

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Estandarización e implementación parcial de la
metodología certificada por la OMS para la clasificación
de la nefritis lúpica en el Hospital Infantil del Estado de
Sonora**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Francisco Xavier Olmos García

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Francisco Xavier Olmos García hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado Estandarización e implementación de la metodología certificada por la OMS para la clasificación de la nefritis lúpica en el Hospital Infantil del Estado de Sonora y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Francisco Xavier Olmos García.

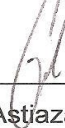
Atentamente:



Dra. Adela Rascón Alcantar
Presiente



Dra. Adriana Garibay Escobar
Secretario



Dr. Humberto Astiazarán García
Vocal



Dra. Judith Celina Tánori Córdova
Suplente

DEDICATORIA

A mi madre, porque sin ella nada de esto hubiera sido posible. Por apoyarme durante todo este largo camino, darme su bendición, su esfuerzo y sus ganas de seguir adelante.

A mi padre, que sin su apoyo incondicional y la ayuda que me brinda día tras día nunca hubiera podido completar esta larga travesía.

A mi hermano y el resto de mi familia por sus ánimos, tías, tíos, primos, primas, por alentarme y apoyarme en este camino.

A Ashley, un gran amor en mi vida, por ese apoyo incondicional, y esa compañía que me brindo durante todo este largo camino, el cual recorrimos juntos, porque no siempre todo fue bueno, pero indiferentemente siempre supe que contaba con ese apoyo y esa compañía. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adriana Garibay, por ese apoyo que siempre les ah brindado a sus alumnos, que mas que sus alumnos somos sus hijos, por esas ganas de sacarnos adelante incondicionalmente y de formarnos como unos profesionistas. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Adela Rascón mi directora de tesis, por aguantarme todo este tiempo, que desde el principio me recibió con los brazos abiertos y hasta el final me apoyo, por que se que siempre conté y siempre contare con su apoyo en muchos aspectos, porque de sus palabras aprendí tantas cosas, ese conocimiento que me acompañara por todo el camino que aun me queda por delante. Muchas gracias.

A Panchito Pacheco y Josimar Villalobos los técnicos del laboratorio, y al Dr. Castillo. Panchito por ser un maestro para mí, porque siempre tenias algo bueno que enseñarme de esta área, siempre al pendiente para poder ayudarme, gracias. Josimar, por todo ese apoyo y acompañarme siempre en este trabajo, además de los conocimientos brindados, gracias. Dr. Castillo, porque siempre tenía algo nuevo que enseñarme de esta área tan bonita, y siempre tenía algo de que platicar, gracias.

A la Dra. Judith Tánori, porque desde el principio me apoyo aun sin siquiera conocerme y puso su confianza ciega en mi hasta final. Muchas gracias.

Al Dr. Humberto Astiazarán, por toda la ayuda que me brindo durante el transcurso de mi trabajo de tesis, y los consejos brindados, gracias.

A mis grandes amigos que me acompañaron durante esta larga lucha (Silvia, Joaquín, Wingates, Saúl, Kasto) y todos los demás, que no me alcanzarían las páginas reglamentarias para agradecerles a todos. Ese apoyo y compañía me ayudaron mucho para finalizar este camino, muchas gracias.

CONTENIDO

	Página
Aprobación.....	2
Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Contenido.....	5
Lista de tablas.....	7
Lista de figuras.....	8
Abreviaturas	9
Objetivos.....	10
Resumen.....	11
Introducción.....	12
Antecedentes.....	14
Lupus eritematoso sistémico	14
Etiología.....	15
Fisiopatología.....	15
Diagnóstico.....	16
Nefritis lúpica.....	17
Fisiopatología.....	17
Diagnóstico.....	20
Clasificación de la organización mundial de la salud.....	21
Microscopia óptica.....	25
Microscopia de fluorescencia.....	25
Microscopia electrónica de transmisión.....	26
Materiales y métodos.....	28
Histoquímicas.....	28
Tinción de hematoxilina-eosina.....	28
Tinción de ácido periódico de Shiff.....	29
Tinción tricrómica de Masson.....	30
Tinción con metilamina de plata.....	31
Inmunohistoquímica.....	32

Tinción con IgG..... 32

Resultados y discusión 34

 Histoquímicas..... 34

 Hematoxilina-eosina..... 34

 Ácido peryódico de Schiff..... 35

 Tricrómica de Masson..... 35

 Metilamina de plata..... 36

 Inmunohistoquímica..... 36

 IgG..... 36

Conclusiones..... 45

Recomendaciones 46

Bibliografía..... 47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Porcentaje de supervivencia en series publicadas de LES en niños.....	19
2	Clasificación original de la OMS de la nefropatía lúpica.....	23
3	Clasificación modificada (1982) de la OMS.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura
Página

1	Representación de un Glomérulo.....	18
2	Comparación de las técnicas de microscopia.....	24
3	Hematoxilina-Eosina.....	37
4	Ácido peryódico de Shiff.....	38
5	Tricrómica de Masson.....	39
6	Metilamina de plata.....	40
7	Inmunohistoquímica IgG.....	41
8	Resultados comparables con histoquímicas.....	43
9	Resultados comparables con inmunohistoquímicas.....	44

ABREVIATURAS

Lupus eritematoso sistémico.....	LES
Organización mundial de la salud.....	OMS
Anticuerpos antinucleares.....	ANA
Hematoxilina Eosina.....	H-E
Ácido peryódico de Shiff.....	PAS
Inmunoglobulina G.....	IgG
Buffer de fosfatos salino.....	PBS
Albumina de suero bovino.....	BSA

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar e implementar parcialmente las técnicas para la clasificación de la nefritis lúpica certificada por la Organización Mundial de la Salud en el Hospital Infantil del Estado de Sonora.

Objetivos Particulares

- Realizar la histoquímica en tejido renal, utilizando las tinciones de hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff, tricrómica de Masson y metilamina de plata.
- Estandarizar e implementar la técnica de inmunohistoquímica en cortes histológicos de tejido renal para la búsqueda de IgG.

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico es un padecimiento de carácter autoinmune, multisistémico y multiorgánico, que se caracteriza por la producción de anticuerpos antinucleares. Esta enfermedad se presenta principalmente en mujeres, con predominación en raza asiática y africana. No se conoce cura. Los síntomas se tratan principalmente con dosis bajas de corticosteroides, inmunosupresores y antipalúdicos. Este padecimiento viene acompañado de un gran número de complicaciones secundarias, que van desde enfermedades cardiovasculares hasta problemas a nivel de sistema nervioso central. La principal complicación en este padecimiento es la nefritis lúpica, la cual consiste en hematuria y/o proteinuria variable con o sin síndrome nefrótico y/o insuficiencia renal. La Organización Mundial de la Salud diseñó una estrategia de clasificación para este padecimiento, la cual consiste en la evaluación de daños renales a nivel histológico empleando diferentes técnicas de microscopía para poder determinar la severidad de la afección, ya que de esto dependen las decisiones terapéuticas. El objetivo de este proyecto fue estandarizar e implementar parcialmente estas técnicas de microscopía en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, para con ello poder coadyuvar en el diagnóstico de lupus eritematoso, y los pacientes puedan recibir un tratamiento más específico según la severidad de su afección.

INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de enfermedad multisistémica de origen autoinmunitario y se caracteriza por la presencia de una gran variedad de anticuerpos, principalmente anticuerpos antinucleares. Es una enfermedad de inicio agudo o insidioso, de evolución crónica, con remisiones y recaídas, con frecuencia febril, que se caracteriza principalmente por lesión en la piel, las articulaciones, los riñones y las membranas serosas. Sin embargo, también se pueden afectar prácticamente todos los demás órganos del cuerpo.

Las características clínicas y la afectación de los diferentes órganos varían dependiendo de la edad de presentación, el sexo y la raza. En general, los niños con LES desarrollan formas más graves de la enfermedad con un curso clínico más agresivo en comparación a los adultos con LES. La tasa de afectación de los diferentes órganos implicados en la enfermedad es también superior en niños con LES.

El rasgo definitivo de la enfermedad es la producción de autoanticuerpos. Algunos de estos anticuerpos reconocen diversos componentes nucleares y citoplasmáticos de la célula que no son específicos de órgano ni especie, y otros se dirigen contra antígenos de la superficie de células de la sangre. Aparte de su utilidad para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con LES, tienen una gran importancia patogénica, como, por ejemplo, en la glomerulonefritis medida por inmunocomplejos, que es tan típica de esta enfermedad.

Como se mencionó anteriormente el riñón es uno de los órganos implicados con más frecuencia en el LES. La mayoría de los enfermos con LES presentarán afectación renal en algún momento de su evolución. La lesión renal en el LES es debida tanto al proceso inflamatorio desencadenado por los mecanismos autoinmunes, como a la respuesta de los diversos componentes del tejido renal a dicha inflamación.

Una característica de la nefritis lúpica (NL) es la existencia de depósitos inmunes y de infiltrados celulares. Los depósitos inmunes pueden localizarse en el glomérulo, en los vasos y a lo largo de la membrana basal tubular. Los depósitos inmunes pueden ser debidos a la interacción de autoanticuerpos con antígenos renales o al agrupamiento

renal de autoantígenos como inmunoglobulinas o nucleosomas sobre los que posteriormente se unen los autoanticuerpos.

Los infiltrados celulares renales son debidos principalmente a linfocitos T y su localización es fundamentalmente intersticial. En respuesta a los depósitos inmunes y a la infiltración por linfocitos T, las células renales endógenas reaccionan con procesos de proliferación y de producción de citocinas y quimiocinas que contribuyen tanto a los procesos de inflamación como a la posterior aparición de fibrosis. La coexistencia por una parte de lesiones renales agudas correspondientes a fenómenos de inflamación y proliferación celular y por otra de lesiones crónicas de fibrosis, caracterizan de forma decisiva las manifestaciones clínicas de la NL, la respuesta al tratamiento y la posible evolución hacia la insuficiencia renal irreversible.

