

**EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS MARCADORES VIMENTINA,
CD10, WT1 Y KI67 EN PODOCITOPATÍAS CAUSANTES DE SÍNDROME
NEFRÓTICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DE UN CENTRO DE
REFERENCIA DE LA COSTA ATLÁNTICA**

MARÍA RESTREPO JALAL

ELIAS ZAKZUK MARTÍNEZ

SHIARA ZARUR TORRALVO

ELIAS JOSÉ ZAKZUK MARTÍNEZ

3106277529

EJZAKZUK@GMAIL.COM

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL NORTE

KM 5 ANTIGUA VÍA A PUERTO COLOMBIA, ATLÁNTICO

INSTITUCIÓN FINANCIADORA

CLINICA DE LA COSTA E INVESTIGADORES.

Resumen

Introducción: El síndrome nefrótico idiopático es el resultado de lesiones en los podocitos o podocitopatías. Los principales tipos de lesión son enfermedad de cambios mínimos, glomeruloesclerosis focal y segmental y glomerulonefritis mesangial difusa. En Colombia presenta una prevalencia de 16 de cada 100.000 en < 16 años, estudios realizados por la Universidad del Valle reporto una distribución de la siguiente manera: ECM en 40%, PMD 35%, GESF 7%. A pesar de esto no se cuenta una epidemiología local. En muchos casos se puede identificar el tipo de lesión, y cuando no, se debe recurrir a otras técnicas, como la microscopía electrónica e inmunohistoquímica.

Objetivos: Estimar el patrón de expresión de biomarcadores (vimentina, Cd10, Wt1, Ki67) por medio de inmunohistoquímica, en pacientes pediátricos entre 0 y 18 años de edad diagnosticados con síndrome nefrótico, en un centro de referencia de la Costa Atlántica entre los años 2008-2015.

Materiales y métodos: Diseño observacional descriptivo y retrospectivo; a partir de análisis de bases de datos de Síndrome Nefrótico con biopsias renales en pacientes entre 0 y 18 años de edad y realización de pruebas inmunohistoquímica.

Resultados: Se analizaron 28 muestras y una muestra control por inmunohistoquímica y morfometría, el control marcó positivo para los marcadores vimentina, Cd10, Wt1 y negativo para Ki67, con un porcentaje de expresión para Wt1 de 6,8%, el cual fue el único marcador sometido a un análisis completo. Por morfometría, WT1 tuvo un promedio de expresión en ECM de 6,9%, en GEFS de 10,3% y en PMD de 8,9%. Según el grupo etario, el síndrome nefrótico se presentó predominantemente en la edad escolar. El 52% de los pacientes eran de sexo masculino, con un 37% para GEFS y PMD. En mujeres el tipo de lesión más común es la ECM con un 45%. Solo 4% de los pacientes eran cortico-resistente.

Conclusión: Se evidenció una tendencia al aumento en la prevalencia de GEFS. Los resultados obtenidos no fueron los mejores esperados, pese al inconveniente de la tinción, los glomérulos esclerosados presentan un porcentaje menor de expresión al WT1 en relación a la muestra control, sin embargo no se puede realizar una adecuada interpretación hacia un perfil de expresión debido a la gran cantidad de tinciones que resultaron inconclusas.

Palabras claves: síndrome nefrótico, podocitopatias, WT1, KI67, CD10, Vimentina, pediatría.

INTRODUCCIÓN

El síndrome nefrótico idiopático en pediatría, según la asociación española de pediatra es una entidad clínica que se caracteriza por proteinuria ($>40 \text{ mg/m}^2\text{sc/h}$), hipoalbuminemia ($<2,5 \text{ g/dl}$), edema, dislipidemia y alteraciones endocrinas en niños de 12 meses a 16 meses **(1)**. Es una enfermedad común en Colombia con una prevalencia de 16 de cada 100.000 niños < 16 años, afectando principalmente a varones, presenta un pico máximo de edad entre los 2 y los 8 años **(2)**, la cual puede variar según el tipo de lesión causante de este síndrome. Las podocitopatías, es decir, aquellas lesiones o alteraciones que afectan a los podocitos (estructuras encargadas del funcionamiento del glomérulo, especialmente en mantener la barrera de filtración), son la principal causa de dicha patología.

Son 3 las lesiones histológicas causantes de síndrome nefrótico que se observan por una alteración de los podocitos: Enfermedad de cambios mínimos (ECM), glomeruloesclerosis focal y segmental (GEFS), glomerulonefritis proliferativa mesangial difusa (PMD). En el momento que se sospeche de este síndrome, se busca descartar cualquier proceso infeccioso, se ordenan paraclínicos, en los cuales se puede incluir con una biopsia para determinar el tipo de lesión. Una vez confirmado el diagnóstico se recomienda el uso de esteroides, como tratamiento, el cual es el mejor indicador pronóstico de la función renal a largo plazo. El esquema recomendado en niños es cuatro semanas a $60 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ (repartidos en tres dosis) seguido por otras cuatro semanas a $40 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, en días alternos (1 dosis al día) **(1)**. De acuerdo con la respuesta al tratamiento y la reaparición de los síntomas, principalmente de la proteinuria, se puede clasificar en: Cortico-sensible (si hay una respuesta a éstos en las primeras 4 semanas de haberlos iniciado), cortico-resistente (si no hay respuesta a esteroides pasadas las primeras 4 semanas de haberlos iniciado), recaídas frecuentes (aparición clínica de síntomas y proteinuria en más de dos ocasiones en seis meses o cuatro en un año), recaídas espaciadas (si la frecuencia es menor que la descrita anteriormente), cortico-dependiente (recaída ocurre mientras que el tratamiento con esteroides es destetado o dentro de 2 semanas después de interrumpir el tratamiento) y resistente tardío (se presenta

tras una de las recaídas y luego no hay remisión de esta, habiendo sido cortico sensible en su inicio).(1)

La ECM se considera la lesión histológica predominante, con una prevalencia de 90% en menores de 10 años, presenta un 90% de sensibilidad a corticoides y un 10% puede presentar resistencia, evolucionando a insuficiencia renal un 30%-50%(1, 3, 4). En segundo lugar se encuentra la GEFS en edades entre los 6 a los 12 años con una prevalencia de 20%, la cual ha ido en aumento en los últimos años, además de esto según la población estudiada puede llegar a presentar hasta un 70% de resistencia a corticoides (4). En Colombia se cuenta con estudios que describen la distribución de estas lesiones, uno de estos realizado por la fundación cardio-infantil de Bogotá con una duración de 14 años publicado en el año 2013 revelo una prevalencia de ECM de 24.2%, de los cuales el 18,7% eran cortico resistentes (2). Otro estudio realizado por el hospital universitario del Valle en el año 2005 revelo que se contaban con 85 pacientes pediátricos que ingresaron entre los años de 1986 a 2002, lo cuales fueron estudiados por histopatología renal se distribuían de la siguiente manera, ECM en 40%, PMD 35%, GESF 7% (5) Un estudio realizado por Arias y colaboradores, en la ciudad de Medellín entre los años de 1998-2007, en los que se contaban con 302 biopsias de niños menores de 15 años encontraron en orden de frecuencia lo siguiente: GEFS 28,7%, ECM 20,8%. A pesar de esto en Barranquilla y su área de influencia no se cuenta con información de las características epidemiológicas de las diferentes lesiones histológicas (3).

La biopsia renal permite realizar el diagnóstico definitivo, permitiendo identificar el tipo de lesión histológica, La ECM se caracteriza por glomérulos normales a nivel de microscopia óptica y borramiento de los procesos podocitarios acompañado de condensación del citoesqueleto de actina a nivel de la microscopia electrónica, por el contrario, la GEFS se caracteriza por cicatrices focales (sólo en algunos glomérulos) y segmentarias a nivel del penacho capilar con acumulación de matriz extracelular, sinequias entre el penacho capilar y la capsula de Bowman, PMD se observa una expansión del mesangial como producto de una acumulación de proteínas en la matriz extracelular, sumado a una hipertrofia e hiperplasia leve de

los podocitos **(6)**. Estas lesiones se pueden observar por medio de microscopia óptica, sin embargo en la ECM, por no presentar características evidentes, o debido a un descuido del patólogo, se puede pasar por alto su diagnóstico, para lo cual se tiene como una alternativa la microscopia electrónica, siendo esta muy costosa y poco asequible.

Aunque la biopsia renal es el principal método utilizado, para el diagnóstico de la GEFS, pero no para la ECM, esta tiene unos requisitos, para que arroje una muestra ideal, además de una serie de inconvenientes, dado que se necesitan como mínimo en la muestra que será observada por microscopia óptica, 10 glomérulos cuando se está abordando al paciente con glomerulopatía, con el fin de poder describir sus características histopatológicas. Sin embargo, hay situaciones en las cuales se tome la muestra, salgan los 10 glomérulos, pero ésta, provenga de una zona del riñón que no se encuentra afectada, o no se logre conseguir un tamaño adecuado de la muestra (1 a 2 mm de diámetro por 1 a 2 cm de longitud) **(7)**.

En la actualidad existen nuevas técnicas que permiten analizar las muestras de biopsias de cualquier tejido. Por medio de la inmunohistoquímica, una técnica la cual utiliza anticuerpos con una enzima que se activa en el momento que el anticuerpo se une a su sustrato permitiendo visualizar su unión a nivel del microscopio. Esta es una técnica que se aprovecha de la utilidad de los anticuerpos monoclonales, y de la capacidad de teñir el tejido cuando se unen a su sustrato, para evidenciar lesiones tumorales, proliferación celular, daños a nivel de una estructura etc. El principal inconveniente de esta técnica es el requisito de tener conocimiento adecuado sobre el anticuerpo monoclonal, en que situaciones este se va a expresar, en cuales no y en cuales estructuras se expresa. Ejemplo de estos marcadores que se expresen a nivel de los podocitos los cuales usaremos en nuestro estudio: WT1 (se expresa en podocitos maduros bien diferenciados) **(8)**, KI 67 (se expresa en células que se encuentren en mitosis) **(9)**, Vimentina (proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto) **(10)**, CD10 (junto con otros marcadores puede ayudar en la interpretación de la ontogénesis renal).**(11-12)**, como lo demuestra un estudio realizado a la glomerulonefritis colapsante, en

donde el estudio histológico se completó con marcadores inmunohistoquímicos: el epitelio visceral hiperplásico expresó un fenotipo no encontrado en otras formas de lesión podocitaria (enfermedad de cambios mínimos, GM Membranosa, etc), sólo hallado en el riñón fetal. En este caso se presentaba, una pérdida de marcadores de maduración (vimentina, CALLA o sinaptopodina) con reexpresión de marcadores de proliferación (Ki 67) o desdiferenciación (citoqueratinas, Cam 5.2), incluso, adquiriendo inmunofenotipo macrofágico **(13)**.

Por esto el objetivo de nuestro estudio es estimar el patrón de expresión de biomarcadores (vimentina, Cd10, Wt1, Ki67) por medio de inmunohistoquímica, en pacientes pediátricos entre 0 años y 18 años de edad diagnosticados con síndrome nefrótico, en un centro de referencia de la Costa Atlántica entre los años 2008-2015, además de proporcionar información acerca de la distribución epidemiológica de los diferentes tipos de lesiones histológicas de las podocitopatías. Con el fin de enriquecer y desarrollar conceptos y conocimientos acerca de la inmunoexpresión de los biomarcadores (vimentina, Cd10, Wt1, Ki67) en presencia de podocitopatías, en el diagnóstico temprano de éstas en pacientes pediátricos cuando aún no se ha evidenciado daño de la estructura, teniendo en cuenta las dificultades de diagnóstico actuales y los costos de la microscopía electrónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo esta investigación se escogió usar un modelo de estudio observacional descriptivo y retrospectivo, cuya población fue la totalidad de pacientes pediátricos diagnosticados con glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de cambios mínimos o proliferación mesangial difusa, cuyo diagnóstico se hizo a través de microscopía óptica de biopsia renal, de la Clínica de la Costa (Barranquilla-Colombia), los cuales se encontraban consignados en la base de datos de dicho centro; además debían cumplir con los criterios de inclusión: pacientes pediátricos (entre 0 y 18 años), pacientes con biopsia renal con hallazgos de síndrome nefrótico con características histopatológicas de GEFS, ECM o PMD, biopsia renal realizada entre enero de 2008 y diciembre de 2015.

Para los registros epidemiológicos se calcularon los porcentajes de presentación de cada patología según las variables demográficas (sexo y edad).

Luego se seleccionaron aquellos reportes de patología que contaban con reservas de tejido en los bloques de parafina para su tinción con los marcadores estudiados (Vimentina, WT1, Cd10 y Ki67); una vez se realizaron las tinciones, las placas fueron analizadas por microscopía óptica, descartando aquellas que por la poca cantidad de tejido almacenada, no tenían glomérulos y, por consiguiente eran imposibles de analizar.

Se tomaron fotografías de cada placa con el equipo Nikon Eclipse 50i, el cual arrojó imágenes que posteriormente se analizaron usando la técnica de morfometría en el software DensitoQuat, que identificó el porcentaje de expresión de cada marcador en las muestras; estos datos se consignaron en tablas bivariadas que fueron analizadas usando Microsoft Excel y EpilInfo para obtener el porcentaje de expresión de cada marcador según el tipo de lesión.

Según la resolución N° 008430 de 1993, el proyecto se clasifica como una investigación sin riesgo, al ser un estudio retrospectivo en el cual no se modifican o intervienen en las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio. La información recogida durante la investigación se mantendrá confidencial y solo los investigadores tendrán acceso a ella.

RESULTADOS.

Dentro de los datos epidemiológicos hallados en la base de datos de la Clínica de la Costa en Barranquilla, la cual reporta los casos de síndrome nefrótico en pacientes de 0 a 18 años ocurridos entre los años 2008 a 2015, con sus diagnósticos de patología realizados por microscopía electrónica, se clasificaron 42 diagnósticos según su presentación por grupo etario y sexo.

Según la distribución por grupo etario, documentado en la **tabla 1**, se halló que en los lactantes el 2,3% (1), de los casos de síndrome nefrótico fue producto de ECM, el 4,7% (2) de GEFS y el 9,5% (4) de PMD, ubicando a los pacientes en este grupo

como el 16,6% (7) del total de los casos reportados; en los pre-escolares el 7,1% (3) se debió a ECM, el 11,9% (5) a GEFS y el 7,1% (3) a PMD, conformando los pre-escolares el 26,1% (11) de los casos estudiados; en los escolares el 19,04% (8) correspondió al diagnóstico de ECM, el 9,5% (4) a GEFS y otro 9,5% (4) a PMD, alcanzando un 38,09% (16) del total; por último en los adolescentes la ECM se presentó en el 4,7% (2), GEFS en el 9,5% (4) y PMD en el 4,7% (2), ocupando el 19,04% (8) de la muestra total. Dichos resultados se representaron en una gráfica de barras compuesta.

Tabla 1. FRECUENCIA DEL TIPO DE LESIÓN PODOCITARIA SEGÚN EL GRUPO ETARIO.

	ECM	Porcentaje	GEFS	Porcentaje	PMD	Porcentaje	Total	Porcentaje
Lactante	1	2.3%	2	4.7%	4	9.5%	7	16.6%
Pre-escolar	3	7.1%	5	11.9%	3	7.1%	11	26.1%
Escolar	8	19.04%	4	9.5%	4	9.5%	16	38.09%
Adolescente	2	4.7%	4	9.5%	2	4.7%	8	19.04%
Total	14	33.3%	15	35.7%	13	30.9%	42	100%

La distribución según el sexo, analizada a partir de la **tabla 2** y representada en gráficas de pastel, se halló de la siguiente manera: en el sexo femenino la ECM se presentó en el 45% (9), la GEFS en el 35% (7) y la PMD en el 20% (4) de un total de 20 casos en este género; en el sexo masculino la EMC fue la causante del 27% (6), la GEFS del 37% (8) y la PMD del 36% (8) de los 22 casos estudiados en este género.

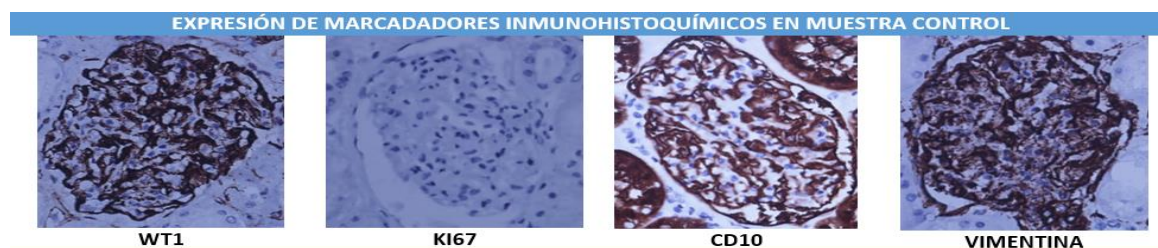


FIGURA 1 EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICO EN MUESTRA CONTROL

Tabla 2. FRECUENCIA DEL TIPO DE LESIÓN PODOCITARIA SEGÚN EL SEXO.

SEXO	ECM	GEFS	PMD	TOTAL
Femenino	9	7	4	20
Masculino	6	8	8	22
Total	15	15	12	42

Entre las 42 muestras incluidas en la base de datos utilizada, sólo 27, además de la muestra control, fueron aptas para la realización del estudio inmunohistoquímico, esto debido a la cantidad de tejido renal que aún permanecía almacenado; cada muestra se ve realcionada con sus resultados para cada marcador en la **tabla 3**.

Una vez realizada la morfometría se observó que entre aquellas tincionadas con el marcador WT1, una muestra con diagnóstico de GEFS tenía todos los glomérulos esclerosados, en una con diagnóstico de PMD no se hallaron glomérulos y 3 muestras con diagnóstico de PMD tuvieron resultados inconclusos en la morfometría, mientras que en la muestra control y en las 22 muestras restantes el marcador WT1 fue positivo; su porcentaje de expresión fue del 6,8% (rango de 2% a 7,9%) en la muestra control, mientras que entre las 8 muestras con diagnóstico de ECM 6 se ubicaron en el mismo rango entre 2% a 7,9%, 2 se ubicaron en un rango entre el 8% al 13,9% y ninguna se ubicó en el rango del 14% al 20% de expresión, la mediana fue de 6,6% y el promedio de 6,9%; entre las 10 muestras con diagnóstico de GEFS 4 estuvieron en un rango del 2% al 7,9%, 5 en un rango del 8% al 13,9% y una en un rango del 14% al 20%, la mediana fue de 9,8% y el promedio fue de 10,3%; de las 9 muestras con diagnóstico de PMD 4 tuvieron una expresión del 2% al 7,9%, 4 del 8% al 13,9% y una del 14% al 20% del marcador WT1, la mediana fue de 8,5% y el promedio de 8,9%; estos datos representan los consignados en las tablas 4, 5, 6 y 7.

TABLA 3. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS MARCADORES T1, KI67, VIMENTINA Y CD10 EN PODOCITOPATÍAS CAUSANTES DE SÍNDROME NEFRÓTICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DE UN CENTRO DE REFERENCIA DE LA COSTA ATLÁNTICA DURANTE LOS AÑOS 2008 A 2015.

PROTOCOLO	DIAGNOSTICO	EDAD	SEXO	WT1	PORCENTAJE WT1	KI 67	VIMENTINA	CD10
CONTROL	Riñón sano	3 AÑOS	F	POSITIVO	8.8%	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
1423	GEFS	8 AÑOS	M	POSITIVO	10.1%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
130	GEFS	2 AÑOS	F	POSITIVO	9.6%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1186	GEFS	5 AÑOS	M	POSITIVO	8.8%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
2964	GEFS	15 AÑOS	F	POSITIVO	13.8%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
2225	GEFS	14 AÑOS	F	GLOMERULO ESCLEROSADO	2.08%	GLOMERULO ESCLEROSADO	GLOMERULO ESCLEROSADO	GLOMERULO ESCLEROSADO
1979	GEFS	4 MESES	F	POSITIVO	7.9%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
484	GEFS	10 AÑOS	M	POSITIVO	11.3%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1840	GEFS	12 AÑOS	M	POSITIVO	13.4%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1573	GEFS	3 AÑOS	M	POSITIVO	6.82%	NO HAY GLOMERULOS	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1814	GEFS	4 MESES	M	POSITIVO	17%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
462	ECM	12 AÑOS	F	POSITIVO	4.93%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1502	ECM	1 AÑO	M	POSITIVO	11.25%	NEGATIVO	POSITIVO	INCONCLUSO
682	ECM	6 AÑOS	M	POSITIVO	5.1%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
918	ECM	7 AÑOS	F	POSITIVO	6.3%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1098	ECM	4 AÑOS	M	POSITIVO	9.1%	NEGATIVO	POSITIVO	INCONCLUSO
393	ECM	8 MESES	F	POSITIVO	4.4%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
2358	PMD	3 AÑOS	M	POSITIVO	7.7%	NO HAY GLOMERULOS	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1387	PMD	6 AÑOS	M	POSITIVO	7%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1097	PMD	6 AÑOS	M	NO HAY GLOMERULOS	0%	NO HAY GLOMERULOS	NO HAY GLOMERULOS	NO HAY GLOMERULOS
913	PMD	13 AÑOS	M	POSITIVO	14.3%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
1717	PMD	6 MESES	F	POSITIVO	11.2%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
277	PMD	3 AÑOS	M	POSITIVO	4.1%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
568	PMD	6 AÑOS	F	INCONCLUSO	9.8%	NEGATIVO	POSITIVO	INCONCLUSO
974	PMD	4 AÑOS	F	INCONCLUSO	8.5%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO
2515	PMD	4 AÑOS	F	INCONCLUSO	12%	NEGATIVO	POSITIVO	INCONCLUSO
313	PMD	1 AÑO	M	POSITIVO	6%	NEGATIVO	INCONCLUSO	INCONCLUSO

Para el marcador Ki67 la muestra control fue negativa, en una muestra con diagnóstico de GEFS todos los glomérulos estaban esclerosados, en una con diagnóstico de GEFS y 2 con diagnóstico de PMD no se encontraron glomérulos y en las 23 muestras restantes el marcador fue negativo.

Para el marcador Vimentina la muestra control fue positiva, una muestra con diagnóstico de GEFS tuvo todos los glomérulos esclerosados, en una muestra con diagnóstico de PMD no se encontraron glomérulos, 4 dieron resultados positivos para la expresión del marcador, entre ellas 2 con diagnóstico de ECM y 2 con diagnóstico de PMD, las 21 muestras restantes tuvieron resultados inconclusos de la marcación.

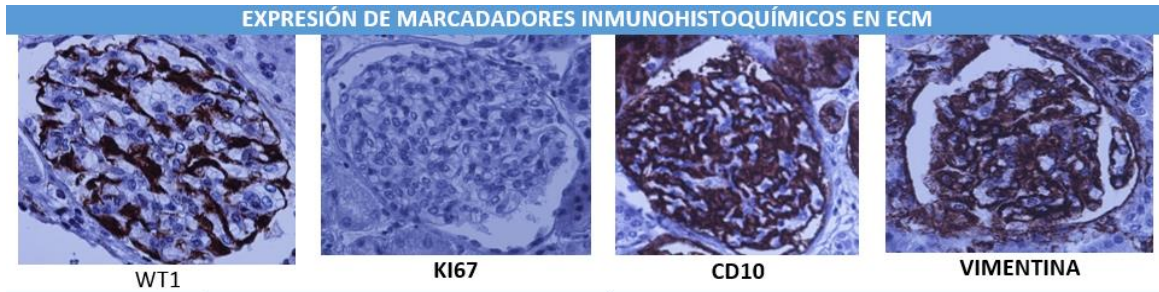


FIGURA 2 EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICO EN ECM

Con respecto al marcador CD10 la muestra control tuvo una expresión positiva, se halló una muestra con diagnóstico de GEFS con todos los glomérulos esclerosados, en una muestra con diagnóstico de PMD no se hallaron glomérulos y las 25 muestras restantes tuvieron resultados inconclusos para este marcador.

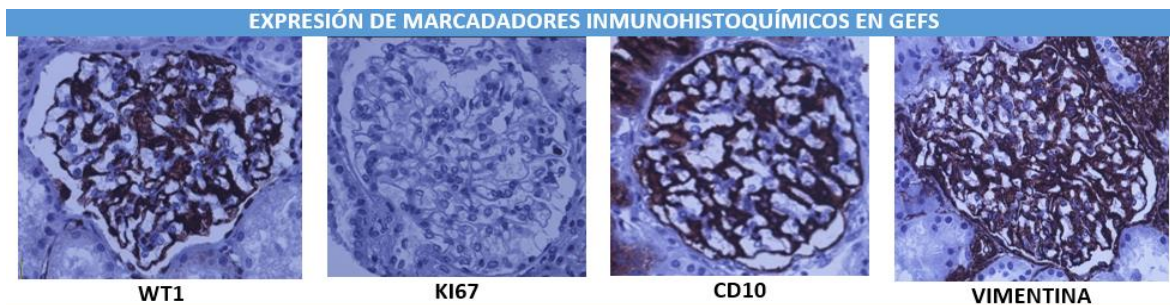


FIGURA 3 EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICO EN GEFS

DISCUSIÓN

Como se esperaba, la expresión del marcador WT1 estuvo presente en todas las muestras aptas para el estudio, lo que indica que todos los glomérulos analizados contenían podocitos maduros bien diferenciados. Habiendo entonces mostrado que la expresión de WT1 en las muestras se encontró igual e incluso mayor que en la muestra control, podemos decir que, de las patologías estudiadas, la ECM tuvo una expresión parecida a la de la muestra control; por otra parte tenemos la PMD, cuyo

porcentaje de expresión se ubicó en un punto intermedio y la GEFS que tuvo la mayor expresión del marcador WT1 entre las patologías estudiadas, lo cual no coincide con lo expresado en la literatura, que propone que el grado de expresión debe ser menor cuanto mayor sea la lesión en los podocitos; por tal motivo se requieren más estudios para una determinación más exacta de la expresión del WT1 y esclarecer la razón de una expresión aumentada en presencia de lesión podocitaria **tabla 4**. Con respecto al marcador Ki67 se esperaba que no se expresara, ya que este es un marcador de proliferación, el cual se encuentra presente en las células en mitosis y como se mencionó anteriormente en este texto, se corroboró que los podocitos en las muestras eran células maduras y bien diferenciadas, es decir, se encontraban en la fase 0 de su ciclo. Se apreció cómo en ninguna de las 3 patologías estudiadas se expresó este marcador, de la misma manera ocurrió en la muestra control.

La expresión de los marcadores Vimentina y CD10 en las muestras glomerulares, a pesar de que la muestra control diera positiva, no se pudo evaluar, ya que se asume que la concentración de los marcadores era muy elevada, lo cual no sólo tiñó los podocitos si no también otras estructuras del glomérulo y sus alrededores, haciendo imposible realizar un conteo minucioso de los podocitos y la visualización de su estructura. Se sospecha que fue debido a un error de laboratorio, al usar marcadores cuya forma comercial no permite diluciones.

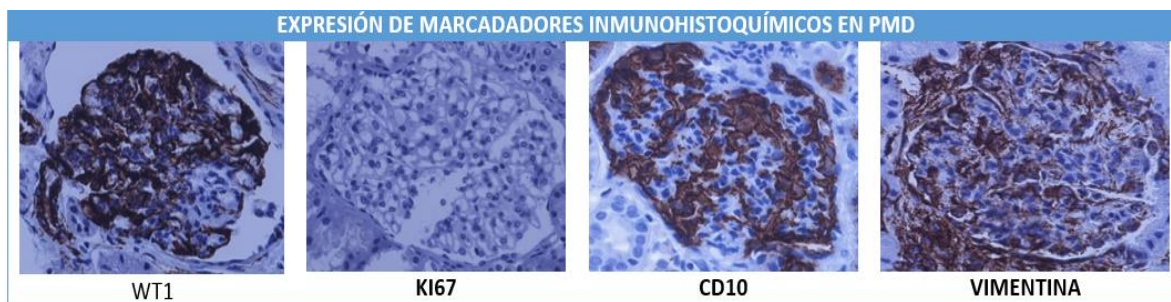


FIGURA 4 EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICO EN PMD

TABLA 4. RELACIÓN DE EXPRESIÓN DE WT1 EN LA MUESTRA CONTROL, ECM, GEFS Y PMD.

DIAGNÓSTICO	MARCADOR	PORCENTAJE DE EXPRESION DEL WT1			
		2%-7.9%	8-13.9%	14%-20%	TOTAL
CONTROL	WT1	1			1
ECM		6	2	0	8
GEFS		4	5	1	10
PMD		4	4	1	9

En el centro de referencia de la costa Atlántica donde se llevó a cabo el estudio, se encontró mayor frecuencia de síndrome nefrótico en el sexo masculino, con un promedio de edad de presentación en grupo etario de escolares, similar a los datos descritos en la literatura **(1)**. La lesión con mayor prevalencia fue la GEFS (34.7%) de los cuales 2 pacientes eran cortico-resistentes (4%), indicando un aumento en la frecuencia de esta enfermedad, como se ha reportado en los últimos años **(4)**. Según el sexo, el tipo de lesión predominante para el sexo femenino es la ECM y para el sexo masculino es la GEFS junto con la PMD.

En comparación con los últimos estudios realizados en Colombia, entre los años 1986 al 2016, realizados por la Universidad del valle en Cali (año 1986-2002), Fundación Cardio-infantil en Bogotá (año 1999- 2013) y en Medellín (año 1998-2007) **(tabla 4)**, nuestro estudio evidencio un aumento en la prevalencia de la GEFS de un 7% a un 33% en los últimos 10 años.

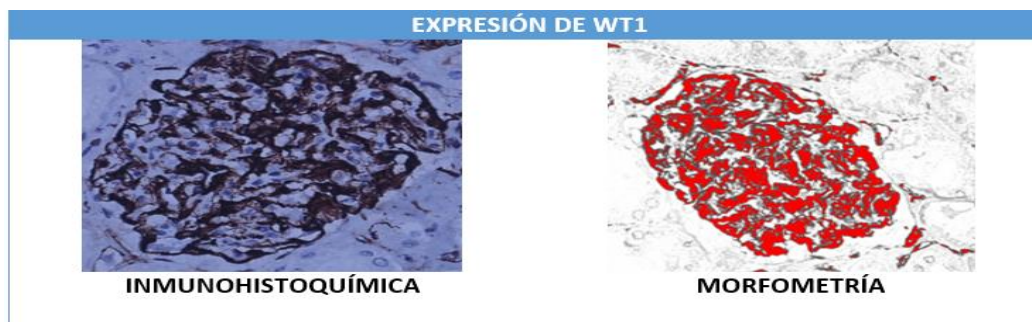


FIGURA 5 EXPRESION DE WT1 POR INMUNOHISTOQUÍMICA Y MORFOMETRÍA

**TABLA 4. PORCENTAJE DE HALLAZGOS HISTOLÓGICOS COMPARATIVOS
EN SNP**

Porcentaje de hallazgos histológicos comparativos en SNP			
Tipo de lesión	Cali, Colombia 2005	Medellín, Colombia 2007	Barranquilla, Colombia 2016
ECM	45%	20.8%	33.30%
GEFS	7%	28.7%	34.7%
PMD	35%		30.9%

CONCLUSIÓN.

A partir de los resultados obtenidos con la presente investigación, se pudo apreciar una tendencia a la elevación en la presentación de casos de Síndrome Nefrótico en pediatría en nuestro país, así como una variación en la prevalencia del tipo de lesión, mostrando una frecuencia similar entre las tres patologías estudiadas (ECM, GEFS y PMD); lo anterior indica que debe seguirse investigando acerca de un método de diagnóstico fiable y temprano, que arroje información sobre la progresión de cada tipo de lesión, para de esta manera asegurar un tratamiento oportuno a cada paciente.

A pesar de que se obtuvieron dichos resultados epidemiológicos, muchos de los casos incluidos en estos, no contaban con reservas de tejido que pudiera ser utilizado para la tinción con los marcadores y su posterior procesamiento, lo que redujo en gran medida el número de casos a analizar a través de la morfometría. Además, hubo varios casos que luego de tincionados, no permitieron su análisis por ausencia de glomérulos o por enfermedad muy severa con esclerosis total de los mismos.

Con respecto a la morfometría, los resultados obtenidos no fueron los esperados, se cree que esto se debió en gran parte a la selección de los marcadores, ya que algunos de ellos no eran específicos para podocitos, también se atribuye a la forma comercial que se usó de cada marcador, ya que al no permitir su dilución para lograr concentraciones diferentes, las muestras se marcaron de una manera inadecuada, señalando no sólo las células que nos interesaban, sino también las adyacentes a éstas, impidiendo de esta manera una correcta porcentualización de la presencia del marcador en la muestra.

Se evidenció una tendencia al aumento en la prevalencia de GEFS. Los resultados obtenidos no fueron los mejores esperados, pese al inconveniente de la tinción, los glomérulos esclerosados presentan un porcentaje menos de expresión al WT1 en relación a la muestra control, sin embargo no se puede realizar una adecuada interpretación hacia un perfil de expresión debido a la gran cantidad de tinciones que dieron inconclusas

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en las tinciones de los marcadores vimentina y CD10, se recomienda la realización de otro método inmunohistoquímico y de dilución, que permita apreciar más adecuadamente la expresión de éstos en los podocitos específicamente. Además, se recomienda la utilización de otros marcadores más específicos para podocitos, como la sinaptopodina, la podocalixina y el GLEPP, evitando la marcación de otras estructuras y componentes glomerulares que alteren la visualización de los podocitos.

ABSTRACT.

Introduction: Idiopathic nephrotic syndrome is the result of podocytes injuries or podocytopathies. The main types of injury are minimal change disease, focal segmental glomerulosclerosis and diffuse mesangial glomerulonephritis. In Colombia the prevalence is 16 per 100,000 in <16 years, studies by the Universidad del Valle reported a distribution as follows: MCD in 40%, 35% PMD, FSGS 7%. Despite this, there is not a local epidemiology. In many cases, the type of injury can be identified and when not, other techniques will be use such as electron microscopy and immunohistochemistry.

Objectives: To estimate the pattern of expression of biomarkers (vimentin, CD10, WT1 Ki67) by immunohistochemistry, in pediatric patients between 0 and 18 years old diagnosed with nephrotic syndrome, from a reference center on the Atlantic Coast between 2008 - 2015.

Materials and methods: descriptive and retrospective observational design; from database analysis of nephrotic syndrome in patients with renal biopsies between 0 and 18 years old and performing immunohistochemical tests.

Results: 28 samples and a control sample where analyzed by immunohistochemistry and morphometry, the control marked positive for vimentina, CD10, WT1 and negative for Ki67, with a percentage of WT1 expression of 6.8%, which was the only marker subjected to a complete analysis. By morphometry, WT1 expression had an average of 6.9% in ECM, in FSGS 10.3% and 8.9% PMD. By age group, nephrotic syndrome was predominantly presented at school age. 52% of patients were male, with 37% for FSGS and PMD. In women the most common type of injury is the ECM with 45%. Only 4% of patients were cortico-resistant.

Conclusion: It showed a tendency to increase in the prevalence of FSGS. The results obtain were not as expected, despite the disadvantage of staining, the glomeruli sclerosed have a lower percentage of expression by WT1 in relation to the control sample, but it wasn't possible to make a proper interpretation to an expression profile due to the large amount of staining resulting unfinished.

Keywords: nephrotic syndrome, podocytopathies, WT1, Ki67, CD10, vimentin, pediatrics.

BIBLIOGRAFIA

1. Ortiz R. SÍNDROME NEFRÓTICO PEDIÁTRICO. *Asoc Española Pediatría*. 2014;1:283–301.
2. Whang C. Prevalencia de nefropatía de cambios mínimos en biopsia renal en niños con síndrome nefrótico idiopático en una institución en Bogotá. 2013. Universidad del Rosario. Disponible en <http://repository.urosario.edu.co/handle/10336/4588>
3. Baquero R. Enfoque diagnóstico de la enfermedad glomerular en pediatría. *precop SCP*. 2015;14(4):45–54.
4. Goodyer KPP, Bitzan M. *Manual of Pediatric Nephrology*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013. cap 3:150-167 p.
5. Bolaños L, Castaño I De. Características clínicas e histopatológicas del síndrome nefrótico primario Colombia Médica. *Colomb Med*. 2005;36(1):29–33.
6. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: A reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2(3):529–42.
7. León-bojorge B De. La biopsia en el diagnóstico de la enfermedad pediátrica Biopsia de médula ósea. *Acta Pediátrica México*. 2009;30(1):36–53
8. Parenti R, Perris R, Vecchio GM, Salvatorelli L, Torrisi A, Gravina L, et al. Immunohistochemical expression of Wilms' tumor protein (WT1) in developing human epithelial and mesenchymal tissues. *Acta Histochem [Internet]*. Elsevier GmbH.; 2013;115(1):70–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.04.006>
9. Thomas Scholzen JG. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(August 1999):311–22.
10. Hookway C, Ding L, Davidson MW, Rappoport JZ, Danuser G, Gelfand VI. Microtubule-dependent transport and dynamics of vimentin intermediate filaments. *Mol Biol Cell [Internet]*. 2015;26:mbc.E14–09 – 1398 – . Available from: <http://www.molbiolcell.org/content/early/2015/02/23/mbc.E14-09-1398.abstract>

11. Towarzystwa P, August L, Kubiak-wlekły A, Niemir ZI. Neprilysin - Structure of the gene and protein product and the localization of expression Neprylizyna. pubmed. 2009. p. 48–50.
12. Julius M. Cruse, MD, PhD, Robert E. Lewis. Atlas of immunology, Third edition. 2010. cap 29: 880
13. Redondo Pachón MD, Ortega Salas R, Corral Molina C, Mollano Peregrín JM, López Andreu M, Espinosa Hernández M, et al. Markers of podocyte dedifferentiation in a patient with collapsing glomerulonephritis. *Nefrologia*. 2010;30:360–6.
14. Ross M, Pawlina W. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007.
<http://es.slideshare.net/ruscett/ross-histologa-5ta-edicin>
15. Kumagai T, Mouawad F, Takano T. Pathogenesis of common glomerular diseases - Role of the podocyte cytoskeleton. *Cell Health Cytoskelet*. 2012; 4:103–18.
16. Liapis H, Romagnani P, Anders HJ. New insights into the pathology of podocyte loss: Mitotic catastrophe. *Am J Pathol* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2013; 183(5):1364–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.033>
17. Sabljar M, Sabljar Matovinović M. PODOCYTE INJURY IN GLOMERULAR DISEASES. *eJIFCC* [Internet]. 2009; Disponible:20–6. Available from: <http://www.ifcc.org>
18. Villalobos J, Atahualpa J, Virginia L. Podocitos y enfermedad de fabry (Revision). *Vitae*. 2014; 58:1–13.
19. E. OLIVA DÁMASO^b, N. SABLÓN GONZÁLEZ^b, J.C. RODRÍGUEZ PÉREZ. Síndromes nefróticos hereditarios. Podocitopatías. *Nefrología Vol. 2 N° 1 Año 2011*
20. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006;69: 2131–47.
21. Santos F. Síndrome nefrótico. *Nefrologia*. 2004; 2(4):1–5.

22. Vivette D. D'Agati, M.D., Frederick J. Kaskel, M.D., Ph.D., and Ronald J. Falk MD, From. Focal segmental glomerulosclerosis. *new Engl J o f Med* [Internet]. 2011 Feb;365(1):2398–411. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9035190>
23. Nieto Ríos, John Fredy; Milena Brand, Sandra; Serna Higueta, Lina María; Arias, Luis Fernando Variante colapsante de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria en niños latreia, vol. 26, núm. 4, octubre-diciembre, 2013, pp. 481-486
24. Saleem MA, Kobayashi Y. Cell biology and genetics of minimal change disease. *F1000Research* [Internet]. 2016;412(May):1–8.
25. Ranganathan S. Pathology of Podocytopathies Causing Nephrotic Syndrome in Children. *Front Pediatr* [Internet]. 2016;4(March):1–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4814732&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.

1. Restrepo C. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria. *asociación Colomb Nefrol e Hipertens Arter*. 2008;1:11–27.
2. MacHado JR, Rocha LP, Neves PDMDM, Cobô EDC, Silva MV, Castellano LR, et al. An overview of molecular mechanism of nephrotic syndrome. *Int J Nephrol*. 2012;1–6.
3. Mathieson PW. Proteinuria and Immunity — An Overstated Relationship? *N Engl J Med*. 2008;359(23):2492–4.
4. Ronco P. