferentes en su patogénesis desde su inicio.

La primera imagen diagnóstica de la EFyS se publicó en 1925 y durante los últimos 30 años el concepto de EFyS se ha redefinido con más detalle basado en los estudios clinicopatológicos de muchos centros a nivel mundial. Actualmente se considera a la EFyS como un síndrome clinicopatológico que se manifiesta clínicamente con proteinuria en valores nefróticos (mayor de 3g/24 h) asociado con lesiones variables en la célula epitelial visceral (podocito) que producen obliteración de los procesos podocíticos (1). La EFyS comprende diferentes subtipos morfológicos que tienen diferente pronóstico y podrían tener diferentes implicaciones terapéuticas. Las variantes morfológicas de daño a los podocitos asociadas a EFyS incluyen: 1.- variante perihiliar, 2.- variante celular, 3.- EFyS con lesión de la punta, 4.- glomerulopatía colapsante (GC), 5.- EFyS con esclerosis de la matriz mesangial (4). Aunque la apariencia del ovillo glomerular es diferente en cada una de las variantes, todas tienen en común el daño a los podocitos a nivel ultraestructural. Al momento actual no se ha dilucidado si las variantes morfológicas reflejan verdaderas diferencias patogénicas o son el resultado de daño histopatológico al podocito de diferente gravedad.

La variante morfológica más grave por su pronóstico es la glomerulopatía colapsante (GC). En México una revisión retrospectiva de la frecuencia de GC en biopsias de pacientes con síndrome nefrótico mostró ser de 15%, similar a la informada en la literatura mundial (5).

La glomerulopatía colapsante (GC) es un tipo de lesión glomerular descrito de manera relativamente reciente en la literatura médica (6). En 1986 Weiss informó de seis casos con síndrome nefrótico, insuficiencia renal progresiva y cambios histopatológicos caracterizados por colapso de los capilares glomerulares y alteraciones en las células

epiteliales viscerales (1). En este trabajo se sugirió que esta lesión podría representar una nueva entidad clinicopatológica. A pesar de sus semejanzas morfológicas, es una enfermedad clínica y patológicamente distinta de la esclerosis focal y segmentaria y de la nefropatía asociada al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (2). En el informe original de Weiss, uno de los pacientes desarrolló 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. La controversia terminó cuando a partir de los años 90 se informa en la literatura de casos de pacientes con GC primaria, VIH negativos (2-8), incluyendo una serie de 43 pacientes de la Universidad de Columbia (5).

EPIDEMIOLOGIA

La GC afecta principalmente a personas jóvenes pero puede presentarse a cualquier edad (2-8). Existe cierta predominancia por el sexo masculino (6) y en algunos países hay predilección por ciertas razas (6). En Estados Unidos la prevalencia de la enfermedad es mayor en la raza negra (4-8). 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 (9).

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 (2,5,6), a pesar de que sigue siendo una causa relativamente infrecuente de síndrome nefrótico en general a cualquier edad. En México, un estudio multicéntrico retrospectivo mostró una prevalencia de GC de 15%, entre las biopsias renales diagnosticadas como esclerosis focal y segmentaria de 1985 a 1995 (7), mientras que en la literatura mundial es de 10% (8).

MANIFESTACIONES CLINICAS

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 (1,5).

El signo clínico más constante y característico de la GC es la presencia de síndrome nefrótico con proteinuria masiva (mayor de 10g/día), con una evolución muy rápida a insuficiencia renal terminal a pesar de cualquier forma de tratamiento o a la muerte por complicaciones del síndrome nefrótico (9). Aunque existen algunos reportes del uso de esteroides, ciclofosfamida y ciclosporina (3,5), no hay tratamientos efectivos para la GC. También se han utilizado inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina ya que se ha demostrado que son efectivos en disminuir la proteinuria en otras formas de enfermedad glomerular, incluyendo la nefropatía asociada a VIH (7,10). Otras manifestaciones clínicas que refieren con frecuencia los pacientes con GC son: hipertensión arterial (56%), diarrea (19%), mialgias y/o artralgias (13%) y erupciones cutáneas (13%) (3) Tablas 1 y 2.

Es frecuente que los pacientes presenten datos de insuficiencia renal al momento del diagnóstico (7). La velocidad de progresión a insuficiencia renal terminal en la GC varía de 2 a 15 meses en promedio en diferentes series (5,6).

HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS

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) (1,3,4,6). Las células epiteliales viscerales son muy prominentes, se agrupan y rodean a los capilares colapsados llenando el espacio de Bowman (Fig 1). Estas células presentan vacuolas y depósitos en forma de gotas hialinas que al estudio de inmunofluorescencia directa muestran positividad para albúmina (4). 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. 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 (3). Algunos glomérulos con lesión más avanzada pueden mostrar cicatrización de zonas segmentarias con el aspecto morfológico a la microscopía de luz de esclerosis focal y segmentaria (EFyS) y es por esto que en muchas ocasiones la GC avanzada se diagnostica como EFyS primaria (1, 2, 4). Los cambios intersticiales también son característicos. Los túbulos presentan dilataciones quísticas con aplanamiento del epitelio tubular y fibrosis (1, 3, 4). A la microscopía de luz se pueden observar capilares glomerulares con áreas denudadas de procesos podocíticos u obliteración de los mismos (3,5).

PATOGENESIS

En la patogénesis de la glomerulopatía colapsante se han implicado algunos factores, sin que se haya podido demostrar la participación fehaciente de alguno de ellos (2). Una de las teorías más apoyadas es que se trata de una infección viral por un retrovirus semejante al VIH, pero diferente del mismo (2,3). Inclusive para los casos de nefropatía asociada al VIH se ha propuesto que las lesiones renales podrían ser el resultado de una infección por un virus diferente al VIH, aún no demostrado (3,10). Esta infección viral sería la responsable de los síntomas que refieren los pacientes con GC al inicio de su enfermedad como son malestar general, fiebre, adenomegalias y pérdida de peso (1,5). En apoyo a la teoría de que la GC es de origen viral se ha observado que esta lesión aparece *de novo* en el injerto renal (6). 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% entre 1993 y 1998, siendo que era de 0% antes de 1993 (11). La presentación de la GC *de novo* en el injerto es más frecuente cuando el paciente ha recibido tratamiento anti-rechazo con anticuerpos monoclonales como el OKT3 (2). Como es bien conocido, la utilización de anticuerpos monoclonales como el OKT3 predispone al paciente trasplantado a infecciones virales *de novo* o a la reactivación de infecciones preexistentes (2). Entre las infecciones virales más frecuentes en el paciente trasplantado están las lesiones cutáneas por virus del papiloma humano y la infección por citomegalovirus (12). La frecuencia de la infección puede variar de acuerdo con el número de cursos de OKT3 y la cantidad total de inmunosupresión administrada (12).

Por lo tanto, se ha propuesto que la aparición de GC *de novo* en el injerto renal posterior al tratamiento con monoclonales apoya su supuesto origen viral (2). Por último, se ha visto que los modelos animales del ratón transgénico para el retrovirus recombinante MPS neo y la porción temprana del virus Simiano 40 desarrollan una lesión glomerular de tipo EFyS (3).

A pesar de todas las evidencias indirectas acerca de un origen viral no se ha aislado hasta el momento algún tipo de DNA viral en el tejido renal de los pacientes con GC. En 1989 Cohen et al reportaron haber aislado DNA viral en biopsias renales y autopsias de pacientes con SIDA, con una distribución diferente para los pacientes con nefropatía que para aquellos sin alteraciones renales (13). En otro trabajo se estudiaron por medio de la reacción de polimerasa en cadena (PCR), 22 pacientes infectados por el VIH (14). Veintiuno de los 22 pacientes estudiados por PCR mostraron la presencia del DNA viral en glomérulos, túbulos y células inflamatorias, pero no en células del intersticio. El DNA viral se identificó tanto en pacientes infectados por el VIH con nefropatía, como en pacientes seropositivos sin afección renal (14).

MECANISMOS DE DAÑO A LAS CELULAS EPITELIALES VISCERALES

La proteinuria es el resultado del daño producido en las células epiteliales viscerales (podocitos), las cuales al degenerar abruptamente pierden su capacidad de filtración produciendo colapso del capilar glomerular y proteinuria (1-3). Ya que no se ha demostrado daño citopático viral directo a las células epiteliales viscerales, es posible que el daño que sufren los podocitos en la GC sea el resultado de factores indirectos como serían factores humorales (15). En apoyo a esto último, se ha descrito que tanto la GC como algunos tipos de EFyS no colapsante primaria, pueden recidivar en el injerto renal al poco tiempo postrasplante, inclusive horas (16). En la EFyS de tipo idiopático recidivante, se ha demostrado recientemente la presencia de un factor sérico que podría estar implicado en la producción de la proteinuria que presentan estos pacientes (17, 18). En algunos trabajos en pacientes con diagnóstico de EFyS que presentan síndrome nefrótico recidivante postrasplante, la remoción de ciertas proteínas séricas por medio de plasmaféresis y adsorción con Sefarosa A llevó a los pacientes a la remisión de la proteinuria (18, 19). Sin embargo, el tratamiento con plasmaféresis no era definitivo, ya

que los niveles de proteinuria de los pacientes regresaban a los niveles que presentaban antes de la adsorción a los 2 meses del procedimiento (19). El concepto de que la sustancia adsorbida era la responsable de la proteinuria se enfatizó aún más con el hallazgo de que las eluciones de Sefarosa A obtenida de la plasmaféresis, producían proteinuria en ratas (19). A pesar de grandes esfuerzos para su caracterización, las propiedades de este factor no se han podido dilucidar totalmente. Aunque la electroforesis con Sefarosa A fija principalmente inmunoglobulinas, la fracción activa de las proteínas eluidas inyectadas a las ratas tenía un peso molecular por abajo de 100,000 (19). Esta observación indica que no se trataba de inmunoglobulinas (19). El análisis por medio de la técnica de Western blot determinó que tampoco se encontraban fragmentos de inmunoglobulinas en el material eluido (19). Las características del material eluido – labilidad al calor y capacidad de precipitación con sulfato de amonio- llevaron a la conclusión de que se trata de una proteína, con la característica poco usual de precipitarse a concentraciones muy altas, en comparación con otras proteínas séricas (17 – 20). Ya que no se trata de una inmunoglobulina se ha propuesto que pudiera ser una linfocina (17 ,19) El descubrimiento del factor proteico es importante ya que por medio de la eliminación del factor circulante utilizando la plasmaféresis, se beneficia a los pacientes con EFyS y se evita la recidiva en el injerto renal. (17- 20).

Un trabajo reciente ha sugerido la existencia de uno o varios factores circulantes que afecten directamente a los podocitos, y por lo tanto alteren la permeabilidad glomerular a la albúmina en los pacientes con GC (21), de manera semejante a lo que sucede en la esclerosis focal y segmentaria de tipo recidivante (17- 20). En este estudio se demostró que en el suero de los pacientes con GC pueden existir uno o varios factores que son capaces de alterar la barrera de permeabilidad glomerular a la albúmina *in Vitro* (21). Utilizando glomérulos aislados de ratas Sprague-Dawley que se incubaron durante 10 minutos a 37°C con el suero de pacientes con GC y albúmina sérica bovina, se demostraron alteraciones en la permeabilidad a la albúmina (21). Los resultados se calcularon midiendo los cambios en el volumen glomerular en respuesta al gradiente oncótico (21). En apoyo a la teoría de la presencia de factores humorales en la GC, un estudio en nuestro laboratorio demostró que la inyección de suero de pacientes con GC a

ratas Wistar produce proteinuria a las 24 horas de la inyección (15). El análisis histológico a los 5 días de observación mostró alteraciones de los podocitos a nivel ultraestructural (15). Estos resultados parecen ser concluyentes acerca de la existencia de un factor sérico asociado a la producción de proteinuria en la GC.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Se debe considerar el diagnóstico de GC en todo paciente que presente un síndrome nefrótico de inicio súbito con proteinuria masiva ($> 10\text{g}/24$ horas), sobre todo si presenta datos de insuficiencia renal. El diagnóstico definitivo sólo puede establecerse mediante el estudio histológico por lo que la biopsia renal juega un papel primordial. Existen dos enfermedades con las cuales se debe de hacer un diagnóstico diferencial ya que se manifiestan por síndrome nefrótico y comparten algunas características histopatológicas con la GC, siendo en algunas ocasiones casi indistinguibles morfológicamente.

Glomerulosclerosis focal y segmentaria de tipo no colapsante. La GC no parece ser únicamente una forma avanzada de esclerosis focal y segmentaria (EFyS). Esta afirmación se basa en la historia natural de la EFyS no colapsante que, aun en su fase más tardía, no se parece a la GC ni clínica ni morfológicamente (22,23). La GC se caracteriza por un tiempo de evolución muy corto, los pacientes presentan un síndrome nefrótico florido con proteinuria masiva (mayor de $10\text{g}/24$ h) y evolucionan rápidamente a insuficiencia renal terminal, independientemente del tratamiento (4-8, 24). La velocidad de progresión a insuficiencia renal terminal en la GC es de 15 meses en promedio en algunas series (5,6). La EFyS no colapsante tiene una evolución lenta a insuficiencia renal (y no en todos los casos), y el curso de la enfermedad puede ser modificado por el tratamiento (25). Además, los cambios tubulointersticiales que se observan en los pacientes con GC (dilatación tubular y alteración del epitelio tubular), no son los mismos que en los pacientes con EFyS, aun en la lesión renal avanzada terminal (25). Posterior a su descripción se propuso que la GC podría ser una variante de la EFyS pero con un curso más agresivo (5). Actualmente esta propuesta sigue siendo controversial.

Nefropatía asociada al VIH. La nefropatía asociada al VIH, indistinguible morfológicamente de la GC, es también más frecuente en la raza negra (10). Clínicamente los pacientes con nefropatía asociada al VIH presentan proteinuria en límites nefróticos y tienen una evolución rápida a insuficiencia renal terminal (10). Entre los hallazgos morfológicos más característicos de la nefropatía asociada al VIH destacan la presencia de colapso glomerular y los cambios intersticiales con dilatación tubular y alteraciones en el epitelio tubular, inclusive mitosis atípicas (26). Con el estudio ultraestructural es frecuente encontrar numerosas estructuras tubuloreticulares tanto en el endotelio de los capilares glomerulares como en capilares peritubulares y en células inflamatorias del intersticio (4). Las estructuras tubuloreticulares son una serie de microtúbulos de aproximadamente 24 NM que se anastomosan entre sí, localizados en cisternas dilatadas del retículo endoplásmico liso o en las cisternas del Golgi de localización peri nuclear (4). Se ha visto que estas estructuras intracitoplásmicas se forman en respuesta al interferón alfa (27). Los padecimientos en los que se ha observado la presencia de estructuras tubuloreticulares, además de la nefropatía asociada al SIDA, incluyen: pacientes con lupus eritematoso, en el injerto renal, en la glomerulopatía colapsante y en aquellos que han recibido tratamiento con interferón, pero nunca con la magnitud observada en los pacientes con SIDA (4,28). En un estudio morfológico detallado de la nefropatía asociada al VIH se encontró un promedio de 0.92 inclusiones tubuloreticulares por asa glomerular estudiada (4). Esto proporciona una idea de la frecuencia de estas estructuras en los pacientes con SIDA. Aunque en la GC primaria se pueden presentar estructuras tubuloreticulares, es muy raro encontrarlas y cuando éstas se observan, son escasas (5,6).

Además, mientras en la nefropatía asociada al SIDA las estructuras tubuloreticulares se encuentran en las células endoteliales tanto de capilares glomerulares como intersticiales, en la GC se llegan a observar ocasionalmente en el endotelio de los capilares glomerulares, pero nunca en otro tipo de capilares (4,28). Por lo tanto, aunque los cambios a la microscopía de luz pueden ser indistinguibles, la presencia, localización y número de estructuras tubuloreticulares permiten establecer el diagnóstico diferencial entre GC y nefropatía asociada al SIDA.

