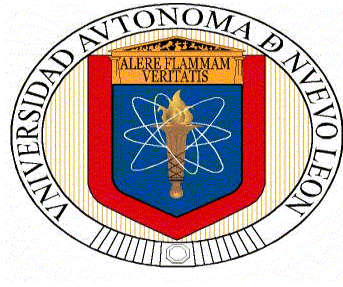


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PARTICIPACIÓN DE LA VÍA FAS-L/FAS EN LA APOPTOSIS DE PACIENTES
CON NEFROPATÍA LÚPICA

Por

M. en BE. JUAN JOSÉ BOLLAIN Y GOYTIA DE LA ROSA

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con Acentuación en Microbiología.

Diciembre, 2010

APROBACIÓN DE TESIS POR EL COMITÉ DE TESIS

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA FAS-L/FAS EN LA APOPTOSIS DE PACIENTES
CON NEFROPATÍA LÚPICA

Comité de Tesis

Dra. en C. Cristina Rodríguez Padilla

Director de Tesis Interno

Dra. en C. Esperanza Avalos Díaz

Director de Tesis Externo

Dra. en C. Diana Resendez Pérez

Secretario

Dr. en C. Juan Manuel Alcocer González

Vocal

Dr. en C. Pablo Zapata Benavides

Vocal

Dra. en C. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Vocal

I.- AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las Dras. Cristina Rodríguez Padilla y Esperanza Avalos Díaz directoras interna y externa respectivamente de mi tesis. Así como al Dr. Rafael Herrera Esparza y al Dr. Leonel Daza Benítez por sus valiosas contribuciones.

Ala Dra. Lydia Norma González Solís y al Dr. Pablo Zapata Benavides por las recomendaciones y formar parte del comité tutorial.

Ala Dra. Lydia G. Rivera Morales y al Comité de tesis por la revisión del presente trabajo.

A PROMEP y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al personal académico y técnico de los laboratorios de Inmunología y Biología Molecular de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas por su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

II.- DEDICATORIA

A Doris, quien con paciencia y generosidad
me apoyó a terminar esta tesis.

A mis hijos Juan Carlos y Denise,
mi fuente de motivación.

A mis padres, a mis hermanos y a mis profesores,
por la formación integral de mi vida.

III.- TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
I.- AGRADECIMIENTOS	iii
II.- DEDICATORIA	iv
III.- TABLA DE CONTENIDO	v
IV.- LISTA DE TABLAS	vii
V.- LISTA DE FIGURAS	viii
VI.- NOMENCLATURA	x
VII.-RESUMEN	xiv
VIII.-ABSTRACT	xvi
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	3
2.- HIPÓTESIS	4
3.- OBJETIVOS	5
3.1 OBJETIVO GENERAL	5
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
4.- ANTECEDENTES	7
4.1 Lupus Eritematoso	7
4.1.1 Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	7
4.1.2 Nefritis Lúpica (NL)	9
4.1.3 Fisiopatología de la NL	9
4.1.4 Tratamiento de la NL	10
4.2 Apoptosis	10
4.2.1 Procesos de Muerte Celular	11
4.2.2 Características Morfológicas y Estructurales de Apoptosis	12
4.2.3 Ligandos de Muerte y sus Receptores	12
4.2.4 El Complejo de Señalización Fas-L/Fas	14
4.2.5 Caspasas	14
4.2.6 Clases de Substratos	15
4.2.7 Apoptosis vía Fas-L/Fas	16
4.2.8 Técnicas para Determinar Apoptosis	18

4.3 Apoptosis en Riñón	19
4.3.1 Podocitos	20
4.3.2 Biomarcadores en la NL	21
5.- MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1 Material Biológico	23
5.2 Clasificación de la Nefritis Lúpica	23
5.3 Identificación de Células Apoptóticas por TUNEL	25
5.4 Detección de Moléculas Apoptóticas por Inmunohistoquímica (IHQ)	26
5.5 Síntesis de Sondas	26
5.6 Hibridación <i>in situ</i>	27
5.7 Detección de Infiltrado Linfocitario por IHQ	27
5.8 Fragmentos Polimórficos de Restricción	28
5.9 WT-1 en Biopsias Renales por Inmunofluorescencia (IF)	28
5.10 WT-1 en Sedimento Urinario (SU) por IF	29
5.11 Podocitos Apoptóticos en Muestras de SU	29
5.12 Activación de Caspasa-3 en Podocitos	30
5.13 Análisis de WT-1 en SU por ELISA	31
5.14 Análisis Estadístico	31
6.- RESULTADOS	32
6.1 Clasificación Histológica de Muestras Renales con NL	32
6.2 Incremento de Células Apoptóticas en Muestras Renales con NL	34
6.3 Sobre-expresión de Moléculas Pro-apoptóticas en Muestras con NL	35
6.4 Infiltrado Linfocitario en Muestras Renales con NL	37
6.5 Polimorfismo -670 de Fas en Pacientes con y sin NL	38
6.6 Expresión de ARNm de Moléculas Apoptóticas en NL	39
6.7 Expresión de WT-1 en Muestras Renales de NL	41
6.8 Activación de Caspasa-3 en Podocitos de Pacientes con NL	42
6.9 WT-1 se Incrementa en el SU de Pacientes con NL	43
6.10 Viabilidad de los Podocitos en el SU de pacientes con NL	44
6.11 WT-1 se incrementa en el SU de pacientes con NL por ELISA	45
7.- DISCUSIÓN	46
8.- CONCLUSIONES	52
8.1 RECOMENDACIONES	53
9.- LITERATURA CITADA	54
10.- RESUMEN BIOGRÁFICO	65
11.- ARTÍCULOS	67

IV.- LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Criterios de Diagnóstico Revisados por (Tan <i>et al.</i> , 1982)	8
II. Modificación de la Función en las Proteínas Blanco en Apoptosis vía Fas-L/Fas	17
III. Técnicas para Detección de Apoptosis	18
IV. Clasificación de la NL por la SIN/SPR	24
V. Clasificación Segmentaria y Focal de la NL	24
VI. Índice Binario de Inmuno Reactividad (IBR)	26
VII. Clasificación Histológica y Clínicos de Muestras Renales de Pacientes con NL C-III	32
VIII. Clasificación Histológica y Clínicos de Muestras Renales de Pacientes con NL C-IV	33
IX. Porcentajes de Alelos en Pacientes de LES con y sin NL	39

V.- LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Identificación de células apoptóticas en muestras renales con NL por TUNEL_____	34
Figura 2. Incremento de células apoptóticas en muestras de NL y controles analizados por TUNEL_____	35
Figura 3. Sobre-expresión de proteínas apoptóticas en muestras renales con NL por IHQ_____	36
Figura 4. Promedio de IBR de Fas-L, Fas, Caspasa-3 y Bax en muestras control y de NL _____	36
Figura 5. Identificación de linfocitos en muestras renales con NL por IHQ _____	37
Figura 6. Promedio de IBR de infiltrados linfocitarios en muestras control y con NL_____	38
Figura 7. Identificación de fragmentos polimórficos en el ADN de pacientes con LES con y sin NL_____	39
Figura 8. Transcripción de los ARNm en muestras renales con NL por hibridación <i>in situ</i> _____	40
Figura 9. Promedio de IBR en la transcripción de los ARNm de fas-L fas y caspasa-3 en muestras control y con NL_____	41
Figura 10. Identificación de podocitos marcados con WT-1 por IFI_____	41
Figura 11. Disminución de podocitos marcados con WT-1 en muestras renales de NL_____	42
Figura 12. Identificación de activación de caspasa-3 por IFI en muestras renales de NL_____	42
Figura 13. Incremento en la activación de caspasa-3 en muestras renales de NL_____	43
Figura 14. Identificación de WT-1 por IFI contrastado con yoduro de propidio en SU_____	43

Figura 15. Excreción de podocitos marcados con WT-1 en muestras de SU_____	44
Figura 16. Podocitos marcados con WT-1 con Rojo Texas (Rx)/ TUNEL en SU_____	44
Figura 17. Podocitos apoptóticos en SU de pacientes con NL_____	45
Figura 18. WT-1 en SU por ELISA _____	45

VI.- NOMENCLATURA

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
°C	Grado centígrado
μl	Micro litro
μm	Micrómetros
AANs	Anticuerpos Antinucleares
ACR	Colegio Americano de Reumatología
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
Anti-ADNds	Anticuerpos anti-ADN de cadena doble
Anti-C1q	Anticuerpos anti-Complemento
Anti-CD19	Anticuerpo anti-linfocitos B
Anti-CD3	Anticuerpo anti-linfocitos
Anti-CD4	Anticuerpo anti-linfocitos T
Anti-CD8	Anticuerpo anti-linfocitos T citotóxico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ASB	Albúmina Sérica Bovina
CARD	Dominio que Recluta Caspasas
Caspasa-3	Caspasa efectora-3

CCS	Cloruro de Sodio/Citrato de Sodio
CD56	Linfocito asesino natural
CD69	Linfocitos activados
CD8	Linfocito Citotóxico
Cfm	Ciclofosfamida
CI	Complejo Inmune
C-III	Clase-III
C-IV	Clase-IV
DEM	Dominio Efecto de Muerte
DEPC	Dietilpirocarbonato
DFF-40	Factor Fragmentador de ADN
DISC	Complejo de Señalización Inductor de Muerte
DM	Dominio de Muerte
ELISA	Ensayo Inmuno Enzimático
FADD	Dominio de Muerte Asociado a Fas
FAK	Cinasa de Adhesión Focal
Fas	Receptor de muerte
Fas-L	Ligando de Fas
g	Gramo
G3PDH	Guanidil-3 Fosfato Deshidrogenasa
GMCP-1	Gen regulador de Muerte Celular Programada-1
h	Hora
HCl	Ácido Clorhídrico
H-E	Hematoxilina-Eosina
hrs	Horas

IADLES	Índice de Actividad de la Enfermedad de Lupus Eritematoso Sistémico
IFD	Inmunofluorescencia Directa
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferón gama
kDa	Kilodalton
l	Litro
LE	Lupus Eritematoso
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
M	Molaridad
MBG	Membrana Basal Glomerular
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
min	Minuto
mM	Milimolar
MORT1	Mediador de la Toxicidad Inducida al Receptor 1
ng	Nanogramos
NL	Nefritis Lúpica
PAK2	Cinasa Activadas p21
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PI-10	Proteína Inductora del interferón en macrófago 10
PMM	Permeabilización de la Membrana Mitocondrial
s	Segundo
SBF	Solución Básica de Fosfatos

SIN/SPR	Sociedad Internacional de Nefrología/Sociedad de Patología Renal
SU	Sedimento Urinario
TAE	Tris base/Acetato de Sodio/EDTA
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral-alfa
TUNEL	Marca de Fragmentos de ADN por Desoxinucleotidil Transferasa
TWEAK	Inductor débil de apoptosis semejante a TNF
WT-1	Tumor-1 de Wilm's

VII.- RESUMEN

Introducción: El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune del tejido conjuntivo con afección de órganos, entre ellos el riñón. El 60% de los pacientes con LES desarrollan Nefritis Lúpica (NL) en etapas tempranas de la enfermedad y los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el daño renal en los pacientes son múltiples, incluyendo el depósito de Complejos Inmunes (CI) que fijan complemento. Existen otros mecanismos, como es la participación de la apoptosis vía Fas-L/Fas que se asocia al desarrollo de autoanticuerpos anti-nucleosomas generados por una inadecuada remoción de restos apoptóticos que se depositan en la Membrana Basal Glomerular (MBG) disparando un proceso inflamatorio. Los podocitos son células epiteliales altamente especializadas que se localizan sobre la MBG, la función es formar parte de la barrera final de filtración en el riñón, por tanto, el daño en estas células está relacionado con una filtración glomerular aberrante, ocasionando proteinuria, una característica clínica de la enfermedad renal. **Objetivo:** Analizar si la apoptosis vía Fas-L/Fas participa en el desarrollo de la nefropatía lúpica en pacientes con LES. **Material y Métodos:** Se estudiaron 2 grupos de pacientes con NL sin tratamiento y 1 grupo control sano. El primer grupo se formó con 7 pacientes con LES y con NL clase-III (C-III), el segundo grupo incluyó 10 pacientes con LES y NL clase-IV (C-IV). Los pacientes se diagnosticaron de acuerdo a los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (abreviado ACR, del inglés American College of Rheumatology) y la clasificación de los rasgos histológicos de las muestras de NL se realizó por microscopía de luz (H-E) de acuerdo a la Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad de Patología Renal (SIN/SPR). Los índices de apoptosis se determinaron con la técnica de TUNEL. La expresión de las moléculas pro-apoptóticas Fas-L, Fas, Caspasa-3, y Bax se analizaron por Inmunohistoquímica (IHQ), se realizó hibridación *in situ* para analizar la expresión de los ARNm de fas-L, fas y caspasa-3. Los infiltrados linfocitarios se evaluaron por IHQ. Con la técnica de Miller se extrajo ADN genómico (ADNg) de sangre total, que se utilizó como templado para amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (abreviado PCR del inglés Polymerase Chain Reaction) la región del promotor -670 de Fas y con la digestión de los productos de PCR se analizó el polimorfismo. Las muestras renales de pacientes con NL C-III y C-IV e igual número de orinas de 24 hrs, se incluyeron en el estudio. Con la técnica de IHQ e

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) se determinó la expresión de WT-1 como marcador específico de podocitos en las muestras renales de NL y controles. La presencia de WT-1 en los sedimentos urinarios (SU) se analizó con la técnica de ELISA e IFI en los frotis. Los índices apoptóticos de los SU se determinaron por TUNEL. **Resultados:** Los pacientes con LES desarrollaron principalmente NL clase-IV y III. Los pacientes con NL C-III presentaron un mayor índice de apoptosis en las células epiteliales de los túbulos y glomérulos, en contraste con los pacientes con NL C-IV. Así mismo, la expresión y transcripción de Fas-L, Fas y Caspasa-3 se incrementó en células tubulares y glomerulares de pacientes con NL C-III a diferencia de los pacientes con NL C-IV. Además, Bax se sobre-expresó principalmente en células de túbulos de pacientes C-IV en contraste con los pacientes C-III y controles. De la misma manera, los linfocitos CD8, CD56 e INF- γ se incrementaron en muestras de pacientes con NL C-III en contraste con pacientes con NL C-IV y controles que disminuyeron. Por otro lado, el genotipo A/A del polimorfismo -670 no muestra diferencias significativas, en relación a los otros dos genotipos (A/G y G/G) y está presente tanto en pacientes como en controles. En las muestras renales de los pacientes con NL clase-III y IV observamos una disminución de la expresión de WT-1 en los glomérulos, en contraste con los controles ($p < 0.0001$). La reducción de podocitos en las muestras renales de pacientes con NL correlacionan con la excreción de WT-1 en los SU y con la proteinuria ($p < 0.0001$). **Conclusiones:** 1.- La apoptosis vía Fas-L/Fas contribuye al daño de las células renales y se incrementa en pacientes con LES y con nefritis lúpica clase-III y clase-IV. 2.- La podocitopenia es un marcador celular del daño renal y puede ser considerado como un factor que indique la pérdida de la función renal en los pacientes con nefritis lúpica. 3.- El incremento de podocitos urinarios marcados con WT-1 correlaciona con la disminución de podocitos en el tejido renal y podría ser considerado como un biomarcador urinario en pacientes con nefritis lúpica.

VIII.- ABSTRACT

Introduction. Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune connective tissue disease which affects internal organs such as the kidneys. Around 60% of affected patients with SLE can develop LN during the onset of the disease initiating a chain of physio-pathological mechanisms causing multiple renal tissue damage including the fixed complement of immune component (IC) deposits. There are other mechanisms such as the involvement of apoptotic Fas-L/Fas induced through their attachment in the development of antibodies and abnormally triggered by a failure of the body's mechanism for clearing up the debris of dead cells the poor discard of apoptotic residue binds to the glomerular plasma membrane and causes inflammation as a response. The podocytes are highly specialised epithelial cells located on the plasma membrane and their function is to act as the final filtering barrier in the kidney therefore the damage associated with abnormal leaking of glomeruli filtration, can cause proteinuria as suggestive sign of the development of the disease. **Purpose:** Analysis of the onset of apoptosis through Fas-L/Fas and their involvement in the development of lupus nephritis. **Method and Material:** Two groups of patients with lupus nephritis were studied neither undergoing treatment a third group used was a healthy control. The first group had 7 patients with SLE with lupus nephritis class III (C-III); the second had 10 patients with lupus nephritis class-IV (C-IV). All patients were diagnosed as per classification under the ACR nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes, the International Society of Nephrology's classification and histological characteristics of lupus nephritis and, the Renal Pathology Society's under light microscopy (H-E). The apoptotic indexes were determined using the TUNEL technique. The expression of pro-apoptotic molecules Fas-L, Fas, Caspase-3 and Bax were analyzed through immune-histological-chemistry (IHQ), an *in situ* hybrid control was created to analyze the mRNA expressions of fas-L, fas and caspase-3. The lymphocyte filtered samples were assessed by IHQ. The Miller technique was applied to extract full-blood genomic ADN (ADNg). The ADNg was used as a template to amplify through PCR the region of -670 of Fas. The study included both similar renal samples from patients with lupus nephritis class-III and IV and the same number of urine samples. Applying the indirect immune fluorescent (IFI) techniques the WT-1 expression was determined as mature podocytes specific marker from the renal samples

of LN and their controls. The ELISA technique together with smear indirect immune fluorescence was applied to determine the presence of WT-1 in the urine sediment. The apoptotic indexes in the sediment of urine were determined using the TUNEL assay technique. **Results:** Patients with SLE principally developed lupus nephritis class-IV and III. Patients with lupus nephritis class-III presented a higher index of apoptosis in epithelial cells of tubules and glomeruli in comparison with class-IV patients in which it presented moderate trending. The Fas-L, Fas and Caspase-3 increased lightly in tubule and glomeruli cells of patients class-III in comparison to patients class-IV and controls. Bax was over expressed mainly in tubule cells of patient's class-IV against patients with class-III and the healthy control. The transcription of the mRNA of Fas-L, Fas and Caspase-3 in tubular and glomeruli increased slightly in patients C-III compared to the C-IV controls. Lymphocytes CD8, CD56 and INF- γ were observed on samples from patients C-III and were compared to those from patients C-IV to identify which controls decreased. The genotype A/A of the polymorphic -670 shows no significant differences in relation to other genotypes and this is present in observed patients and control. It was observed that in the renal samples from patients with lupus nephritis class-III and IV there were lower glomeruli on the mark WT-1 compared to the controls where it increases ($p < 0.0001$). The reduction of podocytes in the renal samples from patients with lupus nephritis correlates to the excretion found in urine sediment measured in WT-1 and with proteinuria ($p < 0.0001$). **Conclusions:** The apoptosis onset through the Fas-L/Fas contributes to the renal cells damage and increases in patients with SLE with lupus nephritis class-III and IV. The podocytis is a cellular renal damage indicator and it can be considered as a factor which indicates the loss of renal function in patients with lupus nephritis. The increase of podocytes in urine correlates to the reduction of podocytes in the renal tissue and can be considered as a biological marker urinary in patients with lupus nephritis.

1. INTRODUCCIÓN

El LES es una enfermedad autoinmune no órgano específica que se caracteriza por afectar varios órganos, entre ellos el riñón (D´Cruz *et al.*, 2007). Berden y cols en 2003 demostraron que un 60% de los pacientes con LES desarrollan NL en etapas tempranas de la enfermedad y que el mecanismo fisiopatológico que desencadena el daño renal es resultado de la formación de CI anti-nucleosomas, que son atrapados en la MBG activando la vía del complemento y provocando así el daño en las células renales. Cabe mencionar que existe gran presencia de estos autoanticuerpos en pacientes con NL severa (Bigler *et al.*, 2007). Ronco y Debiec en 2007 describieron otro mecanismo basado en la reacción de los autoanticuerpos contra blancos celulares específicos de la MBG produciendo el daño renal. Sin embargo, el mecanismo fisiopatológico que desencadena el daño renal en pacientes con NL no ha sido completamente explorado y existen evidencias que las citocinas inflamatorias como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral-alfa (abreviado TNF- α , en inglés Tumor Necrosis Factor) regulan la expresión de moléculas promotoras de apoptosis que están presentes en el tejido renal de pacientes con NL (Herrera Esparza *et al.*, 1998). Es importante conocer sí el proceso de apoptosis es parte del daño renal, ya que es un fenómeno fisiológico y necesario para mantener la homeostasis tisular del tejido (Ortiz *et al.*, 1999). En el riñón, la apoptosis puede ser benéfica o patogénica, dependiendo de qué tipo de células afecte, de la magnitud del fenómeno y del momento en que ocurre, tanto la apoptosis como la lisis mediada por complemento han sido consideradas las dos formas principales de muerte celular en el glomérulo inflamado. Sin embargo, estudios recientes indican que la lisis por complemento no es una forma directa de muerte celular glomerular, ya que las células nucleadas son relativamente resistentes a la lisis por complemento y las células del glomérulo expresan proteínas protectoras (Ortiz 2000). Como podemos notar, la etiología de la enfermedad no es bien entendida y no se explica cómo las células del riñón son afectadas perdiendo su función. Es importante destacar, que el daño renal que se presenta en los pacientes con NL evoluciona a través de la enfermedad, por tanto es necesario identificar con un método no invasivo, rápido y de bajo costo la evolución de la enfermedad en los pacientes con NL. Estudios sobre podocitos marcados con WT-1 en muestras de SU de pacientes con NL contribuirá a monitorear el curso de la enfermedad. El objetivo central de este trabajo de tesis es explorar sí el proceso de

apoptosis vía Fas-L/Fas participa y coadyuva en el daño renal de pacientes con NL y dar respuesta a las siguientes preguntas: 1) Analizar sí la apoptosis vía Fas-L/Fas está involucrada en el daño renal. 2) Determinar sí el índice de apoptosis se incrementa, en las biopsias renales de pacientes con NL. 3) Determinar sí existe el polimorfismo -670 de Fas en los pacientes con NL. 4) Determinar la presencia de WT-1 en células de los SU de pacientes con NL. La realización de este trabajo sobre apoptosis en daño renal de los pacientes con nefritis lúpica, contribuirá a aumentar el conocimiento a nivel molecular y celular de este proceso fisiopatológico, y puede ayudar a diseñar nuevas estrategias de diagnóstico y terapéutica para los pacientes con LES que desarrollan NL.

1.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el daño renal en los pacientes con LES que desarrollan NL no son del todo precisos, ya que abordan de manera primordial, la vía inflamatoria desencadenada por CI que fijan complemento, y en relación a otros mecanismos, existen evidencias de que la expresión de moléculas promotoras de apoptosis se incrementan en el tejido renal de pacientes con NL. Es importante señalar que el aumento en el número de células apoptóticas, provoca la biodisponibilidad de antígenos a nivel glomerular; lo cual puede incrementar la formación *in situ* de CI y de esta forma disparar la respuesta inmune celular a nivel local, lo que teóricamente puede amplificar el daño renal. La biopsia renal, es el estándar para el diagnóstico de la NL, el análisis microscópico de la muestra identifica las etapas tempranas y tardías de la enfermedad. Sin embargo, el análisis es invasivo, costoso y los resultados no son inmediatos, lo que motiva a desarrollar y buscar nuevos biomarcadores que proporcionen información en las diferentes etapas de la enfermedad. Por estos motivos, la realización de este trabajo de tesis sobre apoptosis en daño renal y detección de WT-1 en sedimento urinario en los pacientes con NL, contribuirá a aumentar el conocimiento a nivel molecular y celular de este proceso fisiopatológico y ayudar a diseñar nuevas estrategias de diagnóstico y terapéutica para los pacientes con LES que desarrollan NL.

2. HIPÓTESIS

La vía de apoptosis Fas-L/Fas en células glomerulares está involucrada en el daño renal de pacientes con LES con nefropatía lúpica clase III y IV.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar sí la vía de apoptosis mediada por Fas-L/Fas está involucrada en la nefropatía lúpica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un grupo de pacientes con diagnóstico de LES con y sin NL, bajo los criterios del ACR.
2. Determinar el grado de glomerulonefritis en las biopsias renales de pacientes con NL, de acuerdo a la clasificación (SIN/SPR 2004).
3. Analizar el grado de apoptosis en las biopsias renales de los pacientes con NL.
4. Evaluar el grado de expresión de moléculas pro-apoptóticas como: Fas, Fas-L, Caspasa-3, M-30 y Bax en las biopsias renales de pacientes con NL.
5. Determinar la transcripción de los genes fas-l, fas y caspasa-3 en las biopsias renales de pacientes con NL.
6. Estudiar si existe el polimorfismo del promotor -670 de Fas en pacientes con NL.
7. Determinar la presencia de los podocitos marcados con WT-1 en muestras renales y de SU en pacientes con NL.

4. ANTECEDENTES

4.1.-Lupus Eritematoso

El Lupus eritematoso (LE), es una enfermedad autoinmune del tejido conjuntivo que se caracteriza por afección de piel, articulaciones, riñón, sistema nervioso central y vasos, entre otros. Los pacientes con LE desarrollan síntomas generales y alteraciones inmunológicas características. El LE se clasifica en una forma puramente cutánea, el lupus eritematoso discoide y en una forma generalizada el LES.

4.1.1-Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

El LES es una enfermedad autoinmune no órgano específica que se caracteriza por afectar varios órganos, entre ellos el riñón (D´Cruz *et al.*, 2007). La enfermedad se destaca por la presencia de autoanticuerpos antinucleares (AANs) con diferentes especificidades, anti-fosfolípidos, anti C1q y por un infiltrado linfocitario en las lesiones de piel, riñón y otros órganos. La interacción de los antígenos con diversos autoanticuerpos es evidente por el depósito de CI en la unión dermoepidérmica, en glomérulos, articulaciones y plexos coroides (Mills, 1994; Chan *et al.*, 1998; Kita *et al.*, 1998). El padecimiento afecta prácticamente todos los aparatos y sistemas, sin embargo las manifestaciones cutáneas son las más comunes (90%) y la afección renal le confiere un pronóstico especial (Villalobos *et al.*, 1996; Morel, 2007).

Inmunológicamente el LES se destaca por una hiperactividad de linfocitos B que median la producción de una gran variedad de autoanticuerpos y por tanto la formación de CI (Mok and Lau, 2003). Los AANs son empleados para el diagnóstico de la enfermedad (Arbuckle *et al.*, 2003). Estos y los autoanticuerpos anti-C1q son considerados factores patogénicos en la generación de las lesiones renales (Cameron, 1999; Flierman and Daha, 2007; Mortensen *et al.*, 2008). En 1971, el comité de diagnóstico y terapéutico del ACR después de analizar más de 800 pacientes publicó los primeros criterios para diagnosticar LES (Cohen *et al.*, 1971). Once años más tarde, estos criterios fueron revisados y evaluados con otra metodología estadística (Tan *et al.*, 1982), por tanto, se reestructuraron los criterios y se incluyeron los exámenes inmunológicos como los anticuerpos AANs, anti-ADN de doble cadena (anti-ADNs) y

los anti-Sm. Para ser diagnosticado con LES los pacientes deberán presentar al menos 4 criterios de los 11 con una sensibilidad y especificidad de 96% (Passas *et al.*, 1985). Como se muestra en la tabla I.

Tabla I

Criterios de Diagnóstico Revisados por (Tan *et al.*, 1982)

Criterios	Descripción
Exantema malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares
Exantema discoide	Elevación de placas eritematosos con escala queratósica adherente y taponamiento folicular; puede producirse cicatrización atrófica
Fotosensibilidad	
Úlceras orales	Incluye úlceras orales y nasofaríngeas, observadas por el médico
Artritis	Artritis no erosiva que compromete 2 o más articulaciones periféricas, caracterizadas por sensibilidad, inflamación o efusión
Serositis	Pleuritis, pericarditis o evidencia de efusión pericardiaca
Desorden renal	Proteinuria (> 0.5 g/l o > 3+) o cilindros celulares
Desorden neurológico	Convulsiones o psicosis
Desorden hematológico	Anemia hemolítica, leucopenia (< 4000 por μ l), linfopenia (< 1500 por μ l) o trombocitopenia (< 100 00 por μ l), en ausencia del medicamento causal
Desorden inmunológico	Preparación de células LE positivas, anticuerpos anti-ADNs, anticuerpos anti-Sm, falso positivo por VDRL
Anticuerpos antinucleares	Títulos anormales de AANs en cualquier punto del tiempo, en ausencia de medicamentos conocidos como inductores de AANs

Actualmente el ACR ha desarrollado los criterios clínicos específicos para diagnosticar a los pacientes con LES si presentan uno o más criterios durante el curso de la enfermedad, la especificidad es de un 98% y la sensibilidad del 97% (Svirbely, 2009).

4.1.2-Nefritis Lúpica (NL)

Berden y cols en 2003 demostraron que un 60% de los pacientes con LES desarrollan NL en las etapas tempranas de la enfermedad, la NL es el término médico como se denomina al daño renal en LES y su diagnóstico comienza con los síntomas clínicos: edema, hipertensión, proteinuria y la determinación de creatinina. Los altos niveles de anticuerpos anti-ADN generalmente acompañan a la NL. Investigadores como Schwartz y cols en 2007 analizaron biomarcadores urinarios de la NL como son: TWEAK, GMCP-1, PI-10 y Lipocalina-2. La biopsia renal en pacientes con LES permite el diagnóstico de la NL y se clasifican empleando criterios histopatológicos que determinan la clase de glomerulonefritis (Sauter and Anders, 2007).

4.1.3-Fisiopatología de la NL

La fisiopatología de la NL no es bien entendida y se han propuesto varios mecanismos: 1).- el primer mecanismo se basa en el depósito de CI anti-nucleosomas o anti-ADNs que se producen por una inadecuada remoción de restos apoptóticos (Zykova *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2008). Después de la formación de los CI anti-ADNs los cuales son atrapados a través de cargas opuestas con el heparan sulfato de la MBG, mientras que, los complejos anti-nucleosomas se unen a las células mesangiales activando la vía del complemento y provocando así el daño en las células renales (Kramers *et al.*, 1994; Berden, 2003; Bigler *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2008). Flierman y Daha en 2007 describen la hipótesis que los autoanticuerpos anti-C1q incrementan la activación de la vía clásica del complemento y son detectados en uno de cada tres pacientes con LES (Trouw and Daha, 2005). Es importante destacar que los autoanticuerpos anti-nucleosomas se encuentran incrementados en plasma y tienen alta prevalencia en pacientes con NL severa (Burlingame and Cervera, 2002; Simon *et al.*, 2004).

2).-El segundo mecanismo describe que existen autoanticuerpos que reaccionan contra antígenos específicos localizados cerca de la MBG produciendo el daño renal (Austin *et al.*, 1984; Ronco and Debiec, 2007). 3). Sin embargo, otros mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el daño renal en pacientes con NL como el de la apoptosis no han sido completamente explorados y existen evidencias que las citocinas inflamatorias como la IL-6 y TNF- α regulan la expresión de moléculas promotoras de apoptosis que están presentes en el tejido renal de pacientes con NL (Herrera-Esparza *et al.*, 1998). Como podemos notar, la etiología de la NL es compleja y se basa en la activación del complemento a través del depósito de CI; pero no explican completamente como las células del riñón son afectadas y pierden su función.

4.1.4-Tratamiento de la NL

En la terapia de la NL se utilizan fármacos como la ciclofosfamida (Cfm) que es un fármaco antineoplásico empleado en cáncer pulmonar, de ovarios y de mama, que presenta también propiedades inmunosupresoras, por lo que se emplea en artritis reumatoide, síndrome nefrótico, y en el rechazo a trasplantes de órganos. Pertenece a la familia de los fármacos alquilantes y requiere ser activado por el sistema de enzimas microsomales del hígado para ser citotóxico, los metabolitos activos se distribuyen en todos los tejidos uniéndose al ADN de las células e impiden la replicación del mismo, en altas dosis bloquea la transcripción provocando así la muerte de las células por apoptosis a través de la activación de caspasas (Goldstein *et al.*, 2008).

El continuo interés de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y de diversos investigadores enfocados a encontrar un tratamiento para la NL comenzaron a finales de los años 70's y principios de los 80's, con la terapia combinada oral de glucocorticoides con Cfm, que era considerado el tratamiento adecuado para la NL (Donadio *et al.*, 1976; Gourle *et al.*, 1996). Años más tarde y dada la actividad citotóxica de la Cfm principalmente en ovarios, medula ósea y severas infecciones por exposición a largos periodos, se optó por administrarla por vía intravenosa en forma de pulsos (Mok *et al.*, 2001). Los investigadores Houssiau, y cols en 2004 y Sauter y Anders en el 2007 indican que se puede administrar glucocorticoides con Cfm vía intravenosa como terapia inicial en pacientes con NL clase-III o IV. Estos medicamentos son muy tóxicos y se reporta que el micofenolato de mofetilo es más eficaz que la Cfm intravenosa en adultos y niños en la inducción de la remisión de la NL y que presenta un perfil favorable de seguridad. Por tanto, el tratamiento está enfocado a aliviar los síntomas y evitar la progresión de la lesión renal (Ginzler *et al.*, 2005; Schieppati and Remuzzi, 2008; Fujinaga *et al.*, 2008).

4.2-Apoptosis

Se conocen dos mecanismos de muerte celular, en su clase XV dictada en 1858, utilizó el término necrobiosis para describir un proceso de muerte celular inducido por un proceso vital alterado, espontáneo y natural, en contraste con la muerte celular violenta por necrosis (Virchow, 1860). Sin embargo, el trabajo de Kerr y cols de 1972 se cita como el punto de partida de los estudios de la apoptosis porque es la primera descripción morfológica y sistemática de los cambios observados en células que mueren de forma fisiológica, y son los que acuñan el termino de apoptosis (apo: desde, ptosis: caer o descender) para este proceso de muerte que semeja el desprendimiento de las hojas de los arboles en otoño (Majno end Joris 1995; Funder, 1994).

La vida requiere de renovación tisular, esta aseveración se origina en virtud de que la muerte celular programada comúnmente llamada apoptosis, es un proceso natural

en organismos multicelulares que permite controlar el número de células durante el desarrollo embrionario y la metamorfosis de un organismo. De igual forma se presenta en tejidos atroficos, regresión de tumores y células infectadas (Sayama *et al.*, 1994; Reed, 2002; Danial and Korsmeyer, 2004); por lo que el desarrollo, función, remodelación y homeostasis tisular de los organismos, depende de una forma coordinada de muerte celular que puede ser inducida por diferentes vías como la fagocitosis, activación de células T citotóxicas, autofagia, necrosis, diferenciación terminal y apoptosis. En ocasiones ésta no se presenta y por tanto los organismos no se desarrollan normalmente, produciendo numerosas alteraciones. Probablemente este mecanismo esté involucrado en la fisiopatología de algunos padecimientos como el cáncer, la autoinmunidad, la inmunodeficiencia innata y adquirida, y en desórdenes neurodegenerativos (McCall and Cohen, 1991; Deirdre *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 2005).

4.2.1-Procesos de Muerte Celular

Existen 3 tipos de muerte celular: autofagia, necrosis y apoptosis; gracias a los trabajos pioneros de Kerr y Willie, se han establecido las diferencias entre ambas. La necrosis, es un proceso pasivo, secundario a daño tisular mientras que la apoptosis, es un evento activo que ocurre de manera fisiológica, donde las células se programan para participar en su propia muerte después de haber cumplido con su función (Clifford *et al.*, 1993; Nagata, 1997). La autofagia también es un proceso ordenado de muerte celular que involucra un gran número de genes conservados a través de la evolución denominados (genes ATG) que producen el bloqueo de la lisis celular y los compartimentos celulares son auto-digeridos de aquí su propio nombre (Yorimitsu and Klionsky, 2005; Meijer and Codogno, 2004).

El término de necrosis, es utilizado para definir la “muerte accidental”, resultado de un daño celular irreversible causado por condiciones patológicas, como hipoxia, isquemia, ataque del complemento, infección viral lítica, toxinas y severas condiciones ambientales; durante el desarrollo de estos procesos, se observa activación de enzimas lisosomales y pérdida de la integridad de la membrana celular produciendo la liberación de los componentes intracelulares al exterior. Histológicamente, el primer signo de necrosis es edema celular, en el ámbito de todos los compartimentos citoplásmicos, rodeada por una fuerte reacción inflamatoria, luego, este proceso es seguido por una ruptura celular, tanto de organelos como de la membrana nuclear y en etapas tardías, la cromatina desaparece progresivamente acompañada por ruptura al azar del ADN (Paus *et al.*, 1993; Ortiz and Egado, 2000).

Como podemos notar, la necrosis no debe ser considerada como un proceso sin control, ya que datos recientes muestran que este tipo de muerte celular normalmente es acompañada de apoptosis en algunos tejidos, y puede ser activada en respuesta a algunos estímulos como el de las citocinas inflamatorias, y por activación de canales de iones. La

muerte celular necrótica también puede ocurrir como una forma alternante a la apoptosis cuando esta es bloqueada (Deirdre *et al.*, 2004).

Por otra parte, la apoptosis fue identificada en células de mamíferos como una forma altamente selectiva de “suicidio celular”, tiene características morfológicas y bioquímicas particulares, y es uno de los mecanismos regulatorios más importantes con el que se puede controlar la proliferación excesiva de poblaciones celulares. En adultos, la apoptosis también juega un papel importante, ya que existe una relación estrecha entre la muerte y la multiplicación celular, asegurando en muchos tejidos un flujo constante de células nuevas, las cuales son cruciales para la preservación y el óptimo funcionamiento de los organismos adultos, ejemplo de esto es la regeneración de la piel (Golstein, 1998; Ortiz and Egido, 2000; Deirdre *et al.*, 2004).

4.2.2-Características Morfológicas y Estructurales de Apoptosis

Los cambios morfológicos y estructurales de la apoptosis son producto de la fragmentación de aproximadamente 400 proteínas (Luthi, 2007). Los cambios son observados por estudios de microscopía electrónica y de luz durante las primeras fases del proceso apoptótico y muestran condensación de la cromatina nuclear, exposición de la fosfatidilserina en la membrana, reducción citoplásmica denominada “encogimiento celular” con la consecuente pérdida del contacto con células vecinas y finalmente la fragmentación del núcleo (núcleo picnótico). Otro evento es la formación de cuerpos apoptóticos, que por lo general están constituidos por material nuclear y donde también pueden encontrarse algunos organelos y proteínas nucleolares, posteriormente se translocan hasta la membrana plasmática, se unen a ella y modifican su arquitectura. Finalmente, ocurre la fragmentación interna de la célula y estos productos son fagocitados por células vecinas o macrófagos (Ortiz y Egido, 2000; Kromer *et al.*, 2005). Los cuerpos apoptóticos frecuentemente están formados por mitocondrias intactas, que poseen un producto del proto-oncogen bcl-2 (anti-apoptótico) en la membrana interna mitocondrial. Además, libera factores inductores de apoptosis que activan las endonucleasas endógenas (EndoG) (Li *et al.*, 2001) acelerando este proceso, los cambios ocurren de una manera reproducible y pronosticable en un período de tiempo de 30 a 120 min (Takahashi *et al.*, 1995; Antonsoon *et al.*, 1997; Green and Kroemer, 2004).

4.2.3-Ligandos de Muerte y sus Receptores

Las citocinas son una familia de proteínas que regulan la proliferación y diferenciación celular al unirse a sus respectivos receptores o células blanco, éstas se agrupan en base a su estructura en tres subfamilias, citocinas como factores de crecimiento, factor de necrosis tumoral y citocinas helicoidales. Los receptores mediadores de apoptosis forman parte de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La región extracelular de los miembros de esta familia tienen de 2-6

repeticiones ricas en cisteínas, que representan aproximadamente un 25% de homología; así mismo, contienen regiones similares (cerca de 80 aminoácidos), en los dominios intracelulares denominados dominios de la muerte (DM), los cuales son responsables de la transducción de las señales (Casiano *et al.*, 1996; Yuan, 1997; Yang *et al.*, 1998).

Los receptores transmembranales se localizan sobre la superficie celular, reciben las señales extracelulares y toman diferentes vías de transducción, ocasionando la activación de ciertas proteasas como las enzimas convertidoras de IL-1 β , proteasas de serina, calpinas y granuloenzimas (Ashkenazi and Dixti, 1998; Nicholson and Thorneberry, 1997; Wallach, 1997).

Los receptores de muerte celular mejor estudiados son el CD95 también conocido como Fas/Apo-1, CD120a conocido como TNF-R1 (receptor del factor de necrosis tumoral 1 ó p55), el CD120b, es conocido como TNF-R2 (receptor del factor de necrosis tumoral 2) y recientemente, DR3 (receptor 3 de la muerte) también llamado Apo-3, WSL-1, TRAMP ó LARD, RD4 y DR5, conocidos como Apo-2, TRAIL-R2, TRICK ó KILLER y el receptor del factor de crecimiento neuronal (p75) (Ashkenazi and Dixti, 1998). Los ligandos de muerte que activan estos receptores con excepción del receptor p75, están estructuralmente relacionados con las moléculas que pertenecen a la superfamilia del TNF.

Fas es una molécula de 45 kDa que también existe en forma soluble. Este es clave en la apoptosis, su expresión puede ser inducida en líneas celulares y cultivos primarios de queratinocitos humanos por una estimulación apropiada, dicha expresión puede ser consecuencia de un proceso inflamatorio intenso ó por radiación UV. Se ha demostrado que la IL-1, IL-1 β e IFN- γ (interferón-gamma) son capaces de inducir la expresión de Fas, a diferencia de otras citocinas inflamatorias como el TNF- α y la IL-12, las cuales fracasan en promover su expresión (Oishi *et al.*, 1994; Matsue *et al.*, 1995; Leverkus *et al.*, Sung *et al.*, Williams, 1997).

El ligando de Fas conocido como CD95L ó Fas-L se une a Fas (Ashkenazi y Dixti, 1998), este ligando efector de muerte, es sintetizado como una proteína homotrimérica de membrana tipo II de 40 kDa; lo que significa que tiene un amino-terminal en el citoplasma y un carboxilo-terminal en el espacio extracelular, en esta región posee ~150 aa conservados con una homología entre un 20 y 25% con los miembros de esta familia, mientras que el dominio citoplásmico presenta segmentos que varían significativamente (Yang *et al.*, 1998). El Fas-L es trimerizado previo a la expresión en la superficie de la membrana (Mesa *et al.*, 2006). En el glomérulo es sobre regulado durante las glomerulonefritis e induce apoptosis de células mesangiales *in vitro* e *in vivo*, dando por resultado lesiones glomerulares (Badillo *et al.*, 2001). En cultivos de células epiteliales tubulares se ha demostrado la expresión funcional del receptor Fas y su ligando (Du *et al.*, 2003).

4.2.4-El Complejo de Señalización Fas-L/Fas

Las proteínas intracelulares FADD/MORT1 interactúan con los DM de los receptores Fas y CD120a Thomas *et al.*, 2004 para formar un complejo de señalización el cual ha sido identificado recientemente y es denominado complejo de señalización inductor de muerte (abreviado DISC, del inglés Death-Inducing Signaling Complex; Thorburn, 2004; Debatin and Kramer 2004), mostrando una red compleja de señales de transducción capaz de inducir apoptosis en algunas células. Los DM se encuentran en los dominios intracelulares de los receptores miembros de la superfamilia del TNF. La interacción electrostática que ocurre entre los DM de los receptores y los DM de las proteínas intracelulares dan como resultado la formación del DISC, el cual tiene la función de activar a las caspasas (Boatright *et al.*, 2003). La presencia de los DM es necesaria y suficiente para inducir apoptosis (Malkani *et al.*, 1993).

Existen diferencias en las vías de señalización de Fas y CD120a, aún cuando ambos receptores inducen apoptosis. Como todos los ligandos ó inductores de la superfamilia de TNF, Fas-L/APO1L requiere de tres moléculas de Fas para unirse y debido a que los DM de los receptores son propensos a unirse unos con otros, la interacción da como resultado la trimerización de los DM de los receptores (Williams, 1997). La proteína intracelular de 23.3 kDa con dominio de la muerte asociado a Fas (abreviada FADD, en inglés Fas-Associated protein with Death)/mediador de la toxicidad inducida al receptor 1 (MORT1) contiene un carboxilo terminal como DM, ésta proteína tiene la capacidad de unirse a los DM de los receptores, reforzando su agrupamiento (Nicholson and Thorneberry, Yuan *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998).

4.2.5-Caspasas

La apoptosis requiere de una maquinaria especializada, el componente central de este sistema proteolítico involucra a una familia de cisteína aspartato específico de proteasas llamadas caspasas Nicholson, 1999 que se encuentran en forma latente en el interior de las células como zimógenos (enzimas inactivas; Thorneberry and Lazebnik, 1998). La expresión constitutiva de los precursores de caspasas y la rápida inducción de apoptosis, indican que existe un sofisticado y efectivo sistema de regulación; estructuralmente y de acuerdo a la longitud del dominio amino-terminal de las caspasas, se han clasificado en tres grupos: a) Las caspasas de dominios largos, son llamadas caspasas inflamatorias y son: la 1, 4, 5, 12, 13 y 14, b) Las caspasas con función reguladora ó iniciadora y son la 2, 8, 9 y 10. c) Las caspasas de dominios cortos como la 3, 6 y 7, son efectoras (Martion *et al.*, 2001; Adams, 2003).

En relación a las caspasas-8 y 10, estas cuentan con dos dominios efectores de muerte (DEM; Sprik *et al.*, 2002), que inducen una interacción homofílica con un dominio llamado CARD (dominio que recluta caspasas), a través del dominio amino-

terminal se une a FADD/MORT-1 y mediante la región carboxilo-terminal se une a caspasas efectoras Golks y cols, 2005 de esta forma, la sobre-expresión de la caspasa-8 induce apoptosis por dos vías, 1) la extrínseca en donde actúa como un adaptador entre el complejo de señalización y la caspasa-3 y 2) la intrínseca en donde activa a la proteína Bid y se transloca a la mitocondria favoreciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM; Luo, *et al.*, 1998; Zamzami *et al.*, 2000). La PMM es considerada la vía de inicio de la apoptosis intrínseca y está relacionada con la extrínseca. Con la permeabilización de la membrana externa por moléculas que provienen del citosol, RE y del núcleo, se liberan proteínas del espacio intermembranal como el citocromo c, Omi/HtrA2, Smac/DIABLO y factores inductores de apoptosis (FIA; Galluzzi *et al.*, 2007). La liberación del citocromo c en el citosol induce activación de la caspasa-9 para ensamblar el apoptosoma con apaf-1, así mismo el FIA y la EndoG se translocan al núcleo y provocan la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, independientemente de las caspasas (Modjtahedi *et al.*, 2006).

Una de las fases del proceso apoptótico se desencadena con la activación de las caspasas efectoras en forma de cascada, a través de la fragmentación proteolítica en residuos de aspartato en las subunidades p20 y p10, un mecanismo común entre las proteasas (Alnemri *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1997). El papel central de las caspasas es inactivar a proteínas que protegen a la célula de la apoptosis, el ejemplo más claro es la separación del complejo responsable de la fragmentación del ADN (abreviado DFF en inglés, DNA Fragmentation factor; Giordano *et al.*, 1997). Otro mecanismo o sistema regulador de la apoptosis lo constituyen proteínas de la familia Bcl-2, que al ser fragmentadas por las caspasas no sólo inactiva a estas proteínas, sino que además producen fragmentos que promueven apoptosis. De igual forma, las láminas nucleares son separadas en un solo sitio por caspasas, causando colapso de las mismas, y así contribuyen a la condensación de la cromatina. La separación de proteínas involucradas en la regulación del citoesqueleto que incluyen la gelsolina, la cinasa de adhesión focal (abreviada FAK del inglés Focal Adhesion Kinase) y las cinasa activada p21 (abreviada PAK2 del inglés Serine/threonine-protein Kinase), dan como resultado final la reorganización de las estructuras celulares (Thorneberry and Lazebnik, 1998). De acuerdo a lo anterior, podemos mencionar que las caspasas participan de forma activa en la apoptosis, promoviendo la reorganización del citoesqueleto, afectando la replicación y reparación del ADN y se rompe la estructura nuclear, todo esto, induce a la célula a mostrar señales para ser fagocitada.

4.2.6-Clases de Substratos

La alta disociación de dominios efectores y reguladores de las proteínas, vía caspasas ocasiona que las células mueran, este proceso ha sido conservado a través de la evolución de los eucariontes. De tal forma que la apoptosis es un mecanismo altamente específico, eficiente y donde no se presenta una digestión indiscriminada de proteínas,

sino por el contrario, solo se detecta la degradación de algunas de ellas, las cuales son separadas de manera coordinada y usualmente en un sólo sitio, dando como resultado final la pérdida o cambios en la función proteica (Thorneberry and Lazebnik, 1998).

Las secuencias específicas de aminoácidos en las proteínas reconocidas por los tres miembros de la familia de las caspasas han sido identificadas, y se les ha denominado substratos de caspasas, la caspasa-1 (ICE), reconoce la secuencia Tyr-Val-Ala-Asp (YVA-D) (Nicholson and Thorneberry, 1997), la 3 (Ccp32) reconoce Asp-Glu-Val-Asp (DEV-D) su función es separar la enzima reparadora del ADN (Villa *et al.*, 1997). La 6 (Mach2) reconoce Val-Glu-Ile-Asp (VEI-D) y degrada las láminas nucleares (Nicholson and Thorneberry, 1997). La función de algunas proteínas provocada por la fragmentación es variable: a) por un lado estas se activan, en este grupo se encuentran las propias caspasas, la cinasa p21-activada (PAK2), la fosfolipasa citosólica A2, proteínas de unión a elementos reguladores de colesterol (SREBPs), la subunidad de 45 kDa del factor de fragmentación del ADN y la cinasa α 2-1 (PITSLRE). b) Otras proteínas se inactivan, aquí se incluyen la subunidad catalítica de la proteína cinasa de ADN (ADN-PKcs) y la proteína supresora de tumores de retinoblastoma. c) La modificación de las propiedades de ensamble o desensamble de proteínas estructurales, como son las láminas nucleares A, B y C y la proteína Gas2. d) Otras, existe un grupo de proteínas que son fragmentadas por las caspasas, pero aún no se conoce su función en la apoptosis, ellas son: fodrina, una proteína de 70 kDa U1 SnRNP, actinas y el regulador de la proteína p53 MDM2 (Villa *et al.*, 1997).

4.2.7-Apoptosis vía Fas-L/Fas

En la apoptosis mediada por la vía de Fas-L/Fas, la degradación de la enzima reparadora del ADN en la secuencia EVD/G ha sido identificada como el principal blanco *in vitro* de la fragmentación nuclear, el segundo evento es la proteólisis de proteínas del huso mitótico y de las láminas nucleares. En general, la separación o degradación de los autoantígenos por las caspasas que se describen en la tabla II están involucradas en el aseguramiento de la integridad y estructura conformacional del ADN, de esta manera las caspasas contribuyen al colapso de la estructura nuclear durante la apoptosis; este dato refuerza la hipótesis de que la apoptosis es acompañada por una selectiva separación de substratos claves y no por una degradación generalizada del material intracelular.

Tabla II

Modificación de la Función en las Proteínas Blanco en Apoptosis vía Fas-L/Fas

Proteína blanco	Funciones asociadas	Efecto de Fas-L/Fas
ADN topoisomerasa I	Modificación de la topología del ADN	ADN estéril
ADN topoisomerasa II	Modificación de la topología del ADN	ADN estéril
Lámina B	Formación de la envoltura nuclear	Desensamble nuclear
NuMa	Formación del huso mitótico	Desensamble mitótico
PARP	Reparación de ADN	ADN estéril
ADN-PKcs	Reparación del ADN de doble cadena	ADN estéril
UBF/NOR- 90	Transcripción de RNA pol 1	Reduce los transcritos
U1-70 KD SnRNP	Splicing pre-RNAm	Reduce los transcritos
hnRNP-c	Splicing pre-RNAm	Reduce los transcritos
SREBPs	Biosíntesis de esterol	Eleva la concentración
D4-GDI	Sostiene la Rho-GTPasa	Desensamble del citoesqueleto
DFF-45 sitio I	Fragmentación de ADN	Desmontaje del genoma
DFF-45 sitio II	Fragmentación de ADN	Desmontaje del genoma
ADN-RC C140	Replicación de ADN	ADN estéril
HDM2/MDM2	Modulación de p53	Transcripción de Bax
FAK	Regula la adhesión de la célula	Pérdida de contacto celular

Utilizando autoanticuerpos humanos como sondas moleculares, se demostró que la vía Fas de apoptosis está asociada con la fragmentación de algunos autoantígenos nucleares que son blancos en enfermedades autoinmunes sistémicas; en todos los casos, la fragmentación ocurre después del residuo Asp, donde están involucradas varias

caspasas (Casiano *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1997; Thorneberry and Lazebnik, 1998). Los datos experimentales indican que proteínas que son frecuentemente blanco de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes sistémicas humanas, no son fragmentadas ni degradadas por actividades proteolíticas durante la apoptosis, tal es el caso del autoantígeno Ro/SS-A y La/SS-B que no son degradados, si no que se convierten en cuerpos apoptóticos, ocasionando una apoptosis aberrante o no regulada (Casiano *et al.*, 1996).

4.2.8-Técnicas para Determinar Apoptosis

La detección de apoptosis incluye la observación de alteraciones morfológicas típicas, como son: la demostración en escalera del análisis electroforético del ADN, tinciones que permiten identificar la fragmentación del ADN *in situ* (abreviado TUNEL, en inglés End-labeling of DNA with fluorescein-dUTP), detección de la activación de caspasa-3 con el M-30 y el movimiento de la fosfatidil serina a la superficie externa de la célula (ver tabla III).

Tabla III

Técnicas para Detección de Apoptosis

Técnica	Descripción	Etapas
Microscopia óptica y electrónica	Cambios morfológicos (condensación de la cromatina, encogimiento citoplasmático)	Tardía
TUNEL	Detecta fragmentos de ADN adicionando una marca fluorescente.	Tardía
Tinción con ioduro de propidio	Penetra en células con aumento en la permeabilidad de la membrana (células necróticas).	Necrosis secundaria
Anexina V-FITC	Detecta la fosfatidil serina en la superficie celular de las células apoptóticas.	Intermedia
M-30 Cito muerte	Detecta activación de caspasa-3 <i>in situ</i>	Tardía

La apoptosis se divide en tres fases: la primer fase denominada de inicio comienza con un estímulo externo en la vía extrínseca y uno intracelular en la intrínseca, a la segunda etapa se la ha llamado, fase de decisión, por que participan un gran número de moléculas anti y pro-apoptóticas, la fase final involucra la participación de las

caspasas efectoras provocando los cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis (Kromer *et al.*, 1997).

4.3-Apoptosis en Riñón

La apoptosis a nivel renal tiene un papel crucial en la morfogénesis (Fierbeck *et al.*, 2003, Yamagishi 2002). Sin embargo, la tasa de apoptosis en células glomerulares se incrementa con la edad y disminuye la proliferación celular (Bollain *et al.*, 2006). Por tanto, es importante conocer sí el proceso de apoptosis es parte del daño renal, ya que este es un fenómeno fisiológico y necesario para mantener la homeostasis tisular del tejido (Ortiz *et al.*, 1999). En el riñón, la apoptosis puede ser benéfica o patogénica, dependiendo de qué tipo de células afecte, de la magnitud del fenómeno y del momento en que ocurre (Ortiz *et al.*, 1996, Ortiz, 2000). La apoptosis y la lisis mediada por complemento han sido consideradas las principales formas de muerte celular en el glomérulo inflamado. No obstante, estudios recientes indican que la lisis por complemento no es una forma de muerte celular glomerular, ya que las células nucleadas son relativamente resistentes y las células del glomérulo expresan proteínas protectoras (Ortiz, 2000).

Estudios recientes en riñones de ratón demuestran que las células que expresan Fas-L son: las células mesangiales, las células epiteliales de los túbulos, los fibroblastos renales, las células endoteliales y los linfocitos. Las células epiteliales de los túbulos son las que expresan más el ligando y en células del glomérulo la expresión es más evidente en la glomerulonefritis proliferativa.

Fas se expresa tanto en células mesangiales humanas como en células mesangiales de ratones, en células epiteliales de los túbulos y en el ratón en fibroblastos renales que se sobre-expresa cuando se presenta una glomerulonefritis proliferativa y durante el rechazo de trasplantes de riñón en el epitelio tubular. Por lo que las células propensas a sufrir una muerte celular programada vía Fas-L/Fas son: células mesangiales, células endoteliales y principalmente células epiteliales de los túbulos (Sánchez Niño *et al.*, 2010). Con respecto a la NL Takemura y cols en 1995 reportaron un incremento del receptor de Fas y del gen Bcl-2 en muestras con varios tipos de glomerulonefritis. Sugiyama y cols en 1996 demostraron la fragmentación del ADN en casos de NL y reportaron una correlación entre el número de células apoptóticas y el índice de esclerosis, pero no con el de proliferación.

Como podemos notar, la presencia de moléculas apoptóticas como Fas sugiere que la apoptosis está involucrada en las glomerulonefritis y se ha intentado definir si existe algún polimorfismo.

Adicionalmente Huang y cols en 1997 describen el polimorfismo del promotor de Fas, en donde una Guanina es sustituida por una Adenina en la posición -670. Este

polimorfismo aumenta la afinidad de la unión del factor de transcripción STAT-1 en la secuencia activada por interferón gama (GAS), modificando de esta forma la tasa de transcripción del receptor Fas. Cascino y cols en 1998 reportan el polimorfismo del gen Fas en la posición 297 del alelo C y que está asociado al desarrollo de LES en población japonesa, en contraste con la italiana.

4.3.1-Podocitos

Estudios sobre mutaciones en los genes de nefrina y del tumor-1 de Wilm's (WT-1) en enfermedades renales han demostrado que afectan la vía de señalización entre los podocitos, células endoteliales y mesangiales, cambiando nuestra idea de los glomérulos como unas estructuras estáticas a unas dinámicas (Verma *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2002). Estas vías de señalización controlan el desarrollo glomerular, la integridad y la función del glomérulo. Los glomérulos de los riñones en los mamíferos actúan como un filtro, permitiendo el paso de pequeñas moléculas como el agua, azúcares, electrolitos y proteínas de bajo peso molecular y retienen proteínas de alto peso molecular y células sanguíneas de la circulación.