La afectación renal del LES se caracteriza por su gran variabilidad morfológica. Casi todas las formas de glomerulonefritis se pueden encontrar en el LES. La naturaleza y la distribución de estas lesiones varían de glomérulo a glomérulo dentro de la misma biopsia e incluso puede ser polimorfa dentro de un mismo glomérulo. Con gran frecuencia hay afectación túbulo-intersticial y vascular. Lesiones agudas inflamatorias pueden coexistir con lesiones crónicas cicatriciales. Todo ello hace que la interpretación de la biopsia renal sea en ocasiones muy complicada y que hayan sido múltiples los intentos de clasificaciones anatómo-patológicas de esta enfermedad.

La clasificación de la NL más universalmente aceptada es la de la OMS. Fue formulada inicialmente en 1974 y modificada posteriormente en 1982 y 1995. Es una clasificación simple y fácilmente reproducible. Proporciona una idea de la severidad y del pronóstico de la afectación renal, y ayuda a seleccionar el tratamiento más adecuado. Con el tiempo se comprobó que para un mismo tipo de NL, la evolución puede ser muy diferente porque hay aspectos de la patología renal que no están incluidos y que han demostrado tener importancia pronóstica. Por lo que es necesario estandarizar e implementar las técnicas necesarias para llevar a cabo esta clasificación en un hospital de Sonora, como lo es el Hospital Infantil del Estado de Sonora, en donde se reporta un índice elevado de pacientes con este padecimiento. Esto con el fin de mejorar el diagnóstico y clasificación ya que de esto dependen las decisiones terapéuticas.

ANTECEDENTES

Lupus Eritematoso Sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad multisistémica autoinmune con manifestaciones variables, con una etiología que aún no ha sido completamente descrita, pero se cree que es multifactorial (Danchenko y col. 2006). Es una enfermedad de inicio agudo o insidioso, de evolución crónica, con remisiones y recaídas, con frecuencia febril, que se caracteriza principalmente por lesión de la piel, las articulaciones, el riñón y las membranas serosas (Robbins y col. 2010).

La prevalencia del LES varía con la raza, el sexo y la edad, la mayor incidencia es en mujeres afroamericanas. Un aumento con incidencia de LES en las familias, también sugiere una predisposición genética (Seshan y Jenette, 2009).

Los estudios epidemiológicos sobre el LES muestran como marcadores desencadenantes de esta enfermedad, el género, la edad, la raza, variaciones regionales temporales, indicadores hormonales, factores genéticos y ambientales, entre otros (Danchenko y col., 2006).

El LES es una enfermedad bastante frecuente, con una prevalencia que puede ser tan elevada como 1 por cada 2500 en algunas poblaciones. De forma similar a muchas enfermedades autoinmunes el LES afecta predominantemente a mujeres, con frecuencia de 1 por cada 700 en mujeres en edad fértil y una relación mujeres-hombres de 9:1 (Robbins y col., 2010).

Aunque afecta principalmente a mujeres jóvenes, el 10-20% de los pacientes debutan en la infancia. Es una de las enfermedades reumáticas más frecuentes en la infancia. Las investigaciones revelan que la edad de inicio de la enfermedad puede modificar la expresión clínica de la misma (Blanca y col., 2009).

Es una enfermedad crónica grave, con importantes efectos no sólo sobre el funcionamiento físico, sino también en los pacientes con bienestar psicológico. La importancia de este último efecto se ilustra por el hallazgo de que la salud relacionada

con la calidad de vida (CVRS) tiende a ser menor en los pacientes con LES que en pacientes con otras enfermedades crónicas (Daleboudt y col., 2011).

Etiología

Aún sigue sin conocerse la causa del LES, aunque la existencia en estos pacientes de números aparentemente ilimitados de anticuerpos frente a constituyentes propios indica que el defecto fundamental del LES es el fallo de los mecanismos que mantienen la autotolerancia. Como ocurre en la mayoría de las enfermedades autoinmunitarias, los factores tanto genéticos como ambientales participan en la patogenia del LES (Robbins y col., 2010).

Fisiopatología

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es un ejemplo de enfermedad producida por una alteración de los mecanismos de tolerancia inmunológica. La lesión inicial consiste en la aparición de linfocitos B periféricos autorreactivos que escapan a los habituales procesos de regulación. Estos linfocitos B dan lugar a la aparición de una enfermedad autoinmune mediante la producción de autoanticuerpos y también a través de la activación de linfocitos T igualmente autorreactivos (Inmaculada, Carlos, y Josefina, 2002).

La producción de estos autoanticuerpos es el rasgo definitorio de esta enfermedad. Algunos de estos anticuerpos reconocen diversos componentes nucleares y citoplasmáticos de la célula que no son específicos de órgano ni de especie, y otros se dirigen frente a antígenos de la superficie celular de las células de la sangre (Robbins y col. 2010). Los anticuerpos antinucleares (ANA) se dirigen contra los antígenos nucleares y se pueden dividir en cuatro categorías: 1) anticuerpos contra el ADN; 2) anticuerpos contra las histonas; 3) anticuerpos contra las proteínas distintas de las histonas unidas al ARN, y 4) anticuerpos contra los antígenos nucleolares (Robbins y col., 2010).

Diagnóstico

Para el diagnóstico del LES se lleva a cabo un gabinete completo de exámenes, que van desde un examen físico, un examen neurológico y un examen cardíaco, buscando el roce pleural, pero más importante aún, se realiza una batería de pruebas de laboratorio, que incluyen conteo sanguíneo completo, análisis de orina, proteína C reactiva, factor reumatoide, entre otras. Pero sin duda la prueba de laboratorio con mayor valor diagnóstico para este padecimiento, es la determinación de anticuerpos antinucleares (ANA).

El método más utilizado para detectar ANA es la inmunofluorescencia indirecta, que puede identificar anticuerpos que se unen a diversos antígenos nucleares, como ADN, ARN, proteínas (llamados en conjunto ANA genéricos). El patrón de fluorescencia nuclear indica el tipo de anticuerpo presente en el suero del paciente. Se reconocen cuatro patrones básicos:

- *La tinción nuclear homogénea o difusa* habitualmente refleja anticuerpos contra cromatina, las histonas y ocasionalmente el ADN bicatenario.
- *Los patrones de tinción anular o periférica* son indicativos la mayoría de las veces de anticuerpos dirigidos contra ADN bicatenario.
- *El patrón moteado* se refiere a la presencia de puntos de tamaño uniforme o variado. Este es uno de los patrones de fluorescencia que se observan con más frecuencia, por lo que es el menos específico. Refleja la presencia de anticuerpos contra componentes nucleares distinto al ADN. Los ejemplos incluyen el antígeno Sm, la ribonucleoproteína, y los antígenos reactivos SS-A y SS-B.
- *El patrón nucleolar* se refiere a la presencia de algunos puntos definidos de fluorescencia dentro del núcleo y representa anticuerpos contra el ARN. Este patrón se ha descrito la mayoría de las veces en pacientes con esclerosis sistémica (Robbins y col., 2010).

Nefritis Lúpica

La nefritis lúpica es una enfermedad renal secundaria al lupus eritematoso sistémico.

El riñón es uno de los órganos implicados con más frecuencia en el LES. La mayoría de los enfermos con LES presentarán afectación renal en algún momento de su evolución. La lesión renal en el LES es debida tanto al proceso inflamatorio desencadenado por los mecanismos autoinmunes, como a la respuesta de los diversos componentes del tejido renal a dicha inflamación (Inmaculada y col., 2002).

Casi el 50% de los pacientes con LES desarrollan enfermedad renal en el primer año del diagnóstico. Aproximadamente el 20% de los pacientes con LES con enfermedad renal incluyen a niños y adultos mayores. Lesiones glomerulares y microvascular similares a lupus puede ocurrir aunque con menos frecuencia en asociación con otras enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, fiebre reumática, enfermedad mixta del tejido conectivo, y diversas vasculitis no infecciosas (Seshan y Jenette, 2009).

Como en la mayoría de las enfermedades crónico-degenerativas, una vez que el daño llega a nivel renal, el índice de mortalidad aumenta en la mayoría de los pacientes. Esto no es diferente para el LES, donde el paso a la nefritis lúpica implica un mayor riesgo para los pacientes (tabla 1).

Fisiopatología

Una amplia gama de cambios patológicos renales en el LES implican alteraciones glomerulares (figura 1), compartimentos túbulo-intersticiales, y vasculares caracterizados por lesiones proliferativos, no proliferativas, inflamatorias, y escleróticas, con diferentes niveles de gravedad. Éstos pueden o no caer estrictamente en determinadas perfiles clínicos, y ayudan a orientar el tipo de tratamiento y el pronóstico. Las características patológicas son muy variables de paciente a paciente. (Seshan y Jenette, 2009).

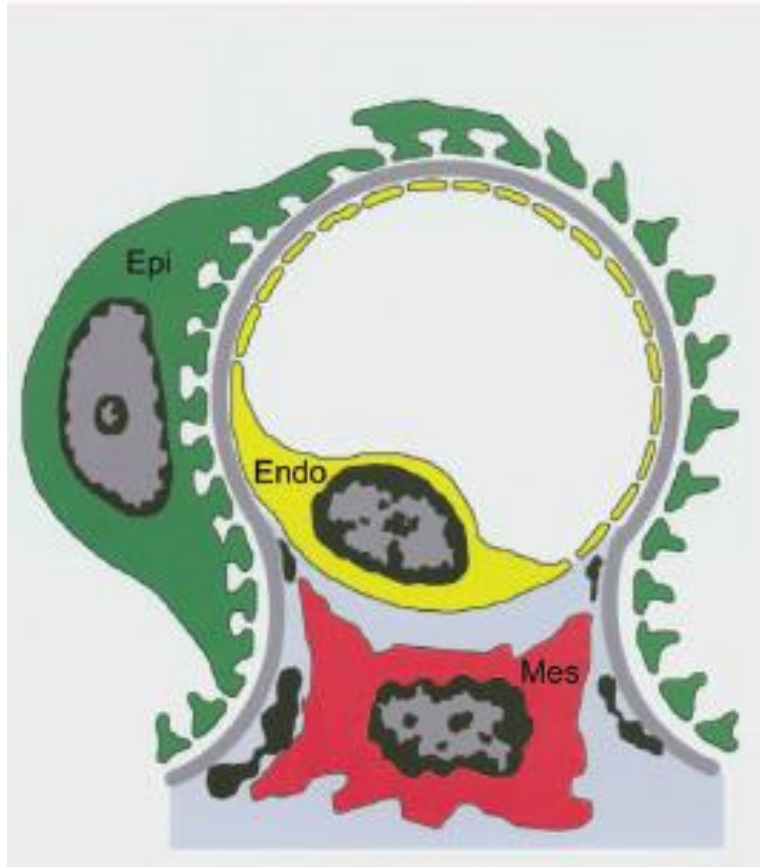


Figura 1. Representación de un glomérulo. En esta figura se observa la representación de un glomérulo y sus partes, se observa el epitelio (Epi), el endotelio (Endo) y una célula mesangial (Mes) (Seshan y Jenette, 2009).

Tabla 0. Porcentaje de supervivencia en series publicadas en LES en niños. En esta tabla se muestra un análisis de datos de la morbilidad y mortalidad en pacientes infantiles con lupus y con nefritis lúpica (Blanca, et al., 2009).

Autores Años	Pacientes n	5 años	10 años	15 años	20 años
Meislin and Rothfield, 1968	42	42/72			
Walravens and Chase, 1976	50		60-70		
Abeles et al., 1980	67	89/100			
Careiro et al. 1981	42	59/83	48/76	77	
Platt et al., 1982	70	90	85	77	
Glidden et al., 1983	55	92	85		
Lacks and White, 1990	32	85			
Yang et al., 1994	167	91			
Wang L et al., 2003	153	75	63		
Candel Chalom et al., 2004	64	94	87	79	
Miettunen et al., 2004	51	100	86		
Appenzeller et al., 2005	61	80			48
Gonzalez B et al., 2005	50	95	90		

*Porcentaje con enfermedad renal/porcentaje sin enfermedad renal

*Todos los pacientes tienen nefritis lúpica

Diagnóstico

Al igual que en otras enfermedades médicas del riñón, la biopsia renal en el LES es rutinariamente examinada por microscopía de luz, microscopía de inmunofluorescencia, y microscopía electrónica, tras un procesamiento previo, seccionado del tejido fino, y el uso de colorantes especiales para evaluar exhaustivamente todos los compartimentos del parénquima renal (glomérulos, túbulos, vasos e intersticio) (Seshan y Jenette, 2009).

Clasificación de la Organización Mundial de la Salud.

Aunque la enfermedad renal en el LES se ha observado desde hace más de un siglo, la clasificación de todo el espectro de las lesiones glomerulares se intentó por primera vez por un grupo de patólogos en Buffalo, Nueva York, en 1974 (tabla 2), bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud, basándose en la patología caracterizada en la biopsia (Seshan y Jenette, 2009). Esto fue posteriormente modificado y revisado en 1982, así como 1995 (tabla 3), teniendo en cuenta la microscopía óptica, inmunohistoquímica, y hallazgos en microscopía electrónica. Cada clase y subclase se hizo para reflejar la variabilidad de las lesiones renales, así como para identificar los parámetros de importancia pronóstica. Las biopsias renales se llevan a cabo en pacientes con LES para proporcionar un diagnóstico, y dar una idea de la gravedad y la actividad (reversibilidad) de la enfermedad renal, para proporcionar información pronóstica y para guiar la terapia (Seshan y Jenette, 2009).

Los cambios morfológicos en la biopsia renal de un paciente con LES comprenden un amplio espectro de lesiones, vasculares, glomerulares y túbulo-intersticiales. La clasificación de la nefritis lúpica se ha desarrollado durante los últimos 40 años a medida que se han identificado y definiendo un mayor tipo de lesiones. Ha sido un reto cada vez mayor para aplicar nuevos conocimientos patogénicos a la interpretación de la biopsia renal en el LES y correlacionar los hallazgos patológicos con los síntomas clínicos, la elección del tratamiento y el pronóstico (Weening y col., 2004).

A pesar de esto la correlación de las características clínicas y serológicas renales subyacentes con hallazgos patológicos renales no es absoluta, tiene un valor predictivo pobre en casi un 30% a un 50% de los casos. (Seshan y Jenette, 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, la clasificación actual de la OMS para la clasificación de la nefritis lúpica, se basa en la correlación del uso de tres técnicas de microscopía (figura 2), las cuales son, la microscopía óptica, donde se evalúa la morfología glomerular principalmente, la inmunofluorescencia, donde se evalúa el depósito de diferentes tipos de inmunocomplejos, (como son IgG, IgM, IgE, C1q, C3 y C5), y la microscopía electrónica de transmisión (donde se evalúan las lesiones a nivel de ultra estructura de los glomérulos, y la ubicación de inmunocomplejos).

Tabla 2. Clasificación Original de la OMS. En esta tabla se muestra la clasificación original realizada por primera vez por un grupo de patólogos en 1974, bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud, basada en los hallazgos de la biopsia renal (Inmaculada y col., 2002).

Tipo	Características
Tipo I	Glomérulos normales (por MO, IF, ME)
Tipo II	Enfermedad Mesengial pura a) Mesangio normocelular por MO, con depósitos mesangiales po IF y/o ME b) Mesangio hiper celular con depósitos mesangiales por IF y/ ME
Tipo III	Glomerulonefritis proliferativa focal y segmentaría
Tipo IV	Glomerulonefritis proliferativa difusa
Tipo V	Glomerulonefritis membranosa

Tabla 3. Clasificación modificada de la OMS (1982). En esta tabla se muestra la clasificación modificada por la OMS en el año de 1982 donde se consideran los hallazgos, en la microcopia óptica, la inmunofluorescencia, y la microscopia electrónica.(Inmaculada y col., 2002).

Tipo	Características
Tipo I	a) Glomérulos normales (MO, IF, ME) b) Glomérulos normales con MO pero con depósitos en IF y/o ME
Tipo II	Alteraciones mesangiales puras (mesangiopatía) a) Mesangio ensanchado y/o hiper celularidad leve (+) b) Hiper celularidad moderada (+++)
Tipo III	Glomerulonefritis focal y segmentaria (asociada con alteraciones mesangiales leves o moderadas) a) Con lesiones necrotizantes activas b) Con lesiones activas y esclerosas c) Con lesiones esclerosas
Tipo IV	Glomerulonefritis difusa (proliferación mesangial grave, endocapilar y/o membranoproliferativa, y/o extensos depósitos subendoteliales) Hay depósitos mesangiales siempre y subepiteliales con frecuencia y pueden ser numerosos a) Sin lesiones segmentarias b) Con lesiones necrotizantes activas c) Con lesiones activas y esclerosas d) Con lesiones esclerosas
Tipo V	Glomerulonefritis membranosa a) Pura b) Asociada con lesiones de categoría II (a o b) c) Asociada con lesiones de categoría III (a, b o c)* d) Asociada con lesiones de categoría IV (a, b, c o d)
Tipo VI	Glomeruloesclerosis avanzada

*: Retirada en la clasificación modificada de 1995

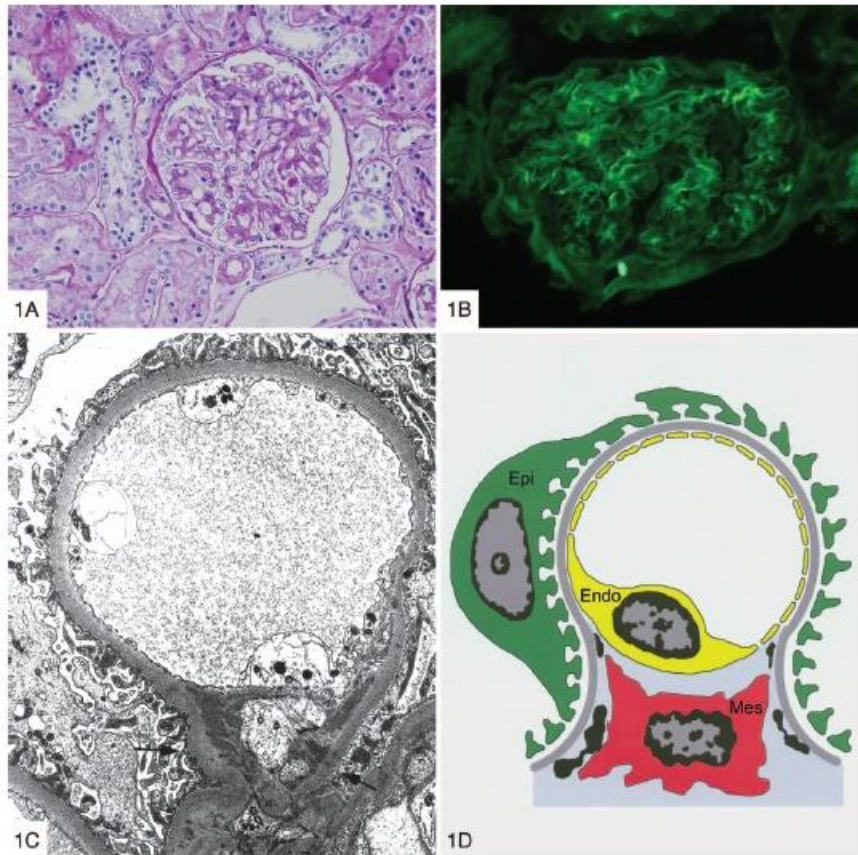


Figura 2. Comparación de las técnicas de microscopía. En esta figura se muestran las tres técnicas de microscopía en las que se basa la clasificación actual de la OMS para la clasificación de la nefritis lúpica, 1A. Evaluación por microscopía óptica de un glomérulo teñido con H-E, 1B. Evaluación de depósitos de inmunocomplejos por microscopía de inmunofluorescencia, 1C. Evaluación de un glomérulo por microscopía electrónica de transmisión, 1D. Representación de un glomérulo con pequeños depósitos mesangiales (Seshan & Jenette, 2009).

Microscopia Óptica

En general, un haz de una radiación de una longitud de onda determinada no puede utilizarse para examinar detalles estructurales mucho más pequeños que su propia longitud de onda. Esto supone una limitación fundamental de los microscopios. Así pues, el límite de resolución de un microscopio óptico está determinado por la longitud de onda de la luz visible, que abarca desde 0.4 micrómetros (para el violeta) hasta 0.7 micrómetros (para el rojo lejano). En la práctica, las bacterias y las mitocondrias, que tienen aproximadamente 0.5 micrómetros de diámetro, son las estructuras más pequeñas que se pueden observar nítidamente al microscopio óptico; los detalles más pequeños que estas dimensiones quedan oscurecidos por los efectos de la naturaleza ondulatoria de la luz (Alberts, 1996).

Microscopia de Fluorescencia

Las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz a otra longitud de onda mayor. Si un componente de ese tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la luz emitida, el componente aparece brillante sobre el fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada.

Los colorantes fluorescentes utilizados para la tinción celular son detectados con la ayuda del microscopio de fluorescencia. Este microscopio es similar al microscopio óptico convencional, a excepción de que la luz incidente, procedente de una fuente, atraviesa dos series de filtros, uno para interceptar la luz antes de que llegue a la muestra y otro para filtrar la luz obtenida a partir de la muestra.

La microscopia de fluorescencia se utiliza habitualmente para detectar específicamente proteínas u otras moléculas en células y tejidos. Una técnica muy utilizada y potente consiste en acoplar covalentemente un colorante fluorescente a

moléculas de un anticuerpo, el cual se puede utilizar entonces como un reactivo muy específico y versátil que se une selectivamente a las macromoléculas que reconoce en las células o en la matriz extracelular (Alberts, 1996).

Microscopia Electrónica de Transmisión

La relación entre el límite de resolución y la longitud de onda de la luz que se utiliza para iluminar la muestra es cierta para cualquier forma de radiación, con independencia de que sea un haz de luz o un haz de electrones. Sin embargo, en el caso de los electrones el límite de resolución puede hacerse muy pequeño. La longitud de onda del electrón disminuye a medida que aumenta su velocidad. Además, los problemas de preparación de la muestra, de contrastado y de lesión por la radiación, limitan claramente la resolución normal para los objetos biológicos a unos 2nm, unas 100 veces mayor a la resolución de un microscopio óptico.

El microscopio electrónico de transmisión es, en sus rasgos generales, parecido a un microscopio óptico, aunque es de mayor tamaño e invertido. La fuente de iluminación es un filamento o cátodo situado en la parte superior de una columna cilíndrica de unos dos metros de altura, que emite electrones. Puesto que los electrones son dispersados al colisionar con las moléculas del aire, se ha de extraer el aire de la columna, para producir un vacío en ella. A continuación, los electrones son acelerados desde el filamento mediante un ánodo, que pueden atravesar a través de un diminuto orificio, y forman un haz de electrones que se dirige hacia la parte inferior de la columna. Unas bobinas magnéticas situadas a intervalos a lo largo de la columna enfocan el haz de electrones, como las lentes enfocan la luz en un microscopio óptico. La muestra se coloca en el vacío de la columna a través de una antecámara de compresión, y se sitúa en el camino del haz de electrones. Como en el caso del microscopio óptico, normalmente la muestra se contrasta, en este caso mediante un material electrodensito. Algunos de los electrones que atraviesan la muestra son dispersados por estructuras contrastadas con el material electrodensito; el resto de electrones son enfocados formando una imagen, de una manera análoga a como se forma la imagen en el microscopio óptico, sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla fluorescente o hacia una cámara CCD (charge-coupled device). Puesto que los

electrones que han sido dispersados han desaparecido del haz, las regiones densas de la muestra aparecen como aéreas de un flujo de electrones, que aparecen negras (Alberts, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

Para este trabajo se utilizaron muestras renales frescas y fijadas, obtenidas en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. Las muestras fueron previamente fijadas con formaldehído buffer y sometidas al procedimiento de embebido con parafina.

Se manejaron tres tipos de muestras:

- La primera muestra obtenida de un riñón sano.
- La segunda muestra obtenida de un riñón con nefropatía, con esclerosis focal y segmentaria.
- La tercera muestra obtenida de un riñón con nefritis lúpica.

Cada una de estas muestras se sometió al mismo procedimiento, el cual fue dividido en tres técnicas fundamentales de microscopía, histoquímica e inmunohistoquímica.

Para la histoquímica, se basó en cuatro tinciones específicas: hematoxilina-eosina, ácido peryódico de Shiff, tricrómica de Masson y metilamina de plata.

Para la inmunohistoquímica, se basó en una inmuno-tinción utilizando anticuerpos anti-IgG unidos a peroxidasa.

Histoquímica

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Las muestras se fijaron previamente a la tinción con formaldehído buffer, se deshidrataron utilizando un deshidratador automático (Thermo-Scientific, Shandon Citadel 2000) toda la noche. Después las muestras se embebieron en bloques de

parafina utilizando un embebedor (Thermo-Electron Corporation, Shandon Histocentre 3). Como siguiente paso, éstas se sometieron a enfriamiento en un congelador para su posterior corte con el microtomo (Leica, Leica-RM2145). El corte fue hecho a 4 micras (que es el corte estándar para el estudio de muestras en estudios histológicos), utilizando un baño maría con alcohol y grenetina, obteniendo las muestras en un portaobjetos. Posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 56°C para desparafinar el tejido, para con esto proceder a realizar la tinción específica.

Para realizar la tinción con hematoxilina-eosina, la muestra se hidrató utilizando el carro de tinciones, el cual está formado por xilol, alcohol concentrado, alcohol al 98 % y alcohol al 96 % y finalizando con agua. Después de esto la muestra se lavó con agua corriente y se sometió al colorante de hematoxilina por 5 minutos, se volvió a lavar con agua corriente y se sometió a unas cuantas sumergidas en alcohol ácido, se lavó con agua de nuevo y se sometió a unas cuantas sumergidas de agua amoniacal, se lavó con agua y se sumergió en colorante eosina por 20 segundos. Seguido se deshidrató utilizando el carro de tinciones en sentido contrario: alcohol al 96, alcohol al 98, alcohol absoluto y xilol. Por último la muestra se montó utilizando resina (Meck, Resin solution).

Tinción con Ácido Peryódico de Shiff

Las muestras se fijaron previamente a la tinción con formaldehido buffer, se deshidrataron utilizando un deshidratador automático (Thermo-Scientific, Shandon Citadel 2000) toda la noche. Después de esto las muestras se embebieron en bloques de parafina utilizando un embebedor (Thermo-Electron Corporation, Shandon Histocentre 3). Como siguiente paso, éstas se sometieron a enfriamiento en un congelador para su posterior corte con el microtomo (Leica, Leica-RM2145). El corte fue hecho a 4 micras (que es el corte estándar para el estudio de muestras en estudios histológicos), utilizando un baño maría con alcohol y grenetina y obteniendo las muestras en un portaobjetos, posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 56°C para desparafinar el tejido y proceder a realizar la tinción específica.

Para realizar la tinción con ácido peryódico de Shiff, la muestra se hidrató utilizando el carro de tinciones, el cual está formado por xilol, alcohol concentrado, alcohol al 98 % y alcohol al 96 % y finalizando con agua, y se lavó con agua destilada.

Después de esto se sumergió en ácido peryódico por 5 minutos, después de lavó con agua corriente y se enjuagó con agua destilada, para posteriormente sumergir en el reactivo de Schiff por 15 minutos. Después se lavó con agua corriente y se enjuagó con agua destilada, y para finalizar se contrastó sumergiendo la muestra en colorante hematoxilina por 2 minutos, se lavó con agua corriente y se deshidrató utilizando el carro de tinciones en sentido contrario: alcohol al 96 %, alcohol al 98 %, alcohol absoluto y xilol. Por último la muestra se montó utilizando resina (Meck, Resin solution).

Tinción Tricrómica de Masson

Las muestras se fijaron previamente a la tinción con formaldehído buffer, se deshidrataron utilizando un deshidratador automático (Thermo-Scientific, Shandon Citadel 2000) toda la noche. Después de esto las muestras se embebieron en bloques de parafina utilizando un embebedor (Thermo-Electron Corporation, Shandon Histocentre 3). Como siguiente paso, éstas se sometieron a enfriamiento en un congelador para su posterior corte con el microtomo (Leica, Leica-RM2145). El corte fue hecho a 4 micras (que es el corte estándar para el estudio de muestras en estudios histológicos), utilizando un baño maría de agua y alcohol con grenetina y obteniendo las muestras en un portaobjetos, posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 56°C para desparafinar el tejido para proceder a realizar la tinción específica.