En un estudio retrospectivo en el que analizamos 138 autopsias de pacientes con SIDA realizadas en un periodo de cinco años en México, encontramos que 87 pacientes (63%), tenían lesión renal y de éstos, el 48% tenía GC asociada a SIDA mientras que la EFyS no colapsante se observó en 32%. El resto de los pacientes con afección renal presentaba lesiones glomerulares inespecíficas, lesión tubulointersticial y/o infecciones. (x)

GLOMERULOPATIA COLAPSANTE ASOCIADA A OTRAS ENFERMEDADES

Además de los casos de GC primaria, se ha informado en la literatura de casos de GC secundarios, es decir asociados con otras enfermedades en pacientes VIH negativos. Un ejemplo de éstos es un informe de un paciente con filariasis por Loa Loa, también conocida como Loiasis, que presentaba glomerulopatía colapsante (29). La infección por Loa Loa ha sido asociada con frecuencia a lesiones renales por complejos inmunes como la glomerulopatía membranosa, la glomerulonefritis membranoproliferativa y en algunas ocasiones a una lesión renal indefinida, esclerosante avanzada (29). También es conocida la asociación de GC con infección renal por citomegalovirus en pacientes VIH negativos (Dr. V. Pardo, Universidad de Miami, Comunicación personal). Una de las asociaciones descritas de manera reciente que ha tenido importancia por su gran prevalencia en los pacientes con síndrome nefrótico es la infección por parvovirus B-19 (30 -34). Se ha visto que esta asociación es mayor entre la GC que entre la EFyS no colapsante (30-34). Se han descrito pacientes con infección por PVB-19 que presentan además algunos síntomas descritos en enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado (LEG) (35), inclusive serología positiva para lupus (30). Entre los síntomas que presentan los pacientes con infección por PVB-19 que semejan LEG se encuentran: erupciones cutáneas, fiebre, fotosensibilidad, vasculitis, artropatía, mialgias, alteraciones hematológicas, hipocomplementemia, anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos anti DNA de doble cadena, factor reumatoide y anticuerpos anti-linfocitos (30,35). Es importante señalar que el daño renal que presentan estos pacientes es secundario al daño de las células epiteliales viscerales y no al depósito de complejos inmunes como se esperaría en el LEG. Por último, también se ha descrito recientemente la asociación de GC y síntomas de enfermedades autoinmunes (35,36). En una serie de 42

pacientes con GC, VIH negativos, 13 pacientes fueron clasificados como portadores de un síndrome semejante al LEG (36).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- 1.- La glomerulopatía colapsante es una entidad agresiva que se presenta con síndrome nefrótico grave que evoluciona rápidamente a insuficiencia renal terminal a pesar de cualquier tratamiento.
- 2.- Aunque no existe todavía un consenso, hay evidencias suficientes para pensar que la glomerulopatía colapsante es una entidad clínico patológica, diferente de la esclerosis focal y segmentaria y de la nefropatía asociada al VIH, a pesar de que podrían tener un factor fisiopatogénico común.
- 3.- El hallazgo de un factor sérico que daña los procesos podocíticos abre un nuevo camino para avanzar en el estudio de la enfermedad y prevenir su curso inexorable a insuficiencia renal terminal.
- 4.- En México un estudio multicéntrico ha mostrado que la GC se presenta con una frecuencia de 15% sobre la glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática no colapsante, similar a la frecuencia reportada en la literatura mundial.

HIPOTESIS

Los pacientes con glomerulopatía colapsante tienen un factor sérico circulante que altera la permeabilidad glomerular a la albúmina a través del daño a las células epiteliales viscerales por lo que esta enfermedad se manifiesta clínicamente con proteinuria.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

- 1.- Demostrar la presencia de factores séricos circulantes que dañan a las células epiteliales viscerales en los pacientes con GC
- 2.- Montar un modelo experimental para reproducir la enfermedad (GC), tanto desde el punto de vista funcional (induciendo la presencia de proteinuria), como histopatológico (produciendo alteraciones en la célula epitelial visceral).
- 3.- Identificar el componente sérico en el que se encuentra el factor implicado en el daño a los procesos podocíticos en la GC.
- 4.- Analizar las características clínicas de los pacientes con GC.
- 5.- Estudiar las alteraciones en las células epiteliales viscerales de las biopsias de los pacientes con glomerulopatía colapsante.

El trabajo será dividido de acuerdo con los objetivos. En la primera parte, Capítulo I, se presenta el estudio experimental (objetivos 1, 2 y 3). En la segunda parte, Capítulo II, se presenta el estudio de los pacientes y los resultados del estudio de las biopsias (objetivos 4 y 5).

CAPÍTULO I
DEMOSTRACIÓN DE LA PRESENCIA DE FACTORES CIRCULANTES EN
PACIENTES CON GC. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS SPRAGUE
DAWLEY.

RESUMEN

Proteinuria en ratas inducida por la inyección de suero de pacientes con GC.

Antecedentes: La glomerulopatía colapsante primaria (GC) recidiva en el injerto planteando la posibilidad de la existencia de factores circulantes implicados en la patogénesis de la enfermedad.

Métodos. Con el objeto de determinar la presencia de factores circulantes en el suero de los pacientes con GC, se montó un modelo experimental *in vivo* en donde 11 grupos de ratas recibieron suero de pacientes con GC, suero de pacientes con glomeruloesclerosis focal y segmentaria (EFyS) no colapsante o de individuos sanos ya sea en su forma nativa, solo la IgG aislada del suero por cromatografía o el suero sin la IgG. Se determinó la presencia de proteinuria, los valores de creatinina sérica y urinaria y se calculó la depuración de creatinina de cada grupo. El análisis histopatológico del riñón incluyó microscopía de luz, inmunofluorescencia directa contra IgG de rata y microscopía electrónica de transmisión.

Resultados. Las ratas que recibieron suero de pacientes con GC desarrollaron proteinuria y daño a los procesos podocíticos mientras que las que recibieron suero de pacientes con EFyS o de individuos sanos no mostraron alteraciones clínicas o histopatológicas. Las ratas que recibieron suero de pacientes con GC en forma nativa desarrollaron proteinuria marcada (99.2 ± 42 mg/24 h al día 5, $p = 0.0001$ comparado con la basal) y disminución en la depuración de creatinina. Las ratas que recibieron solo la IgG aislada del suero o el suero sin IgG de estos pacientes también desarrollaron proteinuria significativa, aunque a menor escala (46.5 ± 8.4 mg/24h y 30.9 ± 11 mg/24h respectivamente al día 5, $p = 0.0001$ comparado con la basal). Los glomérulos de las ratas que recibieron suero de pacientes con GC mostraron colapso focal con retracción del ovilleo glomerular y daño extenso de los procesos podocíticos al análisis ultraestructural. Las ratas que recibieron

suero de individuos sanos o de pacientes con EFyS no mostraron alteraciones a la microscopía de luz ni anomalías ultraestructurales del podocito.

Conclusiones. En el suero de los pacientes con GC existen factores circulantes que producen daño a los podocitos mientras que estos factores no están presentes en los pacientes con EFyS no colapsante. Los eluidos de IgG de los pacientes con GC producen proteinuria cuando se inyectan a la rata pero esto también se produce cuando se inyecta el suero sin IgG lo que plantea que existen varios factores implicados en la patogénesis de la enfermedad.

MATERIAL, METODOS Y PROCEDIMIENTO

1.- OBTENCION DE LOS SUEROS.

Se utilizó el suero de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de glomerulopatía colapsante, según los criterios de Weiss (1), estudiados en el Departamento de Patología y/o Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Selección de los pacientes.

Veinte pacientes reunieron los criterios histológicos y clínicos para el diagnóstico de GC de los cuales 10 colaboraron con el estudio (Tablas 1A y 1B). Todos los pacientes eran mexicanos y seronegativos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), sin historia de utilización de drogas intravenosas. Los datos clínicos se obtuvieron de los expedientes hospitalarios y la hoja de solicitud de estudio histopatológico.

Datos clínicos.

La edad media de los 20 pacientes con GC fue de 32 ± 12 años con un intervalo de 12 a 70 años. El 60% de los pacientes son hombres (n=12) y el 40% mujeres (n=8). Todos los 20 pacientes presentaron síndrome nefrótico al momento del diagnóstico con un promedio de proteinuria en 24 horas de 8.4 ± 4 g. Once de los 20 pacientes (55%) presentaron proteinuria masiva (> 10 g/24 horas). Quince de los 20 pacientes (75%)

mostraron una creatinina sérica > 1.5 mg/dl. La información clínica detallada de los 10 pacientes con GC que participaron en el estudio se presenta en la tabla 1A.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y apoyado por CONACYT 34751-N, por la UNAM-DGAPA IN-201902 y PAPIIT

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE LAS BIOPSIAS RENALES DE LOS PACIENTES CON GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE.

Se estudiaron 2 ó 3 fragmentos cilíndricos de tejido renal procesados para microscopía de luz, microscopía electrónica e inmunohistoquímica y un corte congelado para inmunofluorescencia directa. Los tejidos se procesaron de acuerdo a técnicas estandarizadas de rutina (37) y fueron incluidos en parafina para la realización de cortes a 4μ . Los cortes para microscopía de luz se tiñeron con hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), metenamina de Jones y tricrómico de Mallory. Hubo un promedio de 15 ± 6 glomérulos por sección en cada muestra. El diagnóstico de glomerulopatía colapsante se fundamentó en la presencia de: 1.- Colapso y/o retracción de los capilares glomerulares ya sea focal y segmentario o global. 2.- Prominencia de las células epiteliales viscerales por hipertrofia o hiperplasia con la presencia de gotas hialinas PAS positivas intracitoplasmáticas. 3.- Cambios túbulo-intersticiales: dilatación tubular y fibrosis intersticial.

Todos los casos diagnosticados como GC presentaban por lo menos un glomérulo con colapso de los capilares glomerulares. La presencia de fibrosis intersticial se analizó de acuerdo a una evaluación semicuantitativa basada en una escala de grados I a III de acuerdo a la cantidad de fibrosis en el área cortical total en 7 campos no cruzados a seco débil (grado I = $<25\%$, grado II = entre el 25 y el 40% y grado III = $>40\%$).

Todos los pacientes con diagnóstico histopatológico de GC mostraron la presencia de colapso del capilar glomerular y retracción del ovillo glomerular con obliteración de la luz capilar, aunque en diferentes grados. En 15 pacientes (75%) la lesión fue focal con

afección de uno o dos glomérulos y en el resto (25%) el colapso de los capilares fue difuso. En todos los glomérulos colapsados las células epiteliales mostraban alteraciones como la presencia de vacuolas, gotas hialinas y/o proliferación. Nueve de los 20 casos (45%) mostraron cambios tubulares que incluyeron dilatación quística y atrofia. Siete casos (35%) mostraron fibrosis intersticial grado II (>25 y < 40% del área cortical total) con un discreto infiltrado inflamatorio mononuclear asociado a la fibrosis. El resto no presentaba fibrosis.

Inmunofluorescencia directa: Un fragmento de tejido congelado de cada muestra se incubó con anticuerpos monoclonales contra IgG, IgM, IgA, C1q, C3, albúmina y fibrinógeno, conjugados con isotiocianato de fluoresceína. La inmunofluorescencia directa fue negativa para todos los inmunorreactantes en todos los glomérulos no colapsados. Los glomérulos colapsados mostraron atrapamiento de IgM o C3 con patrón esclerótico segmentario.

Sólo se realizó la microscopía electrónica en 8 de las 10 biopsias. El estudio ultra estructural en todos los casos estudiados mostró obliteración difusa de procesos podocíticos en el 100% de los glomérulos examinados. Los glomérulos colapsados mostraron plegamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares. Las células epiteliales viscerales de los glomérulos colapsados mostraron numerosas vacuolas intracitoplasmáticas. La presencia de estructuras tubuloreticulares se demostró solo en 2 casos. Estas estructuras se encontraron en el endotelio de las asas capilares. Se encontraron 2 estructuras tubuloreticulares por 10 campos, en la evaluación de diferentes de asas capilares periféricas analizadas a 10,000 aumentos.

La información detallada de los datos histopatológicos de la biopsia de cada paciente se presentan en la tabla 1B.

SUEROS UTILIZADOS COMO CONTROL.

- 1.- Sueros de individuos sanos, apareados por sexo y edad con los pacientes con GC, obtenidos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- 2.- Sueros de pacientes con diagnóstico de EFyS estudiados de manera prospectiva con criterio de inclusión de contar con una biopsia renal con diagnóstico de EFyS no colapsante, tipo 1 de acuerdo a la clasificación para las variantes de EFyS (con afección periférica, sin afección del hilio glomerular). Estos pacientes accedieron también a colaborar con el estudio. La muestra de sangre obtuvo directamente en nuestro laboratorio en tubos sin anticoagulante. La muestra se tomó entre una semana y un mes después de la biopsia en donde se estableció el diagnóstico de EFyS no colapsante tipo 1, en pacientes con proteinuria mayor de 3 g/día y con datos clínicos de síndrome nefrótico. La información clínica detallada de los pacientes con EFyS se presenta en la tabla 2A y los hallazgos patológicos de las biopsias de estos pacientes se resumen en la tabla 2B.

2.- ANALISIS DEL SUERO.

A.- PURIFICACION DE PROTEINAS:

Diálisis y concentración: objetivo--- eliminación de sales y moléculas pequeñas

Se formó un “pool” con los sueros por grupo. El “pool” de los sueros de los pacientes se sometió a un proceso de diálisis para eliminar las sales y moléculas pequeñas utilizando el siguiente procedimiento (38):

- 1.- Se colocó la muestra en una bolsa de diálisis de celulosa, se cerró con doble nudo para evitar el escape de líquido.
- 2.- El saco bien cerrado se colocó en un volumen grande de una disolución amortiguadora fría de baja fuerza iónica (buffer de fosfatos 0.1 M) y se agitó moderadamente.
- 3.-El tubo de diálisis tiene poros de determinado tamaño que permitieron el paso de moléculas pequeñas de sales inorgánicas pero no de macromoléculas.
- 4.- La salida de moléculas pequeñas a la solución amortiguadora de diálisis decrece la fuerza iónica de las proteínas de la disolución.

- 5.- En 6 horas se alcanzó un equilibrio dentro y fuera de la bolsa.
- 6.-Se hicieron recambios de la solución amortiguadora para disminuir más la concentración de moléculas pequeñas
- 7.- El proceso eliminó también otras moléculas pequeñas como ATP y coenzimas.

Preparación de la membrana de diálisis:

- 1.- Para 300 o 600 cm. de tubo se colocaron en un recipiente con 4 L de una disolución de EDTA 0.5M
- 2.-Hirvió durante 30 min.
- 3.- Se decantó la solución y el proceso se repitió 8 veces más empleando agua en lugar de EDTA
- 4.- Para evitar contaminarla o dañarla, la membrana se manejó con pinzas y/o guantes estériles

B.- CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION PARA EL FRACCIONAMIENTO DE LOS SUEROS:

Los sueros de los pacientes con GC y de los controles fueron fraccionados utilizando geles de Sephadex G100, G75 y G50. Los sueros así fraccionados fueron comparados de acuerdo a su concentración proteica. Las fracciones obtenidas se guardaron para posteriormente ser inyectadas a los animales de experimentación, ratas Sprague-Dawley hembras de 250-300 g. Existen diferentes tipos de Sephadex con diferentes características que permiten un diferente límite de exclusión. Como las proteínas que deseábamos aislar tienen un peso molecular de alrededor de 100,000 se utilizó un tipo de Sephadex que no filtre proteínas con este peso molecular sino mayores. Para los diferentes geles el límite de exclusión corresponde al peso molecular del soluto más pequeño que emerge con el volumen que se encuentra en los espacios interparticulares.

Preparación de geles de Sephadex (38):

- 1.- Se colocó el Sephadex en un vaso de precipitado y se agregaron 20-30 volúmenes de buffer de fosfatos al 0.1M.
- 2.- Se mantuvo en agitación continua
- 3.- Se decantó y eliminó el sobrenadante.
- 4.- Se agregó un volumen igual de buffer, y se dejó en contacto durante 3 a 4 horas para G-25 G-50 y en agitación continua a 4 grados C durante la noche para los de mayor grado.
- 5.- Se eliminó el sobrenadante, se reemplazó por un volumen igual de buffer y se calentó en baño de agua hirviendo durante una hora.
- 6.- Se decantó y reemplazó el buffer nuevamente.

Para el armado de la columna:

- 1.-A un volumen de 20 a 30 ml. de buffer Se añadió la suspensión densa del gel.
- 2.-Se eliminaron las burbujas de aire
- 3.-Se dejó reposar la columna en posición vertical hasta se formó una capa densa de gel en la parte inferior de 4-5 cm. de alto.
- 4.- Se procedió a abrir la columna y seguir añadiendo gel hasta completar el volumen
- 5.- Se conectó con el reservorio que contiene el buffer de elusión y haciendo pasar una cantidad suficiente al equivalente de 4-5 volúmenes de la columna.
- 6.-Se filtró hasta que la columna líquida excedió en 7-8 cm. la superficie del gel y entonces se cerró el flujo de la columna.
- 7.- Para introducir la muestra a filtrar se eliminó con pipeta el exceso de amortiguador eluyendo hasta que la eliminación fue total.
- 8.- Se depositó la muestra a filtrar y cuando había penetrado totalmente en la columna, se lavó el tope con buffer.
- 9.- La elusión fue continua hasta que se obtuvo la penetración total.

C.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Se utilizó para el estudio de la concentración en suero de proteínas nativas tanto de pacientes con GC como de los controles y para verificar las fracciones. La resolución obtenida depende en gran manera del amortiguador seleccionado, su pH y la

concentración de acrilamida. El pH del amortiguador afecta directamente la motilidad proteica. Las proteínas plasmáticas se separan mejor en un buffer con pH de 8.6.

Preparación de los geles (38,39):

- 1.- Se mezcló la acrilamida, agua y buffer del gel en un frasco de Erlenmeyer de un brazo.
- 2.- Se eliminó el gas porque el oxígeno inhibe la polimerización.
- 3.- Se agregó persulfato de amonio de TEMED moviendo lentamente para mezclar.
- 4.- Se pipeteó la solución del gel en el molde con el peine insertado.
- 5.- Se agregó agua para sellar la acrilamida del contacto con el aire.
- 6.- Se dejó reposar el gel a temperatura ambiente por una hora

Preparación de la muestra:

- 1.- Las proteínas liofilizadas se disolvieron en amortiguador hasta la disolución total.
- 2.- La muestra se dializó contra un amortiguador de baja fuerza iónica.
- 3.- Las muestras se diluyeron en el rango de 0.1 a 20mg/ml para alcanzar la concentración óptima.
- 4.- Se agregó azul de bromo fenol 10 µl por cada 250 µl de solución muestra.