El riñón presenta una tasa de regeneración muy baja en contraste con otros órganos. Cada ser humano contiene aproximadamente un millón de nefronas que tienen una tasa limitada de reparación, básicamente se reparan los túbulos proximales. El glomérulo es el componente central de las nefronas, este comienza a formarse a partir de la segmentación de la nefrona que depende de la vía de señalización de NOTCH2 y su ligando (Cheng and Kopan, 2005). La estructura precursora de los glomérulos se puede apreciar como un cuerpo en forma de "S" cuando se observa en cortes histológicos y se detectan tres componentes: el primero es una capa de podocitos "primitivos" que aparecen en forma de una columna. El segundo, una capa delgada que formará la cápsula de Bowman's y el tercero, la primer asa capilar dentro del surco glomerular. En esta etapa, los podocitos y las células endoteliales capilares forman su propia lámina basal que posteriormente se fusionan para formar la MBG.

Los podocitos sufren una transformación durante las primeras etapas del desarrollo de los glomérulos, estos adquieren ciertas características: primero comienzan a perder las uniones con las células laterales excepto con la MBG, finalmente los cuerpos de los podocitos maduros aislados unos de otros, extienden largas prolongaciones (pies) que se van dividiendo en otras intermedias y se contactan con otras prolongaciones de otros podocitos. A esta interdigitación de los podocitos alrededor de los capilares se le llama diafragma de abertura (DA) y es el único aspecto del desarrollo glomerular que es fundamental para mantener la función renal y prevenir así la enfermedad glomerular (Asanuma and Mundel, 2003; Kreidberg *et al.*, 2006). Holthofer y cols en 1999 identifican la mutación en el gen NPHS1 que codifica para la proteína llamada nefrina y demostraron que mantiene la estabilidad del DA. Lo que

indica que está relacionada con el inicio y la progresión de la enfermedad glomerular. El ensamble del DA es importante para el desarrollo glomerular, este sólo puede ser observado por microscopía electrónica, es una estructura que conecta a los cuerpos de los podocitos adyacentes y está formado por un complejo de proteínas que forman la barrera de filtración (Hamano *et al.*, 2002; Asanuma *et al.*, 2007).

El desarrollo y la estabilidad de la estructura glomerular a través de la vida es fundamental para prevenir las enfermedades renales y la diferenciación de los podocitos es el primer factor determinante para la formación glomerular.

Probablemente el factor de transcripción mejor estudiado en podocitos es el WT-1 que presenta cuatro isoformas de RNAm (Haber *et al.*, 1991), Call y cols en 1990 reportan que WT-1 es una proteína de cuatro dedos de zinc que se puede unir a ADN y ARN. Por tanto, la función de WT-1 no es totalmente clara (Barbosa *et al.*, 1999). En humanos las mutaciones de WT-1 que afectan la región del tercer dedo de zinc está relacionada con dos clases de glomerulonefritis, el síndrome de Deny-Drash (DDS Denis *et al.*, 1967; Drash *et al.*, 1970) y el síndrome de Fraiser, ambos presentan anomalías en el desarrollo glomerular. Otra mutación de WT-1 reportada por Gao y cols en 2005 se caracteriza por un incremento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular del lado interno de la MBG que provoca una enfermedad llamada esclerosis mesangial difusa.

Otras proteínas transcritas por el WT-1 son la nefrina y la podocalxina, dos proteínas fundamentales en el ensamble del DA (Guo *et al.*, 2004). La nefrina presenta múltiples residuos de tirosin cinasas que son fosforilados por la familia de la Src cinasas, la fosforilación de la proteína se presenta durante el desarrollo glomerular, por tanto, está involucrada en el ensamble del DA (Jones *et al.*, 2006). Por otra parte esta fosforilación también se presenta durante el daño a los podocitos provocando el desensamble (Verma *et al.*, 2006).

4.3.2-Biomarcadores en la NL

La biopsia renal, es el estándar para el diagnóstico de la NL, el análisis microscópico de la muestra identifica las etapas tempranas y tardías de la enfermedad (Reveille, 2004). Sin embargo, el análisis es invasivo, costoso y los resultados no son inmediatos, lo que motiva a desarrollar y buscar nuevos biomarcadores que proporcionen información en las diferentes etapas de la enfermedad. Estos pueden ser de: tejidos, suero y orina. Los biomarcadores “ideales” deben de cumplir los siguientes parámetros: 1) Diagnosticar de forma oportuna el grado y la actividad inflamatoria e inmunológica de la enfermedad. 2) Evaluar la respuesta al tratamiento. 3) Definir el grado de daño renal. 4) Ser sensibles y específicos de la enfermedad, reproducibles, fáciles de medir y de bajo costo (Illei *et al.*, 2004).

Existen marcadores genéticos que indican susceptibilidad para desarrollar LES, por ejemplo: ciertos alelos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II-Hartung *et al.*, 1992). Deficiencias en C4, C2 y C1q (Liu *et al.*, 2004). Polimorfismos en genes que codifican para citocinas como la IL-10, IL-6, TNF- α e IFN- γ 2 (Gibson *et al.*, 2001; Linker *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1994). Mutaciones en los receptores de citocinas y moléculas coestimuladoras como CD28/B7 (Matsushita *et al.*, 2000). Polimorfismos de genes asociados al desarrollo de apoptosis como son: Fas, Fas-L y Bcl-2 (Kojima *et al.*, 2000). Como podemos notar, múltiples genes y no solo un gen están involucrados con la susceptibilidad a desarrollar LES.

Históricamente los marcadores del suero empleados para el diagnóstico de LES son: los autoanticuerpos anti-Sm, anti-ADNds, anti-Ro, anti-La y anti-snRNP. Otros marcadores del suero como los anti-nucleosomas se relacionan con la falla renal. Los anti-C1q correlacionan con la actividad de la enfermedad (Horvath *et al.*, 2001). La ausencia de estos autoanticuerpos excluye el diagnóstico, mientras el incremento en los niveles predice el daño renal (Moroni *et al.*, 2001).

Tomando en cuenta la facilidad y el método no invasivo, se han empleado algunas citocinas y quimiocinas como posibles biomarcadores urinarios en pacientes con NL como son: la lipocalina-2, GMCP-1, PI-10, IL-6, IL-10 e IL-8 (Schwartz *et al.*, 2007). Li y cols en 2006 reportaron un incremento en pacientes con NL de la quimiocina GMCP-1 involucrada en la quimiotaxis de monocitos y su disminución en pacientes bajo tratamiento. Se ha reportado un incremento de la IL-6 y 10 en pacientes con LES con y sin NL utilizando la técnica de PCR (Li *et al.*, 2006). El inductor maestro de apoptosis semejante a TNF denominado TWEAK pertenece a la familia del TNF, es un potente inductor de citocinas proinflamatorias *in vitro* e *in vivo* y probablemente regula la apoptosis, la proliferación e inflamación. TWEAK se expresa en células mesangiales y podocitos, la activación induce la transcripción de IL-6 por efecto del factor de transcripción NF-Kappa B desencadenando el daño renal (Zhao *et al.*, 2007; Sanz *et al.*, 2008). De igual forma, clínicamente la lipocalin-2 urinaria correlaciona de manera significativa con la actividad de la nefritis (Rubinstein *et al.*, 2008).

Es importante destacar, que el daño renal que se presenta en los pacientes con NL evoluciona a través de la enfermedad y es necesario identificar con un método no invasivo, rápido y de bajo costo la evolución de esta en los pacientes con NL. Estudios sobre la presencia de WT-1 en muestras de sedimentos urinarios de pacientes con LES con NL contribuirá a monitorear el curso de la enfermedad.

Tomando en cuenta lo anterior; hasta el momento no queda claro que produce el daño a las células renales, por tanto, estudios sobre el mecanismo de apoptosis vía Fas-L/Fas pueden contribuir a un mejor entendimiento del proceso de daño renal.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.-Material Biológico

Se estudiaron 17 Biopsias renales de pacientes con LES y con NL de las cuales, el 88.23% (15) pertenecían al sexo femenino (F) y el 11.76% (2) al masculino (M) con un promedio de edad de 26 años y un rango entre los 14 y 40 años, con una evolución promedio de la enfermedad de 4.88 años y un rango de 1-10 años y con un promedio IADLES de 6.5 con un rango entre 4-10. Un grupo de 10 biopsias de sujetos sanos sin NL masculinos con un promedio de edad de 29.2 años y con un rango entre 23-35 años fueron incluidos en el estudio. Para determinar el polimorfismo -670 tanto en controles como en pacientes con LES con y sin NL se estudiaron 3 grupos, el primer grupo incluyó 32 pacientes que desarrollaban LES sin NL de las cuales, 25 pertenecían al sexo F y 7 al sexo M con un promedio de edad de 34.4 años, el segundo grupo se formó con 9 pacientes con LES y con NL clase-IV y III de las cuales, 5 pertenecían a mujeres y 4 a hombres con un promedio de edad de 33.5 años, el tercer grupo incluyó a 46 sujetos sanos de los cuales, 39 pertenecían a mujeres y 7 a hombres con un promedio de edad de 34.3 años. Así mismo, se estudio el polimorfismo -670 en un grupo que incluyó 13 pacientes con LES de la ciudad de León Guanajuato, de las cuales, 12 pertenecían al sexo F y 1 al M, otro grupo se formó con 8 pacientes del sexo F con LES y con NL de la ciudad de Guadalajara Jalisco. Para determinar la expresión de WT-1 en SU tanto en controles como en pacientes con LES con y sin NL se estudiaron 27 muestras de orina, de las cuales, 24 pertenecían a mujeres y 3 a hombres con un promedio de proteinuria de 0.615 g/l. Un grupo de 10 muestras de orina de sujetos sanos sin NL masculinos con un promedio de edad de 24.5 años y con un rango entre 18-52 años fueron incluidos en el estudio.

5.2.-Clasificación de la Nefritis Lúpica

Las biopsias de los controles y los pacientes con LES y con NL, se evaluaron por ensayos de tinción nuclear. Las biopsias se cortaron en un micrótopo (LEICA RM2125RT) en piezas de 4 µm de espesor y fueron des-parafinadas 10 min a 60°C, luego se pre-hidrataron en xileno y etanol a diferentes grados, posterior a los lavados con SBF (1X) de 5 min, se colocaron 5 min en una solución de Hematoxilina de Harris,

seguidas de un lavado con agua se sumergieron en una solución de eosina por 1 min. Finalmente, se deshidrataron con lavados de etanol y aclaradas en xileno. Las muestras fueron montadas en resina sintética con xileno para ser analizadas a 20 y 40X en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) en campo claro. Los pacientes con LES y con NL fueron diagnosticados por un reumatólogo de acuerdo a los criterios del ACR como son los IADLES, en tanto que las muestras renales fueron clasificadas por un patólogo experto de acuerdo a los criterios establecidos por la SIN/SPR (Weening *et al.*, 2004), como se muestra en las tablas IV y V.

Tabla IV

Clasificación de la NL por la SIN/SPR

Criterios de clasificación		
Clasificación histológica de la NL	Depósitos Inmunes	Clase
Mesangial mínima	Mesangial	I
Mesangial proliferativa	Mesangial	II
Focal	Subendotelial	III
Difusa	Subendotelial	IV
Membranosa	Subepitelial con o sin subendotelial	V
Esclerosante avanzada	NA	VI

Tabla V

Clasificación Segmentaria y Focal de la NL

	Glomérulos afectados \leq 50%	Glomérulos afectados \geq 50%
Porcentaje de compromiso de un glomérulo $< 50\%$	Segmentaria focal	Segmentaria difusa
Porcentaje de compromiso de un glomérulo $\geq 50\%$	Global focal	Global difusa

Características de la nefritis focal (clase-III).

- (1) <50% de los glomérulos afectados.
- (2) Depósitos inmunes subendoteliales.
- (3) Subgrupos:
 - (3a) Activa (A).
 - (3b) Inactiva crónica con cicatrización (C).
 - (3c) Tanto activa como crónica (A/C).

Características de la nefritis difusa (Clase-IV)

- (1) $\geq 50\%$ de los glomérulos afectados
- (2) Depósitos inmunes subendoteliales
- (3) Subgrupos:
 - (3a) Activa segmentaria (A).
 - (3b) Activa global (C).
 - (3c) Inactiva crónica segmentaria con cicatrización: S (C).
 - (3d) Inactiva crónica global con cicatrización: G (C).
 - (3e) Segmentaria activa y crónica: S (A/C).
 - (3f) Global activa y crónica: G (A/C).

5.3.-Identificación de Células Apoptóticas por TUNEL

La apoptosis en células renales de muestras control y de pacientes con NL se determinó *in situ* por el rompimiento del ADN con el kit de detección de apoptosis de Roche TUNEL-Apo-AP (No de cat 11684795910 Penzberg, Germany). Los cortes se des-parafinaron y se pre-hidrataron de acuerdo al protocolo establecido para ensayos de tinción nuclear. Las muestras fueron lavadas con SBF por 5 min y se bloquearon 30 min con Tris-HCl 0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% de suero normal bovino luego, se lavaron por 5 min en SBF 1X y se incubaron con la mezcla de TUNEL por 1 h a 37°C en la oscuridad. Las muestras fueron lavadas en SBF y montadas en SBF/Glicerol (3:7) para ser analizadas a 20 y 40X e inmersión en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) equipado para fluorescencia. Para distinguir células apoptóticas y no apoptóticas se contrastaron con yoduro de propidio. Como control positivo de la técnica de TUNEL se utilizó una muestra con ADNasa-1 por 30 min y como control negativo se incubó con la solución de marcaje sin enzima. Finalmente, el anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina incluido en el kit del TUNEL, se reveló con NBT/BCIP (No de Cat. Sc-24981 Santa Cruz, California) para marcar células apoptóticas de muestras renales en campo claro. Las células en apoptosis se identificaron por fluorescencia en color verde y con el contraste del yoduro de propidio se calculó el número de células por glomérulo. El análisis se realizó por dos investigadores de forma independiente y tomando 10 campos al azar. Las imágenes se analizaron con el programa Imagen-plus Versión 7.0 para WindowsTM.

5.4.-Detección de Moléculas Apoptóticas por Inmunohistoquímica (IHQ)

La expresión de moléculas involucradas en el proceso de apoptosis en muestras de controles y pacientes con LES y con NL se determinó por IHQ. Los cortes de 4 μm de espesor se des-parafinaron 10 min a 60 °C y se pre-hidrataron en xileno y con etanol a diferentes grados, después de un lavado en SBF por 5 min, se calentaron por radiación de microondas a 750 W por 1 min en buffer citrato pH-6 para recuperación antigénica, los cortes seguidos de un bloqueo con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol se sumergieron 30 min con Tris-HCl 0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% suero normal bovino, seguidas de un lavado en SBF por 5 min se colocaron los anticuerpos monoclonales anti-fas-L (®RDI-CD95Lamb. RDI Flanders, NJ, USA), anti-Fas (DAKO), anti-caspasa-3 (Clone4-1-18 No de Cat. 35-1600 Zymed San Francisco, California) y anti-bax (®RDI-BAX-amb-A7 RDI Flanders, NJ, USA) diluidos 1:200 en SBF y se incubaron 18 hrs a 4°C en cámaras húmedas, después de 3 lavados de 5 min con SBF se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con HRP anti-IgG de ratón (No de Cat. 50695148 Zymed San Francisco, California) por 4 hrs y se lavaron 2 veces con SBF por 10 min. Las muestras seguidas del revelado con 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma) se contrastaron con Hematoxilina por 1 min y se deshidrataron con etanol. Finalmente, se aclararon con xileno y se montaron en resina sintética para ser analizadas a 20 y 40X en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) en campo claro. Los índices binarios de inmuno reactividad (IBR) se calcularon con los siguientes parámetros (ver tabla VI).

Tabla VI

Índice Binario de Inmuno Reactividad

Valor	Intensidad de tinción	Valor	% de células glomerulares teñidas
0	Negativo	1	1-25
1	Leve	2	26-50
2	Moderada	3	51-75
3	Severa	4	76-100

Los IBR se calcularon multiplicando el valor de la tinción por el valor del porcentaje de células teñidas. Muestra negativo 0, muestra positiva valores de 1 a 12.

5.5.-Síntesis de sondas

Las muestras de los controles y las de los pacientes con LES y con NL se trataron para ensayos de hibridación *in situ* para detectar la expresión de los ARNm de fas-L, fas y caspasa-3. Los oligonucleótidos que se utilizaron para sintetizar las sondas fueron:

para Fas-L derecho 5'-CAAGTCCAACCTCAAGGTCCATGCC-3', inverso 5'-CAGAGAGAGCTCAGATAGCGTTTGGAC-3', Fas derecho 5'-GGTGGGTTACTGTTTACA-3', inverso 5'-GTGCTACTCCTAACTGTGAC-3', y para caspasa-3 derecho 5'-TCCAGTCGGAGGCCAGATCTGAG-3', inverso 5'-CTGAAGCCTGCCTCCCGGGATGA-3'. Las sondas se sintetizaron por PCR usando el kit Platinum Taq ADN Polymerase High Fidelity de Invitrogen. 1 µg de templado de ADN se colocó en un eppendorf de 200 µl con una mezcla de reacción de 0.2 mM de los iniciadores derecho e inverso para fas-L, fas y caspasa-3 respectivamente, 5 µl de buffer PCR 10X, 25 µl de nucleótidos 2X, 1µl de MgSO₄ 50 mM y 0.2µl de platinum Taq High fidelity más 0.5µl el Fluoro-Red (RPN 2123). Las mezclas incubadas a 4°C se aforaron a un volumen final de 50 µl con agua. La reacción se realizó en un termociclador (COY) a 30 ciclos de 2 min 93.8°C, 2 min 55°C y 1.5 min 72°C al final de la reacción. Como control positivo se amplificó el gen de G3PDH y como control negativo no se incubó el templado con la Tac ADN polimerasa. 10µl de los productos de PCR se caracterizaron en un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X.

5.6.-Hibridación *in situ*

Las muestras renales de los pacientes con LES y con NL y las muestras de los controles fueron adheridas a portaobjetos, luego se desparafinaron a 60°C por 10 min, seguidas de una pre-hidratada con xileno y con etanol a diferentes grados tratados con DEPC por 5 min se incubaron 10 min en HCl 0.02 M y se lavaron 2 min con SBF/DEPC, luego se permeabilizaron 90 s en Tritón 0.01%/ SBF/DEPC, y seguidas de un lavado en SBF/DEPC se incubaron 15 s a 4°C en ácido acético al 20%. Finalmente se lavaron 5 min en SBF/DEPC. 50 ng de cada una de las sondas se prepararon en buffer de hibridación con formamida (1:1). Cada una de las sondas se aplicó de forma individual sobre los cortes tratados. Las condiciones de pre-hibridación fueron de 90°C por 3 min y la hibridación se realizó por 24 hrs a 37°C en cámara húmeda y en la oscuridad. Después de la hibridación fueron lavados a temperatura ambiente con 2X CCS por 10 min. Finalmente, se contrastaron con DAPI (No de Cat. 10236276001 Roche Diagnostic Indianapolis, USA) y se montaron en SBF/glicerol para ser visualizadas en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) equipado para inmunofluorescencia. Las células con la expresión de los ARNm se identificaron por fluorescencia en color rojo y con el contraste del DAPI se calculó el número de células por glomérulo. El análisis se realizó por dos investigadores de forma independiente y tomando 10 campos al azar. Las imágenes se analizaron con el programa Imagen-pro plus Versión 7.0 para Windows™.

5.7.-Detección de Infiltrado Linfocitario por IHQ

La presencia de infiltrado linfocitario en muestras de controles y pacientes con LES y con NL se determinó por IHQ. Los cortes de 4 µm de espesor se des-parafinaron 10 min a 60 °C y se pre-hidrataron en xileno y con etanol a diferentes grados, después de

un lavado en SBF por 5 min, se calentaron por radiación de microondas a 750 W por 1 min en buffer citrato pH-6 para recuperación antigénica, los cortes seguidos de un bloqueo con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol se sumergieron 30 min con Tris-HCl 0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% suero normal bovino, seguidas de un lavado en SBF por 5 min se colocaron los anticuerpos monoclonales anti-interferón- γ (No de Cat. 506501 BioLegend San Diego, California), CD56 (No de Cat. 304601 BioLegend San Diego, California) y CD69 (No de Cat. 3109001 BioLegend San Diego, California) diluidos 1:200 en SBF y se incubaron 18 hrs a 4°C en cámaras húmedas, después de 3 lavados de 5 min con SBF se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con HRP anti-IgG de ratón (No de Cat. 50695148 Zymed San Francisco, California) por 4 hrs y se lavaron 2 veces con SBF por 10 min. Las muestras seguidas del revelado con 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma) se contrastaron con Hematoxilina por 1 min y se deshidrataron con etanol. Finalmente, se aclararon con xileno y se montaron en resina sintética para ser analizadas a 20 y 40X en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) en campo claro. Los IBR se calcularon con los parámetros de la tabla VI.

5.8.-Fragmentos Polimórficos de Restricción

Se utilizó la técnica de PCR-RFLPs para determinar el polimorfismo en la región -670 del promotor de Fas en pacientes con LES con y sin NL. Con la técnica de Miller, se realizó la extracción del ADN genómico (ADNg) de sangre total, después del análisis de calidad y la cuantificación del ADNg se utilizó como templado para amplificar por PCR la región del promotor -670 de fas, la reacción de PCR se realizó usando el kit Platinum Taq ADN Polymerase High Fidelity de Invitrogen. 1 μ g de templado de ADN se colocaron en un eppendorf de 200 μ l con una mezcla de reacción de 0.2 mM de los iniciadores derecho 5'-CTACCTAAGAGCTATCTACCGTTC-3' e inverso 5'-GGCTGTCCATGTTGTTGGCTGC-3' con 5 μ l de buffer PCR 10X, 25 μ l de nucleótidos 2X, 1 μ l de MgSO₄ 50 mM y 0.2 μ l de la platinum Taq High fidelity, las mezclas incubadas a 4°C se aforaron a un volumen final de 50 μ l con agua. La reacción se realizó en un termociclador (Perkin Elmer 2400) a 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 58°C y 30 s a 72°C. La extensión final de la reacción fue de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron digeridos a 37°C por 1 h con la enzima de restricción Mva I (No de Cat. 11288075001). 10 μ l de los productos de PCR sin digerir y los digeridos se caracterizaron en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X.

5.9.-WT-1 en Biopsias Renales por Inmunofluorescencia (IF)

La expresión de WT-1 en muestras renales de controles y pacientes con LES y con NL se determinó por IFI. Los cortes de 4 μ m de espesor se desparafinaron 10 min a 60°C y se pre-hidrataron en xileno y con etanol a diferentes grados, después de un lavado en SBF por 5 min, las muestras se colocaron en buffer citrato pH-6 y se calentaron por 1 min a 750 W con radiación de microondas para recuperación

antigénica, para bloquear los sitios inespecíficos los cortes se sumergieron 30 min en Tris-HCl (0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% suero normal bovino). Seguidas de un lavado en SBF por 5 min se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-WT-1 (sc-7385 Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Santa Cruz.CA) diluido 1:200/SBF por 18 hrs a 4°C en cámara húmeda, luego de 3 lavados de 5 min con SBF se incubó con el segundo anticuerpo conjugado con Rojo Texas anti-IgG de ratón (No de Cat. 50695148 Zymed San Francisco, California) por 4 hrs, después de un lavado con SBF por 5 min las muestras se contrastaron con DAPI (Roche) por 15 min a 37°C. Finalmente, se montaron en SBF/Glicerol (3:7) para ser fotografiadas a 20 y 40X en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) equipado para fluorescencia con una cámara (Olympus DP-71). Los podocitos (WT-1) se identificaron por fluorescencia en color rojo y con el contraste del DAPI se calculó el número de podocitos por glomérulo. El análisis se realizó por dos investigadores de forma independiente y tomando 5 campos al azar. Las imágenes se analizaron con el programa Imagen-pro plus Versión 7.0 para Windows™.

5.10.-WT-1 en Sedimento Urinario por IF

La expresión de WT-1 en muestras de SU tanto en controles como en los pacientes con LES y con NL se determinó por IFI. 20 µl del SU se extendieron sobre un portaobjetos, después del secado a temperatura ambiente por 5 min, se fijó con paraformaldehído al 4% durante 2 min, luego de lavar con SBF por 5 min, se permeabilizó con Triton X-100 (Triton al 0.1% con citrato de sodio al 0.1% en SBF) por 2 min, luego de lavado con SBF, se bloquearon los sitios inespecíficos por 30 min con Tris-HCl (0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% suero normal bovino), después de un lavado en SBF por 5 min se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-WT-1 (sc-7385 Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Santa Cruz.CA) diluido 1:200/SBF por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, seguido de 2 lavados de 5 min con SBF se incubó con el segundo anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (abreviado FITC, en inglés Fluorescein isothiocyanate) anti-IgG de ratón (No de Cat. 50695148 Zymed San Francisco, California) por 1 h, después de 2 lavados con SBF por 5 min, las muestras se contrastaron con yoduro de propidio diluido 1:100 en SBF por 30 s. Finalmente, se montaron en SBF/Glicerol (3:7) para ser fotografiadas a 20 y 40X en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) equipado para fluorescencia con una cámara (Olympus DP-71). Los podocitos se identificaron por fluorescencia en color verde. El análisis se realizó por dos investigadores de forma independiente y tomando 10 campos al azar. Las imágenes se analizaron con el programa Imagen-pro plus Versión 7.0 para Windows™

5.11.-Podocitos Apoptóticos en Muestras de SU

La apoptosis de podocitos en SU tanto de controles como de pacientes con NL se determinó *in situ* por el rompimiento del ADN con el kit de detección de apoptosis (Roche TUNEL-Apo-AP No de cat 11684795910 Penzberg, Germany). 20 µl del SU, se

extendieron sobre un portaobjetos, después del secado a temperatura ambiente por 5 min se fijó con paraformaldehído al 4% durante 10 min, luego de lavar con SBF por 5 min se permeabilizó con Triton X-100 por 2 min, luego de un lavado por 5 min con SBF, se bloquearon los sitios inespecíficos 30 min con Tris-HCl (0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% de suero normal bovino) después, se lavaron por 5 min en SBF y se incubaron con la mezcla de TUNEL por 1 h a 37°C en la oscuridad. Las muestras se lavaron en SBF y se realizó la IFI con Rojo Texas para detectar a WT-1, después de los lavados, se montaron en SBF/Glicerol (3:7) para ser fotografiadas a 20 y 40X en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) equipado para fluorescencia con una cámara (Olympus DP-71). Los podocitos (WT-1) se identificaron por fluorescencia en color rojo y con el traslape de la marca del TUNEL se calculó el número de podocitos apoptóticos. El análisis se realizó por dos investigadores de forma independiente y tomando 5 campos al azar. Las imágenes se analizaron con el programa de Imagen-pro plus Versión 7.0 para WindowsTM. Como control positivo de la técnica de TUNEL se utilizaron muestras digeridas con ADNasa1 por 15 min y como control negativo se incubó con la solución de marcaje sin enzima.

5.12.-Activación de Caspasa-3 en Podocitos

La activación de las caspasas efectoras en los podocitos de muestras tanto de controles como de pacientes con NL se determinó *in situ* por la detección del sitio fragmentado de la citoqueratina 18 con el anticuerpo monoclonal anti ratón M-30 (CytoDeath de Roche No de cat 12140322001). Los cortes des-parafinados y pre-hidratados de acuerdo al protocolo establecido para ensayos de tinción nuclear, se lavaron con SBF por 5 min y se bloquearon 30 min con Tris-HCl 0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% de suero normal bovino, luego de un lavado por 5 min en SBF 1X, se incubó con el anticuerpo monoclonal M-30 diluido 1:100 en SBF por 3 hrs a temperatura ambiente en cámara húmeda, luego de 2 lavados de 5 min con SBF se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con Rojo Texas anti-IgG de ratón (No de Cat. 50695148 Zymed San Francisco, California) por 3 hrs, después de 2 lavados de 5 min con SBF, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-WT-1 (sc-7385 Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Santa Cruz.CA) diluido 1:200/SBF por 12 hrs a 4°C en cámara húmeda, seguido de los lavados con SBF se incubó con el segundo anticuerpo conjugado con FITC anti-IgG de ratón (No de Cat. 50695148 Zymed San Francisco, California) por 3 hrs, después de los lavados con SBF por 5 min las muestras se contrastaron con DAPI (Roche) por 15 min a 37°C. Finalmente, se montaron en SBF/Glicerol (3:7) para ser fotografiadas a 20 y 40X en un microscopio (Olympus B-Max BX-40) equipado para fluorescencia con una cámara (Olympus DP-71). Los podocitos (WT-1) se identificaron por fluorescencia en color verde y con el traslape del Rx y el contraste del DAPI se calculó el número de podocitos por glomérulo. El análisis se realizó por dos investigadores de forma

independiente y tomando 5 campos al azar. Las imágenes se analizaron con el programa de Imagen-pro plus Versión 7.0 para Windows TM.

5.13.-Análisis del WT-1 en SU por ELISA

Se estableció la técnica de ELISA para evaluar WT-1 en los SU tanto de controles sanos como de pacientes con NL. Las muestras de orina recolectadas durante 24 hrs se procesaron en un lapso menor a 30 min 10 ml de orina fueron centrifugadas por 5 min a 1,500 rpm, el sobrenadante se decantó y el SU fue re-suspendido en 1 ml de SBF-TS (0.1% Tween-20, SDS 0.02% en SBF). 100 µl de SU re-suspendido en SBF-TS (50 células/µl) se incubaron por cuadruplicado durante 18 hrs a 4°C en una placa de poliestireno para tapizar los pozos, después de fijar con paraformaldehído al 4% y permeabilizar con Triton X-100 por 5 min la placa se lavo tres veces en agitación con SBF-TS por 1 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon 30 min con Tris-HCl (0.1M pH-7.5, ASB 3% y 20% suero normal bovino), seguido de los 3 lavados por 1 min, se inactivó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, luego de los lavados de la placa se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-WT-1 (sc-7385 Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Santa Cruz.CA) diluido 1:200/SBF, seguido de los lavados con SBF-TS se incubó con el conjugado diluido 1:500/SBF (HRP-anti-IgG de ratón No de Cat. 62-6620 Zymed San Francisco California), por 30 min, después de los lavados se reveló con el substrato TMB/H₂O₂ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/hydrogen peroxide, Fulka) por 15 min. Finalmente, se utilizaron 100 µl de ácido sulfúrico 0.5 M para detener la reacción. La placa se analizó en un lector de ELISA (Stat Fax-2100) a 450 nm. Como control negativo de la técnica un pozo no se incubó con el monoclonal anti-WT-1 mientras que, para el control positivo se incubó con el anticuerpo anti-Ro-60.

5.14.-Análisis Estadístico

Los datos fueron procesados con la distribución de t Student en el programa Prisma.

6. RESULTADOS

6.1.-Clasificación Histológica de Muestras Renales con NL

De acuerdo a los parámetros establecidos por la SIN/SPR, el análisis histológico de las muestras renales de pacientes con LES y con NL, indicó que el 41.17% de las biopsias estudiadas son de NL clase-III y el 58.82% son de NL clase-IV (ver tablas VII y VIII).

Tabla VII

Clasificación Histológica y Clínicos de Muestras Renales de Pacientes con NL C-III

Género	Edad	Evolución de la enfermedad (años)	IADLES	Clase de NL	I/A	I/C	Proteinuria en 24 horas
3-M	40	8	5	III-A	5	0	5.1
5-F	15	7	6	III-A/C	6	3	2.5
6-F	35	5	6	III-A/C	6	2	1.2
7-F	24	10	4	III-A	8	0	1.9
10-F	14	1	7	III-A/C	16	11	6.1
14-F	26	2	8	III-A/C	8	1	0.8
16-F	26	2	10	III-A/C	8	5	0.07
Media	25.71	5	6.57	7	8.14	3.14	2.52
S	9.53	3.46	1.98		3.67	3.89	2.25

Clasificación histológica y datos clínicos de muestras renales de pacientes con NL clase-III. La edad promedio de los pacientes fue de 25.71 años con un promedio de evolución de la enfermedad de 5 años y el promedio IADLES fue de 6.57 con un promedio de actividad de 8.14 y cronicidad de 3.14. El promedio de proteinuria fue de 2.25 g/l.

Tabla VIII

Clasificación Histológica y Clínicos de Muestras Renales de Pacientes con NL C-IV

Género	Edad	Evolución de la enfermedad (años)	IADLES	Clase de NL	I/A	I/C	Proteinuria en 24 horas
1-F	33	5	8	IV-A/C	4	4	0
2-F	19	8	6	IV-A/C	4	5	1.8
4-F	26	7	4	IV-A/C	8	4	3.2
8-F	34	9	5	IV-A/C	14	12	1
9-F	32	4	7	IV-A/C	4	3	0
11-F	16	4	8	IV-A	6	0	1.7
12-F	30	4	6	IV-A/C	4	5	5.5
13-F	36	1	4	IV-A/C	5	2	1.1
15-M	16	2	8	IV-A/C	10	1	2.7
17-F	19	4	8	IV-A/C	5	7	1.8
Media	26.1	4.8	6.4	10	6.4	4.3	1.88
S	7.90	2.52	1.64		3.34	3.40	1.63

Clasificación histológica y datos clínicos de muestras renales de pacientes con NL clase-IV. La edad promedio de los pacientes fue de 26.1 años con un promedio de evolución de la enfermedad de 4.8 años y un IADLES de 6.4 con un promedio de actividad de 6.4 y cronicidad de 4.3. El promedio de proteinuria fue de 1.88 g/l. Esta clase de nefritis lúpica predomina en los pacientes con LES.

6.2.-Incremento de Células Apoptóticas en Muestras Renales con NL

Para evaluar el mecanismo fisiopatológico de la apoptosis en la NL, determinamos con la técnica de TUNEL el grado de apoptosis en muestras renales de pacientes con NL y en las muestras control. Las células apoptóticas se identificaron por fluorescencia en color verde y con el contraste del yoduro de propidio se calcularon los índices de células apoptóticas por glomérulo. Los resultados indican que el 100% de las muestras de NL clase-III y IV presentan un mayor número de células apoptóticas principalmente en túbulos y glomérulos (Fig. 1E y 1F), en contraste con las células de los túbulos y glomérulos de los controles (Fig. 1D). Al comparar la tasa de apoptosis entre las muestras de NL clases-III y IV se observó que los pacientes con NL clase-III presentan un promedio de 68 células por glomérulo (Fig. 1E), en tanto que en los pacientes con NL clase-IV se observan 61 células (Fig. 1F), en contraste con los controles que presentan 17 células (Fig. 1D). Los resultados se promediaron y se muestran en la figura 2.

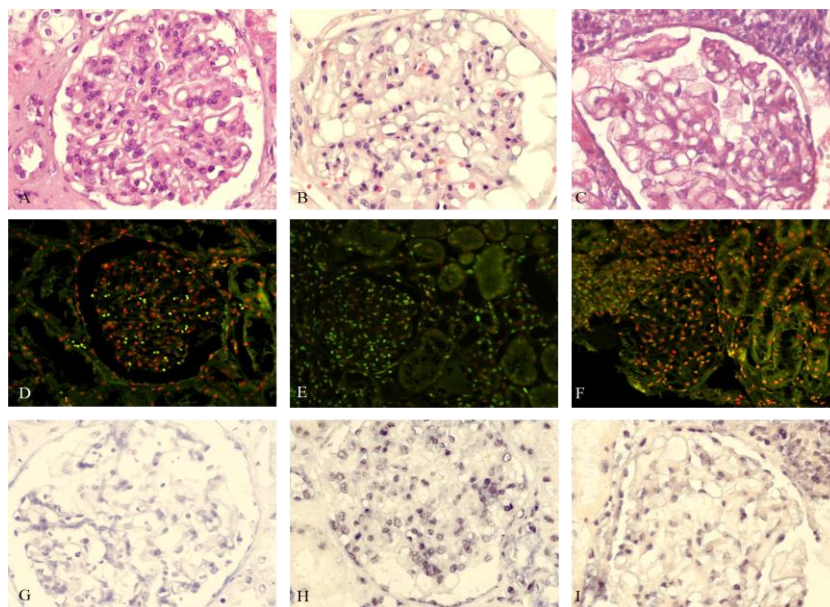


Figura 1. Identificación de células apoptóticas en muestras renales con NL por TUNEL. A, B, y C H-E. A. Control, B. NL clase-III y C. NL-clase-IV. D, E y F. Muestras con TUNEL. D. Muestra control. Se observan células apoptóticas en células epiteliales de la cápsula de bowman y en células del mesangio. E. Muestra de NL clase-III. Se detecta mayor número de células apoptóticas principalmente en glomérulos y túbulos, en contraste con las muestras con NL clase-IV que se detectan menor número de células apoptóticas en los mismos sitios F. Células verdes, células apoptóticas, células rojas, células necróticas. G, H e I. Muestra de TUNEL en campo claro. Células moradas células apoptóticas. G. Muestra control. Se observa menor número de células apoptóticas en glomérulos y túbulos, en contraste con las muestras de NL clase-III H y IV I que aumenta el número de células apoptóticas principalmente en túbulos y glomérulos.

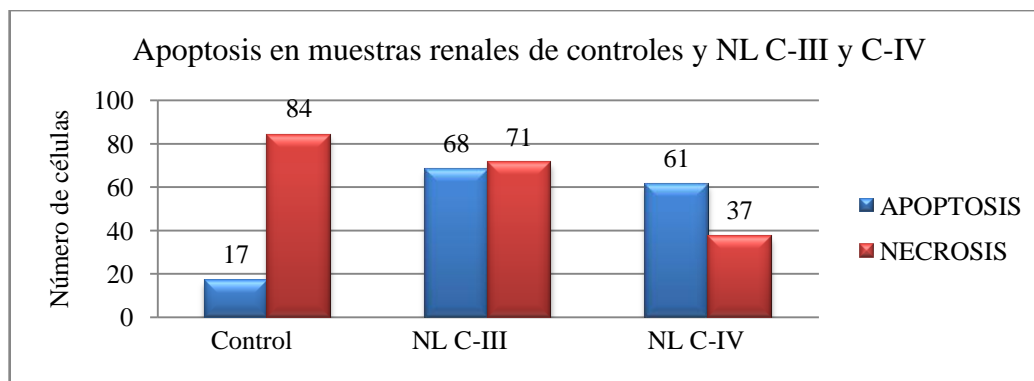


Figura 2. Incremento de células apoptóticas en muestras de NL y controles analizados por TUNEL. Las muestras de NL clase-III presentan mayor número de células apoptóticas en contraste, con las muestras de NL clase-IV que disminuyen ligeramente. En controles la tasa de apoptosis es baja. Por tanto, el índice de apoptosis depende de la clase de nefritis lúpica.

6.3.-Sobre-expresión de Moléculas Pro-apoptóticas en Muestras Renales con NL

Existen varios estímulos y moléculas que inducen apoptosis en las células, el más estudiado es la vía Fas-L/Fas. Utilizando la técnica de IHQ se determinó si moléculas apoptóticas como Fas-L, Fas, Caspasa-3 y Bax se expresan tanto en muestras control como en los pacientes con NL clase-III y IV. Los resultados indican que el 100% de las muestras de NL clase-III y IV son positivas para Fas-L (Fig. 3E y 3I). Estos resultados muestran una expresión de 1.57 para Fas-L en células endoteliales de túbulos y glomérulos de muestras de NL clase-III (Fig. 3E), mientras que en los túbulos y glomérulos de pacientes de NL clase-IV fue de 0.5 (Fig. 3I) y las muestras control fueron negativas. Los índices para Fas son de 1.28 y 1.25 en células de túbulos y glomérulos de pacientes con NL clase-IV y III respectivamente (Fig. 3J y 3F), mientras en controles la expresión es de 1. (Fig. 3B). El 100% de las muestras de pacientes con NL clase-III y IV son positivas para caspasa-3. El índice para caspasa-3 fue de 2.3 principalmente en túbulos y menor en las células de los glomérulos de pacientes con NL clase-III (Fig. 3G), en contraste con las células de los túbulos y glomérulos de los pacientes con NL clase-IV que es de 1.75 (Fig. 3K). En controles, se observa expresión de 1.2 (Fig. 3C). El 100% de las muestras son positivas para Bax. La expresión de Bax fue de 1.75 principalmente en túbulos y de forma leve en glomérulos de muestras de NL clase-IV (Fig. 3L) en contraste, con los túbulos y glomérulos de pacientes con NL clase-III (Fig. 3H) que disminuye a 1.6 y en los controles a 1.2. (Fig. 3D). Los resultados se promediaron y se muestran en la Figura 4.

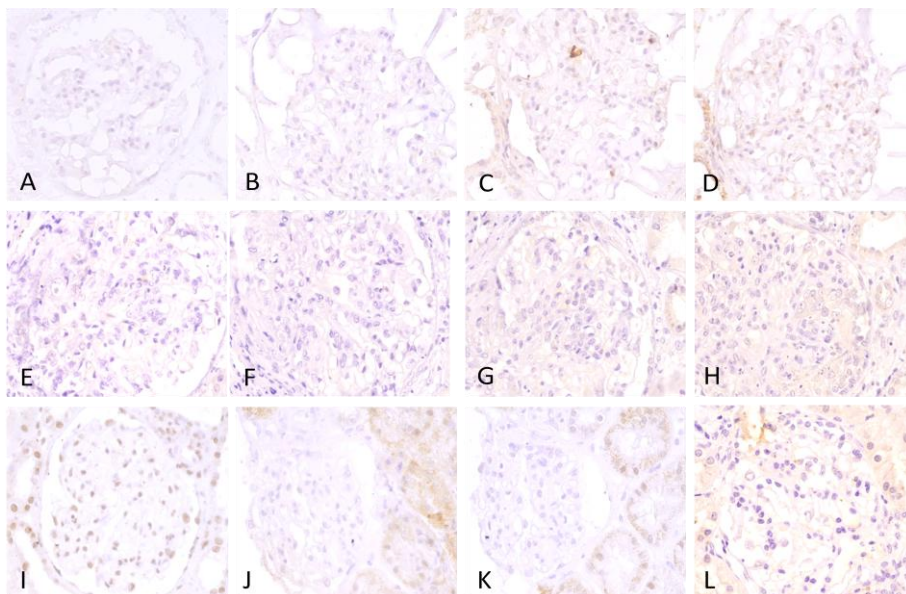


Figura 3. Sobre-expresión de proteínas apoptóticas en muestras renales con NL por IHQ.

A, B, C y D muestras control. A. No se observa expresión de Fas-L. B. Se detecta expresión de Fas en glomérulos y túbulos en forma leve. C. Se observa expresión de caspasa-3 principalmente en túbulos y glomérulos. D. Se detecta una expresión moderada de Bax principalmente en túbulos y glomérulos. E, F, G y H. Muestras de NL clase-III. E y F. Se observa expresión de Fas-L y Fas en glomérulos y túbulos en forma leve. G. Se detecta expresión de caspasa-3 principalmente en túbulos y glomérulos. H. Se observa una expresión moderada de Bax principalmente en túbulos y glomérulos. I, J, K y L. Muestra de NL clase-IV. I. Se observa expresión de Fas-L en glomérulos y túbulos con mayor intensidad. J. Se detecta expresión de Fas principalmente en túbulos y con menor intensidad en glomérulos. K. Se detecta expresión de caspasa-3 principalmente en túbulos y con menor intensidad en glomérulos. L. Se observa una expresión moderada de Bax principalmente en túbulos y glomérulos.

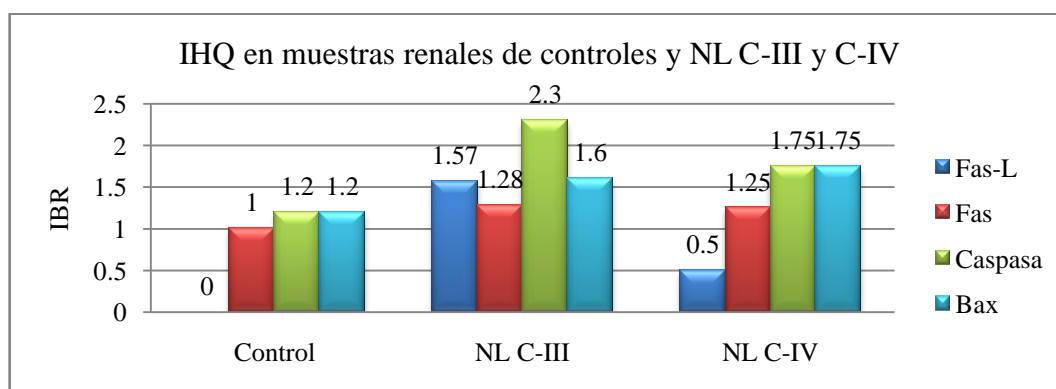


Figura 4. Promedio de IBR de Fas-L, Fas, Caspasa-3 y Bax en muestras control y de NL.

Las muestras de NL clase-IV presentan expresión de Fas-L, Fas y caspasa-3 de 0.5, 1.25 y 1.75 respectivamente, en contraste con las muestras con NL clase-III que se sobre-expresan a 1.57, 1.28 y 2.3. En controles se observa una menor expresión. En las muestras renales de NL clases-III y IV se sobre-expresan las moléculas pro-apoptóticas como Fas-L, Fas, Caspasa-3 y Bax.

6.4.-Infiltrado Linfocitario en Muestras Renales con NL

Para evaluar si la expresión de Fas-L detectado por IHQ en las muestras renales de NL clase-III y IV son producto de los infiltrados celulares como linfocitos CD8 y CD56, se utilizó la técnica de IHQ. Los resultados de los IBR indican una presencia de 3.3 células CD3 en promedio en glomérulos y túbulos de pacientes con NL clase-IV, en contraste con los túbulos y glomérulos de pacientes con NL clase-III (Fig. 5G) y los controles que fue de 2 (Fig. 5A) y 1.6 respectivamente. Con respecto a los linfocitos B (CD19), los resultados indican una presencia de 3 en glomérulos y túbulos de pacientes clase-IV, en contraste con los túbulos y glomérulos de pacientes con NL clase-III (Fig. 5H) y controles (Fig. 5B) que fue de 2.6 y 2 respectivamente. Se encontraron 0.6 linfocitos CD8 principales productores de Fas-L, tanto en las muestras control (Fig. 5C) como en los pacientes con NL clase-III (Fig. 5I) y IV. La expresión del interferón-gama (INF- γ) fue de 1.3 en glomérulos de muestras de NL clase-III (Fig. 5L), en contraste con los túbulos y glomérulos de NL clase-IV que fue de 3 y de 1 para los controles (Fig. 5F). Las células CD56 también expresan Fas-L y se observo 1.6 en glomérulos de pacientes clase-IV y en la clase-III de 1 (Fig. 5J). Se encontraron 1.20 células con el marcador CD69 en glomérulos y túbulos con NL clase-III (Fig. 5K), en contraste con las muestras clase-IV que se incremento a 1.71, en contraste con los controles que fue de 0.6 (Fig. 5E). Los resultados se promediaron y se muestran en la Figura 6.

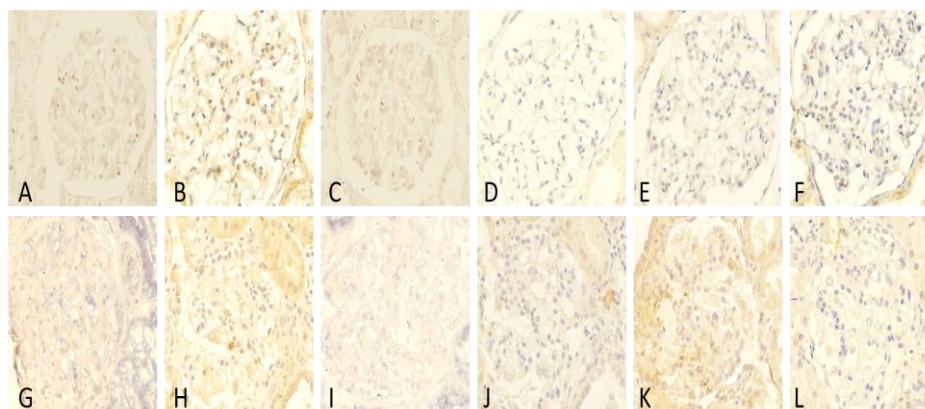


Figura 5. Identificación de linfocitos en muestras renales con NL por IHQ. A, B, C, D, E y F. Muestras control. A. Se observan pocas células CD3 en los glomérulos en contraste, con las muestras de NL clase-III que aumentan G. B. El número de células CD19 se incrementa en los glomérulos al igual que en las muestras de NL clase-III H. C y D. Se observan células CD8 y CD56 en glomérulos y túbulos en menor número que las muestras de NL. E y F. Células CD69 e INF- γ . Se detectan pocas células con la marca en glomérulos y túbulos en contraste, con las muestras de NL que aumentan K y L. En las muestras de NL clases-III y IV se detecta activación de los infiltrados.

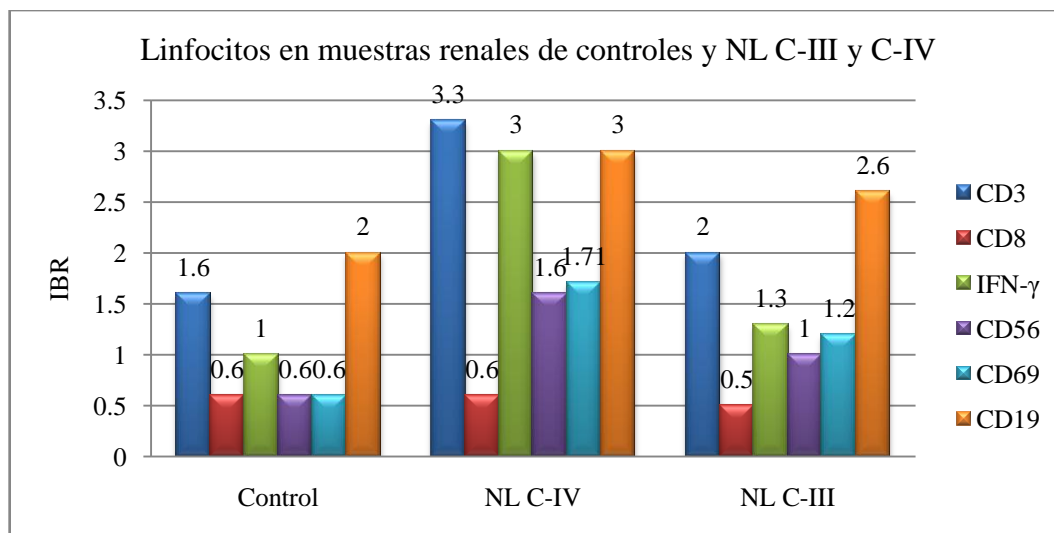


Figura 6. Promedio de IBR de infiltrados linfocitarios en muestras control y con NL. Las muestras de NL clase-IV presentan mayor número de linfocitos en contraste con las muestras de NL clase-III que disminuyen. En controles se observa una menor expresión. La presencia de los linfocitos CD8 y CD56 en las muestras renales de NL clases-III y IV incrementan la expresión de Fas-L y pensamos que activan la apoptosis de las células glomerulares y tubulares en estos pacientes.

6.5.-Polimorfismo -670 de Fas en Pacientes con y sin NL

Con los resultados de la expresión del receptor de Fas, CD8 y CD56 por IHQ en las muestras renales de los pacientes con NL-clase-III y IV, decidimos analizar el polimorfismo -670 de Fas en pacientes con LES con y sin NL. Los resultados de los corrimientos electroforéticos muestran una banda de 232 pb para el alelo polimórfico (Fig. 7 carril 7), mientras que para el normal se detecta una banda de 188 pb (Fig. 7 carriles 3 y 13), el doblete de 232/188 pb corresponde al alelo heterocigoto (Fig. 7 carriles 5, 9 y 11). Los resultados de la tabla IX indican que los porcentajes de los genotipos del promotor de Fas en muestras de los controles es de 52.2% para el genotipo polimórfico A/A, para el genotipo A/G 17.4% y para el genotipo normal G/G 30.4%. En muestras de pacientes con LES sin NL son: genotipo A/A 40.6%, para el genotipo A/G 25% y para el genotipo G/G 34.4%. En muestras de pacientes con NL son; para el genotipo A/A 55.5%, para el genotipo A/G 22.2% y para el genotipo G/G 22.2%. Los porcentajes de los alelos en los pacientes de LES con y sin NL fueron evaluados por dos sistemas estadísticos: el MedCalc y EpoInfo con $p > 0.05$ e indican que el genotipo A/A del polimorfismo -670 no muestra diferencias significativas, y está presente tanto en pacientes como en controles. Tabla IX.

Tabla IX

Porcentajes de Alelos en Pacientes de LES con y sin NL

ALELO	Controles	%	LES Zac	%	NL Zac	%	NL Jal	%	LES León	%
A/A	24	52.2	13	40.6	5	55.5	2	25	1	7.7
A/G	8	17.4	8	25	2	22.2	4	50	5	38.5
G/G	14	30.4	11	34.4	2	22.2	2	25	7	53
TOTAL	46	100	32	100	9	100	8	100		100

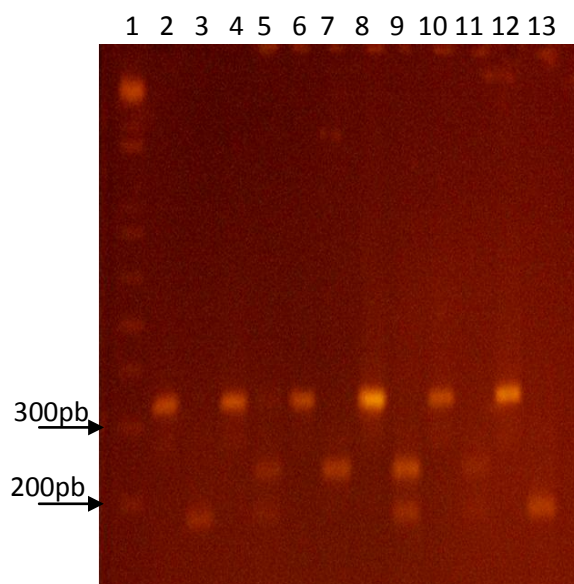


Figura 7. Identificación de fragmentos polimórficos en el ADN de pacientes con LES con y sin NL. Carril. 1. Marcador de peso molecular. Se destacan las bandas de 300 y 200 pb. Carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Producto de PCR sin digestión de pacientes con LES. Carriles 3 y 13. Producto de PCR digerido. Se observa una banda de 188 pb que corresponde al alelo normal G/G. carril 7. Producto de PCR digerido. Se observa una banda de 232 pb que corresponde al alelo polimórfico de A/A. carriles 5, 9 y 11. Producto de PCR digerido. Se observan dos bandas una de 232 pb y otra de 188 pb que corresponde al doblete A/G.

6.6.-Expresión de ARNm de Moléculas Pro-apoptóticas en NL

Para evaluar si la expresión de Fas, Fas-L y caspasa-3 en los pacientes con NL-clases-III y IV correlaciona con la transcripción de los mensajeros, se utilizó la técnica de hibridación *in situ* en muestras de NL y controles. Las marcas fluorescentes en color rojo de Fas-L muestran una expresión baja de 0.6 en células de los túbulos y glomérulos de las muestras control (Fig. 8A), en contraste con las muestras de NL clase-III que se

incrementa a 1.6, en túbulos y glomérulos (Fig. 8M), en muestras clase-IV la expresión fue de 1 en los mismos sitios (Fig. 8G). La expresión de Fas fue de 1.6 en células de túbulos y de glomérulos de pacientes con NL clase-III (Fig. 8O) y de 2 en los mismos sitios de las muestras clase-IV (Fig. 8I). Caspasa-3 se observa con la misma intensidad en células de los túbulos y glomérulos de muestras con NL clase-III (Fig. 8Q), clase-IV (Fig. 8K) y controles (Fig. 8E). Los resultados en promedio se muestran en la Figura 9.

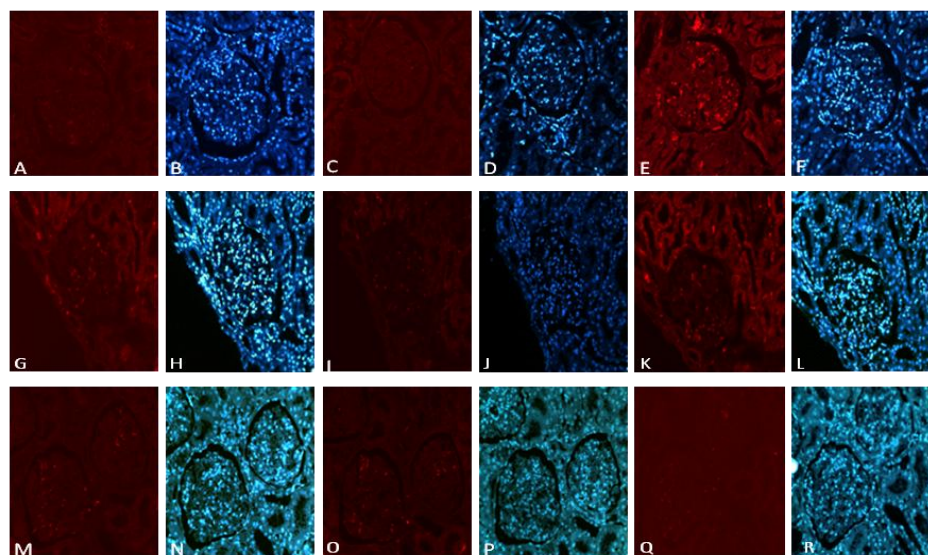


Figura 8. Transcripción de los ARNm en muestras renales con NL por hibridación *in situ*. A, C y E. Muestras control. A. Se detecta menor expresión de Fas-L y Fas en células de glomérulos y túbulos C. E. Se observa mayor expresión de caspasa-3 en células de túbulos y glomérulos. B, D y F. Muestras control. Tratadas con DAPI. G, I y K. Muestras clase-IV. G. Se observa un incremento en glomérulos y túbulos de Fas-L y Fas I. K. Se observa una expresión alta de caspasa-3 principalmente en túbulos y glomérulos. H, J y L. Muestras clase-IV. Tratadas con DAPI. M, O y Q. Muestras clase-III. M. Se observa una expresión alta de Fas-L, Fas O y Caspasa-3 Q en células de glomérulos y túbulos. N, P y R. Muestras clase-III. Tratadas con DAPI. Se observan los núcleos de las células renales en color azul.

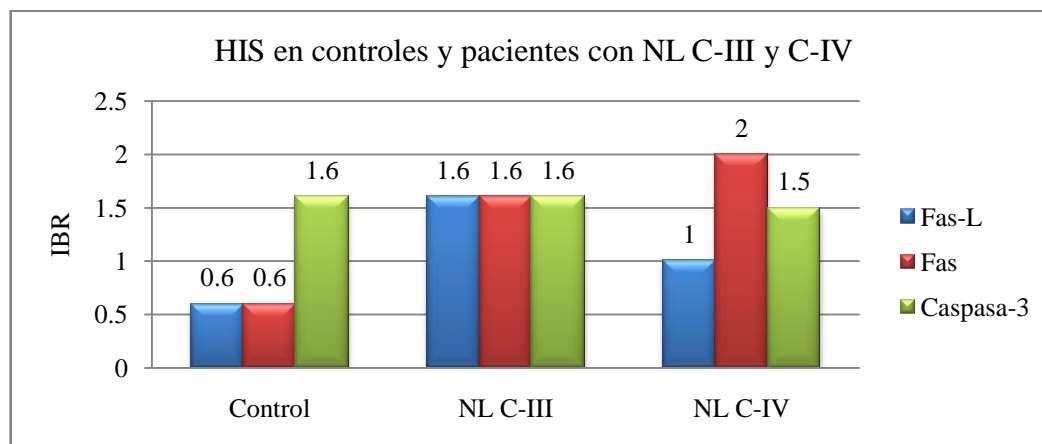


Figura 9. Promedio de IBR en la transcripción de los ARNm de Fas-L, Fas y Caspasa-3 en muestras control y con NL. Las muestras con NL clase-IV presentan una expresión de 1.0 para Fas-L y Fas en contraste, con las muestras con NL clase-III que sobre-expresa a 1.5. En controles se observa una expresión de 0.5 para Fas-L y Fas. La expresión de Caspasa-3 fue de 1.5 tanto en controles como en pacientes con NL. La transcripción de Fas se incrementa en los pacientes con NL clases-III y IV, posiblemente por efecto del polimorfismo -670 de Fas y el incremento del INF- γ .

6.7.-Expresión de WT-1 en Muestras Renales de NL

Para determinar el número de podocitos identificados con WT-1 en muestras renales de controles y pacientes con NL clase-III y IV, utilizamos la técnica de IFI. Los podocitos se identificaron por fluorescencia en color rojo y con el traslape del DAPI da un color rosa. La (fig. 10A y 10D) muestra el número total de células glomerulares utilizando la tinción del ADN con DAPI. En las muestras renales de los controles los podocitos están presentes en un promedio de 32 podocitos por glomérulo (Fig. 10B), en contraste con las muestras de NL en las que se observa una disminución de los podocitos en un promedio de 13.2 por glomérulo (Fig. 10E), existiendo una diferencia significativa entre las muestras control y la de los pacientes con NL ($p < 0.0001$). Los resultados en promedio se muestran en la Figura 11.

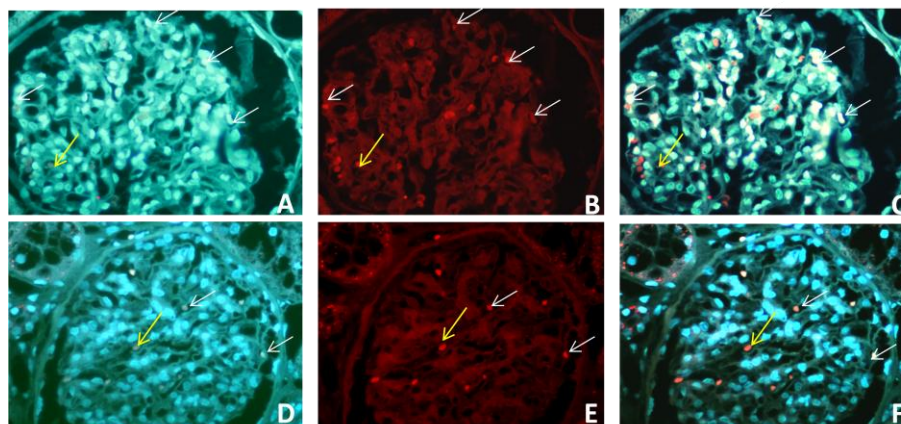


Figura10. Identificación de podocitos marcados con WT-1 por IFI. A y D. Glomérulos marcados con DAPI. D. Se observan células marcadas de azul (núcleos), en pacientes con NL y controles A. B. Se detecta mayor número de podocitos en los glomérulos de controles sanos en contraste con los pacientes de NL que disminuyen E. A-B traslapes C. Se observa un mayor número de podocitos de color rosa en los controles en contraste con los pacientes con NL F. Los señalamientos de color blanco muestran podocitos, los amarillo artefactos (eritrocitos).

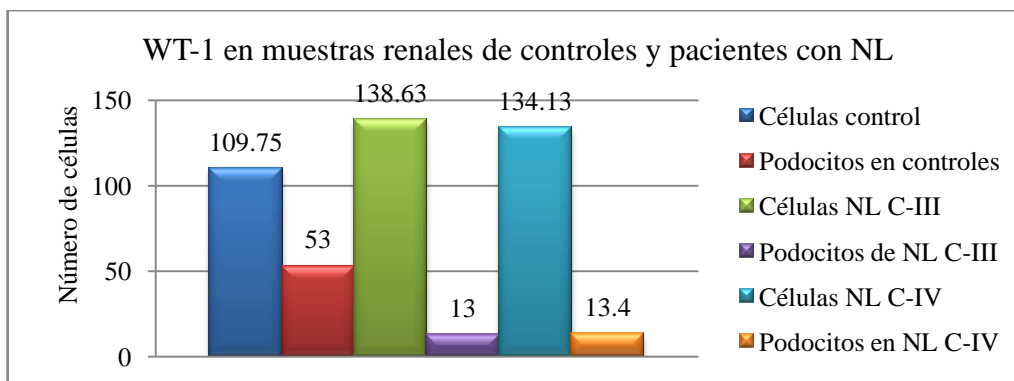


Figura 11. Disminución de podocitos marcados con WT-1 en muestras renales de NL. Las muestras de NL clases-III y IV presentan menor número de podocitos marcados con WT-1, en contraste con los controles que se mantiene alta. La eliminación de estos podocitos se refleja en la proteinuria de estos pacientes.

6.8.-Activación de Caspasa-3 en Podocitos con NL

La activación de caspasas efectoras se identificó por fluorescencia en color rojo y con el contraste del DAPI y WT-1 se calcularon los IBR de podocitos por glomérulo. Los resultados indican que el 100% de las muestras de NL clase-III y IV presentan 5.87 podocitos con activación de caspasas efectoras por glomérulo (Fig. 12H), en contraste con 4.75 podocitos por glomérulo de los controles (Fig. 12C).

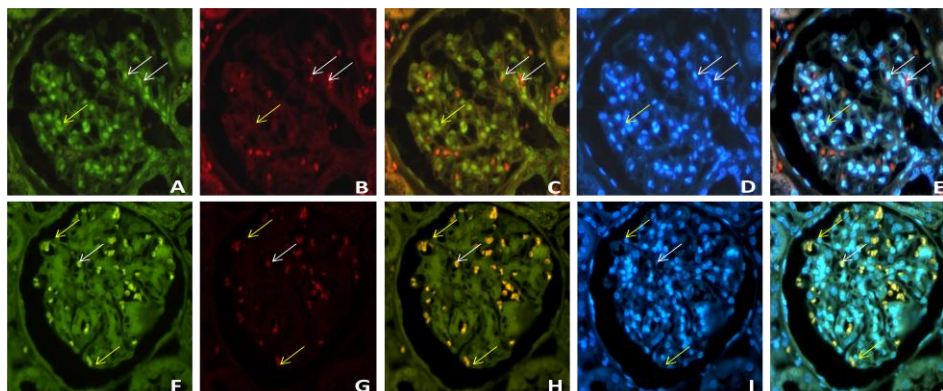


Figura 12. Identificación de activación de caspasa-3 por IFI en muestras renales de NL. A, B, C, D y E. Muestras control. F, G, H, I y J. Muestras de NL C-III. D e I. Muestras teñidas con DAPI. Se observan núcleos en color azul. A. Se observa un mayor número de podocitos marcados en color verde, en contraste con las muestras de NL C-III F. B. Se detecta menor número de células con activación de caspasas efectoras en color rojo, en contraste con las muestras de NL C-III que aumenta G. C y H. Traslapos de A-B y F-G. Se detecta menor número de podocitos con activación de caspasas efectoras en controles D, en contraste con las muestras de NL C-III que aumenta H. E y J. Traslapos de DAPI con C y H. Se observan los podocitos en color turquesa y en citoplasma la marca de activación de caspasas efectoras. Células verdes, podocitos, células rojas, células con activación de caspasas efectoras.

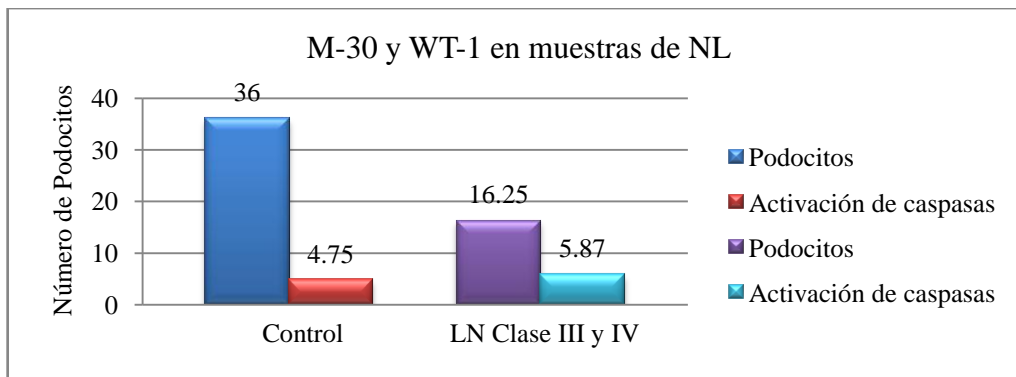


Figura 13. Incremento en la activación de caspasa-3 en muestras renales de NL. Las muestras de NL clase-III y IV presentan mayor número de podocitos con activación de caspasas efectoras, en contraste con las muestras de controles.

6.9.-WT-1 se Incrementa en él SU de Pacientes con NL

Para determinar el número de podocitos marcados con WT-1 en SU de pacientes con NL y controles, utilizamos la técnica de IFI. Los podocitos se identificaron por fluorescencia en color verde y fueron contrastados con yoduro de propidio. El análisis de las imágenes de la figura 14 muestra un incremento en la cantidad de podocitos de 15.5 en las muestras de SU de los pacientes con NL clase III y IV (Fig. 14B), en contraste con 4 podocitos detectados en las muestras control (Fig. 14A), existiendo una diferencia significativa entre las muestras control y la de los pacientes con NL ($p < 0.0001$). La tasa de necrosis es de 1.4 en los controles (Fig. 14C) en contraste, con los pacientes con NL clases-III y IV que fue de 3. Los resultados en promedio se muestran en la Figura 15.

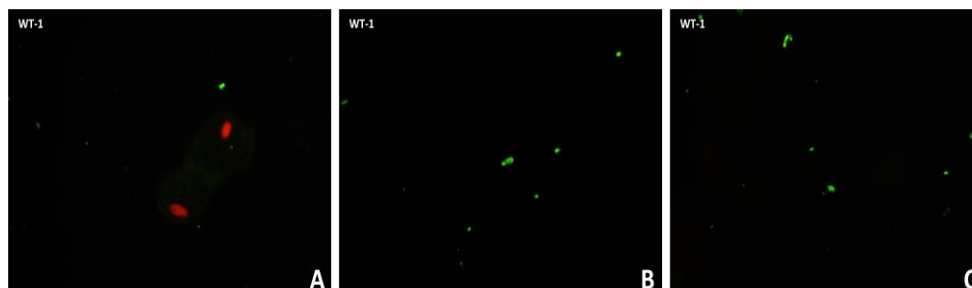


Figura 14. Identificación de WT-1 por IFI contrastado con yoduro de propidio en SU. A. SU de controles. Se observan pocas células marcadas en los SU de controles sanos en color verde en contraste, con los pacientes con NL que se incrementan en número B y C.

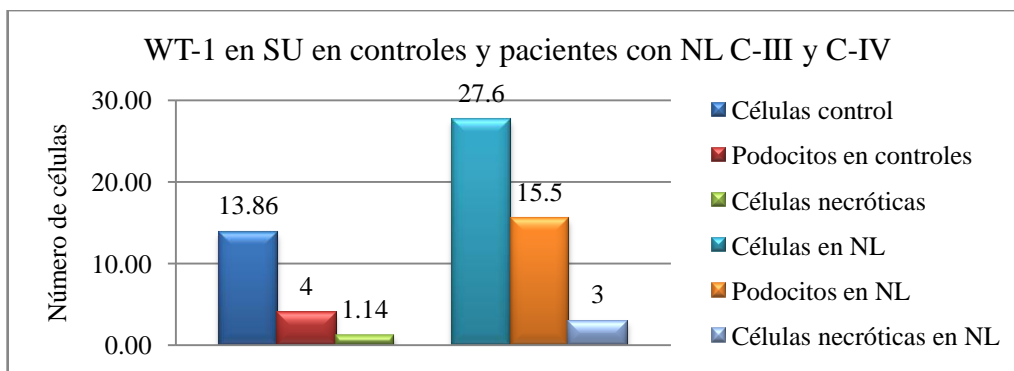


Figura 15. Excreción de podocitos marcados con WT-1 en muestras de SU. Las muestras de SU con NL clases-III y IV presentan mayor número de podocitos marcados con WT-1. En contraste, con los controles que se mantiene bajo. Por tanto, los pacientes con NL clases III y IV presentan podocitopenia.

6.10.-Viabilidad de los Podocitos en el SU de Pacientes con NL

Para comprender el tipo de muerte celular de los podocitos en las muestras de los SU tanto de pacientes con NL como de controles, utilizamos la técnica de IFI y TUNEL. Los podocitos se identificaron por fluorescencia en color rojo y contrastados con la marca fluorescente del TUNEL dan un color amarillo. El análisis de las imágenes muestra un incremento en el número de podocitos apoptóticos en las muestras de SU de pacientes con NL clases-III y IV (Fig. 16E), encontrando un valor promedio de 4.57, en contraste con las muestras de los controles (Fig. 16B) que fue de 1.71, existiendo una diferencia significativa entre las muestras control y la de los pacientes con NL ($p < 0.0001$). Los resultados en promedio se muestran en la Figura 17.

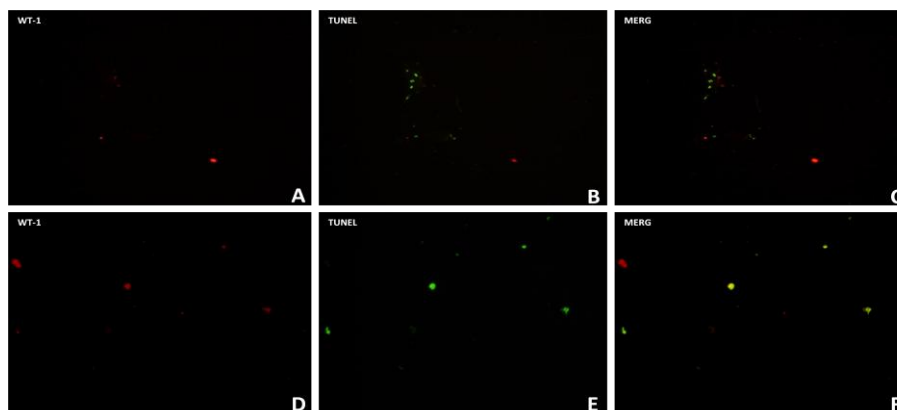


Figura 16. Podocitos marcados con WT-1 con Rojo Texas (Rx)/TUNEL en SU. A, B y C. SU de controles. A. Se observan pocos podocitos marcados de color rojo en los SU de los controles sanos, en contraste con los pacientes con NL D. B. Células apoptóticas. Se detectan células apoptóticas en SU de controles sanos y pacientes con NL E, C. Traslape de WT-1/TUNEL en SU de controles sanos. Se identifican mayor número de podocitos apoptóticos en pacientes con NL F, en contraste con los controles sanos C.

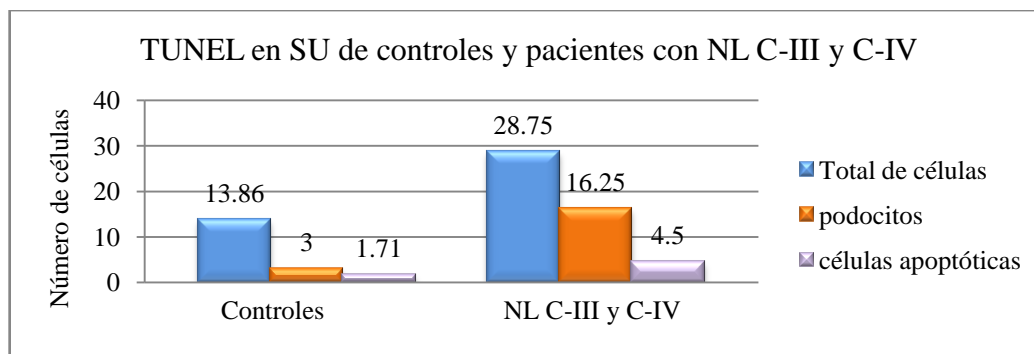


Figura 17. Podocitos apoptóticos en SU de pacientes con NL. Las muestras de SU con NL clases-III y IV presentan mayor número de podocitos marcados con WT-1. En contraste, con los controles que se mantiene bajo. En los pacientes con NL clases-III y IV el porcentaje de viabilidad es del en contraste con los controles que es del Los podocitos que son excretados en la orina de los pacientes con NL son viables.

6.11.-WT-1 se Incrementa en él SU de Pacientes con NL por ELISA

Para determinar de forma cualitativa la presencia de podocitos marcados con WT-1 en SU de pacientes con NL y controles, utilizamos la técnica de ELISA. El grupo de estudio se dividió en dos grupos, el primer grupo se formó con pacientes con proteinuria menor a 0.5 g/l y el segundo grupo incluyó a pacientes con una proteinuria mayor a 0.5 g/l. La absorbancia obtenida en promedio fue de 0.49 para el primer grupo y 0.57 para el segundo grupo, en contraste con las muestras control que fue de 0.121. Figura 18. Estos resultados indican que los pacientes con LES y con NL excretan podocitos por la orina.

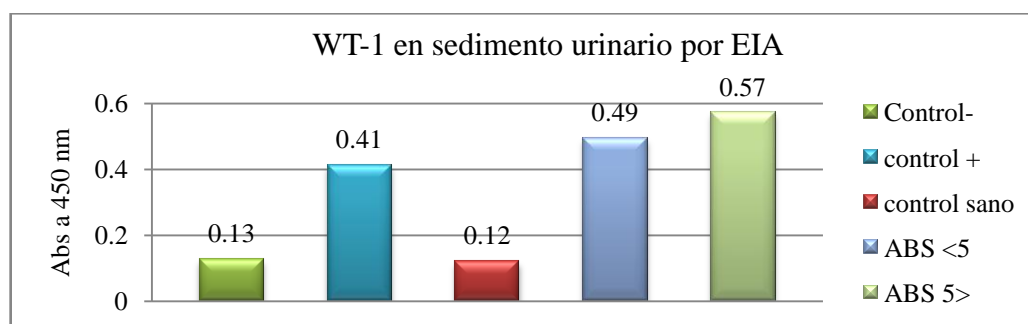


Figura 18. WT-1 en SU por ELISA. La absorbancia obtenida por ELISA fue de 0.121 para las muestras control, mientras que fue mayor en los pacientes con NL, lo que sugiere que existe una excreción acumulativa de podocitos en la orina de pacientes con NL.

7. DISCUSIÓN

Durante la última década se han reportado importantes contribuciones que permiten comprender la formación, el desarrollo y la función de los glomérulos, principalmente en modelos experimentales murinos. En algunas enfermedades renales los podocitos han comenzado a ser reconocidos como las células clave de la enfermedad, especialmente por formar parte de la barrera final de filtración de las proteínas (Asanuma and Mundel, 2003). Sin embargo, toda-vía no se comprende en su totalidad el mecanismo del daño renal por apoptosis en pacientes con NL. Para contribuir a comprender este mecanismo, los estudios realizados en ésta tesis fueron encaminados a determinar si la vía de apoptosis Fas-L/Fas participa en el desarrollo de la nefritis lúpica. Observando los siguientes resultados: 1) Los pacientes con LES en edad reproductiva desarrollan NL clase-IV y III. 2) La tasa de apoptosis en podocitos, células epiteliales de la cápsula de Bowman y células mesangiales se incrementa en pacientes con NL clase-III y IV con respecto a los controles. 3) El índice de expresión de moléculas pro-apoptóticas se incrementan de forma primordial en células epiteliales de los túbulos y mesangiales en pacientes con NL clase-III y IV en contraste con los controles. 4) Las células CD19, CD56, CD8 y CD69 se detectan en mayor número en los infiltrados linfocitarios en muestras de pacientes con NL clase-III y IV en contraste con los controles. 5) El genotipo A/A del polimorfismo -670 no muestra diferencias significativas entre los controles y pacientes con LES con y sin NL. 6) Los índices de transcripción de los ARNm de moléculas pro-apoptóticas se incrementan en células epiteliales de túbulos y glomerulares en pacientes con NL clase-III y IV, en contraste con los controles. 7) El número de podocitos en muestras renales disminuye en pacientes con NL clase-III y IV en contraste con los controles. 8) En muestras de sedimento urinario de pacientes con NL clase-III y IV el número de podocitos aumenta con respecto a los controles.

Al daño de las células renales que se presenta en los pacientes con LES en etapas tempranas y tardías de la enfermedad en (glomérulos, túbulos, intersticio y vasos sanguíneos) es llamado colectivamente nefritis lúpica. Como podemos notar, las lesiones son muy heterogéneas afectando los cuatro compartimentos del riñón y gracias al trabajo de varios investigadores estas lesiones se han podido definir y cuantificar para

comprender mejor el daño en la NL. De acuerdo a los parámetros establecidos por la SIN/SPR (Weening *et al.*, 2004), nuestros resultados indican que las muestras de pacientes con LES y con NL teñidas con H-E, muestran que el 41.17% de las muestras estudiadas son de NL clase-III y el 58.82% son de NL clase-IV. Las lesiones de esta nefropatía son idénticas a las descritas en la clase-III que se caracteriza por una afección menor al 50% de los glomérulos afectados, en contraste con la clase-IV que se detectan más del 50% de los glomérulos. Estos resultados concuerdan con los de Houssiau y cols en 2002 quienes reportan que cerca del 50% de los pacientes con LES desarrollan NL y que los pacientes presentan de un 65-90% NL clase-III y IV. Hiramatsu y cols en 2008 reportan en un estudio utilizando un total de 92 pacientes y los criterios de clasificación de NL del 2004, que el 17% de las muestras son clase-III y el 60% son clase-IV. Estos resultados y los nuestros nos indican que el daño a las células renales en la NL clase-III y IV una glomerulonefritis proliferativa difusa predomina en los pacientes con LES como un mecanismo para mantener la homeostasis tisular del tejido renal en los pacientes con NL y mantener así la función renal.

Los mecanismos para mantener la función renal en la NL no son bien entendidos y no han sido completamente explorados, ya que existen evidencias de que la apoptosis contribuye al daño de las células renales. La apoptosis se analizó en esta tesis para comprender el papel fisiopatológico en los pacientes con NL. Nuestros resultados con las muestras de pacientes con LES y con NL clase-III y IV marcadas con TUNEL y de acuerdo a los parámetros establecidos con los IBR y el conteo de células apoptóticas nos muestran, que el 100% de las muestras de NL clase-III y IV presentan células en apoptosis. Los índices de apoptosis en las células endoteliales, mesangiales y podocitos de muestras de NL clase-III aumentó a 68 células en comparación con las muestras de pacientes con NL clase-IV que presentaron un índice de 61 células en los mismos sitios, en los controles se detecta un índice de 17. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Makiano y cols en 2003 que reportan que el 93% de los pacientes con NL clase-IV presentan células apoptóticas y que solo el 20% de pacientes con NL clase-V desarrollan células apoptóticas en túbulos y glomérulos. Nuestros resultados también concuerdan con los de Ott y cols en 2007 que reportan un incremento en la fragmentación del ADN de las células epiteliales de túbulos y en menor número en las células de los glomérulos de pacientes con nefritis proliferativa, en contraste con las no proliferativa. Con estos resultados y los nuestros pensamos que los pacientes con LES y con NL clase-III y clase-IV por ser nefritis proliferativa y activas tienen un mayor índice de apoptosis con el objetivo de mantener el equilibrio tisular. Después de lo que se acaba de exponer consideramos que la apoptosis de células renales aumenta o disminuye dependiendo de la clase de nefritis lúpica.

Una de las vías de apoptosis mejor estudiada es la extrínseca de Fas-L/Fas que involucra moléculas como Caspasa-3, DFF-40 y Bax. Nuestros resultados en las

muestras de pacientes con LES y con NL clase-III y IV analizadas por IHQ nos muestran una expresión de 1.28 del receptor de Fas en células epiteliales de los túbulos y en células endoteliales de la cápsula de Bowman, mesangiales y podocitos de pacientes clase-IV, en contraste con los pacientes clase-III que disminuye a 1.25 en las mismas células. Estos resultados concuerdan con los de Uguz y cols en 2005 que reportan empleando la técnica de IHQ el incremento del receptor de Fas en células de glomérulos de pacientes con NL proliferativa, en contraste con la nefritis no proliferativa. Nuestros resultados también concuerdan con los de Fathi y cols en 2006 que detectan en muestras renales de pacientes con NL analizadas por IHQ que Fas no se expresa en controles, sin embargo se incrementa en células mesangiales de pacientes con NL. Estos resultados y los nuestros nos sugieren, que Fas se incrementa en los pacientes de LES con NL clase-III y IV para provocar un mayor índice de apoptosis y de esta forma mantener el equilibrio tisular en los pacientes con nefritis proliferativa.

Nuestros resultados de Fas-L en las muestras de pacientes de LES con NL, nos muestran una expresión de 1.57 en células de glomérulos y túbulos de muestras de pacientes con NL clase-III, en contraste con los pacientes de NL clase-IV que disminuye a 0.5. Estos resultados concuerdan con los estudios reportados por Corina y cols de 2000 quienes utilizando la técnica de hibridación *in situ* e IHQ en un modelo de NL en ratas Wistar y ratones albinos que Fas-L se expresa principalmente en túbulos de riñones normales y se incrementa en células glomerulares de nefritis proliferativa, resultado del depósito de CI atrapados y causando la NL. Estos resultados y los nuestros, nos sugieren que estas moléculas pro-apoptóticas de la vía externa de apoptosis se sobre-expresan y están activando a las células glomerulares y endoteliales de los túbulos de pacientes con NL clase-III y IV a entrar en apoptosis y de esta forma coadyuvar con el daño de las células renales a perder su función.

Para detectar caspasa-3, no activada, sino como pro enzima utilizamos la técnica de IHQ y encontramos que el 100% de las muestras de pacientes con NL sobre-expresan caspasa-3, la expresión se incrementa en células epiteliales de túbulos y disminuye en glomérulos de pacientes con NL clase-III y IV. Estos resultados correlacionan con los índices de apoptosis identificados por TUNEL en las muestras de NL clase-III y IV que se incrementan respectivamente. Nuestros resultados concuerdan con los estudios reportados por Jeruc y cols en 2006 que empleando la técnica de IHQ contra caspasa-3 activada en biopsias de pacientes con NL clasificadas con los criterios de la SIN/SPR un incremento de la activación de caspasa-3 en células glomerulares en un 88.2 % de las muestras renales analizadas y correlación con el índice de apoptosis utilizando la técnica de TUNEL. Estos resultados y los nuestros nos hacen pensar que si bloqueamos la cascada de apoptosis a nivel de caspasa-3 con inhibidores naturales podríamos disminuir la apoptosis de las células renales y de esta manera disminuir el daño renal.

Bcl-2 y Bax son proteínas intracelulares relacionadas con el proceso apoptótico de las células, la sobre-expresión de Bax induce apoptosis, mientras que Bcl-2 bloquea la apoptosis. Nuestros resultados muestran que Bax se sobre expresa de forma severa en células epiteliales de los túbulos de pacientes con NL clase-III y IV. Estos resultados concuerdan con los de Goumenos y cols de 2004 que utilizaron la técnica de IHQ y reportan que Bax se expresa principalmente en muestras de glomerulonefritis en células epiteliales de los túbulos distales, proximales, colectores e intersticio renal y en glomérulos, donde la distribución y expresión no está relacionada con el tipo de glomerulonefritis. La sobre-expresión de caspasa-3 y Bax en células endoteliales de los túbulos se debe a que existe una tasa de apoptosis mayor y es por que las células se regeneran constantemente, en contraste con las células de los glomérulos que no se regeneran y los espacios son ocupados por fibroblastos renales causando esclerosis en el glomérulo. Después de lo que se acaba de exponer consideramos que la vía intrínseca de la apoptosis se activa en las células renales.

Para comprender el papel de los infiltrados linfocitarios en la NL y en particular la población de linfocitos CD8 y CD56 como principales productores de Fas-L, utilizamos la técnica de IHQ. Los datos indican que los linfocitos CD8 se detectan en menor número en el área peri glomerular y túbulos de pacientes con NL clase-III y IV en contraste con los controles. Estos datos concuerdan con los de Couzi y cols de 2007 que reportan en un estudio realizado por IHQ en 25 muestras de NL clase-III y IV la presencia de linfocitos CD8 en el área peri glomerular de las muestras renales en contraste con los linfocitos CD4. Con respecto a las células CD3, CD19 y CD56 detectamos un incremento en glomérulos y túbulos de pacientes con NL clase-IV, en contraste con los túbulos y glomérulos de pacientes con NL clase-III y controles que presentan un menor número. Estos resultados concuerdan con los de Chan RW y cols en 2007 que reportan en un estudio con 12 pacientes con NL activa el predominio de las células CD3 y CD20 en SU en contraste, con las células CD56. Estos resultados y los nuestros nos sugieren que los linfocitos que se encuentran en mayor número son eliminados por la orina. Con respecto a la presencia del interferón-gama encontramos que se expresa en menor número en glomérulos de muestras de NL clase-III en contraste con los túbulos y glomérulos con NL clase-IV que se incrementa. Después de lo que se acaba de exponer consideramos que con la presencia de los principales productores de Fas-L (CD8 y CD56) y la sobre-expresión de Fas en las muestras de NL clase-III y IV, se activa la apoptosis en las células renales y de esta manera se provoca la pérdida de la función renal. Así mismo, es importante explorar con mayor detalle el papel del INF- γ en la NL para comprender la fisiopatología de la enfermedad.

La regulación de la transcripción de Fas es importante en el desarrollo del LES y depende de la activación del INF- γ . Nuestros datos indican que el genotipo A/A del polimorfismo -670 no muestra diferencias significativas, y está presente tanto en

controles como en pacientes con LES con y sin NL. Estos resultados no concuerdan con los de Satomi y cols en 2001 que reportaron que el polimorfismo -670 del alelo A está asociado al desarrollo de LES en la población japonesa. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los de Huang y cols en 1999 que describen que este polimorfismo está relacionado con la formación de úlceras orales y fotosensibilidad, no así al desarrollo de LES en población caucásica y con los de Young y cols en 2001 que muestran que el polimorfismo -670 A/A no está relacionado al desarrollo de LES y AR, sin embargo, si se encuentra relación con la generación de anticuerpos anti-RNP en pacientes coreanos con LES. Pensamos que la discordancia entre el polimorfismo -670 de Fas y los resultados mostrados en la sobre-expresión de Fas en las muestras de los pacientes con LES se debe al número de muestras que se procesaron para la determinación del polimorfismo y por otro lado, cabe señalar que la población mexicana es mestiza. Estudios sobre otros polimorfismos y el receptor del INF- γ contribuirían a entender mejor la expresión de Fas en los pacientes con LES con NL.

El objetivo en esta parte de la tesis fue analizar la relación directa entre la proteinuria y la disminución de podocitos glomerulares en la NL clase-III y IV. Nuestros resultados muestran una disminución glomerular de podocitos identificados por WT-1 en muestras de pacientes con NL clase-III y IV. Estos datos concuerdan hasta cierto punto con los de Yu y cols en 2005, que reportan en un estudio realizado en tres modelos experimentales de glomerulonefritis en ratas, la disminución de podocitos glomerulares marcados con WT-1. Hara y cols en 2004 encuentran una disminución en el número de podocitos en los glomérulos marcados con podocalyxina en un grupo de pacientes con varios tipos de glomerulonefritis, incluyendo solo 4 con NL. Estos datos y los nuestros nos hacen pensar que la disminución de los podocitos en los glomérulos de los pacientes con NL se debe tomar en cuenta para realizar un mejor diagnóstico de la enfermedad.

Actualmente, poco se conoce sobre el diagnóstico clínico oportuno y durante el tratamiento de la NL. Los marcadores de diagnóstico tradicionales para la NL son: los anticuerpos anti-ADNs y los niveles del complemento, que reflejan la actividad inmunológica que desencadena la respuesta auto inmune. Estos estudios de diagnóstico no proporcionan información acerca de la actividad de la enfermedad y la clase de NL, por otra parte, la proteinuria, hematuria y la disminución de la tasa de filtración glomerular se detectan después de que ha ocurrido el daño renal. Por tanto, es necesario identificar con un método no invasivo la evolución de la NL. En esta parte de la investigación, nosotros encontramos que la disminución de los podocitos detectados en tejido renal correlacionan con el aumento de los podocitos en los SU pacientes con NL clases-III y IV. Estos datos concuerdan hasta cierto punto con los de Yu y cols en 2005, que reportan en un estudio realizado en tres modelos experimentales de glomerulonefritis en ratas, el aumento en la excreción de podocitos urinarios viables

marcados con WT-1. Hara y cols en 2004 encuentran un aumento en el número de podocitos en muestras de SU marcados con podocalyxina en una cohorte de pacientes con varios tipos de glomerulonefritis, incluyendo solo a 4 con NL. Estos resultados y los nuestros demuestran que los podocitos se están despegando de la MBG por un mecanismo aun no bien entendido y que son eliminados por la orina en las diferentes glomerulonefritis, incluyendo la lúpica. Consideramos que en un análisis urinario de rutina se pueden detectar podocitos y células glomerulares que coadyuvarían a diagnosticar de forma oportuna, rápida y económica la evolución de la NL. Estudios sobre el mecanismo del desprendimiento de los podocitos de la MBG ayudarían a comprender la fisiopatología de las glomerulonefritis.

8. CONCLUSIONES

El estudio de la apoptosis activada por la vía Fas-L/Fas en pacientes con LES que desarrollan nefritis lúpica permitió conocer que:

- 1) La nefritis lúpica clase-IV y III predominan en los pacientes con LES de sexo femenino en edad reproductiva y presentan mayor índice de apoptosis en células renales.
- 2) El incremento en la expresión de Fas-L, Fas, Caspasa-3, M-30 y Bax, así como el número de linfocitos CD8 y CD56 contribuye a la activación de la vía extrínseca de la apoptosis en las células renales de los pacientes con nefritis lúpica.
- 3) El genotipo A/A del polimorfismo -670 no está involucrado aparentemente en el daño renal en los pacientes con nefritis lúpica.
- 4) Los índices de transcripción de los ARNm de moléculas pro-apoptóticas se incrementan en células epiteliales de túbulos y glomerulares en pacientes con NL clases-III y IV.
- 5) La pérdida de los podocitos identificados por WT-1 en las muestras renales de los pacientes con nefritis lúpica correlaciona con el incremento de los podocitos excretados en la orina de estos pacientes. Estas variables se pueden considerar como indicadores clave de la disfunción renal progresiva en pacientes con nefritis lúpica.

8.1. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de investigar el papel autoinmune de las células CD56 o Asesinas Naturales en la fisiopatología renal de los pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico con nefritis lúpica como principales inductores de apoptosis en las células renales.

Evaluar el mecanismo fisiopatológico que está involucrado en el desprendimiento de los podocitos de la membrana basal glomerular en los pacientes con nefritis lúpica.

Incrementar el número de muestras de pacientes con LES de la ciudad de León y Guadalajara para determinar el polimorfismo -670.

9. LITERATURA CITADA

Adams JM. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17:2481-2495.

Alnemri ES. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Hrley JB. 2003. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med* 349:1526-1533.

Asanuma K, Mundel P. 2003. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 7:255-259.

Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Takagi M, Kodama F, Tomino Y. 2007. The role of podocytes in proteinuria. *Nephrology* 3:15-20.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.

Austin HA, Joyce KM, Antonovch TA, Balou JE. 1984. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affect in renal outcome. *Kidney Int* 25:689-695.

Badillo I, Daza L, Avalos E, Herrera R. 2001. Glomerular expression of Fas ligand and Bax ARNm in lupus nephritis. *Autoimmunity* 34(4):283-9.

Barbosa AS, Hadjiathanasiou CG, Theodoridis C, Papathanasiou A, Tar A, Merksz M, Gyorvari B, Sultan C, Dumas R, Jaubert F. 1999. The same mutation affecting the splicing of WT1 gene is present on Fraiser syndrome patients with or without Wilm's tumor. *Hum. Mut* 13:146-153.

Berden JH. 2003. Lupus nephritis: consequence of disturbed removal of apoptotic cells. *Neth J Med* 61:233-8.

Bigler C, Lopez-Trascasa M, Potlukova E, Moll S, Danner D, Schaller M, Trendelenburg M. 2008. Antinucleosome antibodies as a marker of active proliferative lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 51:624-9.

Boatright KM. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* 11:529-541.

Bollain-y-Goytia JJ, Avalos E, Rodríguez C, Herrera R. 2006. Renal cell turnover result in fine balance between apoptosis and cell proliferation. *Journal of Biological Research*. 6:131-138

Burlingame RW, Cervera R. 2002. Anti-chromatin (anti-nucleosome) autoantibodies. *Autoimmune. Rev* 1:321-328.

Call KM, Glaser T, Ito CY, Bucker AJ, Pelletier J, Haber, DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilm's tumor locus. *Cell* 60:509-520.

Cameron JS. 1999. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 10:413-424.

Cascino I, Ballerini C, Audino S. 1998. Fas gene polymorphisms are not associated with systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis and HIV infection. *Dis Markers* 13:221-5.

Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, Wojnarowska F, Stevens SR, Chen M, Fairley JA, Woodley D, Miller SD, Gordon KB. 1998. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol* 110:103-109.

Chan RW, Lai FM, Li EK, Tam LS, Chung KY, Chow KM, Li PK, Szeto CC. 2006. Urinary mononuclear cell and disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 15:262-267.

Cheng HT, Kopan R. 2005. The role of Notch signaling in specification of podocytes and proximal tubules within the developing mouse kidney. *Kidney Int* 68:1951-1952.

Cohen AS, Reynolds WE, Franklin EC, Kulka JP, Rope MW, Shulman LE. 1971. Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull Rheum Dis* 21:643-8.

Couzi L, Merville P, Deminiere C, Moreau JF, Combe C, Pellegrin JL, Viillard JF, Blanco P. 2007. Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular

infiltrating cell and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 56:2362-70.

Cruz D, Khamashta M, Hughes G. 2007. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 369:587-596.

Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116:205-219.

Debatin KM, Krammer PH. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23:2950-2966.

Denys P, Malvaux P, Van Den Berghe H, Tangle W, Proesmans W. 1967. Association of an anatomic-pathological syndrome of male pseudohermaphroditism Wilm's tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaics. *Arch. Fr. Pediatr* 24:729-739.

Donadio JV Jr, Holley KE, Ferguson RH, Illstrup DM. 1976. Progressive lupus glomerulonephritis. Treatment with prednisone and combined prednisone and cyclophosphamide. *Clin Proc* 51:484-494.

Drash A, Sherman F, Hartmann WH, Blizzard RM. 1970. A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilm's tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J. Pediatr* 76:585-593.

Fathi NA, Hussein MR, Hassan HI, Mosad E, Galal H, Afifi NA. 2006. Glomerular expression and elevated serum Bcl-2 and Fas protein in lupus nephritis: preliminary findings 146:339-343.

Fujinaga S, Ohtomo Y, Hara S, Umino D, Someya T, Shimizu T, Kaneko K. 2008. Maintenance therapy with mycophenolate mofetil for children with severe lupus nephritis after low-dose intravenous cyclophosphamide regimen. *Pediatr Nephrol*.

Funder J. 1994. Apoptosis: two p or not p?. *Nature* 371:98.

Gao X, Chen X, Taglienti M, Rumballe B, Little M, Kreidberg JA. 2005. Angioblast-mesenchyme induction of early kidney developments is mediated by Wt1 and Vegf. *Development* 132:5437-5449.

Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westennwjddorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. 2001. Novel single nucleotide polymorphism in the distal IL-10 promoter affects IL-10 production and enhances the risk of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 166:3915-3922.

Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, Kim MY, Buyon J, Merrill JT, Petri M, Gilkeson GS, Wallace DJ, Weisman MH, Appel GB. 2005. Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N Engl J Med* 353:2219-2228.

Goldstein M, Roos WP, Kaina B. 2008. Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mamosfamide in human lymphoblastoid cells. Contribution of ADN replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 229:20-32

Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. 2005. CFLIPR: a new regulator of death receptor induced apoptosis. *J. Biol. Chem* 280:14507-14513.

Goumenos DS, Tsamandas AC, Kalliakmani P, Tsakas S, Sotsiu F, Bonikos DS y Viachojannis JG. 2004. Expression of apoptosis-related protein bcl-2 and bax along with transforming growth factor (TGF-beta1) in the kidney of patients with glomerulonephritis. *Ren Fail* 26:361-367.

Gourley MF, Austin HA 3rd, Scott D, Yarboro CH, Vaughan EM, Muir J, Boumpas DT, Kliper JH, Balow JE, Steinberg AD. 1996. Methylprednisolone and cyclophosphamide, alone or in combination, in patients with lupus nephritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 125:549-557.

Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.

Guo G, Morrison, DJ, Licht JD, Quaggin SE. 2004. Wt1 activate a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J. Am. Soc. Nephrol* 15:2851-2856.

Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison DH, Hammes A, Hastie ND, and Schedl A. 2002. Wt1 is a key regulator of podocytes function: reduced expression level cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum. Mol. Genet* 11:651-659.

Haber DA, Sohn RL, Bucler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilm's tumor gene Wt1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9618-9622.

Hamano Y, Grunkemeyer JA, Sudhakar A, Zeisberg M, Consgrove D, Morello R, Lee B, Sugimoto H, Kalluri R. 2002. Determinant of vascular permeability in the kidney glomerulus *Biol Chem* 277:31154-31162.

Hartung K, Baur MP, Coldewey R. 1992. Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J. Clin. Invest* 90:1346-1351.

Herrera Esparza R, Barbosa Cisneros O, Villalobos Hurtado R, Avalos Díaz E. 1998. Renal expression of IL-6 and TNF- α genes in lupus nephritis. *Lupus* 7:154-158.

Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nurnberg G, Garg P, Verman R, Chaib H, Hoskins BE. 2006. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephritic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 38:1397-1405.

Hiramatsu N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. 2008. Revised classification of lupus nephritis is valuable in predicting renal outcome with an indication of the proportion of glomeruli affected by chronic lesions. *Rheumatology* 47: 702-707

Holthofer H, Ahola H, Solin M, Wang S, Palmén T, Luimula P, Miettinen A, Kerjaschki D. 1999. Nephritin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am.J Pathol* 155:1681-1687.

Horvath L, Czirjak L, Fekete B. 2001. High levels of antibodies against C1q are associated with disease activity and nephritis but not with other organ manifestation in SLE patient. *Rheumatol* 19:667-672.

Houssiau F. 2004. Management of lupus nephritis: an update. *J Am Soc Nephrol* 15:2694-2704.

Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D. 2002. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis Rheum* 46 2121-2131.

Huang QR, Danis V, Lassere M, Edmonds J, Manolios N. 1999. Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *J Rheumatol* 38:645-51.

Huang QR, Morris D, Manolios N. 1997. Identification and characterization of polymorphism in the promoter region of the human Apo/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 34:577-82.

Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. 2004. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: Markers of disease activity. *Arthritis Rheum* 50:2048-2065.

- Jeruc J, Vizjak A, Rozman B, Ferluga D. 2006. Immunohistochemical expression of activated caspase-3 as a marker of apoptosis in glomeruli of human lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 48:410-418
- Johanson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 38:551-558.
- Jones N, Blasuting IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt FLiH, Huang H, Larose LLiSS, Takano T. 2006. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440:818-823.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissues kinetic. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kita Y, Kuroda K, Mimori T, Hashimoto T, Yamamoto K, Saito Y, Iwamoto I, Sumida T. 1998. T cell receptor clonotypes in skin lesions from patients with systemic lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 110:41-46.
- Kojima T, Horiuchi T, Nishizaka H. 2000. Analysis of fas ligand gene mutation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43:135-139.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18:44-51.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Gostein P. 2005. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell. *Cell Death Differ* 12:1463-1467.
- Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115:2679-2688.
- Li LY, Luo X, Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNAase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.
- Li Y, Tucci M, Narain S, Barnes EV, Sobel ES, Segal MS, Richards HB. 2006. Urinary biomarkers in lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 5:383-388.
- Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J. 1999. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. *Genes Immun* 1:45-52.
- Liu CC, Manzi S, Danchenko N, Ahearn JM. 2004. New advances in measurement of complement activation: lesson of systemic lupus erythematosus. *Curr. Rheumatol. Rep* 6:375-381.

- Lorz C, Ortiz A, Justo P, Gonzáles-Cuadrado S, Duque N, Gómez-Guerrero C, Egido J. 2000. *J AM Soc Nephrol*. 11:1266-1277.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
- Luthi AU, Martin SJ. 2007. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14:641-650.
- Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, necrosis end oncosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.
- Makino H, Sugiyama H, Yamasaki Y, Maeshima Y, Wada J, Kashihara N. 2003. Glomerular cell apoptosis in human lupus nephritis. *Virchos Arch* 443:67-77.
- Martinion F, Hofmann K, Tschopp J. 2001. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr. Biol* 11:118-120.
- Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. 2000. New polymorphisms of human CD80 and CD86 lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 1:428-434.
- McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA. 1995. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 38:1260-1270.
- Meijer AJ, Codogno P. 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2445-2462.
- Mills JA. 1994. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med* 330:1871-1879.
- Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. 2006. Apoptosis inducing factor: vital and lethal. *Treds Cell Biol* 16:264-272.
- Mok CC, Ho CT, Siu YP, Chan KW, Kwan TH, Lau CS, Wong RW, Au TC. 2001. Treatment of diffuse proliferative lupus glomerulonephritis: A comparison of two cyclophosphamide-containing regimens. *Am J Kidney Dis* 38:256-264.
- Mok CC, Lau CS. 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin Pathol* 56:481-490.
- Morel L. 2007. Genetics of human lupus nephritis. *Semin Nephrol* 27:2-11.
- Moroni G, Trendelenburg M, del Papa N. 2001. Anti.C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis. *Am J. Kidney Dis* 37:490-498.

- Mortensen ES, Fenton KA, Rekvig OP. 2008. Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed. *Am J Pathol* 172:275-83.
- Muller S, Dieker J, Tinicani A, Meroni P. 2008. Pathogenic anti-nucleosome antibodies. *Lupus* 17:431-6.
- Nicholson DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6:1028-1042.
- Ortiz A, Egado J. 2000. Mecanismos patogénicos de las glomerulonefritis: muerte celular por apoptosis. *Revista Clínica Española* 8:438-441.
- Ortiz A, González Cuadrado S, Lorz C, Egado J. 1996. Apoptosis in renal diseases. *Frontiers in Bioscience* 1:30-49.
- Ortiz A, Lorz C, Egado J. 1999. The Fas ligand/Fas system in renal injury. *Nephrol dial transplant* 14:1831-1834.
- Ott U, Aschoff A, Pocock J, Funfstuck R, Jirikowski G, Stein G, Wolf G. 2007. DNA fragmentation in chronic glomerulonephritis: an immunohistological analysis. *Nefron Clin Pract* 105:18-28.
- Passas CM, Wong RL, Peterson M, Testa MA, Rothfield A. 1985. A comparison of the specificity of the 1971 and 1982 American Rheumatism Association criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 28:620-3.
- Probet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. 1995. *Métodos histotecnológicos*. ARP Washington D. C. pp
- Reed JC. 2002. Apoptosis based therapies. *Nat Rev drug Discov* 1:111-121.
- Reveille JD. 2004. Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13:290-297.
- Ronco P, Debiec H. 2007. Podocyte antigens and glomerular disease. *Nephron Exp Nephrology* 107:41-46.
- Rubinstein T, Pitashny M, Putterman C. 2008. The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. *Autoimmun Rev* 7:229-34.
- Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M, Jakubowski A, Blanco J, Egado J, Ruiz-Ortega M, Ortiz A. 2008. The cytokine TWEAK modulate renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 19:695-703.

Satomi K, Kenji I, Ahmed S, Takeshi O, Tsutomu T, Jun N, Michihiko Kuwano, Toshiro H. 2002. A functional polymorphism in Fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 29:1183-8.

Sauter M, Anders HJ. 2007. Lupus nephritis. *Minerva Med* 98:749-58.

Schieppati A, Remuzzi G. 2008. Novel therapies of lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:156-61.

Schiffer M, Mundel P, Shaw AS, Bottinger EP. 2004. A novel role for the adaptor molecule CD2- associated protein in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:37004-37012.

Schwartz N, Michaelson JS, Putterman C. 2007. Lipocalin-2 TWEAK and other cytokines as urinary biomarkers for lupus nephritis. *Ann NY Acad Sci* 1109:265-274.

Schwartz N, Michaelson JS, Putterman C. 2007. Lipocalin-2, TWEAK, and other cytokines as urinary biomarkers for lupus. *Ann N y Acad Sci* 1109:265-274.

Shankland SJ. 2006. The podocytes response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 69:2131-2147.

Simon JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sánchez-Guerrero J. 2004. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity maker. *Rheumatology* 43:220-224.

Soto H, Mosquera J, Rodríguez Iturbe B, Henríquez la Roche C, Pinto A. 1997. Apoptosis in proliferative glomerulonephritis: decreased apoptosis expression in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 12:273-280.

Sprick M. 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death inducing signaling complexes in FADD- dependent manner but can not functionally substitute caspas-8. *EMBO* 21:4520-4530.

Sugiyama H, Kashihara N, Makiano H. 1996. Apoptosis en glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49:103-111.

Svirbely J. 2009. *Rematología*. Springer, pp. 118-119.

Takemura T, Murakami K, Miyazato H. 1995. Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 48:1886-1892.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-7.

Thomas LR, Henson A, Reed JC, Salisbury FR, Thorburn A. 2004. Direct binding of FADD to the TRAIL receptor DR5 is regulated by the death effectors domain of FADD. *J Biol Chem* 279:32780-32785.

Thorburn A. 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 16:139-144.

Trouw LA, Daha MR. 2005. Role of anti-C1q autoantibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Expert. Opin. Biol. Ther* 5:243-251

Uguz A, Gonlusen G, Ergin M y Tuncer I. 2005. Expression of Fas, Bcl-2 and p53 molecules in glomerulonephritis and their correlations with clinical and laboratory finding. *Nephrology* 10:311-316.

Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB. 2006. Nephrin ectodomain engagement results in Scr kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerizations. *J. Clin. Invest* 116:1346-1359.

Virchow. 1860. Lecture XVI. Translated by. Chance F. *Cellular Pathology*. twenty lectures. London: John Churchill, New Burlington street. 318.

Weening JJ, Aganti VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruun JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Lool LM, Makino H, Morua LA, Nagata M. 2004. The classification of glomerulonephritis in system lupus erythematosus revisited. *J. AM. Soc. Nephrol* 15:241-250.

Wilson AG, Gordon C, Gioine Fs. 1994 Genetic association between systemic lupus erythmatosus and tumor necrosis factor α . *Eur J. Immunol* 24:191-195.

Yorimitsu T, Klionsky DJ. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12:1542-1552.

Young L, Ye R, Jong D, Jeongwon S, Gwan G. 2001. Fas promoter -670 polymorphism is associated with development of Anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 28:2008-11.

Zamzami N, Hamel C, Maise C. 2000. Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene* 6342-6350.

Zhao Z, Burkly LC, Campbell S, Schwartz N, Molano A, Choudhury A, Eisenberg RA, Michaelon JS, Puterman C. 2007. TWEAKfn14 interaction are instrumental in

the pathogenesis of nephritis in the chronic graft-versus-host model of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 179:7949-58.

Zykova SN, Seredkina NE, Rekvig OP. 2007. Glomerular target for autoantibodies in lupus nephritis-an apoptotic origin. *Ann N y Acad Sci* 1108:1-10.

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Juan José Bollain y Goytia de la Rosa

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: PARTICIPACIÓN DE LA VÍA FAS-L/FAS EN LA APOPTOSIS DE PACIENTES CON NEFROPATÍA LÚPICA

Directora Interna: Dra. en C. Cristina Rodríguez Padilla

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Zacatecas., Zac. el 28 de Agosto de 1972, hijo de Salvador Bollain y Goytia Muñoz y Amelia de la Rosa Robles.

Grupo académico:

1) Integrante del cuerpo Académico de Autoinmunidad Consolidado (ca.uazac-5).

Reconocimientos académicos:

1) Perfil deseable PROMEP-2008-2011

2) Candidato SNI-2009-2011

Educación: Estudios de Postgrado: Maestría en Biología Experimental. Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas, Guadalupe, Zac. Director de tesis: Dra. Esperanza Avalos Díaz. Título de Tesis: La luz ultravioleta-A aumenta la transcripción de los genes fas-l y bax y contribuye a la redistribución de la proteína Ro60 de queratinocitos. Grado obtenido en el 2001: Título de Maestro en Biología Experimental. Becado por CONACYT convenio: 114246/114856.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. Guadalupe, Zac. Grado Obtenido: Título Químico Farmacéutico Biólogo. Con especialidad en farmacología.

Experiencia Profesional: Docente Investigador Titular A, adscrito a los Laboratorios de Biología Molecular e Inmunología de la Unidad Académica de Biología Experimental desde el 2007.

Publicación de artículos en revistas internacionales indexadas 14, 5 como primer autor y 9 como colaborador. Memorias en congresos con ISSN 29, como primer autor 12 y 17 como colaborador.

11. ARTÍCULOS

1.- Bollain-y-Goytia JJ, Avalos E, Rodríguez C, Herrera R. 2006. Renal cell turnover result in fine balance between apoptosis and cell proliferation. Journal of Biological Research. 6:131-138

2.- [Widespread expression of inducible NOS and citrulline in lupus nephritis tissues](#)

JJ Bollain-y-Goytia, R Ramirez-Sandoval, L Daza, ... - Inflammation ..., 2009 - Springer Abstract. Objective: Examine the presence of functional inducible nitric oxide synthase (iNOS) in lupus nephritis lesions. Methods: Seventeen kidney biopsies from patients with lupus nephritis and an equal number of normal control kidney biopsies were examined ... [Citado por 2](#) - [Artículos relacionados](#)

Cita 1.-[The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus](#)

JC Oates - Autoimmunity, 2010 - [informahealthcare.com](#) Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune syndrome marked by autoantibody production. Innate immunity is essential to transform humoral autoimmunity into the clinical lupus phenotype. Nitric oxide (NO) is a membrane-permeable signaling molecule involved in a ... [Citado por 1](#) - [Artículos relacionados](#) - [Las 4 versiones](#)

Cita 2.-[B1 cells produce nitric oxide in response to a series of toll-like receptor ligands](#)

G Tumurkhuu, N Koide, J Dagvadorj, ASM Noman, ... - Cellular ..., 2009 - Elsevier The effect of a series of toll-like receptor (TLR) ligands on the production of nitric oxide (NO) in mouse B1 cells was examined by using CD5 + IgM + WEHI 231 cells. The stimulation with a series of TLR ligands, which were Pam3Csk4 for TLR1/2, poly I:C for TLR3, ... [Artículos relacionados](#) - [Las 2 versiones](#)

Cita 3.-[Glomerular Antibodies in Lupus Nephritis](#)

C Hanrotel-Saliou, I Segalen, Y Le Meur, P Youinou, ... - Clinical Reviews in Allergy ... - Springer ... Arthritis Rheum 54:2198–2210 31. **Bollain-y-Goytia JJ, Ramírez-Sandoval R, Daza L, Esparza E, Barbosa O, Ramirez D et al** (2009) Widespread expression of inducible NOS and citrulline in lupus nephritis tissues. Inflamm Res 58:61–66 32. ...

3.- Bollain-y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-del-Muro F, Daza-Benítez L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, Avalos-Díaz E, Herrera-Esparza R. 2010. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. Indian Journal of Nephrology. En prensa.

Widespread expression of inducible NOS and citrulline in lupus nephritis tissues

J. J. Bollain-y-Goytia¹, R. Ramírez-Sandoval¹, L. Daza², E. Esparza¹, O. Barbosa¹, D. Ramirez¹, G. Pacheco-Tovar¹, E. Avalos-Díaz¹, C. Rodríguez-Padilla³ and R. Herrera-Esparza¹

¹Laboratorio de Inmunología, Universidad Autónoma de Zacatecas, Guadalupe, Zac. México. Chepinque 306. Col. Lomas de la Soledad. Zacatecas, Zac. 98040 México, Fax: 52(492)9226070, e-mail: herrerar@uaz.edu.mx or rafael.herreraesparza@gmail.com

²Departamento Reumatología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. A. López Mateos e Insurgentes S/N, Col. Los Paraísos CP 37480 León, Guanajuato, México

³Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, NL, México

Received 4 November 2007; returned for revision 17 December 2007; received from final revision 11 June 2008; accepted by M. Katori 13 June 2008

Published Online First 20 January 2009

Abstract. *Objective:* Examine the presence of functional inducible nitric oxide synthase (iNOS) in lupus nephritis lesions.

Methods: Seventeen kidney biopsies from patients with lupus nephritis and an equal number of normal control kidney biopsies were examined for the presence of iNOS and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and citrulline by using immunohistochemical methods. Additionally, iNOS and eNOS mRNAs were examined by reverse transcription-PCR amplification of total renal RNA.

Results: All biopsies expressed constitutive eNOS, but in contrast to normal kidney biopsies, 70% of the lupus biopsies also expressed iNOS mRNA and the cognate protein. Eight positive biopsies corresponded to class IV lupus nephritis, which also had a high degree of citrullination.

Conclusions: The data indicate that functional iNOS activity is present in glomeruli as part of the inflammatory process in the kidney; therefore the products of iNOS could play a role in the pathogenesis of lupus nephritis.

Key words: iNOs – Lupus nephritis – Free radicals and tissue damage – Inflammatory mediators – Citrulline

Introduction

Nitric Oxide (NO) is a free radical that behaves as a diffusible gas, and it has known effects on blood flow and renal function. Among its multiple effects, NO induces vasodilata-

tion in response to acetylcholine and bradykinin. Moreover, NO agonists augment renal blood flow, whereas antagonists decrease it, therefore modulating renal arterial pressure and natriuresis [1].

NO is the product of nitric oxide synthase (NOS), which has three isoforms: NOS I or neuronal (nNOS), originally discovered in neurons, with splice variants found in other tissues. NOS II (iNOS) is the inducible form linked to inflammation and it is expressed by macrophages and other cells in several tissues. Finally, endothelial NOS III or endothelial (eNOS) is constitutively expressed by endothelial cells [2]. The kidney express the three isoforms of the enzyme, with NOS I present in macula densa cells whereas iNOS is expressed by smooth muscle cells of pre-glomerular afferent arterioles, and eNOS is present in arterioles [1].

The pathway of NO production is marked by the conversion of arginine to citrulline, and one of the three isoforms is converted by the enzyme nitric oxide synthases. The eNOS dependent NO production is a physiologic process whereas iNOS produces NO-related inflammation. Citrulline is an amino acid that possesses an asymmetric carbon with two enantiomers, the natural form being the L form. Citrulline has reactivity like other aminoacids; it may form peptide bonds and is present in certain proteins, however as this amino acid lacks a genetic codon, its presence in a given protein is necessarily the result of post-translational modification [1, 2].

During inflammatory processes, iNOS replaces the constitutive eNOS expression, which is of particular importance because as in the case of inflammatory glomerulonephritis, such a replacement is linked to tissue damage [3]. The consequences of NO generation in systemic lupus erythematosus (SLE) has been studied, and the levels of serum nitrate/nitrite

and nitrotyrosine has been correlated with lupus disease activity, and renal disease activity scores such as glomerular proliferation, leukocyte exudation, karyorrhexis/fibrinoid necrosis, cellular crescents, hyaline deposits, and interstitial inflammation [3–5]. In the murine New Zealand Black x New Zealand White F1 (NZB/NZW F1) model of SLE, the kidney damage is blocked by aminoguanidine, a potent inhibitor of NO [6].

Since iNOS expression may be an indicator of inflammation with particular clinical importance in lupus nephritis, NO may be a potential therapeutic target. The current studies were designed to determine whether the iNOS/eNOS expression ratio is altered in lupus nephritis. Moreover, we examined the presence of citrulline in kidney tissues as an indirect indicator of iNOS function. These studies are important because the activity of iNOS has not been previously reported.

Methods

Kidney biopsies

Biopsies from seventeen patients with systemic lupus erythematosus (SLE) (14 females and 3 males) were studied. The patients had a mean of age of 25.9 years (range 14–40) with a mean disease duration of 4.8 years (range 1–10). All patients met the revised American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE [7], and they had one or more serologic criteria, such as positive antinuclear antibody test, low serum complement, or anti-dsDNA antibodies (*Crihidia. luciliae* test). Some patients had a positive lupus skin band test. In all patients kidney biopsies were performed percutaneously, and a segment of each biopsy was stained for hematoxylin and eosin (H&E), and evaluated under light microscopy. Biopsies were classified according to the ISN/RPS (The 2003 International Society of Nephrology (ISN)/Renal Pathology Society (RPS) 2003 classification of lupus nephritis) [8] as follows: Class I minimal mesangial lupus nephritis (LN). Class II mesangial proliferative. Class III Focal (50% of glomeruli), active lesions (III A), active and chronic lesions (III A/C), Class IV diffuse (50% of glomeruli), diffuse segmental (IV-S) or global (IV-G), IV A (active lesions) or IV A/C (active and chronic lesions), IV C (chronic lesions). Class V or membranous. Class VI (advanced sclerosing (90% globally sclerosed glomeruli without residual activity).

Activity and chronicity were determined by the indicators proposed by Austin et al [9]. The Activity Index (AI) was based on the following histology features: glomerular proliferation, leukocyte exudation, karyorrhexis/fibrinoid necrosis (×2), cellular crescents (×2), hyaline deposits, and interstitial inflammation. A scale of 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe) was applied to each histological feature for biopsy specimens, in which six or more glomeruli were examined. Accordingly, the maximum AI score was 24. The Chronicity Index (CI) was the sum of individual scores of the following features: glomerular sclerosis, fibrous crescents, tubular atrophy, and interstitial fibrosis, the scale of 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe) was applied. The maximum CI score was 12.

Seventeen control normal kidney biopsies were obtained during necropsy from subjects without renal pathology, who died in accidents as a result of craneo-encephalic trauma. The Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) was measured when the kidney biopsy was obtained; SLEDAI is an instrument that measures disease activity by weighting the importance of each organ system involved [10].

This investigation was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki; biopsies were performed with the consent of the human subjects and or relatives. In the case of control biopsies, and the protocol was approved by the Ethics Committee of each institution participating in this study.

Immunohistochemistry

eNOS, iNOS and citrulline were detected in tissues by immunohistochemistry of 4 µm thick sections of renal tissues mounted on microscope slides. The specimens were dewaxed, permeabilized with 0.01% Triton X-100/Phosphate buffer saline (PBS) and then washed three times with PBS. Endogenous peroxidase was blocked with horse serum heat inactivated at 56°C. After a further wash, tissues were incubated for 12 hour with rabbit anti-iNOS (sc-651 Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA), anti-eNOS (sc-654), or anti-citrulline antibody (cat 231246, Calbiochem, Darmstadt, Germany) diluted 1:1000 in 10% BFS-PBS. The tissues were then washed in several changes of PBS and bound antibodies were identified with peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG. Color reaction was induced by 2, 2-diaminobenzidine-0.06% H₂O₂ (Sigma, San Louis, MO) and the reaction stopped with 2N sulphuric acid. The slides were then examined under light microscope. The assays were performed in triplicate and evaluated by two pathologists in a blinded fashion. The intensity of the color reaction obtained by immunohistochemistry was analyzed by the KDS1 program (Kodak) that measures the sum of color intensity in selected pixels.

NO production and citrulline presence

With the rationale that both NO and citrulline are the products in the reaction catalyzed by NOS, the presence of free citrulline was tested by immunohistochemistry. We used an anti-citrulline antibody from Calbiochem (Cat. 231246) that was originally developed for ELISA. Therefore, it was necessary to demonstrate that the cellular production of NO was *bona fide* and was correlated to the intensity of anti-citrulline antibody staining in a well-defined *in vitro* system as follows: Kidneys were excised from adult Balb/c mice and cultured for 12 h in DMEM media in presence of 20 µl of TNF or IL-1 (Sigma, St Louis MO). The nitrite production was measured by Griess method [11]. In addition, tissues were fixed, embedded in paraffin and processed by immunohistochemistry to detect citrulline. Control kidneys cultured without cytokine exposure were included as controls. A mean and standard deviation (SD) was done in ten replicas of this experiment, differences between control and problems was calculated by Student t test.

RNA extraction

Total RNA was extracted from several 4 µm kidney sections (containing a mean of 10 glomeruli per section) by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (TRIzol, GIBCO-BRL Gaithersburg MD). RNA was quantitated by OD at 260 nm.

Oligonucleotides

The primers used for polymerase chain reaction (PCR) were: eNOS forward 5'-CAGTGTGTCCAACATGCTGCTGGAAATTG-3', and backward 5'-TAAAGGTCTTCTTCTGCTGGTATGCC-3' of the coding sequence that amplify a 485-bp product; iNOS forward 5'-GGCCTCGCTCTGGAAAGA-3', backward 5'-TCCATGCAGACAACTT-3' of the sequence coding that amplify a 485-bp product [12]. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) forward 5'-TGA AGG TCG GTGTGA ACG GAT TTG GC-3' and backward 5'-CATG-TA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' (Clontech, Palo Alto, CA)

Reverse-transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR)

cDNA synthesis was achieved from 250 ng total RNA incubated with 200 mM dNTP, and 0.7 µM of the forward and backward primers were mixed with 5 µl of rTth/DNA polymerase (SuperScript One-Step, Invitrogen LifeTechnology, Carlsbad, CA). Reverse transcription was per-

Table 1. Clinical and histological data of lupus nephritis patients.

Gender	age	Disease duration	SLEDAI	Nephritis Class	Nephritis Activity	Nephritis Chronicity
1-Female	33	5	8	IV-A/C	4	4
2-Male	19	8	6	IV-A/C	4	5
3-Male	40	8	5	III-A/C	4	1
4-Female	26	7	4	IV-A/C	8	4
5-Female	15	7	6	III-A/C	6	3
6-Female	35	5	6	III-A/C	6	2
7-Female	24	10	4	III-A	8	0
8-Female	34	9	5	IV-A/C	14	12
9-Female	32	4	7	IV-A/C	4	3
10-Female	14	1	7	III-A/C	16	11
11-Female	16	4	8	IV-A	6	0
12-Female	30	4	6	IV-A/C	4	5
13-Female	36	1	4	IV-A/C	5	2
14-Female	26	2	8	III-A/C	8	1
15-Male	16	2	8	IV-A/C	10	1
16-Female	26	2	10	III-A/C	8	5
17-Female	19	4	8	IV-A/C	7	5
Mean ± sd	25.9±8.3	4.8±2.8	6.4±1.7	10 = IV, 7 = III	7.2±3.4	3.7±3.4

A = active C = chronic

Sd = Standard deviation

Table 2. Immunohistochemistry in kidneys of eNOS and iNOS protein, the intensity of the color reaction was expressed in pixels.

Group	Positive biopsies	Mean +sd	t Test
1- eNOS Lupus Nephritis	17/17	639.8±181.2	1 vs 2 = P <0.0001; 1 vs 3 = P <0.0001
2- eNOS Control	17/17	12170±4016	2 vs 3 = P <0.0001
3- iNOS Lupus Nephritis	12/17*	26210±7146	3 vs 4 = P <0.0001
4- iNOS Control	0/17	235.4±61.68	4 vs 2 = P <0.0001
5- Citrulline Lupus Nephritis	12/17*	38170±9115	5 vs 6 = P <0.0001
6- Citrulline Control	0/17	188.0±58.85	6 vs 4 = 0.0001

*p <0.001 by Fisher's exact test

formed at 55°C for 30 min. Reaction tubes containing 25 µl of sample mixture were amplified in a thermal cycler (Perkin Elmer, GeneAmp PCR system 2400, Foster City, CA) with 30 cycles under the following conditions: 94°C for 2 min, 55°C for 2 min and 72°C for 1.4 min. At the end of the PCR reaction, the samples were electrophoresed in 2% agarose containing 0.5 µl ethidium bromide. PCR products were observed under UV light. Band migration and density were documented using an image analysis system by BioRad. Pro-apoptotic transcript levels were determined by comparing with the G3PDH densitometry.

Statistical analysis

Data were processed by Student t test using the Prisma program, and Fisher exact test, p <0.05 was considered statistically significant (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact2.html>).

Results

Histology

The lupus nephritis biopsies included ten that had Class IV and seven with Class III. Patients with Class IV nephritis displayed the highest activity and chronicity scores while control kidneys had no histological evidence of renal disease. The background data of individual patients is shown in Table 1.

eNOS is expressed in all glomeruli

Control kidney tissues broadly expressed the physiologic eNOS, which was mainly detected along the tubules, in

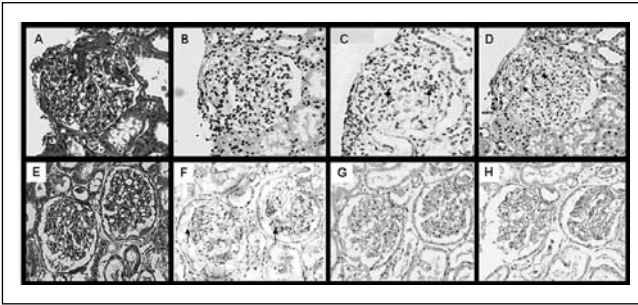


Fig. 1. Immunohistology of lupus nephritis (A, B, C and D) and control (E, F, G and H) kidney biopsies processed by hematoxylin & eosin staining (A and E), and by immunohistochemistry to detect eNOS (B and F), iNOS (C and G) and citrulline (D and H). The expression of eNOS is demonstrated mainly in control biopsies (F), shown as brown color scattered in glomerular loops) and iNOS and citrulline is exclusively present in lupus nephritis (C, arrows pointing out the cell infiltration and proliferation surrounded by iNOS) and citrulline (D) is present in glomerular loops and mesangium.

glomerular endothelial cells and in the mesangium. Although lupus nephritis biopsies showed similar distribution of eNOS, their staining intensities were lower (Table 2). Because the staining color exhibited slight differences from one experiment to another, each experiment was performed with positive and negative controls, and color intensity was measured by an image analyzer program, and values were expressed as sum of intensities in pixels in one hundred fields. Using this approach, significant differences of eNOS between controls and nephritis biopsies were observed (Table 2).

iNOS expression in lupus nephritis

Since none of the control biopsies displayed a defined iNOS signal, it was assumed that iNOS activity was absent. In sharp contrast, lupus nephritis kidneys broadly expressed iNOS along the glomeruli, tubular epithelia, as well as around cellular infiltrates (Table 2).

iNOS expression in the kidney correlates with the presence of citrulline

NO production is the result of the conversion of L-arginine to L-citrulline, and one indirect way to demonstrate NO production in tissues is to examine the presence of citrulline with anti-citrulline antibodies [13]. Thus, positive staining for citrulline probably reflects iNOS activity. Figure 1 shows that citrulline was not detected in normal kidney tissues, despite the possibility that endothelial NO synthase (eNOS) is available to generate citrulline. This unexpected negative result could be due to NO activity that was lower than eNOS activity. As a consequence, it was almost not detectable by anti-citrulline antibodies used in the present assay. In sharp contrast, citrulline was abundantly detected in glomeruli and tubules of lupus nephritis tissues, and, particularly around the inflammatory infiltrates. Seventy percent of all lupus nephritis biopsies showed the presence of both messenger (m) iNOS and iNOS protein and the presence of citrulline; the remaining 30% biopsies was negative. (Table 2)

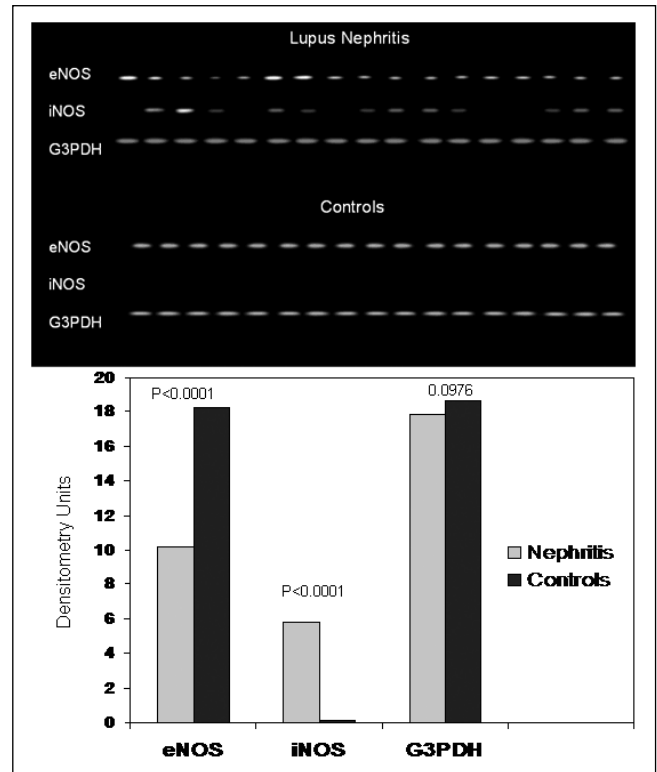


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis showing the bands correspondent to reverse transcription-PCR amplification of eNOS, iNOS and G3PDH mRNA from total RNA isolated from lupus nephritis and control kidney biopsies. The presence of iNOS amplicates was observed exclusively in the twelve lupus nephritis specimens.

Messengers of iNOS are increased in lupus nephritis

By RT-PCR amplification, iNOS mRNA was detected in 70% of lupus nephritis biopsies, all class IV and two class III exhibited RT-PCR products, which were associated with the presence of iNOS protein (Table 2 and Figure 2). As expected, all biopsies had detectable physiologic eNOS. G3PDH was used as a housekeeper gene because it is constitutive in eukaryotic cells and is relatively unaffected by external factors. As expected G3PDH expression was not different between lupus nephritis and controls.

Citrulline in tissues means NO activity

Since the present investigation utilized tissue biopsies included in paraffin, it was technically difficult to demonstrate the *in vitro* NO activity as detected by nitrite production. As a consequence, an experiment using normal murine kidneys was performed. When NO production was triggered by TNF and IL-1, an increase of NO concentration as measured by Griess reagent was observed in kidney tissues accompanied by widespread citrulline production and deposition in tubular epithelia and glomeruli. Control kidney tissues were negative in both assays (Figure 3). This *in vitro* finding suggested that the presence of citrulline in kidneys of lupus nephritis is linked to NO production.

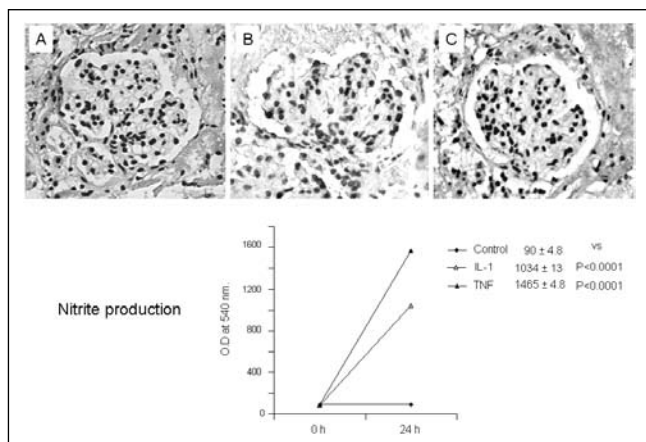


Fig. 3. Citrulline detection by immunohistochemistry in kidneys of Balb/c mice, stimulated with IL-1 and TNF. A. Control at 0 h is negative. B. Kidneys stimulated with IL-1 and C. Kidneys stimulated with TNF are positive for citrulline presence, which is evident in glomerulus. On the inferior panel a graphic showing the nitrite production triggered by these cytokines after 24 hours, and measured by spectrophotometry at 560 nm, by the Griess method. Mean and standard deviation was obtained in ten experiments, and the P value was calculated by Student t test.

Discussion

The aim of the present studies was to determine whether iNOS is present during inflammatory processes of lupus nephritis. The major findings of our studies are:

- 1) iNOS was detected in 70% of lupus nephritis biopsies;
- 2) All class IV lupus nephritis classified according to the ISN/RPS displayed iNOS;
- 3) the presence of citrulline was correlated with NO production and iNOS expression. These findings suggest that the NO pathway could play a role in the pathogenesis of lupus nephritis.

The participation of the NO pathway in autoimmune glomerulonephritis has been addressed by other investigators who found that normal kidneys constitutively express eNOS, whereas the iNOS species is found exclusively in inflammatory glomerulonephritis [14, 15]. Based on these observations, therapies based on deviation of inflammatory to physiologic NO have been experimentally used. Among these is hemin, a molecule that triggers the inducible form of haem oxygenase (HO-1), which protects tissues by switching inflammatory NO to the physiologic form and is expressed in response to various stimuli such as hydrogen peroxide, heat, heavy metal ions, hyperoxia, hypoxia, endotoxin and inflammatory cytokines [16]. HO-1 prevents the development of inflammatory kidney disease by suppressing the synthesis of IL-1, IL-6 and TNF [17], all of which are also involved in the pathogenesis of lupus nephritis [17]. Moreover, all-trans-retinoic acid (ATRA), a drug that blocks iNOS, has beneficial effects on nephritis and improves renal function of NZB/NZW mice [18].

Citrulline is an amino acid which is a key piece of the NO pathway. Citrulline metabolism in mammals can be found in two forms: free citrulline that is the product of one of the three NOS isoenzymes. The second species of citrulline, is

the result of post-translational modification of certain proteins at arginine residues by peptidylarginine deiminases (PADs), which are a group of enzymes that citrullinate (deiminate) protein arginine residues, yielding citrulline residues. Protein citrullination is NOS independent and is important in rheumatoid arthritis [19].

Citrulline can be detected by two different methods. The first one uses diacetylmonoxim and requires the removal of urea prior to the assay [19]. The second, which we used, employs anti-citrulline antibodies, an excellent method to detect citrulline in tissues, which can be used to detect NOS activity [20]. The only weakness of this technique is that it also detects citrullyl residues in tissue proteins [21]. The high association observed in our studies between the presence of citrulline in areas of iNOS expression suggests that iNOS is functionally active and hence the likely result that NO is produced *in situ* in lupus nephritis.

In conclusion, the present studies suggest that NO-related responses may be results of lupus nephritis, and could play a pathogenic role by increasing inflammation and kidney damage. Although the presence of iNOS was previously reported in lupus nephritis [14, 15], the main contribution of the present investigation is the demonstration of significant iNOS activity in lupus nephritis that is accompanied by the presence of citrulline, a finding which was not previously reported. The importance of this work implicated NO as a potential therapeutic target to improve renal function in lupus nephritis.

Acknowledgements. Supported by PROMEP-UAZ-CA5 Autoinmunidad. The Ph. D. study of JJ Bollain y Goytia was supported by CONACYT grant 114642. Dr Marvin J Fritzler and Dr Jose Moreno are thanked for their critical comments and help in editing the manuscript.

References

- [1] Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am. J. Physiol* 1995; 268: F885–F898.
- [2] Förstermann U, Boissell JP, Kleinert H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; 12: 773–90.
- [3] Cattell V. Nitric oxide glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 1999; 19: 277–87.
- [4] Wanchu A, Khullar M, Bamberg P, Sud A. Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1998; 28: 41–3.
- [5] Gilkeson G, Cannon C, Oates J, Reilly C, Goldman D, Petri M. Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. *J Rheumatol* 1999; 26: 318–24.
- [6] Yang CW, Yu CC, Ko YC, Huang CC. Aminoguanidine reduces glomerular inducible nitric oxide synthase (iNOS) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) mRNA expression and diminishes glomerulosclerosis in NZB/W F1 mice. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 258–64.
- [7] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271–7.
- [8] Weening JJ, D'Agatti VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers C, Appel G, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 241–50.
- [9] Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TA, Kullick ME, Klippel JH, et al. Prognostic factors in lupus nephritis: Contribution of renal histologic data. *Am J Med* 1983; 75: 382–91.

- [10] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang DH, and the Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630–40.
- [11] Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*. 1993; 214: 11–6.
- [12] Smith R, Robinson N, McPeake J, Baylis S, Charles I, Heaton N, Moncada S, Williams R, Martin J. Induction and Role of NO synthase in hypotensive hepatic failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 3079–82.
- [13] Aoki E, Takeuchi IK. Immunohistochemical localization of arginine and citrulline in rat renal tissue. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 875–81
- [14] Furuu A, Miyasaki M, Abe K, Tsukasaki S, Shiohita K, Sasaki O et al. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney International* 1998; 53: 1760–68.
- [15] Wan JS, Tseng HH, Shih DF, Jou HS, Ger LP. Expression of inducible nitric oxide synthase in human lupus nephritis. *Nephron* 1997; 77: 404–11.
- [16] Herrera-Esparza R, Barbosa-Cisneros O, Villalobos-Hurtado R, Avalos-Diaz E. Renal Expression of IL-6 and TNF α genes in lupus nephritis. *Lupus* 1998; 7: 154–58.
- [17] Takeda Y, Takeno M, Iwasaki M, Kobayashi H, Kirino Y, Ueda A, et al. Chemical induction of HO-1 suppresses lupus nephritis by reducing local iNOS expression and synthesis of anti-dsDNA antibody. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 237–244.
- [18] Nozaki Y, Yamagata T, Yoo BS, Sugiyama M, Ikoma K, Kinoshita K, et al. The beneficial effects of treatment with all-trans-retinoic acid plus corticosteroid on autoimmune nephritis in NZB/WF1 mice. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 74–83.
- [19] Curtis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Ménszeth S, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005; 29: 177–207.
- [20] Keilhoff G, Reiser M, Stanarius A, Aoki E, Wolf G. Citrulline immunohistochemistry for demonstration of NOS activity in vivo and in vitro. *Nitric Oxide* 2000; 4: 343–353.
- [21] Keilhoff G, Wolf G. Citrulline immunohistochemistry may not necessarily identify nitric oxide synthase activity: the pitfall of peptidylarginine deiminase. *Nitric Oxide* 2003; 8: 31–38.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/IR>

Renal cell turnover results in a fine balance between apoptosis and cell proliferation

JUAN JOSÉ BOLLAIN-Y-GOYTIA¹, ESTEBAN MEZA-LAMAS¹,
ADRIÁN LÓPEZ¹, ESPERANZA AVALOS-DÍAZ¹,
CRISTINA RODRÍGUEZ-PADILLA² and RAFAEL HERRERA-ESPARZA^{1*}

¹ Department of Molecular Biology, Institute for Experimental Biology,
Universidad Autónoma de Zacatecas, Guadalupe, Zacatecas, México

² Department of Immunology, School of Biological Sciences,
Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Received: 2 January 2006

Accepted after revision: 27 June 2006

Renal cell turnover (RCT) results in a fine balance between apoptosis and cell proliferation. RCT starts early in developing mammalian kidneys and after birth it supports the structure and function of the kidney. After renal inflammation, the role of RTC is critical in repair. Current studies have been addressed to whether apoptosis participates in renal cell turnover at different stages of renal life. Kidneys were obtained from a group of newborn and adult normal Balb/c mice. Tissues were preserved in RNAlater, and sections were obtained and processed with the TUNEL method. The protein expression of fas, fasL and pcna was studied by immunofluorescence. The expression of the fas, fasL, caspase 3, dff40, pcna and g3pdh genes was determined by RT-PCR. Results showed a low apoptotic rate in kidneys of newborn mice. However, this rate progressively increased by elderly. On the opposite, a high cell proliferation and transcription of pcna was observed in newborn mice which declined by elderly. Our study demonstrated that apoptosis is a normal process in the kidney. Apoptosis is increased by elderly and is concurrent with a decline of cell proliferation. Both mechanisms contribute to maintain renal cell turnover. This work attempts to provide a rational of the renal development which can be applied for better comprehension of the molecular mechanisms on renal pathology and novel designs of therapeutic interventions.

Key words: apoptosis, cell proliferation, renal cell turnover, TUNEL, fas/fasL, caspase 3.

INTRODUCTION

The cell induction of metanephric mesenchyma transforms the neighbour ureteric bud into a differentiated epithelium which produces the nephron. The collecting system is formed later by the ureter branching under the signals of the MAP kinase pathway (Lechner & Dressler, 1997; Fisher *et al.*, 2001).

Apoptosis normally occurs in developing vertebrate organs. In the mammalian kidney, less than 3% of the nephrogenic region and the medullar papilla

exhibit an apoptotic morphology. Death cells become cleared rapidly by phagocytosis executed by the neighbouring parenchyma (Harriet *et al.*, 1993). After birth, apoptosis of kidney cells is low and contributes to maintain the structure and function of the renal tissue. After renal injury, its role is critical in healing.

Studies on newborn animals and human infants have shown that the renal cell proliferation activity decreases after birth; in preterm neonates cell proliferation of the kidney continues 40 days after birth (Rodriguez *et al.*, 2004). In the rat, the kidney is not fully developed until approximately 12 days after birth, and mechanisms involved in renal cell proliferation depend in part on the platelet-derived growth

* Corresponding author: fax: +52 492 922 6070, e-mail: herrerar@intranet.uaz.edu.mx, rafael.herreraesparza@gmail.com

factor (PDGF), that is a potent chemotactic and proliferation factor for mesenchyma-derived cells. PDGF plays a critical role in kidney development of neonatal mice, therefore the blockade of PDGFR-beta results in glomerular mesangial cell and/or pericyte apoptosis (Sano *et al.*, 2002). Additional external factors such as sodium intake, modulate the expression of pcna and the renal cortex development (Balbi *et al.*, 2004).

Because the issue of the renal cell turnover after birth is not fully defined, the present study explores the rate of apoptosis in different stages of life and addresses the relationship with cell proliferation. To clarify these important issues, the apoptotic rate was appraised in kidneys of normal Balb/c mice at different ages.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Balb/c mice were studied after birth, at the 7th and 52nd week of the extra-uterine life (n = 20 per group). Animal studies were approved by the ethics committee following the principles of laboratory animal care (NIH publication 86-23, revised 1985). Kidneys obtained by dissection were rinsed in phosphate buffer saline (PBS). The kidneys were transferred into a RNAlater[®] based buffer (Ambion Inc., Austin, TX) to avoid RNA degradation. They were then fixed with 10% formaldehyde, embedded in paraffin, cut in 4 mm sections and stained with hematoxylin and eosin. Tissue sections were also used for immunohistochemistry and TUNEL assays. Total RNA was extracted from tissue sections by TRIzol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and the RNA was used for RT-PCR amplification.

TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

Tissue sections were de-waxed by immersion in xylene for 10 min. The nuclear stripping was performed on de-waxed tissue sections by incubation for 5 min in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. The slides were incubated for 15 min in 20 µg ml⁻¹ proteinase K (dissolved in Tris-HCl buffer) and then washed in PBS. DNA fragment elongation was carried out by 60 min incubation at 37°C with 75 µl of reaction mixture (DDW, 10x TdT buffer: 30 mM Tris base, 140 mM sodium cacodylate, pH 7.2, 1 mM cobalt chloride, 1 mM DTT; 10% of the final volume) and fluorescein-11-dUTP

(0.5 mg dissolved in 1 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 7.0), and also TdT enzyme (0.3 enzyme units µl⁻¹). Termination of the reaction was performed with stop solution composed of 300 mM NaCl and 30 mM sodium citrate, pH 8.0 (Deng & Wu, 1983). Finally, the slides were washed in PBS and counterstained with 2% propidium iodide. To differentiate the true green tag of apoptotic cells from the background incorporation, cells were counterstained with 2% propidium iodide. By this procedure the non-apoptotic nuclei develop a red stain. The rate of apoptotic cells by TUNEL was the percent of cells exhibiting green tag in 100 fields. The total cellular amount resulted in the addition of red and green tagged cells.

Immunofluorescence

The expression of the fas, fasL and pcna was detected by incubation of the sections for 2 h in a 1:500 dilution of a fluorescein-labelled monoclonal anti-fasL and anti-fas (Research Diagnostics Inc, Flanders NJ) and anti-pcna antibodies (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, CA). The slides were washed, mounted, and examined using a confocal scanning microscope LSM (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Combination of fluorescein filters with excitations of 450-490 nm and rodamin filters with emissions of 515-565 nm were used. Objectives were LCI "Plan-Neofluar" and image processing was done with a Zeiss LSM Image examiner.

Oligonucleotides

The primers used for PCR were the following: fasL forward 5'-CAA GTC CAA CTC AAG GTC CAT GCC-3' and backward 5'-CAG AGA GAG CTC AGA TAC GTT TGA C-3' (Giordano *et al.*, 1997); fas forward 5'-GGT GGG TTA CAC TGG TTT ACA-3' and backward 5'-GTG CTA CTC CTA ACT GTG AC-3' (Vaishnav *et al.*, 1999); caspase 3 forward 5'-TCC AGT CGG AGG CCA GAT CTG AG-3' and backward 5'-CTG AAG CCT GCC TCC CGG GAT GA-3' (SNP000005036); dff40 forward 5'-CTC TGG GGT ACT CGT TGG AT-3' and backward 5'-ACT GCT GTT CAG ATC CGC GT-3' (Iguchi *et al.*, 2002); g3pdh forward 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3' and backward 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' (Clontech, Palo Alto, CA).

Reverse-transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from the kidney sections by acid guanidium thiocyanate/phenol/chloroform (TRIzol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD). RNA was measured by OD at 260 nm. For cDNA synthesis, 250 ng of the total RNA was incubated with 200 mM dNTP, and 0.7 μ M of the forward and backward primers were mixed with 0.5 U/20 μ l of rTth/DNA polymerase (SuperScript™ One-Step, Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA). The reverse transcription was performed at 55 °C for 30 min. The amplification of fas, fasL, caspase 3, dff40 and g3pdh cDNAs was carried out by PCR. Reaction tubes containing 25 μ l

of sample mixture were amplified in a thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp PCR system 2400, Foster City, CA) with 30 cycles under the following conditions: 94 °C for 2 min, 55 °C for 2 min and 72 °C for 1.4 min. At the end of the PCR reaction, the samples were electrophoresed in 2% agarose containing 0.5 mg ml⁻¹ ethidium bromide. PCR products were observed under UV light (Wang & Mark, 1990).

Band migration and density were documented using an image analysis system by BioRad. Pro-apoptotic transcript levels were determined by comparing with the g3pdh densitometry. Differences between samples were evaluated using the ANOVA test (Number Cruncher Statistical Systems, NCSS program).

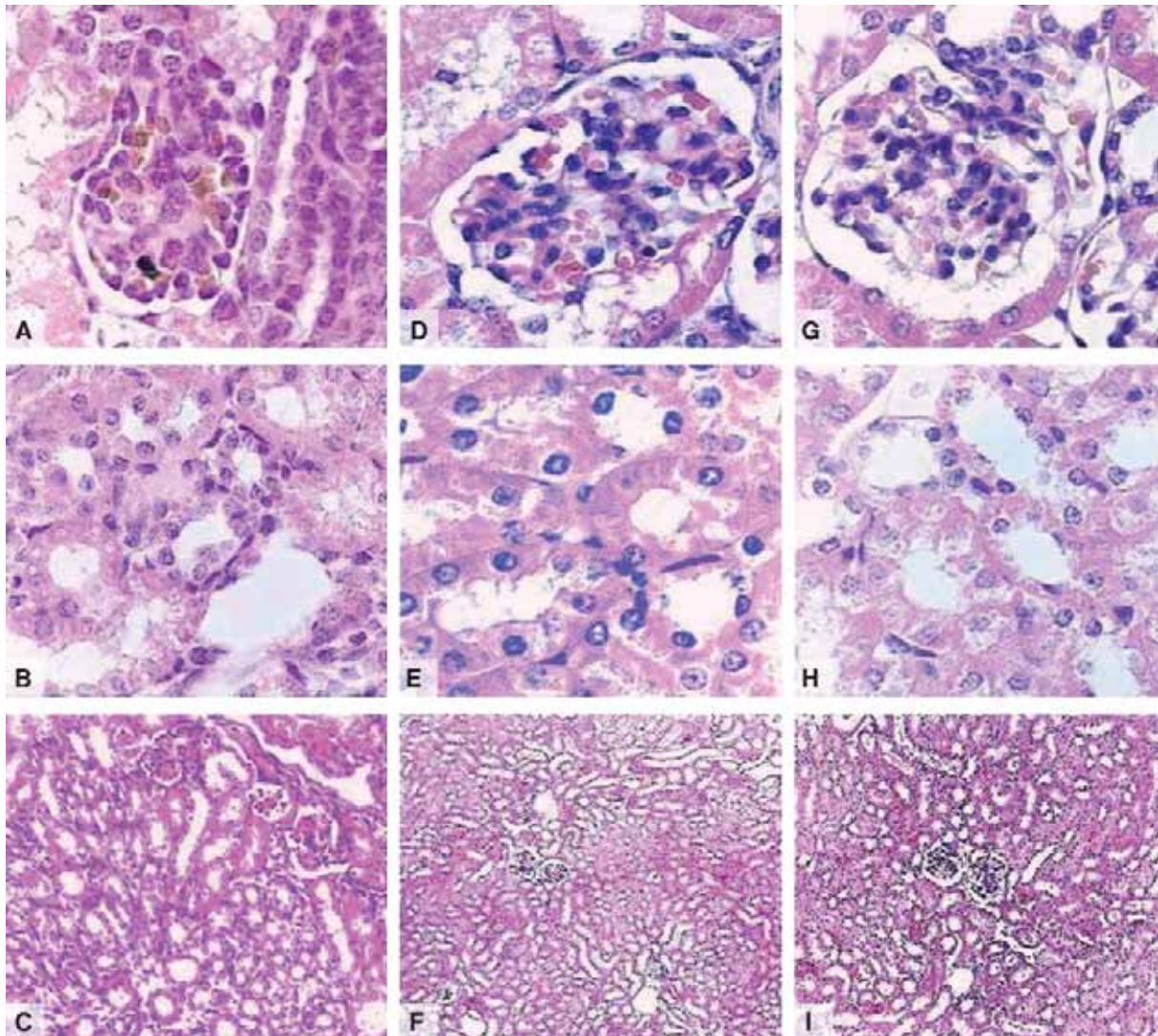


FIG. 1. Balb/c mice kidney histology. A, B, C: newborn mouse kidney; D, E, F: middle-age mouse kidney; G, H, I: elderly mouse kidney. Main differences are: the glomerulus of newborn is ovoid, in contrast to the bouquet of the fully developed glomerulus of an elderly mouse.

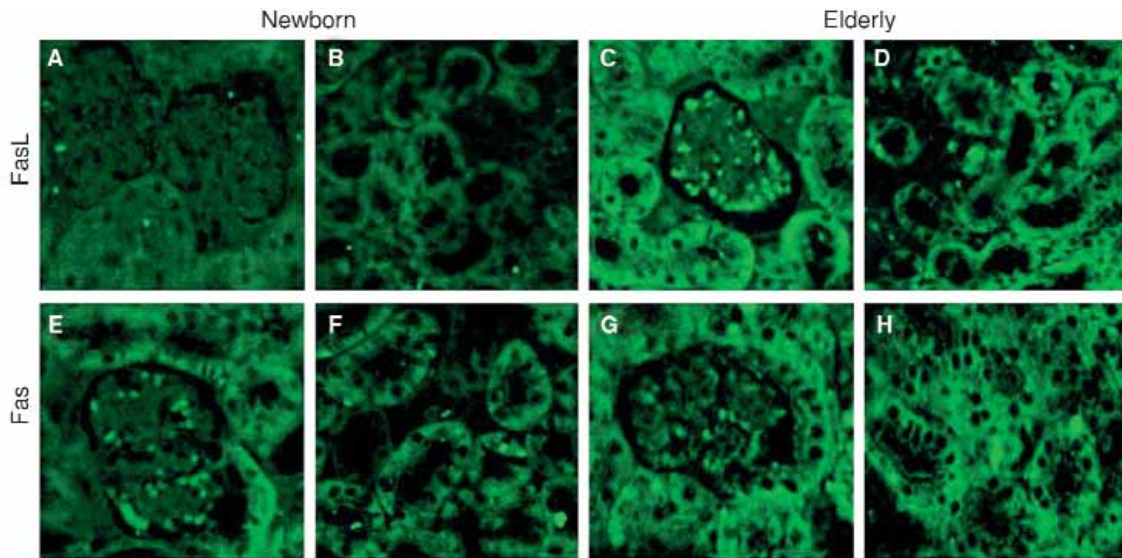


FIG. 2. The fasL and fas protein expression by direct immunofluorescence in kidneys of Balb/c mice. FasL is distributed in mesangial and endothelial glomerular cells and also in epithelial tubular cells. Fas is broadly distributed whitening glomerulus and tubules.

RESULTS

Microscopic differences between kidneys of newborn and elderly animals were detected in renal cortex. Morphological differences were observed in the glomerulus of new born mice which had an ovoid form, rather than the full developed bouquets of adult glomeruli. The tubular morphology was similar in both groups (Fig. 1).

Fas and fasL were expressed differently in the kidney. Both fas and fasL proteins were present in

the kidneys of newborn mice. FasL was faintly expressed on the surface of mesangial cells and tubules. By contrast, the fas receptor was widely distributed in the mesangial cells and the tubular epithelium. The expression of the fasL and the fas proteins was superior in the adult mice (Fig. 2).

Elderly enhances the fas pathway gene transcription. The gene expression of the fas receptor was similar in all studied groups. By contrast, the fasL, caspase 3 and dff40 transcripts were barely detected

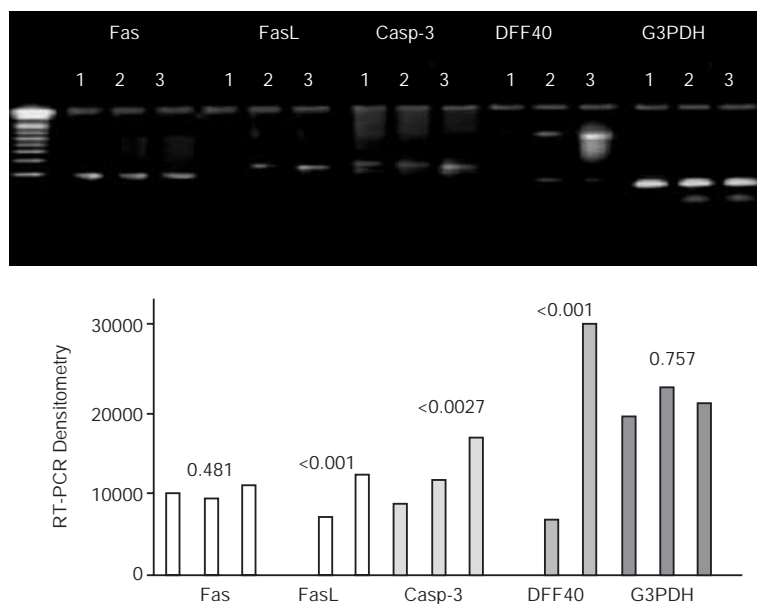


FIG. 3. A representative panel of RT-PCR amplification showing in the upper part a gel electrophoresis with RT-PCR products from fas, fasL, caspase 3 and dff40. The g3pdh correspond to the housekeeping gene. The graph of the lower part matches up with the gel electrophoresis, and shows the mean densitometry values. Group 1: newborn, 2: seven weeks old, 3: elderly mice. The p value was obtained by ANOVA.

TABLE 1. Renal pro-apoptotic gene expression at different stages of life (mean ± SD)

RT-PCR	Newborn (n = 20)	7 th week (n = 20)	52 nd week (n = 20)	p value
Fas-CD95 mRNA	10100 ± 3053	9402 ± 2874	10970 ± 3739	0.418
FasL mRNA	9.00 ± 3.74	7351 ± 2148	12240 ± 4692	< 0.001*
Caspase 3 mRNA	8878 ± 3325	11760 ± 6169	16430 ± 7692	< 0.0027*
DFF40 mRNA	14.0 ± 7.5	6999 ± 3659	29600 ± 10360	< 0.001*
PCNA mRNA	30060 ± 33.7	29430 ± 487.6	3.90 ± 4.5	< 0.001*
G3PDH mRNA	19140 ± 6312	22330 ± 7506	20480 ± 6873	0.757

* = statistically significant by ANOVA

after birth. These genes were over-regulated by elderly and transcripts were significantly increased. G3PDH housekeeping transcripts were similar in all samples (Fig. 3 and Table 1).

Apoptotic rates increase by elderly in tubular epithelium and mesangium. The rate of apoptotic cells in the control kidney of newborn mice was less than 0.0023 in 100 fields. The kidney of adult mice, exhibited a rate of 0.0576 apoptotic cells. The differences between both groups were statistically significant. Interestingly, no apoptotic tag was detected in podocytes. The tubular epithelium of adult mice exhibited

a superior apoptotic ratio, as seen in Table 2 and Fig. 4 that shows representative fields of apoptosis. However, most of the renal tissue did not show apoptotic features.

Cell proliferation is higher in the newborn. The pcna protein was used as a cell proliferation marker and was widely distributed throughout the mesangial, the glomerular epithelium and the tubuli of newborn mice. The pcna expression was declined during elderly and was almost absent in kidney samples of elderly animals. This finding was concordant with the pcna mRNA transcription which was detected only in new-

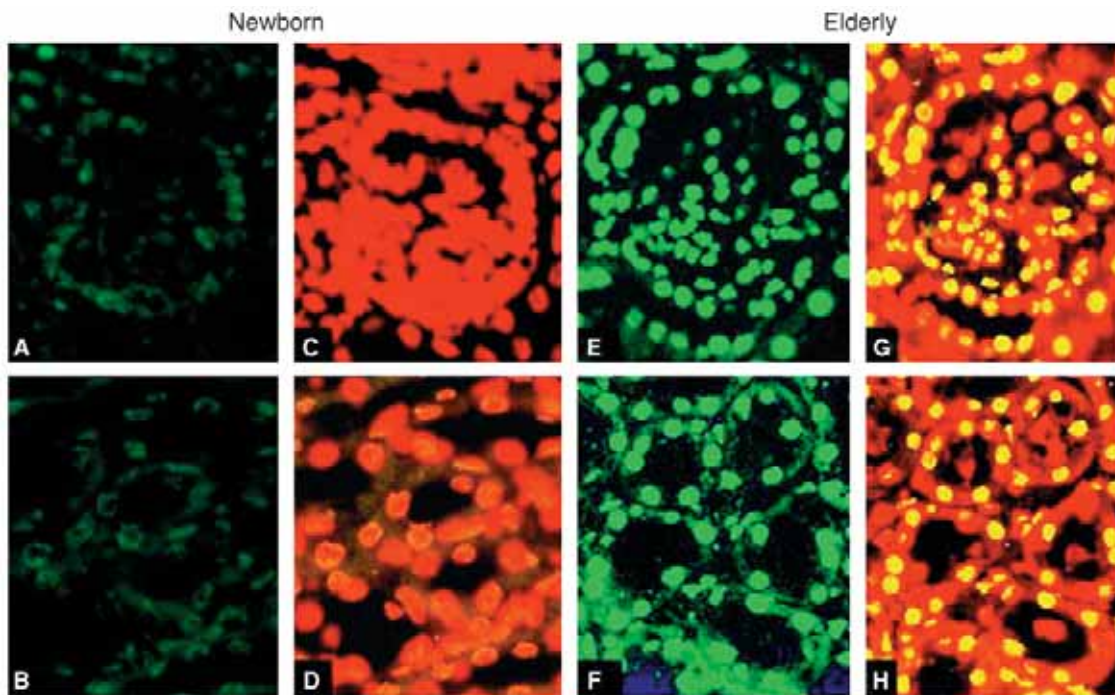


FIG. 4. Apoptotic cell features in kidneys of Balb/c mice studied by TUNEL. A, C, E and G are glomerulus; B, D, F and H are tubules. Apoptotic cells are green tagged indicating the incorporation of the fluorescent nick end labelling into apoptotic nuclear DNA fragments. Cells counterstained with 2% propidium iodide (C, D, G and H). The non-apoptotic nuclei develop a red staining and the apoptotic nuclei a yellow staining.

TABLE 2. Apoptosis of renal cells at different stages of life (mean \pm SD)

TUNEL	Newborn (n = 20)	7 th week (n = 20)	52 nd week (n = 20)	p value
Glomerular apoptotic rate	0.0023 \pm 0.0008	0.0118 \pm 0.0032	0.0576 \pm 0.0063	< 0.0001*
Tubular apoptotic rate	0.0150 \pm 0.0206	0.0550 \pm 0.0243	0.262 \pm 0.30	< 0.0001*

* = statistically significant by ANOVA

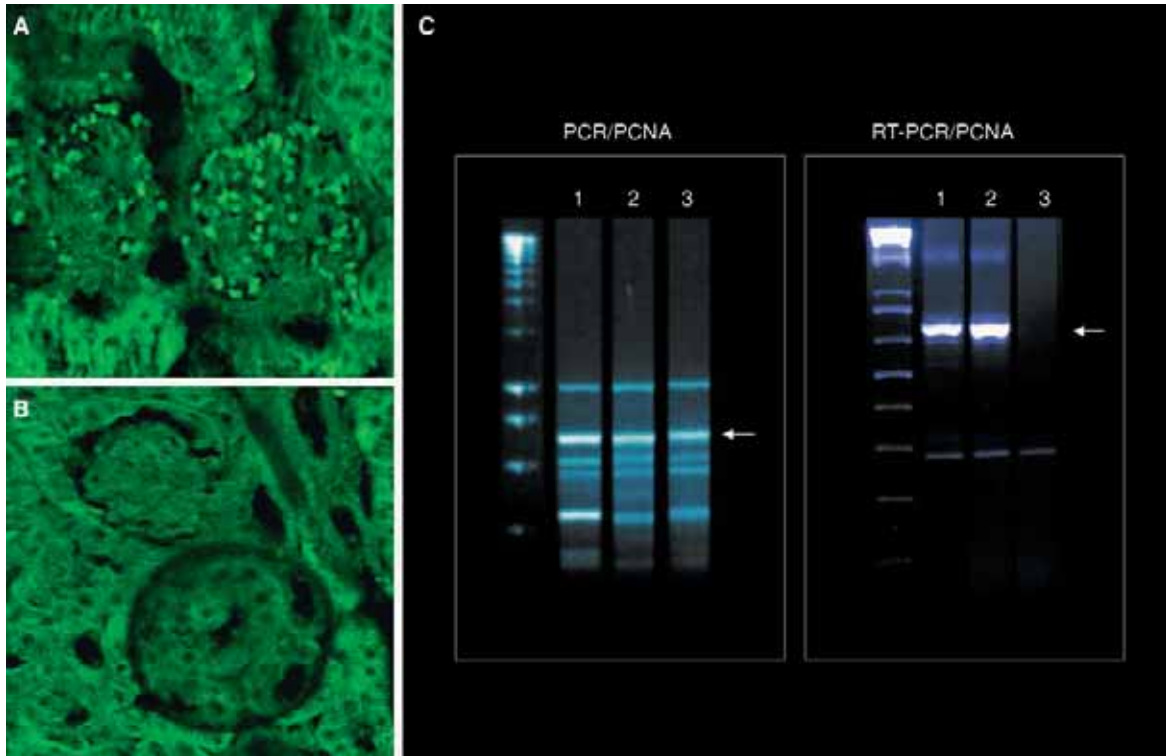


FIG. 5. The pcna expression determined by immunofluorescence in newborn (A) and aged mouse kidney (B). The constitutive pcna (C) was determined by PCR amplification using DNA extracted from kidney. The synthesized pcna was determined by RT-PCR amplification using the total renal RNA extracted from newborn (1), seven weeks old (2) and aged animals (3).

born and young animals, in contrast to the pcna transcription which was shut down in the kidneys of elderly mice (Fig. 5).

DISCUSSION

Apoptosis was studied during kidney development within the course of diverse inflammatory processes. It was demonstrated that apoptosis normally occurs in a low proportion after birth and this process progressively increases by elderly. Apoptotic cells are replaced by cell proliferation (renal cell turnover).

During embryogenesis, a TGF-beta1-dependent apoptosis in endothelial areas contributes to the development of the glomerular loop. By this mecha-

nism, the capillary lumens of the vascular bed become opened (Fierlbeck *et al.*, 2003). The mesangium is composed of a matrix with two main cell types: a bone marrow-derived phagocyte and a smooth muscle-like cell, the latter being more abundant. The mesangium maintains the structure and function of the glomerular capillary bouquet. During embryogenesis, the mesangial tissue suffers apoptosis induced by the VEGF specific endothelial cell mitogen (Kreisberg *et al.*, 1985; Yamagishi *et al.*, 2002). After birth, diverse inflammatory conditions may increase the nitric oxide (NO) and free radical concentration, a fact resulting in an abnormal increase of the mesangial apoptosis (Keil *et al.*, 2002).

By the end of the embryonic development, the renal epithelium is differentiated into tubules. A down-regulation of the bcl-X (L), bcl-w and bcl-2 genes induces tubular maturation by triggering massive apoptosis of the collecting ducts and the distal tubular epithelia. Signaling is promoted by the TGF-beta1 (Moser *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 2003). By this process, tubules achieve their definitive shape.

The glomerular cell turnover is below 1% per day. This reflects a long life span of the endothelial and mesangial structures. Concurrently, cell differentiation and trans-differentiation support this process. By cell trans-differentiation, the glomerular epithelium acquires a mesenchymal reminiscent embryonic phenotype (like-mesangioblast/myofibroblasts) and produces huge amounts of extra cellular matrix. Under the effect of IL-1, TGF-beta1, and EGF, the renal cells with an adult-mature-phenotype of the proximal tubules may regress to an embryonic stage (Pabst & Sterzel, 1983; El Nahas, 2003). Renal plasticity principally occurs during embryogenesis. After birth, it supports the structure and function of the kidney. This process can be activated by renal insults (Dai *et al.*, 2003).

Renal apoptosis depends in part on the fas receptor, which is broadly expressed on the cell surface of the mesangial cells, the tubular epithelium and the fibroblasts (Strutz & Müller, 2000). The activation of the fas receptor requires stimulation by its ligand. FasL is expressed in the renal infiltrating leukocytes and faintly in the mesangial, tubular epithelial cells, and the renal interstitial fibroblasts. Glomerular cells damaged by the immune-complexes, also express fasL. Consequently, fas receptor and fasL ligands are both present in certain areas of the kidney (French *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 1999; Lorz *et al.*, 2000). However, under homeostatic conditions the autocrine or paracrine apoptosis is unusual, because fas and fasL remain segregated in different cell compartments. The mechanisms involved in the renal autocrine expression of fasL under physiological conditions, remain largely unknown. Our results demonstrated that apoptosis of renal cells is low and is increased by elderly. Tubules display more apoptosis, probably due to the broad distribution of the fasL/ fas pair along the tubular epithelium.

Cell proliferation is superior in the kidneys of new born animals than in the kidneys of elderly animals. We infer that genes involved in cell proliferation including pcna, are down-regulated in senescent kidneys (Rodríguez *et al.*, 2004). Cellular senescence de-

scribes a phenotype with permanent and irreversible growth arrest. Such a *turn down* mechanism was described in mammalian cells in culture. This mechanism may be similar to that of senescent mammalian kidneys (Wright & Shay, 2002; Melk, 2003).

In conclusion, our results suggest that renal apoptosis is a physiological process executed by the fas/ fasL pathway, and is important to support the structure and function of the kidney. Our results provide a rational about renal development that in clinics can be applied in comprehension of the molecular mechanisms of renal pathology and the novel designs of therapeutic interventions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by PROMEP/103.5/04/2310. The Ph. D. study of JJ Bollain y Goytia was supported by CONACYT grant 114642.

REFERENCES

- Balbi AP, Costa RS, Coimbra TM, 2004. Postnatal renal development of rats from mothers that received increased sodium intake. *Pediatric nephrology*, 19: 1212-1218.
- Dai C, Yang J, Liu Y, 2003. Transforming growth factor-beta1 potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of Smad signaling. *Journal of biological chemistry*, 278: 12537-12545.
- Deng GR, Wu R, 1983. Terminal transferase: use in the tailing of DNA and for in vitro mutagenesis. *Methods in enzymology*, 100: 96-116.
- El Nahas M, 2003. Kidney remodelling and scarring: the plasticity of cells. *Nephrology dialysis transplantation*, 18: 1959-1962.
- Fierbeck W, Liu A, Coyle R, Ballermann BJ, 2003. Endothelial cell apoptosis during glomerular capillary lumen formation in vivo. *Journal of the american society of nephrology*, 14: 1349-1354.
- Fisher CE, Michael L, Barnett MW, Davies JA, 2001. Erk MAP kinase regulates branching morphogenesis in the developing mouse kidney. *Development*, 128: 4329-4338.
- French LE, Hahne M, Viard I, Radlguber G, Zanone R, Becker K, Müller C, Tschopp J, 1996. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: Ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *Journal of cell biology*, 133: 335-343.
- Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A, 1997. Potential involvement of Fas and its ligand in pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science*,

- 275: 960-963.
- Harriet S, Coles R, Burne JF, Raff MC, 1993. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development*, 118: 777-784.
- Iguchi K, Hirano K, Ishida R, 2002. Activation of caspase-3, proteolytic cleavage of DFF and no oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic Molt-4 cells. *Journal of biochemistry*, 131: 469-475.
- Keil A, Blom IE, Goldschmeding R, Rupperecht HD, 2002. Nitric oxide down-regulates connective tissue growth factor in rat mesangial cells. *Kidney international*, 62: 401-411.
- Kreisberg JI, Venkatachalam M, Troyer D, 1985. Contractile properties of cultured glomerular mesangial cells. *American journal of physiology*, 249: F457-463.
- Lechner MS, Dressler GR, 1997. The molecular basis of embryonic kidney development. *Mechanisms of development*, 62: 105-120.
- Lorz C, Ortiz A, Justo P, González-Cuadrado S, Duque N, Gómez-Guerrero C, Egido J, 2000. Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli. *Journal of the american society of nephrology*, 11: 1266-1277.
- Melk A, 2003. Senescence of renal cells: molecular basis and clinical implications. *Nephrology dialysis transplantation*, 18: 2474-2478.
- Moser M, Pscherer A, Roth C, Becker J, Mucher G, Zerres K, Dixkens C, Weis J, Guay-Woodford L, Buettner R, Fassler R, 1997. Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2b. *Genes and development*, 11: 1938-1948.
- Ortiz A, Lorz C, Egido J, 1999. New kids in the block: the role of FasL and Fas in kidney damage. *Journal of nephrology*, 12: 150-158.
- Pabst R, Sterzel RB, 1983. Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney international*, 24: 626-631.
- Rodriguez MM, Gomez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE, 2004. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatric and developmental pathology*, 7: 17-25.
- Sano H, Ueda Y, Takakura N, Takemura G, Doi T, Kataoka H, Murayama T, Xu Y, Sudo T, Nishikawa S, Nishikawa S, Fujiwara H, Kita T, Yokode M, 2002. Blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta pathway induces apoptosis of vascular endothelial cells and disrupts glomerular capillary formation in neonatal mice. *American journal of pathology*, 161: 135-143.
- Schaefer L, Beck KF, Raslik I, Walpen S, Mihalik D, Micegova M, Macakova K, Schonherr E, Seidler DG, Varga G, Schaefer RM, Kresse H, Pfeilschifter J, 2003. Biglycan, a nitric oxide-regulated gene, affects adhesion, growth, and survival of mesangial cells. *Journal of biological chemistry*, 278: 26227-26237.
- Strutz F, Müller GA, 2000. Transdifferentiation comes of age. *Nephrology dialysis transplantation*, 15: 1729-1731.
- Vaishnav AK, Orlinick JR, Chu JL, Krammer PH, Chao MV, Elkon KB, 1999. The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations. *Journal of clinical investigation*, 103: 355-363.
- Wang AM, Mark DF, 1990. Quantitative PCR. In: Innis MA, Gelfand DH, Snisky JJ, Withe TJ, eds. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, USA: 70-75.
- Wright WE, Shay JW, 2002. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nature biotechnology*, 20: 682-688.
- Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, Makita Z, 2002. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *Journal of biological chemistry*, 277: 20309-20315.