Para realizar la tinción tricrómica de Masson la muestra se hidrató utilizando el carro de tinciones, el cual está formado por xilol, alcohol concentrado, alcohol al 98 y alcohol al 96 y finalizando con agua y lavando con agua destilada. Después de esto la muestra se colocó en solución de Bouin en un horno a 56°C por 1 hora, posterior a este tiempo la muestra se dejó enfriar por 10 minutos y se lavó con agua corriente hasta que el color amarillo de la solución Bouin desapareció. Seguido se sumergió la muestra en colorante hematoxilina por 5 minutos, se lavó con agua corriente y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se sumergió en solución de escarlata de Biebrich por 15 minutos y se lavó con agua destilada. Seguido se diferenció con la solución de ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10-15 minutos. Para finalizar se contrastó con azul de anilina por 10 minutos y se enjuagó con agua destilada. Se deshidrató utilizando

el carro de tinciones en sentido contrario: alcohol al 96, alcohol al 98, alcohol absoluto y xilol. Por último la muestra se montó utilizando resina (Meck, Resin solution).

Tinción con Metilamina de Plata

Las muestras se fijaron previamente a la tinción con formaldehído buffer, se deshidrataron utilizando un deshidratador automático (Thermo-Scientific, Shandon Citadel 2000) toda la noche. Después de esto las muestras se embebieron en bloques de parafina utilizando un embebedor (Thermo-Electron Corporation, Shandon Histocentre 3). Como siguiente paso, éstas se sometieron a enfriamiento en un congelador para su posterior corte con el microtomo (Leica, Leica-RM2145). El corte fue hecho a 4 micras (que es el corte estándar para el estudio de muestras en estudios histológicos), utilizando un baño maría con alcohol y grenetina y obteniendo las muestras en un portaobjetos, posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 56°C para desparafinar el tejido para proceder a realizar la tinción específica.

Para realizar la tinción de metilamina de plata la muestra se hidrató utilizando el carro de tinciones, el cual está formado por xilol, alcohol concentrado, alcohol al 98 % y alcohol al 96 % y finalizando con agua y lavando con agua destilada. Después de esto la muestra se sumergió en ácido peryódico por 15 minutos, posterior a esto se lavó y enjuagó con agua destilada, seguido, la muestra se colocó en solución de metilamina en un horno a 56°C por 1 hora o hasta que la muestra presentara un color café oscuro, seguido se lavó y enjuagó con agua destilada. Después se sumergió en cloruro de oro por 1 minuto y sin lavar se pasó a la solución de tiosulfato de sodio al 2.5% por 2 minutos más y se lavó con agua destilada. Para finalizar se contrastó utilizando el colorante verde claro por 5 minutos, se lavó y enjuagó con agua destilada. Se deshidrató utilizando el carro de tinciones en sentido contrario, alcohol al 96, alcohol al 98, alcohol absoluto y xilol. Por último la muestra se montó utilizando resina (Meck, Resin solution).

Inmunohistoquímica

Tinción con IgG

Las muestras se fijaron previamente a la inmuno-tinción con formalina buffer, se deshidrataron utilizando un deshidratador automático (Thermo-Scientific, Shandon Citadel 2000) toda la noche. Después de esto las muestras se embebieron en bloques de parafina utilizando un embebedor (Thermo-Electron Corporation, Shandon Histocentre 3). Como siguiente paso, éstas se sometieron a enfriamiento en un congelador para su posterior corte con el microtomo (Leica, Leica-RM2145). El corte fue hecho a 3 micras (que es el corte estándar para el estudio de muestras en estudios inmuno-histológicos), utilizando un baño maría con alcohol y obteniendo las muestras en un portaobjetos cubierto con poli lisina, posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 56°C para desparafinar el tejido para proceder a realizar la tinción específica.

Para realizar la inmuno-tinción contra IgG la muestra se hidrató utilizando el carro de tinciones, el cual está formado por xilol, alcohol concentrado, alcohol al 98 y alcohol al 96 y finalizando con agua y lavando con agua destilada. Después de esto la muestra se sometió al desenmascaramiento del epítipo utilizando calor químico, para esto la muestra se colocó en solución de citrato buffer a 98°C en baño maría por 20 minutos, seguido se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez fría la muestra se colocó en una cámara húmeda, para evitar que la muestra se secase, y se lavó con PBS-BSA 0.2%. Seguido de esto se le agregó a la muestra peróxido de hidrógeno al 5% durante 10 minutos, esto para bloquear la peroxidasa endógena eritrocitaria, ya que los anticuerpos utilizados estaban unidos con peroxidasa. Después la muestra se lavó con PBS-BSA al 0.2%. Posteriormente se le agregó el anticuerpo (Bethyl, Human IgG-heavy and light chain Antibody, unido a HRP) por 40 minutos, evitando que la muestra se secase en este tiempo. Posterior a esto la muestra se lavó con PBS-BSA al 0.2% y se reveló agregándole el cromógeno (DAB diluido con peróxido de hidrógeno) por 15 minutos. Seguido se lavó con PBS-BSA al 0.2% y para finalizar se contrastó utilizando

el colorante hematoxilina por 2 minutos y se lavó con agua destilada. Se deshidrató utilizando el carro de tinciones en sentido contrario, alcohol al 96 %, alcohol al 98 %, alcohol absoluto y xilol. Por último la muestra se montó utilizando resina (Meck, Resin solution).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de montar y estandarizar las dos técnicas necesarias para el estudio histológico de la nefritis lúpica, se sometieron a evaluación las muestras previamente seleccionadas, obteniéndose resultados variables para cada tipo de técnica que a continuación se presentan.

Histoquímicas

Tinción con hematoxilina-eosina

La muestra control sano, teñida con hematoxilina-eosina (fig. 3, a) se observó a diferentes aumentos para apreciar su morfología. Éste mostró glomérulos en adecuada cantidad, bien conservados, con el intersticio y túbulos sin alteraciones.

El control positivo, teñido con hematoxilina-eosina (fig. 3, b) también se observó a distintos aumentos. Éste mostró adecuado número de glomérulos, presentó proliferación de células del mesangio a una magnificación de 20X, logrando evidenciarse aún más a un aumento de 63X.

La muestra correspondiente al caso problema teñida con hematoxilina-eosina (fig. 3, c) se observó en distintos aumentos. Este presentaba un número de glomérulos adecuado, en un acercamiento (63X) se observó proliferación de células mesangiales.

Tinción con ácido peryódico de Schiff

La muestra de control sano, teñida con PAS (fig. 4, a) se observó a diferentes aumentos, con la posibilidad de evidenciar la existencia de depósitos de glucógeno. En éste no se identificaron depósitos.

El control positivo, teñido con PAS (fig. 4, b) se observó a diferentes aumentos con el mismo propósito. En éste no se localizaron depósitos de glucógeno.

La muestra del caso problema, teñido con PAS (fig. 4, c) se observó a diferentes aumentos, con el mismo propósito. En éste no se observaron depósitos de glucógeno.

Tinción tricrómica de Masson

La muestra control sano, teñida con la coloración tricrómica de Masson (fig. 5, a) se observó a diferentes aumentos para lograr apreciar si existía proceso de fibrosis glomerular. Éste fue negativo a fibrosis, y se observó una buena delimitación de la membrana basal glomerular y tubular (20X).

El control positivo teñido con la coloración tricrómica de Masson (fig. 5, b) se observó a diferentes aumentos con el mismo propósito. Éste mostro tres glomérulos, uno parcialmente y dos totalmente fibrosados. En un aumento de 20X se observaron glomérulos totalmente fibrosados y, en un aumento mayor (63X) uno parcialmente fibrosado, también se aprecian hendiduras y algunas células.

La muestra del caso problema teñida con la coloración tricrómica de Masson (fig. 5, c) se observó a diferentes aumentos con el mismo propósito. Éste presentó un número razonable de glomérulos total o parcialmente fibrosados.

Tinción con metilamina de plata

La muestra control sano, teñida con la coloración de metilamina de plata (fig. 6, a) se observó a diferentes aumentos para lograr apreciar si existía daño en la cápsula de Bowman de los glomérulos. Éste mostró un patrón reticular conservado.

El control positivo teñido con la coloración de metilamina de plata (fig. 6, b) se observó a diferentes aumentos con el mismo propósito. Éste presentó un patrón reticular conservado.

La muestra problema teñida con la coloración de metilamina de plata (fig. 6, c) se observó a diferentes aumentos con el mismo propósito. Éste presentó un patrón reticular conservado.

Inmunohistoquímica

Tinción con IgG

La muestra de biopsia de piel (control positivo) (fig. 7, a) se observó a diferentes aumentos para la búsqueda de complejos inmunológicos. Este presentó positividad (++) difusa.

La muestra del caso problema con una dilución del anticuerpo 1:200 (fig 7, b) se observó a diferentes aumentos para el mismo propósito. Éste presentó negatividad.

La muestra del caso problema con una dilución del anticuerpo 1:100 (fig. 7, c) se observó a diferentes aumentos para el mismo propósito. Éste también presentó negatividad.

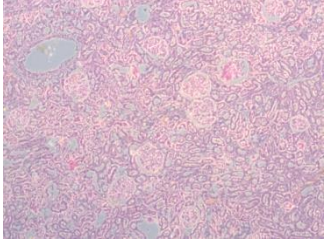
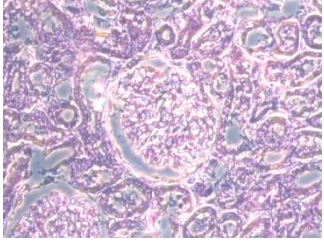
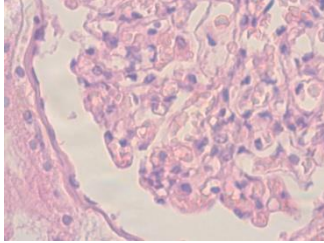
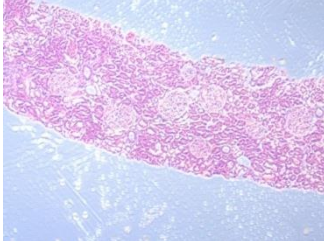
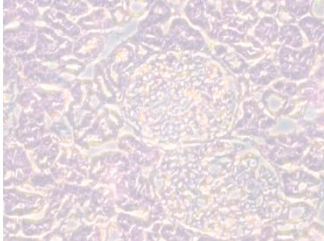
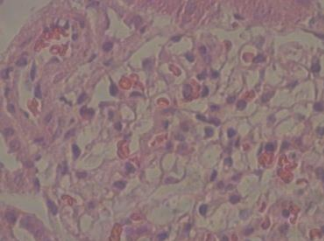
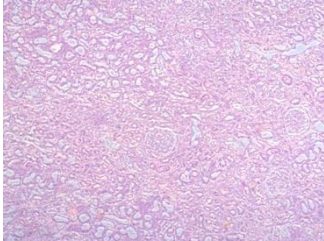
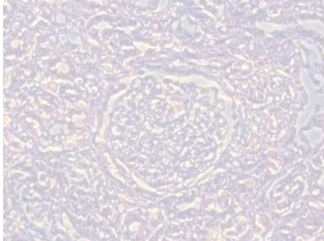
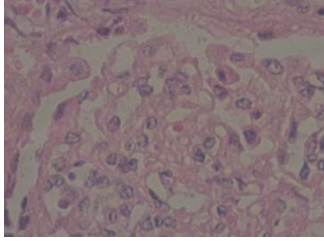
	10X	20X	63X
a)H-E -			
b)H-E +			
c)L.E.S. H-E			

Figura 3. Hematoxilina-Eosina. En esta figura se pueden observar los resultados de someter las tres muestras correspondientes a la coloración con H-E. a) Se observa en tres diferentes aumentos (10x, 20x y 63x) la morfología de un glomérulo sano. b) Aquí se logra observar glomérulos teñidos con H-E, de un riñón con nefropatía focal y segmentaria donde se alcanza a apreciar una ligera proliferación mesangial. c) Aquí se logra observar otro glomérulo teñido con H-E, éste de la muestra con diagnóstico de LES, en la cual se observa hiper celularidad mesangial.

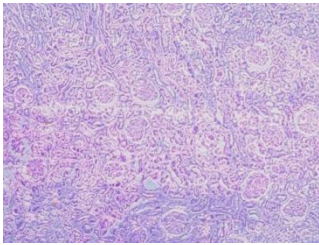
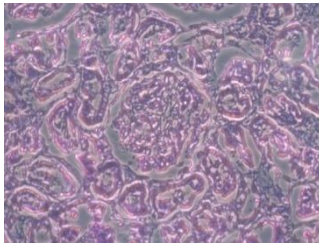
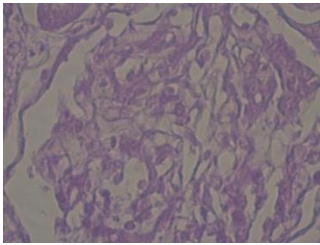
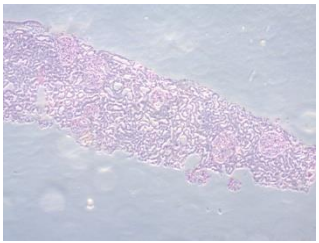
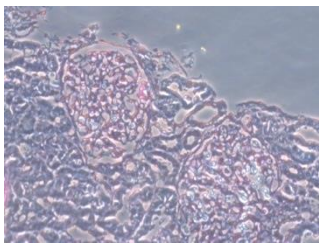
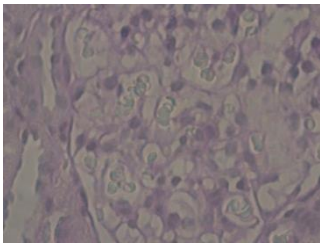
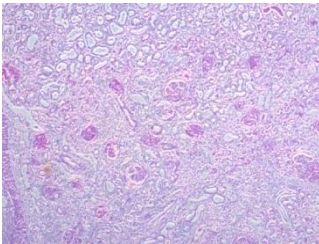
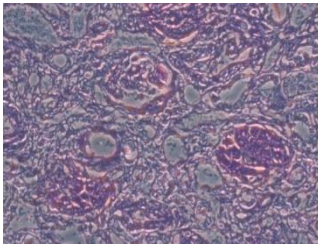
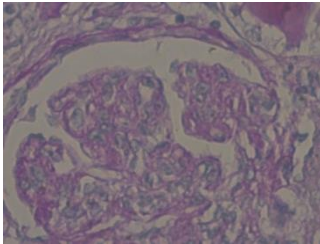
	10X	20X	63XX
a)PAS -			
b)PAS +			
c)L.E.S. PAS			

Figura 4. Ácido peryódico de Shiff. En esta figura se pueden observar los resultados de someter las tres muestras a la coloración con PAS a tres diferentes aumentos (10x, 20x y 63x). a) En la primera parte se logra observar la histología del riñón sano, donde se aprecia una coloración rosa mexicano, deduciendo con esto que no existe una gran proliferación dentro del glomérulo. b) En esta segunda muestra se observa una coloración más abundante con la cual se define una ligera proliferación mesangial aumentada, posiblemente ocasionada por los depósitos inmunológicos. c) En esta tercera muestra, la cual es positiva a LES, se logra observar una fuerte coloración rosa, incluso desde un punto de vista panorámico (10x), a 63X se observa una predominante celularidad mesangial que sobresale en el glomérulo.

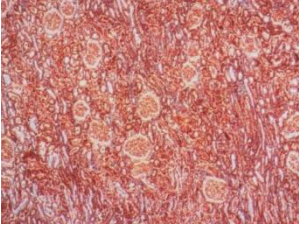
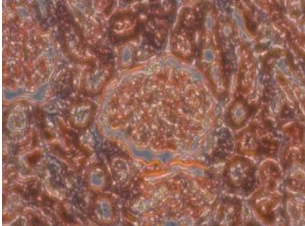
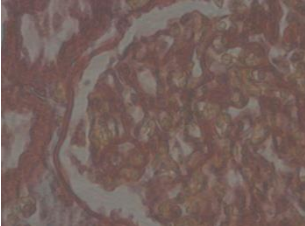
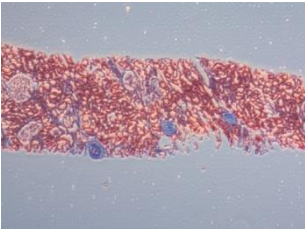
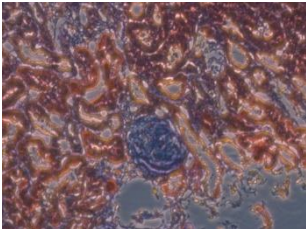
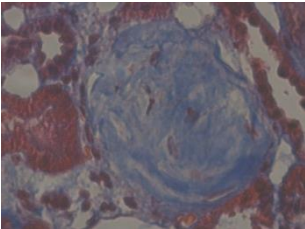
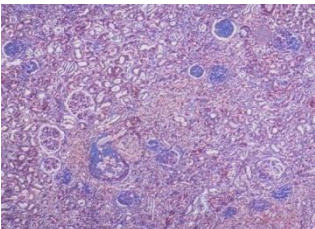
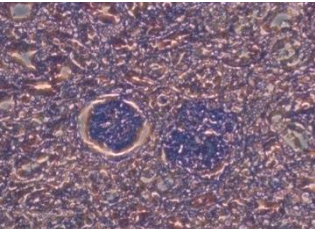
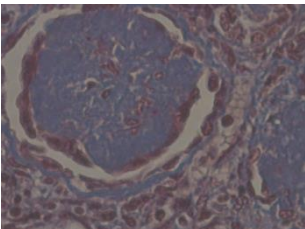
	10X	20X	63X
a) MASSON -			
b) MASSON +			
c) L.E.S. MASSON			

Figura 5. Tricrómica de Masson. En esta figura se logra observar las tres muestras sometidas a la coloración tricrómica de Masson a tres diferentes aumentos (10x, 20x y 63x) la cual ayuda a evidenciar la fibrosis tisular gracias a la coloración del colágeno (azul). a) En la primera muestra se logra observar glomérulos intactos. Se logra apreciar colágeno en la matriz extracelular, donde se encuentra normalmente en tejido sano. b) En esta segunda muestra se observan algunos glomérulos fibrosados, teñidos completamente de azul, debido a la fibrosis, causado por depósitos inmunológicos. c) De igual forma en esta tercera muestra se observa una gran cantidad de glomérulos fibrosados causados también por depósitos inmunológicos.

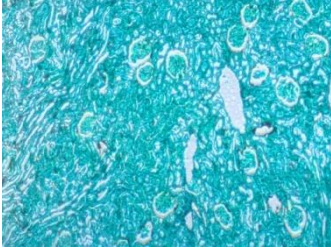
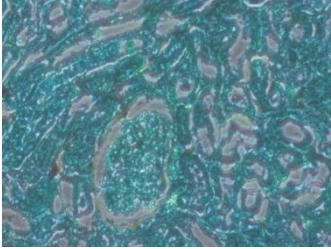
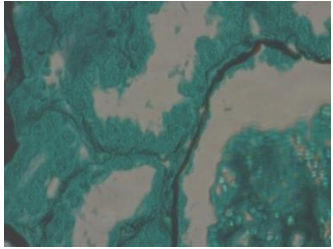
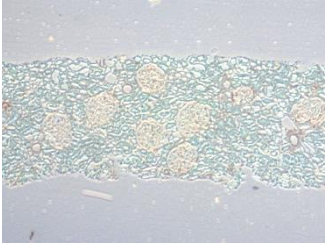
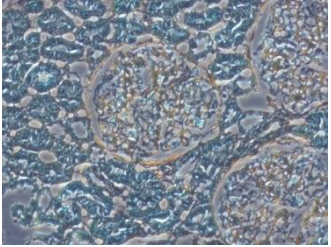
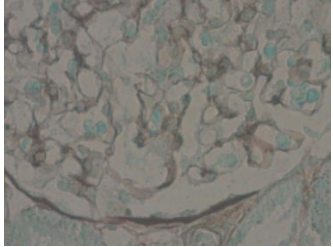
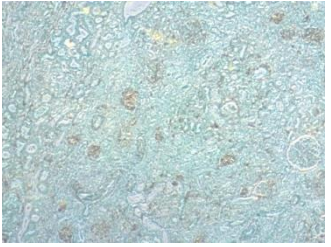
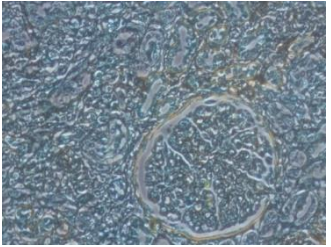
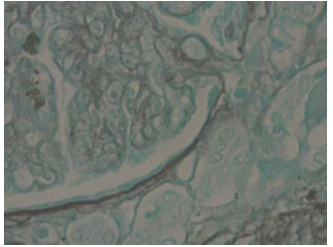
	10X	20X	63X
a)PLATA -			
b)PLATA +			
c)L.E.S. PLATA			

Figura 6. Metilamina de plata. En esta figura pueden observarse las tres muestras sometidas a la coloración con metilamina de plata, la cual ayuda a apreciar la integridad de la cápsula de Bowman que recubre al glomérulo, el cual está formado principalmente de colágeno tipo IV, a tres diferentes aumentos (10x, 20x y 63x). a) En la primera muestra se logran observar glomérulos sanos, con su cápsula de Bowman intacta. b) En esta segunda muestra se observan las cápsulas de los glomérulos un poco más grandes, sin embargo conserva su patrón reticular. c) En esta tercera muestra también se logra observar las cápsulas gruesas y oscuras, también conservando su patrón reticular.

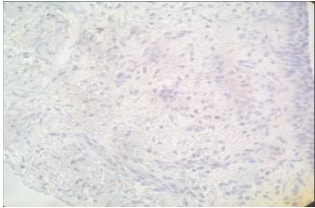
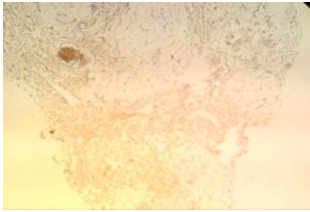
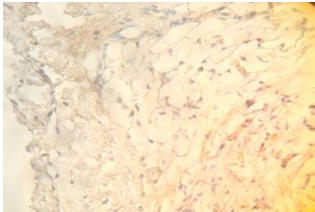
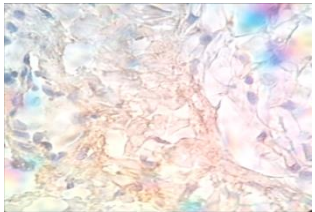
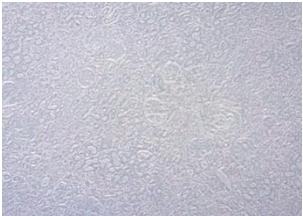
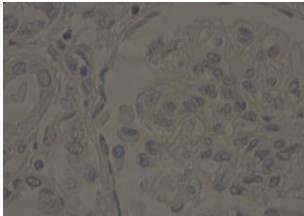
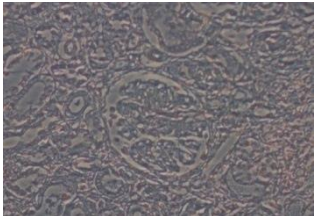
	10X	20X	63X
a) IgG -			
b) IgG +			
c) L.E.S. IgG			

Figura 7. Inmunohistoquímica IgG. En esta figura se observan tres muestras sometidas a la inmuno-tinción con anti-IgG con el fin de localizar los depósitos inmunológicos. a) En la primera muestra se aprecia una biopsia de piel negativa a depósitos inmunológicos. b) En la segunda se observa una biopsia de piel positiva a dermatosis y en la tinción positiva a complejos inmunológicos IgG; c) En la tercera muestra puede observarse el riñón positivo a LES, en el cual no se observa positividad para la inmuno-tinción para IgG.

Estos resultados son comparables con los reportados por Weening en 2004, donde se puede apreciar en las histoquímicas coloraciones similares en la técnica de hematoxilina-eosina, donde se siguen patrones morfológicos similares, al igual que en la coloración de ácido peryódico de Schiff, donde varía un poco los resultados, en cuanto a los depósitos de glucógeno, pero aún así se alcanza a apreciar una proliferación mesangial similar. El caso de las coloraciones de Masson y metilamina de plata, son comparables con las reportadas por Weening en 2004 tan sólo con la coloración de metilamina de plata, donde se observan los patrones reticulares conservados y en alguno de los casos glomérulos fibrosados.

En el caso de las inmunohistoquímicas, éstas son comparables con los resultados reportados por Inmaculada y col., en 2002 donde se puede apreciar un glomérulo teñido con una inmuno-tinción por fluorescencia contra IgG, para la localización de depósitos inmunológicos, que a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo se observa una positividad en el caso de la muestra con nefritis lúpica. Esta positividad se puede comparar con el resultado de la muestra de piel con dermatosis de este trabajo, la cual dio positivo a la tinción contra IgG.

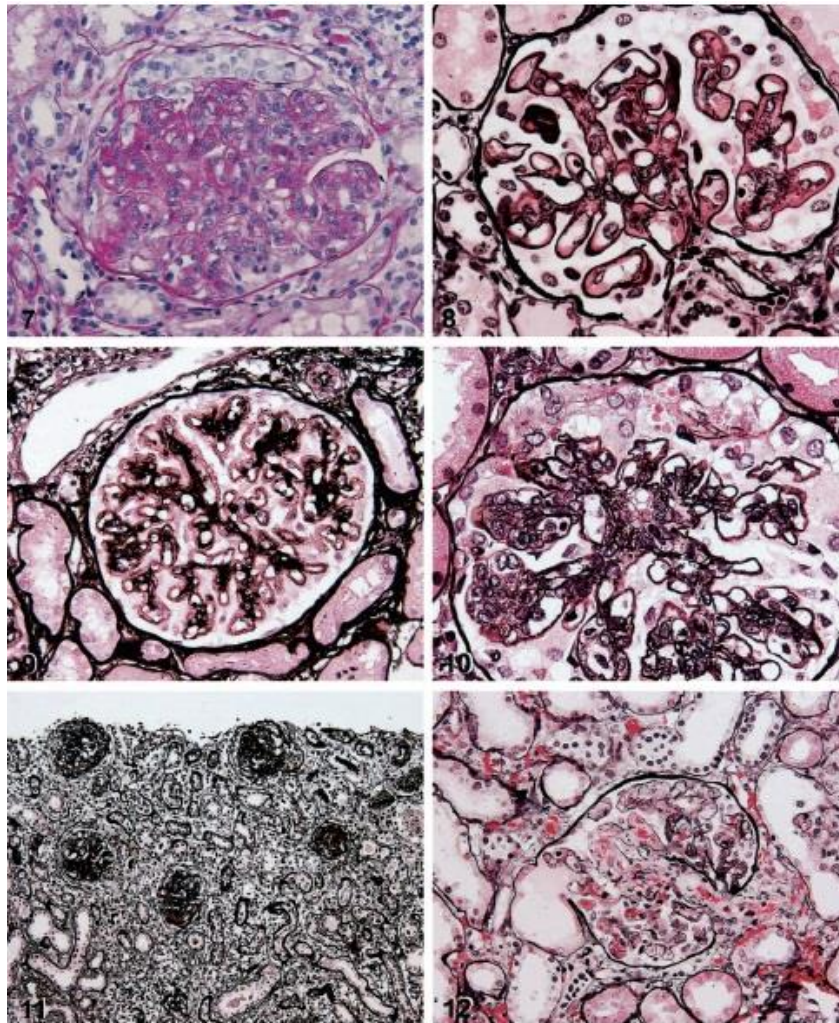


Figura 8. En ésta figura se observan los resultados reportados por Weening en 2004 con las coloraciones de PAS y metilamina de plata, en un caso de nefritis lúpica. En éste se logra apreciar una proliferación mesangial y algunos glomérulos fibrosados. (Weening, y col., 2004).

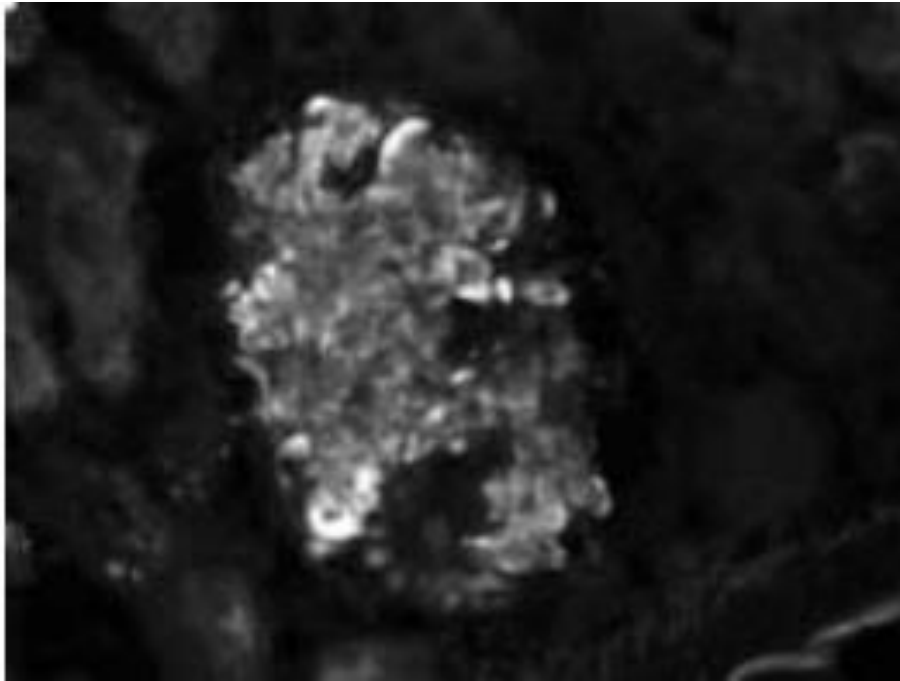


Figura 9. En esta figura se observan los resultados reportados por Inmaculada en 2002, con la inmuno-tinción por fluorescencia para IgG, utilizado para la determinación de inmunocomplejos en el espacio glomerular . En ésta se observan depósitos de IgG, en paredes vasculares, con cierto patrón lobular y menos intensos en mesangio (Inmaculada, y col., 2002).

CONCLUSIONES

- Las cuatro tinciones de histoquímica lograron estandarizarse e implementarse correctamente.
- Las histoquímicas implementadas, ayudan a evidenciar los criterios morfológicos e histopatológicos que recomienda la OMS para una correcta clasificación de la nefritis lúpica.
- Aunque tuvo que cambiarse el tipo de revelado en la inmunohistoquímica de fluorescencia a colorimétrico, se obtuvieron los resultados esperados, ya que se respetó el mismo principio (antígeno-anticuerpo).
- La inmunohistoquímica implementada, ayudó a evidenciar los criterios inflamatorios en cuanto a depósitos de inmunocomplejos se refiere, como lo recomienda la OMS para la clasificación de la nefritis lúpica.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda implementar la técnica de microscopia electrónica para el estudio de muestras biológicas, con el fin de complementar las técnicas ya implementadas y obtener un estudio más completo de la biopsia renal con padecimiento nefrítico.
- Se recomienda emplear las técnicas de microscopia para evaluar muestras de pacientes del Hospital Infantil del Estado de Sonora con diagnóstico de Nefritis Lúpica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B. (1996). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega.
- Balow, J. E. (2005). Clinical presentation and monitoring of lupus nephritis. *Lupus*, 14(1), 25-30.
- Blanca, L., Guevara, M., & Espinosa, F. (2009). Lupus eritematoso sistémico en niños, una revisión de la supervivencia. *Alerg Asma Inmunol Pediatr*, 18(1), 10-15.
- Churg, J., & Sobin, L. H. (1982). *Renal disease: classification and atlas of glomerular diseases*: Igaku-Shoin.
- Corral, J. H., Arrieta, Y. H., Carreon, F. O. C., Abarca, N. A., Jimenez, N. N., & Gonzalez, F. J. G. (2011). Change in grass population in an open grassland under continuous grazing in northern Mexico. *Interciencia*, 36(4), 300-305.
- Daleboudt, G. M. N., Broadbent, E., Berger, S. P., & Kaptein, A. A. (2011). Illness perceptions in patients with systemic lupus erythematosus and proliferative lupus nephritis. *Lupus*, 20(3), 290-298.
- Daleboudt, G. M. N., Reinders, M. E. J., Hartigh, J. d., Huizinga, T. W. J., Rabelink, A. J., de Fijter, J. W. (2013). Concentration-controlled treatment of lupus nephritis with mycophenolate mofetil. *Lupus*, 22(2), 171-179.
- Danchenko, N., Satia, J. A., & Anthony, M. S. (2006). Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 15(5), 308-318.
- Del Toro, M. E., Capote, A. C., Paneque, R. J., Gil, J. M. M., Perez, C. C., & Kokuina, E. (2008). Supervivencia en pacientes cubanos con lupus eritematoso sistémico, influencia de las características iniciales de la enfermedad. *Centro Nacional de Informacion de Ciencias Medicas*, 47(3), 1-12.
- Fouda, N., Abaza, N., El-Hilaly, R., El Said, H. W., & El-kabarity, R. H. (2012). Evaluation of visfatin in patients with systemic lupus erythematosus: Correlation with disease activity and lupus nephritis. *The Egyptian Rheumatologist*, 34(1), 9-17.

- Frankovich, J. D., Hsu, J. J., & Sandborg, C. I. (2012). European ancestry decreases the risk of early onset, severe lupus nephritis in a single center, multiethnic pediatric lupus inception cohort. *Lupus*, 21(4), 421-429.
- Frutos Sanz, M. Á., Praga Terente, M., Quereda Rodríguez-Navarro, C., Rivera Hernández, F., & Segarra, A. (2012). Nefritis lúpica: en busca de un futuro mejor. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española de Nefrología*(2), 136-138.
- Glasscock, R. J., Khorashadi, L., & Kushner, Y. B. (2012). Case 32-2012. *New England Journal of Medicine*, 367(16), 1540-1553.
- Hwang, J., Kim, H. J., Oh, J.-M., Ahn, J. K., Lee, Y. S. (2012). Outcome of reclassification of World Health Organization (WHO) class III under International Society of Nephrology-Renal Pathology Society (ISN-RPS) classification: retrospective observational study. *Rheumatology International*, 32(7).
- Inmaculada, S.-V., Carlos, T., & Josefina, M. (2002). Nefritis lúpica. *Rev. Esp. Patol.*, 35(n°3), 269-278.
- Matar, H. E., Peterson, P., Sangle, S., & D'Cruz, D. P. (2012). Correlation of 24-hour urinary protein quantification with spot urine protein:creatinine ratio in lupus nephritis. *Lupus*, 21(9), 836-839.
- Mendez, M. A. P., Hernandez, R. S., Lopez, D. J. P., & Garcia, S. S. (2011). Chemical characterization of sugarcane waste composting in the southeast of Mexico. *Interciencia*, 36(1), 45-52.
- Miranda, J. M., Jara, L. J., Calleja, C., Saavedra, M. A., Bustamante, R. M., & Angeles, U. (2009). Significado clínico de la nefropatía del síndrome antifosfolípido en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). 5(5), 209-213.
- Miranda Limón, J. M., Mendoza, L., & Saavedra, M. A. (2006). Tratamiento inmunosupresor en pacientes con glomerulonefritis lúpica. Revisión de eventos adversos. *Reumatología clínica*, 2(6), 313-321.
- Movsat Hajkhan, A., Sánchez Atrio, A. I., Pérez Gómez, A., & Albarrán Hernández, F. (2009). Protocolo de tratamiento de la nefritis lúpica. [DOI: 10.1016/S0304-5412(09)71066-2]. *Medicine*, 10(32), 2178-2179.
- Munteanu, A., Caraba, A., & Romosan, I. (2012). Treatment Of Proliferative Lupus Nephritis With Cyclophosphamide. *Analele Societatii Nationale de Biologie Celulara*, 17(2), 153-157.

- Márquez Marín, R., Sánchez Arellano, B., González Bonilla, C., Solís Vallejo, E., Matamoros Tapia, J. L., & Huerta Yopez, S. (2007). La expresión de Yin-Yang-1 (YY-1) y Fas en las biopsias de niños con nefritis lúpica tipo IV se correlaciona con la condición clínica. *Reumatología clínica*, 3(3), 117-125.
- Nord, J. A., & LaBombardi, V. J. (2001). Obstacles to penicillin use in treating pneumococcal infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 5(4), 199-201.
- Pilar, G., & Gloria, V. (2004). Polimorfismos de citoquinas en lupus eritematoso sistémico. *Revista Colombiana De Reumatología*, 11(3), 209-216.
- Richaud-Patin, Y., Perez-Romano, B., Carrillo-Maravilla, E., Rodriguez, A. B., Simon, A. J., Cabiedes, J. (2003). Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology Letters*, 88(2), 95-99.
- Rizk, A., Gheita, T. A., Nassef, S., & Abdallah, A. (2012). The impact of obesity in systemic lupus erythematosus on disease parameters, quality of life, functional capacity and the risk of atherosclerosis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 15(3), 261-267.
- Robbins, S. L., Cotran, R. S., & Kumar, V. (2010). *Robbins y Cotran patología estructural y funcional*. Barcelona: Elsevier.
- Ruiz Irastorza, G., Espinosa Garriga, G., Frutos Sanz, M. Á., Jiménez Alonso, J., Praga Terente, M., Pallarés Ferreres, L. (2012). Diagnóstico y tratamiento de la nefritis lúpica: Documento de consenso del grupo de enfermedades autoinmunes sistémicas (geas) de la sociedad española de medicina interna (semi) y de la sociedad española de nefrología (s.e.n.). *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española de Nefrología*, 32(1), 1-35.
- Seshan, S. V., & Jenette, J. C. (2009). Renal Disease in Systemic Lupus Erythematosus With Emphasis on Classification of Lupus Glomerulonephritis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(2), 233-248.
- Sternberg, S. S., & Mills, S. E. (2010a). *Sternberg's diagnostic surgical pathology Vol. 1*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Sternberg, S. S., & Mills, S. E. (2010b). *Sternberg's diagnostic surgical pathology Vol. 2*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Stites, D. P., Terr, A. I., & Parslow, T. G. (1996). *Inmunología básica y clínica*. México, D.F.: El Manual Moderno.

- Ségalen, I., Renaudineau, Y., Hillion, S., Hanrotel, C., Le Meur, Y., & Youinou, P. (2011). Quels auto-anticorps pour le diagnostic et le suivi de la néphropathie lupique. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 26(3), 113-117.
- Tziraki, A. A., Sotsiou, F. K., Tzirakis, M. A., Kominakis, A. P., Hadjiconstantinou, V. F., Nikolopoulou, N. I. (2007). Reduction in glucocorticoid receptors in renal biopsies of patients with lupus nephritis. *Clinical Biochemistry*, 40(16–17), 1188-1193.
- Weening, J. J., D'Agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B. (2004). The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(2), 241-250.