3.- BIOENSAYO

Con el objeto de montar el modelo experimental para reproducir la enfermedad, se utilizaron en el proyecto un total de 99 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, con un peso de 200-250 g, y se formaron 11 grupos (n=9), distribuidos de la siguiente manera:

Grupo 1.- Ratas que no recibieron inyecciones.

Grupo 2.- Ratas que recibieron inyecciones de solución salina (NaCl 0.9%)

Grupo 3.- Ratas que se inyectaron con suero de individuos sanos (**HS**), obtenido del

Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Grupo 4.- Ratas que recibieron suero de pacientes con **GC** en forma nativa (sin adsorción o fraccionamiento).

Grupo 5.- Ratas que recibieron suero de pacientes con esclerosis focal y segmentaria primaria, no colapsante (EFyS).

Grupo 6.- Ratas que recibieron **suero sin IgG de HS.**

Grupo 7.- Ratas que recibieron **suero sin IgG de pacientes con GC.**

Grupo 8.- Ratas que se inyectaron con **suero sin IgG de pacientes con EFyS.**

Grupo 9.- Ratas que se inyectaron con **IgG aislada del suero de HS.**

Grupo 10.-Ratas que recibieron **IgG aislada del suero de pacientes con GC.**

Grupo 11.- Ratas que se inyectaron con **IgG aislada del suero de pacientes con EFyS.**

Protocolo de administración IV de los sueros:

Los sueros se administraron diariamente, de manera intravenosa (IV), en las venas de la cola durante 5 días seguidos, La concentración fue de 25mg/ml en salina con un volumen final de 1 ml. Las inyecciones se aplicaron cada 24 horas, previa sedación en una cámara de narcosis (Daigger), de acuerdo al siguiente procedimiento:

Las ratas permanecieron en jaulas metabólicas de Nalgene con acceso a agua y comida *ad libitum*, desde 24 horas antes de la primera inyección y hasta 24 horas después de la última. Antes de su colocación en la caja metabólica correspondiente, las ratas fueron pesadas y etiquetadas con números progresivos con aretes metálicos en la oreja derecha. Cada día la rata fue separada de la caja a la misma hora, para ser colocada directamente en la cámara de narcosis la cual está preparada con éter. Después de unos minutos, la rata se duerme y es separada de la cámara de narcosis, la cola se sumerge en agua caliente (50-60 grados C), se coloca sobre la mesa y se pone un tubo que contiene un algodón con éter cerca de la nariz, sin presionar, a una distancia de 2 cm. Se procede inmediatamente a inyectar en la vena de la cola 1ml de la solución suero/salina con una jeringa de 3 cc que tiene una aguja con gauge 30. Después de la inyección, se limpia la cola nuevamente con agua fría y se regresa a su caja metabólica.

Las ratas fueron sacrificadas 24 hrs. después del último contacto con el suero por el método de fijación-perfusión in situ siguiendo los lineamientos éticos para el manejo de pequeñas especies.

B- PROTOCOLO DE ADMINISTRACION DEL SUERO:

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley (Bioterio del INC), con peso de 180-200 g las cuales permanecieron en cajas metabólicas de Nalgene durante todo el período de observación del experimento, para la medición de la proteinuria de cada 24 h.

El suero fue administrado:

1.- Por medio de inyecciones IV en bolo, diarias en las venas de la cola, a razón de 1ml de suero en solución salina. La dilución fue de 25mg/ml, determinada por un estudio previo de reactividad de los sueros.

C.- PROTOCOLO DE MEDICION DE LA PROTEINURIA

Las ratas fueron colocadas en cajas metabólicas de Nalgene con acceso libre a agua y alimento para ratas (PMI 5001 y 5008). La presencia de proteinuria se midió diariamente en orina de 24 horas, tanto en el día previo a la primera inyección o contacto con el suero (día 0) para obtener los niveles basales, como durante cada uno de los días de observación en los cuales la rata estuvo en contacto con el suero. La orina fue almacenada a 4 ° C, hasta ser analizada. Los niveles de proteinuria se determinaron a través de la utilización de tiras reactivas el día de la obtención de la muestra y utilizando el método cuantitativo de precipitación (Biuret), que se describe brevemente a continuación (40).

Método de Biuret para cuantificación de proteínas.

Se mezclaron 40 µl de orina con 2 ml de NaOH al 10%, 560 µl de agua destilada, 100 µl de desoxicolato de sodio al 0.4% y 100 µl de CuSO₄. La muestra se mezcla en el vortex por 10 segundos y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se realiza la medición de las proteínas por medio de espectrofotometría a 540 nm utilizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina.

Se consideró como proteinuria a aquellos valores por arriba de los niveles basales normales, es decir los niveles de proteinuria que los animales presentaban el día 0, antes de la primera inyección.

D.- ESTUDIOS MORFOLOGICOS:

Los animales fueron sacrificados (previa nefrectomía derecha en fresco, sin fijador) por medio del método de perfusión-fijación in situ del riñón izquierdo con MJK2, (fijador modificado de Karnovski consistente en formaldehído-para- formaldehído), bajo anestesia con Pentobarbital Sódico (Thiopental, Abbot Laboratories de México, S.A. de C. V.). El riñón derecho fue cubierto con un crioprotector (Tissue Teck, Laboratorios Milles) y congelado a -20° C en el criostato. Ya congelado se trasladó a la ultra congeladora para su conservación a -75° C, hasta ser utilizado. Del riñón izquierdo se tomaron muestras para microscopía de luz, inmunohistoquímica en tejido fijado y microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Para el procesamiento de tejidos para inmunofluorescencia, microscopía de luz y microscopía electrónica se utilizaron métodos estandarizados de rutina (37). La IF directa se realizó en cortes por congelación a 4 micras, incubados con anticuerpos comerciales unidos a isotiocianato de fluoresceína dirigidos contra IgG de rata (37) (Caltag Laboratories Inc. San Francisco California, E. U. A.)

Se estudió además el bloque pulmonar. Los pulmones fueron perfundidos por vía transtraqueal con fijador (MJK2). Los cortes representativos se procesaron para microscopía de luz de acuerdo a técnicas de rutina (37) y fueron incluidos en parafina. Los cortes a 4μ se tiñeron con HE, PAS y Mallory. Se procesaron cortes de pulmón para estudio de microscopía electrónica.

FIJADORES:

Para los estudios morfológicos del material fijado se utilizó como fijador MJK2, una mezcla de para-formaldehído / glutaraldehído en amortiguador de cacodilatos (2% de para-formaldehído y 2.5% de glutaraldehído en una solución amortiguador 0.1M de cacodilatos/HCL, pH 7.4)

ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

Las muestras de tejido renal de los pacientes se estudiaron también con inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpos comerciales para determinar la expresión de una serie de moléculas que podrían estar relacionadas con la producción del daño a la célula epitelial visceral. Los inmunomarcadores que se realizaron en las biopsias renales son: Bcl2, CD68, CD45, y Parvovirus B-19.

En los cortes de tejido pulmonar se realizaron los siguientes inmunomarcadores: CD45, CD45RA, CD45RO, CD68.

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA SISTEMA ABC (37):

- 1.- Se desparafinaron las laminillas en el horno caliente. Los cortes estaban incluidos en parafina con punto de fusión menor a 60°C para evitar que se desnaturalicen los sitios antigénicos (Merck, México). Las laminillas se hidrataron en agua destilada.
- 2.- Se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno por 30 minutos.
- 3.- Se rehidrataron las laminillas en dos cambios de agua destilada.
- 4.- Se colocaron las laminillas en amortiguador de fosfatos (PBS) durante 2 minutos.
- 5.- Se realizó digestión enzimática para descubrir sitios antigénicos utilizando tripsina, pepsina o pronasa. Se colocó la enzima 20 minutos a temperatura ambiente o 10 minutos a 37° C.
- 6.- Se enjuagaron las laminillas con PBS y se incubaron con suero normal de la misma especie que el anticuerpo puente por 30 minutos. Después de este tiempo se drenaron las laminillas.
- 7.- Se limpió el exceso de líquido, se marcó un círculo alrededor del tejido con un marcador indeleble graso y se incubó con el anticuerpo primario en una cámara húmeda durante 12 horas a 4° C.

- 8.- Se enjuagaron las laminillas con PBS.
- 9.- Se secó el exceso de líquido y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado por 12 horas a 4° C, en una cámara húmeda.
- 10.- Se enjuagaron las laminillas en PBS.
- 11.- Se secó el exceso de líquido y se aplicó el complejo avidina-biotina por 30 minutos a temperatura ambiente, en la cámara húmeda.
- 12.- Se enjuagaron las laminillas con PBS, se secó el exceso de líquido y se agregó la diaminobencidina (DAB). Se observó el revelado bajo el microscopio.
- 13.- Para detener la reacción se colocaron las laminillas en dos cambios de agua destilada.
- 14.- Las laminillas se contrastaron con hematoxilina, alcoholes y xilol.
- 15.- Se cubrieron con resina Entellan y se observaron al microscopio.

MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (37).

La muestra se procesó inmediatamente para evitar su deterioro.

Se cortaron muestras de tejido no mayores a 2mm de diámetro y se fijaron con Parafor G (para formaldehído al 4% con 1% de glutaraldehído con un pH de 7.4). Las muestras se postfijaron en tetróxido de Osmio. Todos los cortes se llevaron a fino y semifino.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados del protocolo de inyecciones del suero total y fraccionado de pacientes con GC y de individuos sanos se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar de la proteinuria de 24 horas en todos los grupos durante 5 días del período de observación y las cifras basales del día 0. La importancia estadística se calculó con la prueba de t (Sigma Stat Versión 2.1). El valor de P de dos colas se fijó a <0.05 .

RESULTADOS.

Pacientes.

Los pacientes seleccionados para el estudio reunieron los criterios histopatológicos y clínicos diagnósticos de GC (1) o EFyS. Todos los pacientes estuvieron de acuerdo en participar en este estudio. El protocolo se registró y estuvo aprobado tanto como por el Comité de Ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez como por CONACYT y DGAPA / PAPIIT UNAM. Las características clínicas y hallazgos histopatológicos de las biopsias de los pacientes se presentan en las tablas 1 y 2. Las muestras de suero para el estudio se tomaron entre 1 semana y 30 días después de haber confirmado el diagnóstico por medio de la biopsia renal.

Resultados del análisis de la proteínas y eluidos de la proteína A

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas eluidas de la proteína unida a agarosa-A o de las obtenidas por fraccionamiento para demostrar que la proteína aislada correspondía a IgG calculando el peso molecular y comparando las bandas obtenidas con IgG comercial (Sigma) utilizada como control con un peso de (150 KD) (Fig. 1).

Efectos de la inyección del suero total o IgG aislada en pacientes con GC, EFyS o individuos sanos sobre la función renal y la excreción urinaria de proteínas.

Se utilizaron los valores de la excreción urinaria de creatinina y la creatinina sérica de cada grupo para calcular la depuración de creatinina en ml/min. (41) como una evaluación indirecta de la función renal. Los resultados mostraron que en las ratas inyectadas con suero de paciente con GC ya sea en forma nativa o la IgG purificada (grupos 4, 7 y 10) tuvieron disminución en la depuración de creatinina comparado con los grupos que recibieron suero o IgG de individuos sanos pacientes con EFyS o solución salina $p < 0.0001$. Estos resultados se muestran en la tabla 4.

La excreción urinaria de proteínas en las ratas inyectadas con suero o IgG aislada de pacientes con GC mostró ser estadísticamente significativa ($p = 0.0001$ y $p < 0.00001$ respectivamente), comparado con las ratas que recibieron el suero de individuos sanos las

cuales no desarrollaron proteinuria. Los resultados de la excreción urinaria de proteínas en los 11 grupos se muestran en las gráficas de la Fig. 2

Grupo 1.- (sin inyecciones) Los niveles de proteinuria fueron similares a los basales (día 0) durante los 5 días del período de observación.

Grupo 2.- (solución salina NaCl 0.9%) Los niveles de proteinuria permanecieron en los niveles basales (similares a los del día 0), durante los 5 días de observación.

Grupo 3.- (suero de individuos sanos **HS**) Las ratas de este grupo no mostraron proteinuria durante los 5 días de observación por lo que permanecieron en niveles similares al día 0.

Grupo 4.- (suero de pacientes con **GC** en forma nativa sin adsorción o fraccionamiento). Las ratas pertenecientes a este grupo presentaron proteinuria 24 horas después de la primera inyección (50.0 ± 6.3 mg/día) y la excreción de proteínas aumentó a 99.2 ± 42 mg/día ($p < 0.001$, comparado con las cifras basales).

Grupo 5.- (suero de pacientes con esclerosis focal y segmentaria primaria, no colapsante **EFyS**). Las ratas no desarrollaron proteinuria y la excreción urinaria de proteínas fue similar a las cifras basales durante los 5 días del período de observación.

Grupo 6.- (**suero sin IgG de HS**). Las ratas no desarrollaron proteinuria y la excreción urinaria de proteínas fue similar a las cifras basales durante los 5 días del período de observación.

Grupo 7.- (**suero sin IgG de pacientes con GC**). Las ratas de este grupo desarrollaron niveles bajos de proteinuria los días 4 y 5 (30.9 ± 11 , $p < 0.001$ comparado con la basal).

Grupo 8.- (**suero sin IgG de pacientes con EFyS**). Las ratas de este grupo no mostraron proteinuria por lo que sus niveles al día 5 eran similares a los basales

Grupo 9.- Ratas que se inyectaron con **IgG aislada del suero de HS**. Las ratas de este grupo no mostraron proteinuria por lo que sus niveles al día 5 eran similares a los basales (día 0).

Grupo 10.- (**IgG aislada del suero de pacientes con GC**). Las ratas desarrollaron niveles medios de proteinuria el día 3 y el día 5 la excreción fue de 46.5 ± 8.4 ($p < 0.001$ comparado con la basal).

Grupo 11.- (**IgG aislada del suero de pacientes con EFyS**). Las ratas de este grupo no mostraron proteinuria por lo que sus niveles al día 5 eran similares a los basales (día 0).

Hallazgos histopatológicos.

Se analizó un promedio de 150 glomérulos por rata para la microscopía de luz. Para la microscopía electrónica se evaluó un promedio de 5 glomérulos por muestra.

Las ratas que recibieron inyecciones de suero de pacientes con GC en cualquiera de sus formas (grupos 4, 7, 10) presentaron retracción del ovillo glomerular por microscopía de luz y obliteración o aplanamiento de los procesos podocíticos en la microscopía electrónica (Fig. 3). Las ratas que recibieron solución salina y las que recibieron suero de EFyS o individuos sanos, no mostraron alteraciones histopatológicas. El análisis detallado de los hallazgos histopatológicos en los 11 grupos de ratas se presenta en la tabla 4 y las fotomicrografías en la figura 3.

La inmunofluorescencia directa contra IgG de rata fue negativa para la presencia de complejos inmunes en todos los grupos, pero mostró positividad lineal en la membrana basal de los capilares glomerulares mostrando hiperfiltración en los grupos de ratas que recibieron suero de pacientes con GC en cualquiera de sus formas.

Estudio histopatológico del tejido pulmonar.

Se evaluaron las alteraciones pulmonares en dos grupos de ratas: Grupo 1, ratas que recibieron suero de pacientes con GC en su forma nativa y Grupo 2, ratas que recibieron suero total de individuos sanos.

Grupo 1.- Los cortes histológicos de pulmón mostraron expansión intersticial por la presencia de un infiltrado inflamatorio mononuclear compuesto por linfocitos y monocitos. Estos cambios se observaron en todas las muestras pulmonares pertenecientes a este grupo. El infiltrado inflamatorio era más abundante en sitios peribronquiales en donde formaba verdaderos nódulos linfoides que se extendían hasta el epitelio respiratorio con ruptura de la membrana basal. Estas alteraciones también se observaron en los cortes estudiados con microscopía electrónica de barrido. En dos casos se encontraron nódulos linfoides de localización subpleural. No se observaron bronquiectasias, bronquiolectasias, fibrosis bronquiolar o neumonía.

Grupo 2.- No se encontraron alteraciones en las muestras de tejido pulmonar en ninguna de las ratas pertenecientes a este grupo. La microscopía de luz mostró una arquitectura pulmonar normal con ausencia total de infiltrado inflamatorio. Los cortes con microscopía electrónica de barrido tampoco mostraron alteraciones.

DISCUSIÓN.

Con el objeto de estudiar los efectos de la inyección del suero sobre la producción de proteinuria y el daño histopatológico, en este estudio se inyectó el suero de los pacientes con diagnóstico clínico-patológico de glomerulopatía colapsante (GC) a ratas Sprague-Dawley utilizando como control el suero de pacientes con glomeruloesclerosis focal y segmentaria no colapsante (EFyS) y suero de individuos sanos del Banco de sangre, apareados por sexo y edad.

El suero se administró en una de las siguientes tres maneras:

- 1.- En su forma nativa (sin adsorción o fraccionamiento)
- 2.- La IgG aislada del suero por medio cromatografía con agarosa-A (eluciones)
- 3.- El suero restante, sin IgG, extraída por medio de cromatografía con agarosa-A.

Los resultados mostraron claramente que la inyección del suero de los pacientes con GC a ratas Sprague-Dawley, en cualquiera de las tres maneras mencionadas anteriormente, indujo proteinuria y daño de las células epiteliales viscerales.

Se ha propuesto que los pacientes con daño de las células epiteliales viscerales con patrón morfológico de glomerulopatía de cambios mínimos (CMG) o con diagnóstico clínico de esclerosis focal y segmentaria (EFyS) que presentan recidiva del síndrome nefrótico postrasplante podrían presentar factores circulantes responsables del daño a las células epiteliales viscerales (19,43). Con respecto a los pacientes con GC, un estudio elegante realizado *in Vitro* demostró que algunos factores circulantes presentes en el suero de los pacientes con GC pueden producir cambios en la permeabilidad glomerular cuando se utilizan glomérulos aislados incubados con el suero de los pacientes con GC (21). Sin embargo hasta el momento no se habían realizado estudios *in vivo* que mostraran claramente la evidencia del daño histopatológico a la célula epitelial visceral secundario a

la presencia de factores circulantes en pacientes con diagnóstico específico de GC. En apoyo a la evidencia de la presencia de factores circulantes en pacientes con GC se ha identificado ya la recidiva temprana de la GC en pacientes trasplantados. El tiempo de recidiva informado en la literatura en diferentes series varía entre 4 y 26 semanas (17,21), basado en la presencia de proteinuria en el examen general de orina pero este descubrimiento depende primordialmente de si se realiza o no la biopsia renal. Algunos estudios han informado de recidiva de la enfermedad 144 meses postrasplante, después de que se tomó una biopsia renal por otras causas (45). La hipótesis de los factores circulantes también ha sido apoyada por la observación de que la plasmaféresis y la adsorción proteica en una columna con proteína A, a menudo disminuye la excreción urinaria de proteínas en pacientes con síndrome nefrótico recidivante (45). El efecto sobre la proteinuria es sin embargo transitorio y después de algunas pocas semanas los pacientes tienen recidiva de los síntomas (17,19). Por lo tanto, la posibilidad de que los pacientes con GC tengan factores circulantes capaces de alterar la permeabilidad glomerular a las macromoléculas se ha sugerido de manera repetida por diferentes autores (2, 5, 6,17).

Algunos estudios sobre la utilidad de la plasmaféresis para el tratamiento de la EFyS recidivante en el injerto han mostrado que este método reduce la proteinuria y el daño glomerular (29). En este último estudio la plasmaféresis redujo la proteinuria de un promedio de 12 ± 7.46 g/24 horas a 5.1 ± 7.43 g/24 horas, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) (29). La demostración del papel que juegan los factores circulantes en la patogénesis del daño glomerular en la GC podría ser de gran utilidad ya que el tratamiento sistemático con plasmaféresis podría ayudar no solo a reducir la proteinuria sino que si dicho tratamiento se administrara de manera temprana los pacientes podrían evitar el deterioro progresivo de la función renal que produce, entre otros factores, el mantener cifras elevadas de proteinuria.

Aunque no se ha demostrado alguna evidencia de que las inmunoglobulinas jueguen algún papel en la producción de proteinuria en el síndrome nefrótico recidivante, algunos estudios han propuesto que la IgG podría inducir la producción de proteinuria en la EFyS que se presenta en el trasplante como síndrome nefrótico recidivante (19). Estos estudios han demostrado la disminución de la excreción urinaria de proteínas en pacientes con

síndrome nefrótico recidivante posterior a la adsorción con Proteína A. Es bien conocido que la Proteína A atrapa y se adhiere al dominio constante de algunas inmunoglobulinas (19). En el presente estudio las ratas que fueron inyectadas con IgG aislada de pacientes con GC (Grupo 10), desarrollaron proteinuria leve (46.5 ± 8.4 mg/día), comparado con aquellas ratas inyectadas con suero total de pacientes con GC (Grupo 4) que mostraron niveles significativos de proteinuria al día 5 (99.2 ± 42 mg/día). También es importante mencionar que las ratas que recibieron suero de pacientes con GC sin IgG también mostraron proteinuria aunque en menor cantidad (30.9 ± 11 mg/día). Esta observación es muy interesante ya que sugiere que los factores responsables de la producción de proteinuria en los pacientes con GC se encuentran no solo unidos a la IgG sino que otros factores presentes de manera libre en el suero también juegan un papel importante en el desarrollo de la proteinuria. Estos hallazgos también apoyan la hipótesis de que existe más de un factor responsable de la alteración de la permeabilidad glomerular y que por lo tanto, la administración de todos los factores en conjunto, como sucedió en el Grupo 4 que recibió el suero en su forma nativa, produce mucho mayor proteinuria que cuando el suero se administra fraccionado (Grupos 7 y 108). Se ha descrito que los eluidos de la agarosa-A contienen otras proteínas además de la IgG (5). En este estudio se analizó el material eluido por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio al 5 y 10% bajo condiciones reductoras y no reductoras para medir el peso molecular de la IgG aislada. La inmunotransferencia de esos geles mostró una banda proteica similar ala banda de IgG comercial que se utilizó como control y no se identificaron otras bandas proteicas.

Los hallazgos histopatológicos en los diferentes grupos de ratas mostraron claramente la presencia de daño a las células epiteliales viscerales con obliteración de procesos podocíticos a nivel ultraestructural en todas las ratas que recibieron suero de pacientes con GC comparado con las ratas que recibieron suero pacientes con EFyS no colapsante o suero de individuos sanos. No hubo diferencia en el tipo de daño histológico entre los tres grupos que recibieron suero de pacientes con GC (Grupos 4, 7 y 10), sin embargo en el grupo 4 (suero de pacientes con GC en forma nativa), hubo mayor retracción y colapso del ovillo glomerular y la obliteración de procesos podocíticos era más extensa en la microscopía electrónica. Por medio de microscopía electrónica no fue posible demostrar

la presencia de plegamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares, vacuolas hialinas en las células epiteliales viscerales o estructuras tubuloreticulares en el endotelio en ninguno de los casos. Debido a los hallazgos histológicos mencionados, las ratas que recibieron suero de pacientes con GC en cualquiera de sus formas desarrollaron una alteración histopatológica similar a la descrita en la enfermedad de cambios mínimos en donde clásicamente se observa proteinuria y obliteración de procesos podocíticos. Esta es una observación importante ya que en algunos trabajos se ha propuesto que existe una relación entre la enfermedad de células epiteliales viscerales de tipo cambios mínimos, la glomérulo esclerosis focal y segmentaria y la glomerulopatía colapsante en donde pudieran existir mecanismos comunes en su patogénesis. Aunque son enfermedades que tienen un curso clínico totalmente diferente, podrían representar un espectro de la misma enfermedad.

La caracterización precisa de las propiedades bioquímicas y la naturaleza de los factores circulantes implicados en el desarrollo de daño glomerular y proteinuria en la GC requiere de estudios posteriores. En este momento hablar de la naturaleza de dichos factores sería especulativo. Sin embargo los resultados de este trabajo muestran evidencia suficiente para apoyar la presencia de estos factores y el hecho de que una fracción de estos factores se une a la proteína A. Ya que una parte importante de los factores responsables del daño glomerular se une a la proteína A, otra aportación de este estudio es que justifica la utilización de plasmaféresis con proteína A para el tratamiento de pacientes con GC con enfermedad activa y para evitar la recidiva en el injerto renal. Otra aportación de este trabajo es que los pacientes con otras variedades de EFyS como los pacientes con EFyS no colapsante tipo I que se analizaron en este estudio, no presentan factores circulantes. Es interesante mencionar que en la literatura se han realizado estudios sobre factores circulantes en pacientes catalogados como presentadores de un “síndrome nefrótico recidivante” pero en donde no se han separado por los hallazgos histopatológicos de las biopsias de los pacientes. En la mayoría de estos trabajos no se proporciona la información de la biopsia o esta es muy general. Por lo tanto otra conclusión importante es que seguramente existen diferentes variedades de EFyS no solo desde el punto de vista morfológico sino desde el punto de vista de la patogénesis de la enfermedad.

TABLA 1A. Características clínicas de 10 pacientes con GC

Característica	1(p)	2(p)	3(p)	4(p)	5(p)	6(p)	7(p)	8(p)	9(p)	10(p)
Edad (años)	70	21	17	52	41	56	19	29	23	32
Género	F	F	F	F	M	M	M	M	M	M
TA (mmHg)	90/60	130/90	150/100	150/85	150/95	140/80	115/75	145/90	170/125	144/95
SCr mg/dl	1.6	7.3	2	1	0.8	2.9	0.9	1.53	1.7	1
BUN mg/dl	15	25	24	22	9	29	14	32	32	18
DCr ml/min*	29.6	5.8	25.5	47.6	96.3	26.4	105	54.2	37.1	82.6
U prot. G/day	15.00	10.00	14.00	12.00	12.70	10.00	11.00	10.00	12.30	14.00
Col mg/dl	269	134	418	341	362	246	213	363	239	226
TG mg/dl	103	162	737	181	452	327	120	243	107	132
S Alb g/d	1.9	0.9	1.4	2	2.1	4.6	3.4	4.3	1.6	3.3

(p) = Paciente, TA cifras de tensión arterial, S Cr= creatinina sérica, DCr.= depuración de creatinina, U prot= proteinuria, Col= colesterol, TG= triglicéridos, S Alb = albumina sérica. * DCr expressed in ml/min/ 1.73m². por el método de Levey (Ann Intern Med 1999, 130: 461-470)

TABLA 1B. Hallazgos histopatológicos en 10 pacientes con GC

	1(p)	2(p)	3(p)	4(p)	5(p)	6(p)	7(p)	8(p)	9(p)	10(p)
Microscopía luz										
No.de glomeruli	18	20	20	12	11	16	10	18	23	20
Colapso global(%)	10	0	10	25	10	25	0	10	20	0
Colapso Seg (%)	0	20	20	0	10	0	25	20	10	25
VEC daño (%)	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100
Esclero Seg..(%)	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0
Esclero. Global (%)	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10
Fibrosis inters. *	0	I	I	0	I	I	I	II	I	II
Hialinosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrofia tubular *	0	I	I	0	I	I	I	II	I	I
quiste tubular **	0	0	0	0	0	0	0	I	0	I
Inmunofluorescencia										
Directa	Neg.	I+IgM	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	I+IgM	Neg.
Microscopía electrónica	nd	EE	FE	EE	EE	EE	nd	EE	FE	EE

(p) = Paciente, Seg.= segmentario, VEC daño = hipertrofia, vacuolas, esclero.= esclerosis, I+IgM= I+/3+ depósito mesangial de IgM, nd= no realizada, EE daño extenso de procesos podocitoc, FE= Daño focal de los procesos podocíticos

* Evaluación de la fibrosis intersticial/atrofia tubular 0 = <10%, Grado I = >10% <25% del área cortical, Grado II = >25% <40% del área cortical, Grado III = >40% del área cortical.

** Evaluación de la dilatación quística tubular. 0 = negativa, I = >10% <25% del area cortical.

TABLA 2A. Características clínicas de 10 pacientes con EFyS no colapsante

Característica	1(p)	2(p)	3(p)	4(p)	5(p)	6(p)	7(p)	8(p)	9(p)	10(p)
Edad (años)	36	37	55	23	22	22	37	39	19	26
Género	M	M	M	F	F	F	F	M	M	F
TA mm/Hg	150/90	160/100	180/110	110/60	120/70	148/96	160/120	196/112	150/100	220/130
SCr mg/dl	2.2	1.5	1.2	2.5	0.7	2.5	2.5	1.5	3.0	0.9
BUN mg/dl	27	22	22	32	18	19	27	22	29	16
DCr ml/min*	37	52.4	59.3	25.5	71.4	26.9	23.5	56.7	29.6	81.1
U prot. G/day	5.7	8.3	3.4	3.0	6.0	3.5	3.1	3.0	5.4	3.1
Col mg/dl	202	273	260	270	645	269	287	272	283	297
TG mg/dl	195	202	184	260	685	305	282	252	208	154
S Alb g/dl	4.2	3.4	3.1	3.9	1.3	3.4	3.6	4.5	4	4.4
Tratamiento	ACE	P,ACE	ACE	ACE	ACE	ACE	P,ACE	P,ACE	P,ACE	P,ACE

(p) = Paciente, TA= cifras de tension arterial, S Cr= creatinina sérica, DCr. = depuración de creatinina, U prot= proteinuria, Col= colesterol, TG= triglicéridos, S Alb = albumina sérica. P= pravastatina, ACE= Inhibidos de la enzima convertidora de angiotensina

* DCr expressed in ml/min/ 1.73m². Por Levey method (Ann Intern Med 1999, 130: 461-470)

TABLA 2B. Hallazgos histopatológicos en 10 pacientes con EFyS no colap.

	1(p)	2(p)	3(p)	4(p)	5(p)	6(p)	7(p)	8(p)	9(p)	10(p)
Microscopía luz										
No.de glomeruli	8	18	29	7	15	10	6	11	18	14
Colapso Global (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colapso Seg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VEC daño. (%)	25	100	30	30	100	100	100	20	100	30
Esclero Seg. (%)	20	30	30	10	30	20	10	10	30	20
Esclero.Global (%)	10	0	10	0	0	10	0	0	10	0
Fibrosis Int. *	I	II	II	I	II	I	I	I	I	I
Hialinosis(%)	20	20	30	0	10	0	0	0	20	0
Atrofia Tubular *	I	II	II	0	I	I	I	I	I	I
Quiste Tubular **	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inmunofluorescencia										
directa	Neg.	1+IgM	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	1+IgM	Neg.	
Microscopía										
electrónica	nd	EE	FE	EE	EE	EE	nd	EE	FE	EE

(p) = Paciente, Seg.= segmentario, VEC daño = prominencia de las células epiteliales viscerales, esclero.= esclerosis, 1+IgM= 1+/3+ depósito mesangial de IgM, nd= no realizada, EE daño extenso de procesos podocíticos, FE= Daño focal de los procesos podocíticos

* Evaluación de la fibrosis intersticial/atrofia tubular 0 = <10%, Grado I = >10% <25% del área cortical, Grado II = >25% <40% del área cortical, Grado III = >40% del área cortical.

** Evaluación de la dilatación quística tubular. 0 = negativa, I = >10% <25% del área cortical.

TABLA 3

Resultados de la excreción urinaria y sérica de creatinina y depuración de creatinina.

Grupo	Peso	uCr mg/dl	sCr mg/dl	DCr ml/min
1 control	270±1g	$1.4 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-6} \pm 4.0 \times 10^{-7}$	1.29 ± 0.09
2 saline	277±2g	$1.5 \times 10^{-4} \pm 3.6 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-6} \pm 2.6 \times 10^{-7}$	1.01 ± 0.33
3 S.HS.	272±2g	$1.5 \times 10^{-5} \pm 3.2 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-6} \pm 4.1 \times 10^{-7}$	0.77 ± 0.15
4 S. GC	275±2g	$9.5 \times 10^{-5} \pm 2.5 \times 10^{-5}$	$2.2 \times 10^{-6} \pm 5.9 \times 10^{-7}$	$0.32 \pm 0.09^{**}$
5 S.EFyS	271±1g	$2.3 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-6} \pm 5.5 \times 10^{-8}$	0.56 ± 0.07
6 S.HS No IgG	270±1g	$1.9 \times 10^{-4} \pm 3.2 \times 10^{-5}$	$9.3 \times 10^{-7} \pm 2.1 \times 10^{-7}$	1.55 ± 0.40
7 S GC No IgG	273±1g	$1.1 \times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-6} \pm 2.3 \times 10^{-7}$	$0.68 \pm 0.19^{**}$
8 S.EFyS No IgG	278±3g	$1.2 \times 10^{-4} \pm 2.8 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-6} \pm 0$	$0.86 \pm 0.20^*$
9 IgG HS	275±2g	$1.8 \times 10^{-4} \pm 3.0 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-6} \pm 1.1 \times 10^{-7}$	1.20 ± 0.68
10 IgG GC	272±1g	$1.1 \times 10^{-4} \pm 1.8 \times 10^{-5}$	$2.2 \times 10^{-6} \pm 3.7 \times 10^{-7}$	$0.43 \pm 0.09^*$
11 IgG EFyS	275±2g	$1.1 \times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-6} \pm 0$	0.81 ± 0.21

* $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.02$ del suero de GC y EFyS versus HS. Resultados expresados en Promedio±SD. **S.HS**= suero de individuos sanos, **S GC**= suero de pacientes con glomerulopatía colapsante, **S EFyS**= suero de pacientes con esclerosis focal y segmentaria. **S.HS no IgG**= suero de individuos sanos sin IgG, **S. GC no IgG**= suero de paciente con GC sin IgG, **S EFyS no IgG**= suero de paciente con EFyS sin IgG. **IgG HS** = IgG aislada de individuos sanos. **IgG GC**= IgG aislada de pacientes con GC. **IgG EFyS**= IgG aislada de paciente con esclerosis focal y segmentaria.

TABLA 4. Hallazgos histopatológicos en los 11 grupos

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Microscopía de luz											
No.de glomeruli	120	137	143	144	130	123	140	144	150	138	130
Global retrac. (%)	0	0	0	25	0	0	20	0	0	20	0
Colapso Seg. (%)	0	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0
VEC prom. (%)	0	0	0	50	0	0	30	0	0	25	0
Esclero Seg. (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esclero Global. (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis Inters. *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis Tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg. lineal	Neg.	Neg.	Neg. lineal	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.Neg. lineal
ME	nl	nl	nl	EE	nl	nl	FE	0	0	FE	nl

No. de glomeruli= promedio de glomérulos presentes en un corte central de riñón completo. Global Retrac= Retracción global del ovillo glomerular expresada en %. de glomeruli afectados. Seg.= segmentario, VEC prom. = prominencia de las células epiteliales viscerales, Esclero.= esclerosis, nl= normal.

IF= inmunofluorescencia directa contra IgG de rata negativa para depósito de complejos inmunes pero con positividad lineal a lo largo de la membrana basal glomerular. **FE**= obliteración extensa de procesos podocíticos. **EE** = obliteración focal de procesos podocíticos.

Figura 1

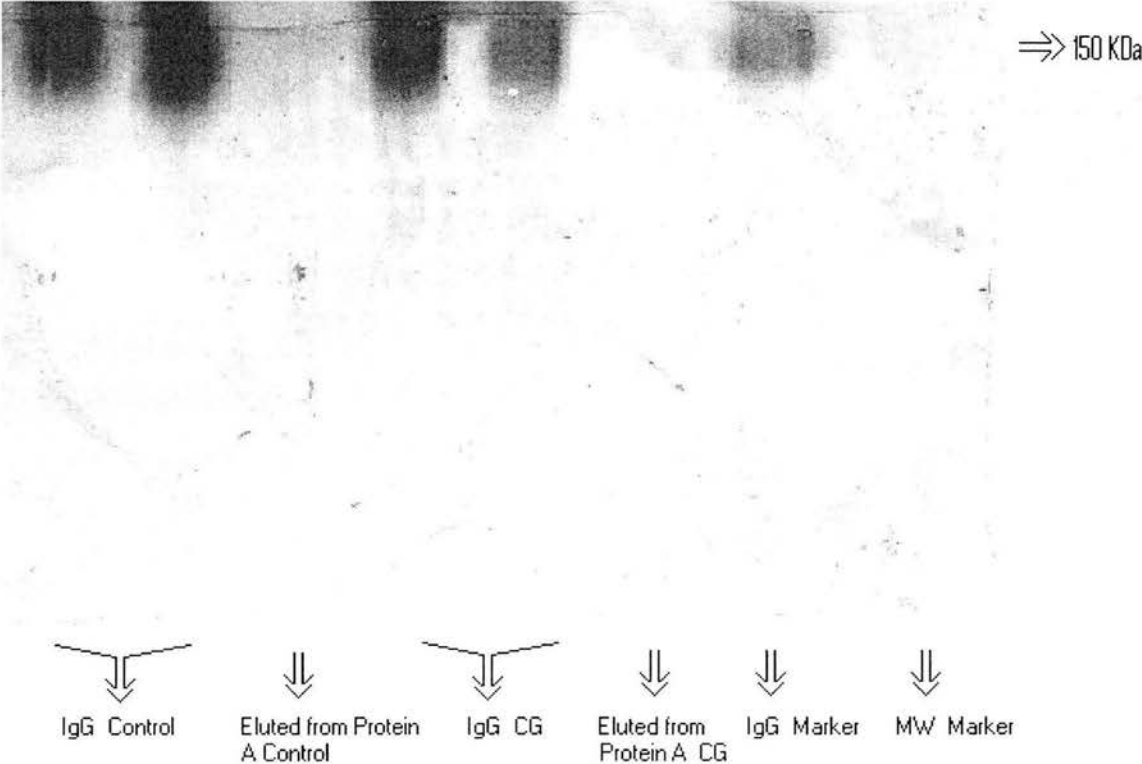


Figure 2

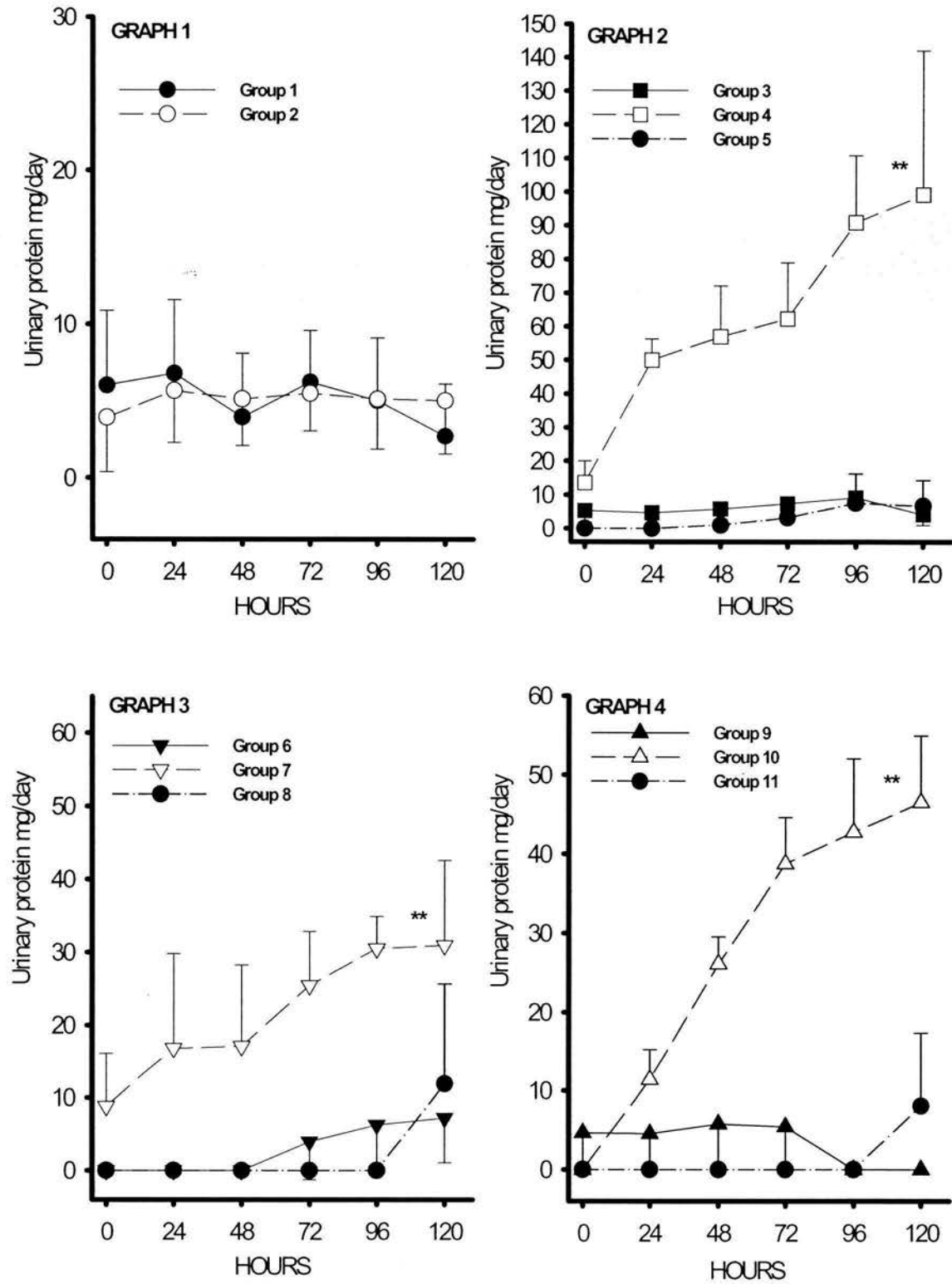


Figure 3

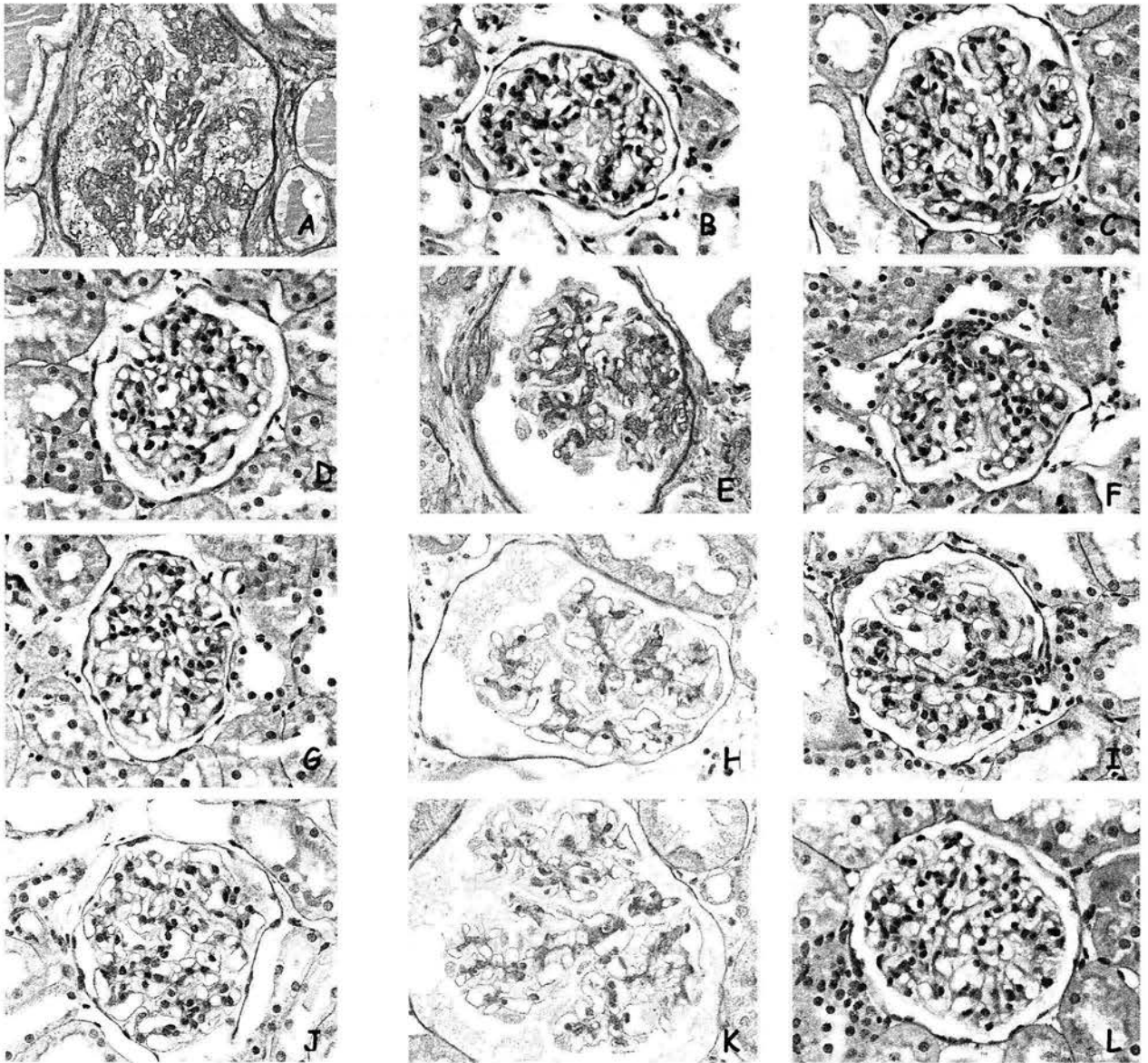
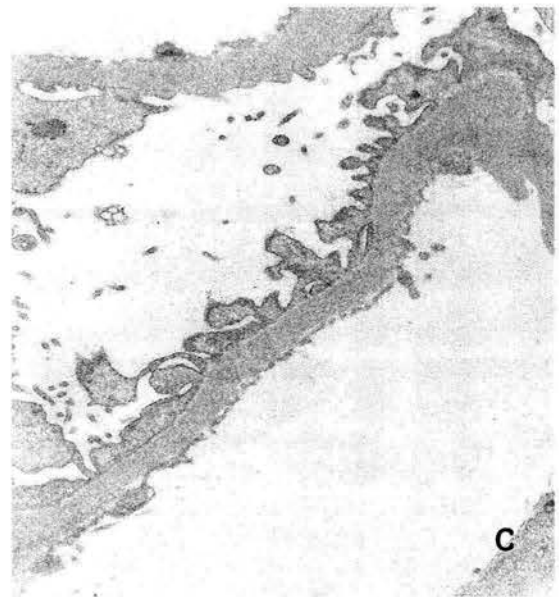
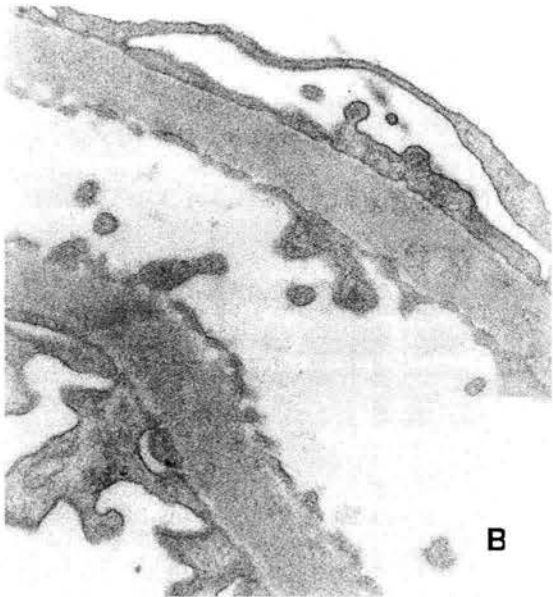
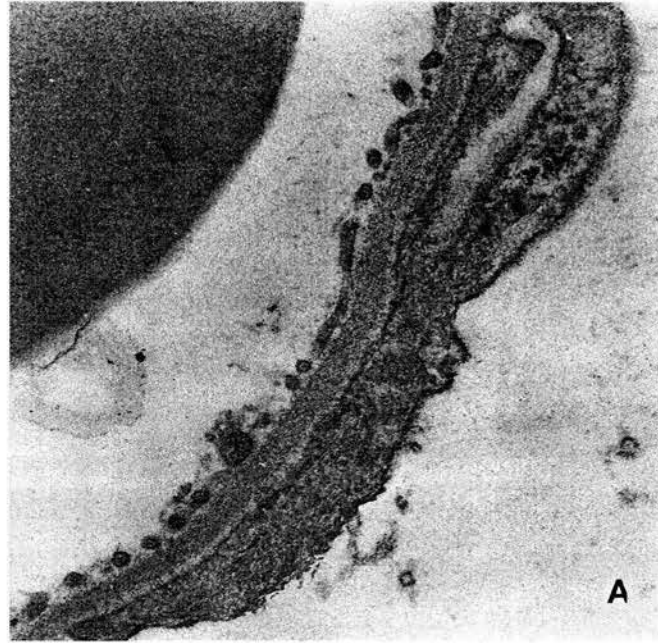


Figure 4



Pies de figura.

Figura 1.- Las primeras dos columnas muestran la IgG aislada de individuos sanos obtenido por el método de precipitación alcohólica. La tercera columna presenta el suero de individuos sanos sin IgG. Las columnas cuatro y cinco muestran la IgG aislada de pacientes con GC y de EFyS respectivamente. La columna seis muestra el suero de paciente con GC después del fraccionamiento con agarosa-A. La columna siete muestra un marcador comercial para IgG (150 KD). La columna nueve muestra un marcador comercial de peso molecular MW, sin IgG.

Figura 2.- Excreción urinaria de proteínas.

Gráfica 1.- La excreción urinaria de proteínas de las ratas de los grupos 1 y 2 permaneció en cifras similares a las basales durante los 5 días de observación.

Gráfica 2.- Esta gráfica compara la excreción urinaria de proteínas entre los grupos 3,4 y 5. La excreción urinaria de proteínas de las ratas con suero de GC en forma nativa está aumentada desde las primeras 24 horas después de la primera inyección. Las ratas que recibieron suero de voluntarios sanos o de pacientes con EFyS no mostraron proteinuria.

Gráfica 3.- Las ratas de los grupos 6 y 8 no desarrollaron proteinuria mientras que las ratas que recibieron suero sin IgG de pacientes con GC alcanzaron niveles significativos de proteinuria al día 5, comparado con la basal.

Gráfica 4.- Las ratas de los grupos 9 y 11 no desarrollaron proteinuria pero las ratas que recibieron la IgG aislada de pacientes con GC tuvieron proteinuria el día 3 postinyección con una elevación discreta al día 5. $p=0.0001$ comparado con la basal.

Figura 3.

3A.- Microscopía de luz de paciente con glomerulopatía colapsante que muestra la imagen característica con retracción del ovillo glomerular e hipertrofia de las células epiteliales viscerales. (400X)

3B.- Rata del grupo 1 (sin inyecciones) sin alteraciones a la microscopía de luz (PAS 600X).

3C.- Rata del grupo 2 sin alteraciones. (PAS 600X)

3D.- Rata del grupo 3 (suero individuos sanos) Sin alteraciones a la microscopía de luz. (PAS 600X).

3E.- Rata del grupo 4 (Suero de GC forma nativa) con retracción global del ovillo glomerular, edema de las células epiteliales viscerales y colapso capilar. (PAS 600X).

3F.- Rata del grupo 5 (suero nativo de EFyS) Sin alteraciones a la microscopía óptica. (PAS 600X).

3G.- rata del grupo 6 (suero nativo de individuo sano) sin alteraciones. (PAS 600X).

3H.- Rata del grupo 7 (suero de GC sin IgG) con prominencia de las células epiteliales viscerales y retracción segmentaria del ovillo capilar. (PAS 600X).

3I.- Rata del grupo 8 (suero de EFyS sin IgG) sin alteraciones a la microscopía de luz. (PAS 600X).

3J.- Rata del grupo 9 (IgG se individuos normales), sin alteraciones. (PAS 600X).

3K.- Rata del grupo 10 (IgG aislada de GC) con retracción parcial del ovillo glomerular y prominencia de los podocitos. (PAS 600X).

3L.- Rata del grupo 11 (IgG aislada de EFyS) sin alteraciones histológicas glomerulares. (PAS 600X).

Figura 4.-

A.- Estudio ultraestructural que muestra una asa capilar de un glomérulo de una rata del grupo que recibió suero total en forma nativa de paciente con GC que muestra obliteración de procesos podocíticos.

B.- Estudio ultraestructural de asa capilar de una rata que recibió suero sin IgG de paciente con GC que muestra obliteración parcial de procesos podocíticos.

C.- Estudio ultraestructural de asa capilar de rata que recibió IgG aislada del suero de paciente con GC que muestra obliteración parcial de procesos podocíticos.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Weiss MA, Daquiaoag E, Margolin EG, Pollak VE Nephrotic syndrome, progressive irreversible renal failure, and glomerular "collapse". A new clinocopathologic entity. *Am. J Kidney Dis* 1986; 7:20-8.
- 2.- Avila-Casado MC, Galvanek EG, Rennke HG. Collapsing glomerulopathy (CG) developing in the renal allograft. *J. Am. Soc. Nephrol* 1994; 5:994 (abstract).
- 3.- Detwiler RK, Falk RJ, Hogan SL, Jennette HCh. Collapsing glomerulopathy: a clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1994; 45:1416-24.
- 4.- D'Agati V, Suh JI, Carbone L, Cheng JT, Appel G. Pathology of HIV-associated nephropathy: a detailed morphologic and comparative study. *Kidney Int.* 1989; 35: 1358-70.
- 5.- Valeri A, Barisoni L, Appel GB, Seigle R, D'Agati V. Idiopathic collapsing focal segmental glomerulosclerosis: a clinicopathologic study. *Kidney Int* 1996; 50:1734-46.
- 6.- Detwiler RK, Hogan S, Falk RJ, Jennette JCh. Collapsing glomerulopathy (CG) in renal trasplant patients: recurrence and de novo ocurrence *J Am Soc Nephrol*: 1996; 7:1331.
- 7.- Avila-Casado MC, Bochicchio-Riccardelli T, Uribe-Uribe NO, Chew-R, García-Torres R. Collapsing glomerulopathy: a ten-year retrospective histological review. *J. Am Soc Nephrol* (abstract) 1997; 8:92.
- 8.- Crary GS, Gulbahce HE, Crosson JT. Collapsing glomerulopathy (CG): a five-year retrospective histologic and immunohistochemical study. *J Am Soc Nephrol* (abstract) 1996; 7:1771.

- 9.- Smith SR, Suetkey LP, Dennis Va. Racial differences in the incidence and progression of renal diseases. *Kidney Int* 1991; 40: 815-22.
- 10.- Stone HD, Appel RG. Human immunodeficiency virus-associated nephropathy: Current concepts. *Am J Med Sci* 1994; 307:212-17.
- 11.- Meehan SH, Pascual M, Williams WW, Tolckoff-Rubin N, Delmonico FL, Cosimi B, Colvin RB. De novo collapsing glomerulopathy in renal allografts. *Transplantation*, 1998 ; 65: 1192 -97.
- 12.- Danovitch, GM. Immunosuppressive medications and protocols for kidney transplantation En: Danovitch GM ed., *Handbook of Kidney Transplantation*. E.U.A. Little- Brown 1992 ; 67-92.
- 13.- Glasscock RJ, Cohen AH, Danovitch G, Parsa KP. Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection and the Kidney. *Annals of Intern Med* 1990; 112: 35 – 49.
- 14.- Kimmel PL, Ferreira-Centeno A, Farkas-Szallasi T, Abraham AA, Garret CT. Viral DNA in microdissected renal biopsy tissue from HIV infected patients with nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 1993; 43: 1347-52.
- 15.- .- MC, Avila-Casado V, Lafragua- Contreras N, Uribe C, Rodríguez de la P R, Domínguez –Mercado J, Herrera-Acosta. IV Injection of serum from patients with collapsing glomerulopathy (CG) causes proteinuria in the rat. *J Am Soc Nephrol* (abstract), 1998; 9: 83.
- 16.- Habib R, Gagnadoux MF, Broyer M. Recurrent glomerulonephritis in trasplanted children. *Contrib Nephrol* 1987, 55: 123-35.

- 17.- Savin VJ, Sharma R, Sharma M, Ellet T, McCarthy ET, Swam S K et al Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 1996, 334: 878-83.
- 18.- Ritz E.: Pathogenesis of “idiopathic” nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1994, 330; 61-62.
- 19.- Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Kriaa F, Jacques Y, Hurault de Ligny B, Niaudet P, Charpentier B, Soulillou JP. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipient with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med*. 1994, 330; 7-14.
- 20.- Lesavre P, Grünfeld JP. Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis, New lessons from kidney transplantation. *N Engl J Med* 1996, 914-15.
- 21.- McCarthy ET, Sharma R, Sharma J, Jennette JC, Falk RJ. Increased albumin permeability caused by sera from patients with collapsing glomerulopathy and glomerular tip lesion. *J Am Soc Nephrol* 1996, 7:875 (abstract).
- 22.- Artero M, Biava C, Amend W, Tomlanovich S, Vincenti F. Recurrent focal glomerulosclerosis: natural history and response to therapy. *Am J Med* 1992; 92: 375 –83.
- 23.- Habib R: Focal glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1973; 4:355-61.
- 24.- Valeri A, Barisoni L, Seigle R. Predictors of progression in collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4:289 (abstract).
- 25.- Wehrmann M, Bohle A, Held H, Schumm G, Kendziorra H, Pressler H: Long-term prognosis of focal sclerosing glomerulonephritis: An analysis of 250 cases with particular regard to tubulointerstitial changes. *Clin Nephrol* 1990; 33: 115-22.

- 26.- Soriano-Rosas J, Avila-Casado MC, et al. AIDS-associated nephropathy: 5-years retrospective morphologic analysis of 87 cases. *Pathol Res Pract* 1998; 194:567-70.
- 27.- Rich, SA. De novo synthesis and secretion of a 36-kD protein by cells that form lupus inclusions in response to alpha-interferon. *J Clin Invest* 1995; 95:219.
- 28.- Humphreys HM. Human immunodeficiency virus –associated glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1995 ; 48: 311-20.
- 29.- Pekasa NM, Nseka NM, Nyimi LM. Secondary collapsing glomerulopathy associated with loa loa filariasis. *Am J of Kidney Diseases* 1997; 30: 836-83.
- 30.- Moore TL, Bandlamudi R, Alam SM, Nesher G. Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus in a pediatric population. *Semin Arthritis Rheum* 1999, 28: 314-318
- 31.- Moudgil A, Nast CC, Bagga A *et al.* Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 2001, 59: 2126-2133
- 32.- Moudgil A, Shidban H, Nast CC, *et al.* Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients. *Transplantation* 1997, 64:1847-1850
- 33.- Torok TJ. Parvovirus B19 and human disease. *Adv Intern Med* 1992, 37: 431-455
- 34.- Naito S, Kohara M, Arakawa K. Association of class II antigens of HLA with primary glomerulopathies. *Nephron* 1987, 45: 111-1114

- 35.- Avila-Casado MC, Vargas-Alarcón G, Soto ME, Hernández G, Reyes PA, Herrera-Acosta J. Familial collapsing Glomerulopathy: clinical, pathological and immunogenetic features. *Kidney Int.* 2003, 63: 233-239
- 36.- Laurinavicius A, Hurwitz S, Rennke HG. Collapsing glomerulopathy in HIV and non-HIV patients: A clinicopathological and follow-up study. *Kidney Int* 1999, 56: 2203-2213.
- 37.- Zugibe F T, General Techniques in: *Diagnostic Histochemistry*. The C.V. Mosby Company, 1970, Pub. Saint Louis Mo., USA.
- 38.- Taylor JF: The isolation of proteins. In: *The proteins: Chemistry, Biological Activity and Methods*, Vol I, Part A, edited by Neurath H, bailey K, New York, Academic Press, 1953, pp 1-72
- 39.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 . *Nature* 1970, 227: 680-5
- 40.- Gornall AG, Bardawill CJ, David M: Determination of serum proteins by means of Biuret reaction. *J Biol Chem* 1949, 177: 751-766
- 41.- Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin. Chem.* 1992, 38 (10): 1933-53
- 43.- Cheung PK, Klok PA, Bakker WW. Minimal change-like alterations induced by a human plasma factor. *Nephron* 74 (3): 586-93, 1996

44.- Sharma M, Sharma R, Reddy SR, McCathy ET, Savin VJ. Proteinuria after injection of human focal segmental glomerulosclerosis factor *Transplantation* 2002, 73 (3): 366-372

45.- Stokes MB, Davis CL, Alpers CE. Collapsing glomerulopathy in renal allografts: a morphological pattern with diverse clinicopathological associations. *Am J Kidney Dis* 1999, 33(4): 658-666

CAPÍTULO II

ESTUDIO CLINICOPATOLÓGICO DE LAS BIOPSIAS DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE GC. ESTUDIO INMUNOGENÉTICO DE UNA FAMILIA CON GC.

Introducción.

El tipo de enfermedad glomerular que causa síndrome nefrótico varía de acuerdo a la edad de los pacientes. En la primera década de la vida la enfermedad de cambios mínimos es la causa de síndrome nefrótico en la mayoría de los pacientes (1), pero a partir de la segunda década y hasta la vida adulta, la esclerosis focal y segmentaria es la responsable de muchos de los casos mientras que la incidencia de glomerulopatía membranosa como causa de síndrome nefrótico ha tendido a disminuir, a nivel mundial, según observaciones recientes. (1,2). Los glomérulos en la enfermedad de cambios mínimos y los glomérulos sin esclerosis en los pacientes con esclerosis focal y segmentaria son histológicamente similares por lo que muchos autores han considerado que podrían ser el espectro de la misma enfermedad (1,2). Sin embargo, ya que tanto el curso clínico como el pronóstico son diferentes: recuperación total en la enfermedad de cambios mínimos versus progresión a insuficiencia renal en EFyS, muchos otros autores consideran actualmente que se trata de dos enfermedades diferentes en su patogénesis.

Una revisión de 20 años de experiencia en un centro en Massachussets E.U.A. mostró que en los últimos años ha habido un aumento importante en la frecuencia de EFyS en biopsias de niños afroamericanos e hispanos (1). Esto también ha sido observado en otros países como La India en donde 47% de los niños con síndrome nefrótico biopsiados entre 1992 y 1996 tenían EFyS comparado con 20% entre 1990 y 1992 (3).

Un estudio nuestro realizado de manera preliminar en biopsias renales de pacientes mexicanos con síndrome nefrótico mostró la misma tendencia (observaciones personales enviadas a publicación). Este estudio demostró que en México ha habido un aumento de la esclerosis focal y segmentaria sobre la glomerulopatía membranosa como causa de síndrome nefrótico en una revisión retrospectiva de 1940 biopsias realizadas entre 1986 y 2002. En este estudio encontramos que la prevalencia de EFyS en este periodo fue de

10% mientras que la glomerulopatía membranosa correspondió al 3.7%. Como ha sido encontrado en diferentes centros a nivel mundial, hemos observado un aumento en la prevalencia de la EFyS en los últimos tres años de 13.1% (2000-2002), comparada con 1991-1993 que fue de solo 1.9% en un centro de concentración de biopsias renales de toda la República Mexicana que recibe actualmente más de 500 biopsias anuales. (Observaciones personales. Datos en proceso de publicación).

La glomerulopatía colapsante (GC) es una forma bien definida de daño glomerular. En 1986 Weiss et al describieron seis pacientes con síndrome nefrótico, insuficiencia renal progresiva e irreversible y los cambios histopatológicos característicos (1). Los cambios histopatológicos característicos de esta entidad son la presencia de colapso o retracción del ovillo glomerular con daño a las células epiteliales las cuales están edematosas y muestran cambios degenerativos (1). En el intersticio se puede observar dilatación tubular quística y fibrosis (1). Clínicamente la enfermedad se manifiesta por síndrome nefrótico con proteinuria masiva y un curso rápido a insuficiencia renal crónica o incluso la muerte por complicaciones del síndrome nefrótico (2). Como se mencionó previamente, el diagnóstico de GC primaria requiere de la ausencia de infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ya que el daño glomerular en esta entidad puede ser morfológicamente y clínicamente indistinguible (2-8). La presencia de enfermedades renales con un patrón familiar se ha descrito en varias entidades que incluyen: enfermedad renal poliquística de tipo autonómico recesivo (9), enfermedad de membranas basales delgadas (10), y enfermedad de Alport (11), todas ellas reconocidas como neuropatías hereditarias. También han sido descritas familias con esclerosis focal y segmentaria (EFyS) (12). La presencia de GC de tipo familiar no ha sido informada en la literatura.

Selección de los casos.

Se colectó de manera prospectiva una serie de veinte pacientes que reunieron los criterios histológicos y clínicos para el diagnóstico de glomerulopatía colapsante que accedieron participar en el estudio. Los pacientes se presentaron al Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez entre 1999 y 2002 y tenían una biopsia renal diagnóstica. Todos los pacientes eran mexicanos y seronegativos para el virus de la

inmunodeficiencia humana (VIH), sin historia de utilización de drogas intravenosas. Dentro de los pacientes con diagnóstico de GC se identificó a una familia con síndrome nefrótico y datos histopatológicos de GC que se presenta al final. Los datos clínicos se obtuvieron de los expedientes hospitalarios y la hoja de solicitud de estudio histopatológico.

RESULTADOS

Datos clínicos.

La edad media de los pacientes con GC seleccionados para el estudio fue de 32 ± 12 años con un intervalo de 12 a 70 años. El 60% de los pacientes son hombres (n=12) y el 40% mujeres (n=8). Todos los 20 pacientes presentaron síndrome nefrótico al momento del diagnóstico con un promedio de proteinuria en 24 horas de 8.4 ± 4 g. Once de los 20 pacientes (55%) presentaron proteinuria masiva (> 10 g/24 horas). Quince de los 20 pacientes (75%) mostraron una creatinina sérica > 1.5 mg/dl.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y apoyado por CONACYT 34751-N y UNAM-DGAPA IN-201902.

Estudio histopatológico de las biopsias renales de los pacientes con diagnóstico de GC

Se estudiaron 2 ó 3 fragmentos cilíndricos de tejido renal procesados para microscopía de luz, microscopía electrónica e inmunohistoquímica y un corte congelado para inmunofluorescencia directa. Los tejidos se procesaron de acuerdo a técnicas estandarizadas de rutina y fueron incluidos en parafina para la realización de cortes a 4μ . Los cortes para microscopía de luz se tiñeron con hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), metenamina de Jones y tricrómico de Mallory. Hubo un promedio de 15 ± 6 glomérulos por sección en cada muestra. El diagnóstico de glomerulopatía colapsante se fundamentó en la presencia de: 1.- Colapso y/o retracción de los capilares glomerulares ya sea focal y segmentario o global. 2.- Prominencia de las células epiteliales viscerales por hipertrofia o hiperplasia con la presencia de gotas

hialinas PAS positivas intracitoplasmáticas. 3.- Cambios túbulo-intersticiales: dilatación tubular y fibrosis intersticial.

Todos los casos diagnosticados como GC presentaban por lo menos un glomérulo con colapso de los capilares glomerulares. La presencia de fibrosis intersticial se analizó de acuerdo a una evaluación semicuantitativa basada en una escala de grados I a III de acuerdo a la cantidad de fibrosis en el área cortical total en 7 campos no cruzados a seco débil (100X) (grado I = <25%, grado II = entre el 25 y el 40% y grado III = >40%).

Todos los pacientes con diagnóstico histopatológico de GC mostraron la presencia de colapso del capilar glomerular y retracción del ovillo glomerular con obliteración de la luz capilar, aunque en diferentes grados. En 15 pacientes (75%) la lesión fue focal con afección de uno o dos glomérulos y en el resto (25%) el colapso de los capilares fue difuso. En todos los glomérulos colapsados las células epiteliales mostraban alteraciones como la presencia de vacuolas, gotas hialinas y/o proliferación. Nueve de los 20 casos (45%) mostraron cambios tubulares que incluyeron dilatación quística y atrofia. Siete casos (35%) mostraron fibrosis intersticial grado II (>25 y < 40% del área cortical total) con un discreto infiltrado inflamatorio mononuclear asociado a la fibrosis. El resto no presentaba fibrosis.

Estudios de inmunofluorescencia directa.

Inmunofluorescencia directa: Un fragmento de tejido congelado de cada muestra se incubó con anticuerpos monoclonales contra IgG, IgM, IgA, C1q, C3, albúmina y fibrinógeno, conjugados con isotiocianato de fluoresceína. La inmunofluorescencia directa fue negativa para todos los inmunorreactantes en todos los glomérulos no colapsados. Los glomérulos colapsados mostraron atrapamiento de IgM o C3 con patrón esclerótico segmentario.

Estudios de inmunohistoquímica.

Se incubaron cortes de tejido procesado y embebido en parafina para estudio de inmunoperoxidasa con la técnica del complejo avidina-biotina anteriormente descrito.

Los cortes se incubaron con anticuerpos contra CD68, Bcl2 y Parvovirus B-19. Como controles se incubaron 20 cortes de riñón normal (biopsia inmediata al momento del trasplante de pacientes, dos de ellos con diagnóstico de GC y el resto con otros diagnósticos clínicos). Los resultados mostraron expresión de CD68 en las células epiteliales viscerales de las biopsias de pacientes con GC mientras que en las biopsias normales era negativo. Los cortes incubados con Bcl2 mostraron una disminución o ausencia de la expresión de este marcador en todas las biopsias de pacientes con GC. En las biopsias normales el Bcl2 fue intensamente positivo en todos los casos. Todas las biopsias de los pacientes con GC fueron negativas para la expresión de PVB-19

Estudios ultraestructurales

Sólo se realizó la microscopía electrónica en 8 casos. El estudio ultraestructural en todos los casos estudiados mostró obliteración difusa de procesos podocíticos en el 100% de los glomérulos examinados (tabla 3). Los glomérulos colapsados mostraron plegamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares. Las células epiteliales viscerales de los glomérulos colapsados mostraron numerosas vacuolas intracitoplasmáticas. La presencia de estructuras tubuloreticulares se demostró solo en 2 casos. Estas estructuras se encontraron en el endotelio de las asas capilares. Se encontraron 2 estructuras tubuloreticulares por 10 campos de diferentes de asas capilares periféricas analizadas a 10,000 aumentos.

CONCLUSIONES

En México la EFyS es la principal causa de síndrome nefrótico en el adulto con una prevalencia de 10% sobre la glomerulopatía membranosa (3.4%) en un análisis de 1940 biopsias renales realizadas entre 1986 y 2002 en un centro que recibe biopsias renales de varios estados de nuestro país. La prevalencia de la EFyS ha aumentado en los últimos años siendo de 13.4% entre 1991-93 mientras que era de 1.9% en el periodo 2000-2002. En nuestra población la GC es causa de síndrome nefrótico con una prevalencia similar a la informada en la literatura mundial. Mientras que en los Estados Unidos se presenta mayormente en pacientes afroamericanos y con serología positiva para VIH, en México se presenta en personas jóvenes sin predilección por algún género, en pacientes con serología negativa para VIH. El curso de los pacientes mexicanos es similar al informado en otras series.

GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE FAMILIAR

Durante el estudio de los pacientes con glomerulopatía colapsante, se detectó a una familia que presentó afección de 4 hermanos, documentada por biopsia y probablemente de otro hermano menor del que no se tomó estudio histopatológico. Se les realizaron estudios inmunogenéticos a varios miembros de la familia para estudiar la posibilidad de riesgo familiar. Esta es la primera descripción de GC que se presenta de manera familiar.

Pacientes

Se estudió a 5 hermanos que no contaban con historia familiar de nefropatía que se presentaron al Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez para su evaluación clínica por proteinuria. Todos los pacientes eran mexicanos, seronegativos para infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y no tenían el antecedente de utilización de drogas intravenosas. Debido a la presencia de síndrome nefrótico, a cuatro de los cinco hermanos se les realizó una biopsia renal por punción que reunió los criterios histológicos diagnósticos de glomerulopatía colapsante (GC). A todos los pacientes, junto con los padres, los abuelos, un tío y una tía se les estudió el sedimento urinario, la excreción de proteínas en orina de 24 horas, niveles de creatinina sérica, electrolitos, y niveles sanguíneos de colesterol. Fuera de los hermanos afectados, en el resto de los familiares los resultados fueron normales o negativos. Tanto a los hermanos con diagnóstico de GC como al resto de la familia se les tomaron muestras de sangre periférica para estudios inmunogenéticos.

Diagnóstico histológico.

El diagnóstico de GC se fundamentó en el estudio de la microscopía de luz en donde se demostró la presencia de colapso de los capilares glomerulares ya sea segmentario y focal o global, prominencia de las células epiteliales viscerales por hipertrofia o hiperplasia, presencia de gotas hialinas en las células epiteliales viscerales, positivas con ácido peryódico de Schiff y alteraciones tubulointercitiales (fibrosis y dilatación tubular). Todos los casos presentaron por lo menos un glomérulo con colapso del ovillo

glomerular con los cambios descritos anteriormente por lo que fueron diagnosticados como glomerulopatía colapsante. Para el estudio histológico se recibieron dos o tres segmentos cilíndricos de tejido renal que se procesaron para microscopía de luz de acuerdo a técnicas estandarizadas de rutina (13). Los cortes se tiñeron con: hematoxilina y eosina (H y E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricómico de Mallory y plata metenamina de Jones. Se examinó un promedio de 15 ± 6 (intervalo de 7 a 23) glomérulos por corte. A todas las biopsias se les realizó estudio de inmunofluorescencia directa (IF) para evaluar la presencia de complejos inmunes. Un fragmento de tejido renal fue congelado en fresco y teñido con anticuerpos contra IgG, IgM, IgA, C1q, C3c, C3d, albúmina, fibrinógeno, kappa y lambda unidos a isotiocianato de fluoresceína (Dako Corp., Palo Alto, California, E.U.A.). Para el estudio de IF directa se estudiaron entre 3 y 5 glomérulos por caso. La intensidad de la fluorescencia fue evaluada de una manera semicuantitativa en una escala de 0 a 3+ donde 0= negativa, 1+ = débil, 2+ = moderada y 3+ = avanzada.

En todos los casos se realizó estudio de microscopía electrónica para buscar la presencia de estructuras tubuloreticulares en el citoplasma de células endoteliales de las asas capilares o del intersticio. Ultraestructuralmente también se estudió la presencia de plegamiento de las membranas basales de los capilares glomerulares, obliteración de los procesos podocíticos y la presencia de vacuolas y gotas hialinas dentro de las células epiteliales viscerales. Todas las biopsias fueron revisadas por 2 nefropatólogos.

Extracción del DNA.

El DNA genómico fue extraído de una muestra de sangre total de acuerdo con las técnicas de rutina (14). En breve, se tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica y se mezcló con 2 ml de EDTA al 5%, p H 7.4. Se centrifugó la muestra a 1500 rpm por 5 minutos. Se decantó el plasma sobrenadante sin tocar los leucocitos. Se colectó el botón y se transfirió a otro tubo Falcon (2097) de 15 ml. Se añadieron 10 ml de buffer para lisis de eritrocitos y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante de eritrocitos; se añadieron 5 ml de buffer para lisis de eritrocitos y se mezcló bien. Se centrifugó durante otros 10 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el botón en 3 ml de buffer para lisis de leucocitos y se añadieron 50 μ l de una

solución de Proteinasa K. Se mantuvo en agitación suave de manera horizontal en un agitador rotativo durante la noche a 42 °C, a 50 rpm.

Tipificación del HLA.

Se determinaron, por medio de la técnica de la reacción de polimerasa en cadena, las variantes genéricas del antígeno linfocitario humano (HLA por sus siglas en inglés) HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQA y HLA-DQB en los 5 hermanos, ambos padres y cuatro familiares cercanos. Se utilizó para la tipificación una secuencia de primers específicos (PCR-SSP; Pel-Freez, Brown Deer, WI, E. U. A.) y electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidium. Para la interpretación de los resultados se utilizó un programa computarizado específico (Pel-Freez).

RESULTADOS.

La historia clínica de los pacientes se resume en la tabla 5.

Paciente 1 (*III-7*). Se trata de una mujer de 21 años que ingresó al hospital en junio de 1997. La historia clínica mencionaba que la paciente mostró edema de las manos y piernas de 18 meses de evolución junto con artralgiás en rodillas y muñecas. La exploración física a su ingreso mostró edema palpebral, caída fácil de cabello, fotosensibilidad, fenómeno de Raynaud y sinovitis de las articulaciones metacarpofalángicas e interfalángicas proximales y rodillas. Los exámenes de laboratorio mostraron una creatinina sérica de 0.89 mg/dl y depuración de creatinina de 42.3 ml/ min. El examen general de orina mostró cilindros granulosos y hialinos así como proteinuria. La proteinuria de 24 horas fue de 4.8 g. Otros análisis mostraron colesterol sérico de 232 mg/dl, triglicéridos de 190 mg/dl, linfopenia 1.3×10^9 , VSG de 50 mm/h, anticuerpos antinucleares (ANA) 1:160, anti-SSA/Ro positivos, CH50 160 (80-320 mg/dl). La serología para VIH, parvovirus B-19 (PV-B-19) y virus de la hepatitis B y C era negativa. Se sospechó el diagnóstico clínico de lupus eritematoso generalizado (LEG) y se administró prednisona (1mg/Kg/día durante tres meses). Con el diagnóstico de síndrome nefrótico en estudio, se le tomó una biopsia renal.

Paciente 2 (*III-9*). Se trata de una mujer de 22 años de edad que ingresó al hospital en agosto de 1997 con una historia clínica de 18 meses con fatiga, caída fácil del cabello, artralgias en manos, rodillas y tobillos. A su ingreso se detectó hipertensión arterial de 150/100 mmHg, edema generalizado y eritema en alas de mariposa. El examen general de orina mostró eritrocitos 3+, proteinuria de 24 horas de 6.5g. Su creatinina sérica era de 1.18 mg/dl, depuración de creatinina de 137 ml/min, colesterol de 279 mg/dl y triglicéridos de 175 mg/dl. La serología fue negativa para la presencia de anticuerpos antinucleares y anti-DNA (*Chrythidia lucilae*), VIH, hepatitis B y C, PV B-19 (IgG e IgM y DNA estudiado por la reacción de polimerasa en cadena en sangre periférica). Recibió captopril (25 mg/24h) durante 6 meses. Con el diagnóstico de síndrome nefrótico en estudio se le tomó una biopsia renal.

Paciente 3 (*III-11*). Se trata de un hombre de 20 años de edad que ingresó al hospital en octubre de 1997 con historia clínica de edema de las extremidades inferiores y fatiga durante 6 meses. Entre sus antecedentes de importancia se encontró tabaquismo positivo (2 cajetillas al día), consumo de marihuana y cocaína así como alcoholismo (90 ml/día). A su ingreso se le encontró hipertenso (140/95 mmHg). El examen general de orina mostró proteinuria de 5.3g/día con un sedimento blando. La creatinina sérica era de 0.89 mg/dl con una depuración de creatinina de 109 ml/min, colesterol de 194 mg/dl, triglicéridos de 169 mg/dl, C3 117 mg/dl (normal >75 mg/dl) Ca de 25 mg/dl (normal > 13mg/dl). La serología fue negativa para anticuerpos contra hepatitis B y C, así como para VIH. La serología para PV B-19 fue positiva para IgG (5.3) y negativa para IgM. Se trató con captopril 50 mg/día) durante 8 meses. Con el diagnóstico de síndrome nefrótico en estudio se le tomó una biopsia renal.

Paciente 4 (*III-8*). Se trata de una niña de 14 años de edad que ingresó al hospital en enero de 1998. Su historia clínica es negativa excepto por tos y rinorrea hialina que fue tratada con penicilina durante 7 días. Dos semanas después notó la presencia de orina espumosa,. Dos días antes de su ingreso al hospital desarrolló disnea y edema de ambas piernas. Los exámenes de laboratorio mostraron proteinuria de 8g en 24 horas, creatinina sérica de 0.85 mg/dL, depuración de creatinina de 67 ml/min, linfopenia 1.3×10^9 y

anticuerpos antinucleares de 1:640 con un patrón homogéneo y fibrilar. La serología fue negativa para PV B-19 (IgG e IgM). Se sospechó el diagnóstico de LES y se le administró prednisona (1 mg/Kg/día) y captopril (50 mg/día) durante un año. Con el diagnóstico de síndrome nefrótico en estudio se le tomó una biopsia renal.

Paciente 5 (III-10). Niño de 7 años de edad que ingresó al hospital en marzo de 1998 por la historia de nefropatía familiar. Como antecedentes de importancia, presentaba neurodermatitis que afectaba el cuello, los brazos y las piernas. Desde el punto de vista renal se encontraba asintomático. El EGO mostró hematuria microscópica y trazas de proteínas. El sedimento no mostró cilindros. La creatinina sérica de 0.7 mg/dl, depuración de creatinina 97.7 ml/min, colesterol 190 mg/dl y triglicéridos 150 mg/dl. La serología fue positiva para PV B-19 (IgG 5.8, IgM negativo). No se estudió la serología VIH, virus de la hepatitis B y C.

Seguimiento.-

Dos años después de la biopsia todos los pacientes mostraban proteinuria persistente en límites nefróticos pero <10g/día, sin progresión a insuficiencia renal terminal, con niveles de creatinina sérica < 2 mg/dl. El hermano menor (Paciente 5) persiste con micro hematuria y trazas de proteínas en orina.

Análisis histopatológico.

La biopsia renal se tomó a cuatro de los cinco hermanos. En todos los casos el examen histopatológico mostró la presencia de colapso y obliteración de la luz de los capilares glomerulares con retracción del ovillo glomerular y prominencia de las células epiteliales viscerales.

Paciente 1:- La biopsia renal contenía 10 glomérulos analizables a la microscopía de luz. Dos glomérulos estaban esclerosados de manera global y dos presentaban colapso global de los capilares glomerulares. En los glomérulos colapsados, las células epiteliales viscerales eran prominentes, estaban aumentadas de tamaño y contenían gotas hialinas. El resto de los glomérulos mostraba solo prominencia discreta de las células epiteliales

viscerales pero las asas capilares estaban abiertas y las membranas basales tenían una apariencia fina y delicada. Se observó la presencia de fibrosis intersticial, catalogada como Grado II (>25% y < de 40%) con escaso infiltrado mononuclear. La inmunofluorescencia directa contra IgG, IgM, IgA, C1q, C3, Kappa y Lambda, fue negativa para la presencia de complejos inmunes en 5 glomérulos no colapsados. Un glomérulo colapsado mostró una positividad difusa e irregular para IgM y vacuolas de albúmina dentro del citoplasma de las células tubulares y en las células epiteliales viscerales.

Paciente 2.- La biopsia renal tenía 12 glomérulos por corte en la microscopía de luz. Un glomérulo estaba esclerosado de manera global. Dos glomérulos mostraban retracción y colapso del ovillo glomerular. Las células epiteliales viscerales eran prominentes y contenían vacuolas y gotas hialinas. El resto de los glomérulos no mostraba alteraciones a la microscopía de luz. La fibrosis intersticial afectaba entre el 25 y el 40% del tejido (Grado II), con escaso infiltrado inflamatorio distribuido de manera irregular. La inmunofluorescencia directa fue negativa para IgG, IgM, IgA, C1q, C3, Kappa y Lambda. Las células tubulares mostraron gotas de albúmina.

Paciente 3.- Esta biopsia renal contenía 23 glomérulos analizables por corte a la microscopía de luz. Un glomérulo estaba esclerosado de manera global y dos glomérulos estaban colapsados. Uno de éstos mostraba un área segmentaria de esclerosis temprana con prominencia de las células epiteliales viscerales que tenían un aspecto edematoso y contenían vacuolas y gotas hialinas. El resto de los glomérulos solo mostraban prominencia de las células epiteliales viscerales. La inmunofluorescencia directa fue negativa contra IgG, IgM, IgA, C1q, C3, Kappa y Lambda en tres glomérulos no colapsados. Dos glomérulos colapsados mostraban depósitos de IgM (atropamiento) y vacuolas de albúmina en el citoplasma de las células epiteliales viscerales. Las células tubulares contenían también vacuolas de albúmina.

Paciente 4.- La biopsia renal contenía 7 glomérulos a la microscopía de luz. Un glomérulo estaba esclerosado de manera global. Dos glomérulos estaban colapsados de

manera global y mostraban las alteraciones características en las células epiteliales viscerales las cuales estaban muy prominentes y contenían vacuolas y gotas hialinas. La inmunofluorescencia directa fue negativa contra IgG, IgM, IgA, C1q, C3, Kappa y Lambda.

Ninguno de los 4 casos estudiados mostró dilatación quística tubular.

Ultraestructura:

El estudio ultraestructural mostró que todas las biopsias renales presentaban obliteración de los procesos podocíticos en cada uno de los glomérulos examinados. Los glomérulos colapsados mostraban plegamiento de las membranas basales de los capilares glomerulares. Las células epiteliales viscerales contenían numerosas vacuolas y gotas hialinas. No se identificaron depósitos electrondensos que sugirieran la presencia de depósitos de complejos inmunes. Dos casos mostraron estructuras tubuloreticulares (caso 1 y caso 4) en el citoplasma de las células endoteliales de los capilares glomerulares. Las estructuras tubuloreticulares eran escasas y se encontraron dentro del endotelio que reviste las asa capilares glomerulares. No se encontraron estructuras tubuloreticulares en el endotelio de vasos intersticiales.

Inmunogenética.

El estudio de segregación de los haplotipos del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) en la familia mostró los siguientes resultados.

1.- Los cuatro hermanos con diagnóstico de GC y el hermano menor sin enfermedad renal comparten el mismo haplotipo MHC heredado de la madre (HLA-A24, B14, DR1, DQA1*0101, DQB1*0501) III-7, III-8, III-9, III-10 y III-11 en la Figura 5.

2.- Los pacientes con GC 1 y 4; III-7 y III-8 respectivamente en la figura 5, mostraron el haplotipo A74, B8, DR1, DQA1*0101, DQB1*0501 y ambos presentaban manifestaciones clínicas similares a los que exhiben los pacientes con lupus eritematoso generalizado.

3.- El estudio de la hermana de la madre (II-6) quien tiene el diagnóstico clínico de artritis reumatoide (AR) presentó el haplotipo HLA A24, B14, DR1, DQA1*0101, DQB1*0501.

DISCUSIÓN.

Este estudio describe a una familia con enfermedad renal con diagnóstico clínico y patológico de glomerulopatía colapsante. Los pacientes son hermanos y no tenían historia clínica previa de enfermedad renal. El intervalo de edad era de 14 a 22 años y se presentaron al hospital en diferentes fechas en un año.

Aunque existen informes previos de glomeruloesclerosis focal y segmentaria de tipo familiar (12) la existencia de glomerulopatía colapsante familiar no había sido informada previamente. Como se mencionó anteriormente, los pacientes presentaron edema y proteinuria en límites nefróticos (>3.5g/día). La creatinina sérica era normal en todos los pacientes al momento del diagnóstico aunque la filtración glomerular, medida de manera indirecta por la depuración de creatinina, mostró grados variables de disfunción renal.

La serología contra VIH, VHB y VHC fue negativa en todos los pacientes. Los pacientes no tenían factores de riesgo conocidos para infección por VIH. Los pacientes no tenían historia clínica previa de transfusiones. El paciente número 3 (III-11) tenía antecedentes de utilización de drogas no intravenosas y en el resto de los pacientes este antecedente era negativo. La serología para parvovirus B-19 (PV B-19) fue positiva en los pacientes 3 y 5 pero los niveles de IgM y el DNA medido por PCR en estos mismos pacientes fueron negativos. El estudio para PV-B-19 por ambos métodos fue negativo en el resto de los pacientes y en la madre.

Los pacientes 1 y 4 (III-7 y III-8 respectivamente) tenían síntomas clínicos sugerentes de lupus eritematoso generalizado pero no reunieron los criterios suficientes para poder establecer este diagnóstico. La asociación de GC con enfermedades autoinmunes ha sido informada previamente, especialmente en pacientes con glomerulopatía colapsante primaria (15).

En una serie de 42 pacientes con glomerulopatía colapsante VIH negativos, 13 pacientes mostraron datos clínicos sugerentes de lupus eritematoso generalizado (15). Es importante mencionar que en estos casos el daño renal no debe ser considerado como una manifestación de lupus ya que no está relacionado con el depósito de complejos inmunes. En los pacientes de este estudio no hubo evidencia de complejos inmunes en la biopsia renal, la inmunofluorescencia fue negativa y la microscopía electrónica no mostró la presencia de depósitos electrodensos. Por lo tanto, el daño renal en los pacientes con GC en este estudio no estuvo mediado a través del depósito de complejos inmunes. También ha sido informada la asociación entre infección por PV B-19 y síntomas sugerentes de lupus eritematoso generalizado, incluyendo serología positiva para lupus (16). Algunos síntomas similares entre infección por PV B-19 y lupus eritematoso generalizado incluyen exantema, fiebre, fotosensibilidad, vasculitis, artropatía, mialgias, citopenia, hipocomplementemia, presencia de anticuerpos antinucleares, anticuerpos antidoble cadena, factor reumatoide y anticuerpos antilinfocitos, entre otros (16). Los pacientes de este estudio que tuvieron manifestaciones clínicas sugerentes de lupus tenían serología negativa para PV B-19 y no tenían evidencia de DNA viral por PCR en sangre periférica en pruebas realizadas en el laboratorio clínico comercial (MSB, Quest Diagnostics). Sin embargo estos dos pacientes tenían estructuras tubuloreticulares en las células endoteliales, aunque en escasa cantidad. Se ha descrito la presencia de estructuras tubuloreticulares en algunas enfermedades virales como en la neuropatía secundaria a la infección por virus de la inmunodeficiencia humana y en la neuropatía lúpica de cualquier tipo (2). Ya que los pacientes de este estudio no presentaron evidencia de alguna infección viral conocida ni reunieron criterios diagnósticos de LEG, no es posible dar una explicación a la presencia de dichas estructuras. Es importante mencionar también que ha sido descrito que la infección por PV B-19 puede inducir la presencia de GC u otras formas de glomerulopatía en individuos susceptibles (17). Esto se ha basado en la gran prevalencia de DNA del PV B-19 en biopsias de pacientes con diagnóstico de GC primaria, de esclerosis focal y segmentaria idiopática (17) o con GC de novo en trasplantes renales (18). La infección por PV B-19 es muy frecuente de manera universal a cualquier edad pero es más frecuente en niños en edad escolar (16). La mayoría de la población se infecta en algún momento de la vida; 15% desarrollan la infección entre los

11 meses y los 5 años de edad., entre 15% y 60% la desarrollan entre los 5 y 19 años de edad y 30% a 60% durante la vida adulta (19). A pesar de esto, el desarrollo de enfermedad renal es poco frecuente lo cual sugiere que algunos pacientes presentan la susceptibilidad genética para el desarrollo de la enfermedad glomerular. En este estudio los pacientes 3 y 5 presentaron una serología positiva para PV B-19 de tipo IgG. Estos resultados parecen indicar que los pacientes se infectaron previamente en algún momento pero no significa que este infectados en este momento o de manera crónica.

Es importante enfatizar que en estos pacientes en particular con diagnóstico de GC con presentación familiar, tanto la presentación clínica como el curso de la enfermedad parecen diferir de lo que sucede comúnmente en los casos esporádicos de GC. A este respecto, los niveles de proteinuria al momento del diagnóstico en los cuatro hermanos con diagnóstico histológico de GC eran menores a 10 g/día mientras que en la mayoría de los pacientes con GC son mayores a 10g en orina de 24 horas (3). Por otro lado, el curso de la enfermedad, aunque progresivo, parecer ser más lento que en los pacientes con GC esporádica los cuales evolucionan rápidamente a IRC. Esto podría sugerir que la forma familiar de GC tiene un curso diferente de la forma esporádica.

Algunos trabajos han informado de la asociación entre algunas clases de HLA con ciertos tipos específicos de glomerulopatías (20). Por ejemplo, el HLA-B8 se ha asociado con el síndrome nefrótico infantil sensible a esteroides (21), la neuropatía por IgA con la presencia de HLA-DR4 (22), la glomerulopatía membranosa idiopática con el HLA-DR2 (20), la enfermedad de cambios mínimos con el HLA-DRw53 (21) y la glomerulonefritis postestreptocócica con el HLA-DR1 (20). En la familia de este estudio el análisis de segregación del haplotipo demostró que todos los miembros de la familia que presentaban GC heredaron el mismo haplotipo de la madre: HLA-A24, B14, DR1, DQA*0101, DQB1*0501. Es importante mencionar además que dos de los cuatro pacientes con GC eran homocigotos para el alelo DR1. El hermano menor que en el momento del estudio no tenía datos clínicos de GC, también presentó este haplotipo. Este niño de 7 años de edad tiene por lo tanto el riesgo potencial de desarrollar la enfermedad en el futuro aunque en este momento solo presentaba trazas de proteínas en la orina, así como microhematuria. El resto de los hermanos no presentaron manifestaciones clínicas hasta

la segunda y tercera décadas de la vida y no habían presentado datos de enfermedad renal durante la infancia.

La frecuencia de este haplotipo en la población mestiza mexicana es menor de 3% mientras que en la población indígena Mazateca y en los Nahuas es de 1% (datos personales aún no publicados). Estas observaciones sugieren que este haplotipo se adquirió por una mezcla genética de origen Caucásico, quizás de origen mediterráneo, ya que en este grupo étnico es uno de los haplotipos más frecuentes (23). Además de que el alelo DR-1 no es el alelo más frecuentemente encontrado en la población con GC ya que se presenta principalmente en grupos de afroamericanos (4).

La GC primaria puede asociarse a enfermedades autoinmunes (15). Dos de los pacientes con GC de este estudio (pacientes 1 y 4, III-7 y III-8 respectivamente), también presentaron datos sugerentes de lupus eritematoso generalizado. Estos pacientes presentaban el haplotipo A74, B8, DR1, DQA1*0101, DQB1*0501. Este haplotipo incluye el HLA B8, el cual ha sido asociado a lupus eritematoso generalizado en algunas poblaciones caucásicas en las que está incluido el haplotipo A1, B8, DR3, SC01. Algunos estudios genéticos en la población mexicana han demostrado que este haplotipo es poco muy común con una frecuencia menor a 1% (25). Sin embargo en los pacientes mexicanos con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado su frecuencia es hasta de 10%, apoyando su origen caucásico (23). Por lo tanto el análisis del sistema principal de histocompatibilidad mostró la presencia de un haplotipo que, en esta familia en particular, se segrega con la enfermedad; este haplotipo pudo haberse adquirido por la mezcla genética con la población caucásica ya que como se mencionó anteriormente, es un haplotipo muy poco frecuente en la población mexicana indígena.

No contamos con alguna explicación para el hecho de que tanto la madre como la abuela y la hermana de la madre no presentan datos de enfermedad renal a pesar de contar con el mismo haplotipo que los hermanos afectados (A74, B8, DR1, DQA1*0101, DQB1*0501). A este respecto podemos presentar la hipótesis de que los factores ambientales podrían jugar un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad. Se ha propuesto que la GC primaria podría ser resultado de una infección viral diferente del

VIH y el PVB-19 (2,3). Los miembros afectados de esta familia, que parecen ser genéticamente susceptibles, podrían haber sido expuestos a una infección viral no detectada o subclínica o a otros factores desconocidos que les condicionaron el desarrollo de la enfermedad.

En este trabajo concluimos que la GC puede presentarse de manera familiar así como ocurre en otras enfermedades que cursan con síndrome nefrótico familiar como la glomeruloesclerosis focal y segmentaria familiar. La GC se puede presentar asociada a síntomas que sugieren lupus eritematoso sistémico. La presencia de nefropatía en los pacientes con GC y síntomas que puedan ser catalogados como similares a lupus no deben ser utilizados como un criterio diagnóstico de lupus ya que en estos casos en particular la nefropatía no está relacionada o no es el resultado de depósito de complejos inmunes en el glomérulo.

TABLA 5A

MANIFESTACIONES CLINICAS EN 27 PACIENTES CON GLOMERULOPATIA COLAPSANTE*
--

Manifestación clínica	n (%)
Síndrome nefrótico	27 (100)
Edema periférico	19 (70)
Hipertensión arterial	16 (59)
Fiebre	15 (55)
Artralgias	6 (22)
Erupciones cutáneas	4 (15)

*Datos tomados de las series presentadas en las referencias 3 y 7

TABLA 5B

HALLAZGOS DE LABORATORIO DE 27 PACIENTES CON GLOMERULOPÁTIA COLAPSANTE AL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO*

Hallazgos de laboratorio	N(%)
Hipercolesterolemia	27(100)
Proteinuria > 3.5g/día	23(85)
Proteinuria > 10g/día	20(74)
Creatinina sérica (>2 mg/dL)	15(55)
Anticuerpos antinucleares (1:80)	4(14)
*Datos tomados de las series presentadas en las referencias 3 y 7	

TABLA 6. Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con GC familiar

PACIENTE	GENERO/EDAD	PROTEINURIA g/día	SINTOMAS	ANA*
1	F/21	4.8	EDEMA ARTRALGIAS	1:160
2	F/22	6.5	EDEMA ARTALGIAS	NEGATIVO
3	M/20	5.3	EDEMA FATIGA	NEGATIVO
4	F/14	8.0	EDEMA ARTRALGIAS	1:640
5	M/7	TRACE	NINGUNO	NEGATIVO

*ANA = TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Weiss MA, Daquioag E, Margolin E G , Pollak VE. Nephrotic syndrome, progressive irreversible renal failure, and glomerular “collapse”. A new clinicopathologic entity. *Am J Kidney Dis* 7: 20-28, 1986.
- 2.- Avila-Casado MC. Collapsing glomerulopathy: a new entity associated to nephrotic syndrome and chronic renal failure. *Rev Invest Clin* 51: 367-373, 1999.
- 3.- Detwiler RK, Falk RJ, Hogan SL, Jennette H Ch. Collapsing glomerulopathy: a clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 45:1416-1424, 1994.
- 4.- D’Agati V, Suh JI, Carbone L, *et al.* Pathology of HIV-associated nephropathy: a detailed morphologic and comparative study. *Kidney Int* 35: 1358-1370, 1989.
- 5.- Valeri A, Barisoni L, Appel GB *et al* . Idiopathic collapsing focal segmental glomerulosclerosis: a clinicopathologic study *Kidney Int* 50:1734-1746, 1996.
- 6.- Stokes MB, Davies CL, Alpers Ch E. Collapsing glomerulopathy in renal allografts: a morphological pattern with diverse clinicopathologic associations. *Am J Kid Dis* 33: 658-666, 1999
- 7.- Stone HD, Appel RG. Human immunodeficiency virus-associated nephropathy: Current concepts. *Am J Med Sci* 307: 212-217, 1994.
- 8.- Meehan SH, Pascual M, Williams WW, *et al.* De novo collapsing glomerulopathy in renal allografts. *Transplantation* 65:1192-1197, 1998.
- 9.- Barth RA, Guillot AP, Capeless EL, Clemmons JJ. Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease: variable outcome within one family. *Am J Obstet Gynecol* 166: 560-561, 1992.

- 10.-Aarons I, Smith PS, Davies RA. Thin membrane nephropathy: a clinicopathological study. *Clin Nephrol* 32: 151- 158, 1989.
- 11.- Rumpelt HJ. Hereditary nephropathy (Alport's Syndrome): correlation of clinical data with glomerular basement membrane alterations. *Clin Nephrol* 13: 203- 207, 1980.
- 12.-Faubert PF, Porush JG. Familial focal segmental glomerulosclerosis: nine cases in four families and review of the literature. *Am J Kidney Dis* 30: 265-270, 1997.
- 13.- Zugibe FT (editor). Immunohistochemistry. Fluorescent antibody technique, in *Diagnostic Histochemistry*. St Louis Missouri, The C.V. Mosby Company 1970, 321-330
- 14.- Davis RW, Thomas M, Cameron J, *et al* . Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 65:404-411, 1980.
- 15.-Laurinavicius A, Hurwitz S, Rennke HG. Collapsing glomerulopathy in HIV and non-HIV patients: A clinicopathological and follow-up study. *Kidney Int* 56: 2203-2213, 1999.
- 16.- Moore TL, Bandlamudi R, Alam SM, Neshor G. Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus in a pediatric population. *Semin Arthritis Rheum* 28: 314-318, 1999
- 17.- Moudgil A, Nast CC, Bagga A *et al*. Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 59: 2126-2133, 2001
- 18.- Moudgil A, Shidban H, Nast CC, *et al*. Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients. *Transplantation* 64:1847-1850, 1997
- 19.- Torok TJ. Parvovirus B19 and human disease. *Adv Intern Med* 37: 431-455, 1992

- 20.- Naito S, Kohara M, Arakawa K. Association of class II antigens of HLA with primary glomerulopathies. *Nephron* 45: 111-1114 , 1987.
- 21.- Swolinska D, Morawska Z, Makulska I, et al. Histocompatibility antigens (HLA) in children with lipoid nephrosis. *Pol Tyg Lek* 47:671-672, 1992
- 22.-Brensilver JM, Mallat S, Scholes S, McCabe R. Recurrent IgA nephropathy in living-related donor transplantation : Recurrence or transmission of familial disease? *Am J Kid Dis* 12:147- 149, 1988
- 23.- Martinez-Laso J, De Juan D, Martinez-Quiles N, *et al*. The contribution of the HLA-A, -B, -C and -DR. -DQ DNA typing to the study of Spaniards and Basques origins. *Tissue Antigens* 45: 237-245, 1995
- 24.- Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 4: 425-437, 1995;
- 25.- De Leo C, Castelan N, Lopez M, *et al* . HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizos established from serological typing of 50 families. *Hum Biology* 69: 809-818, 1997.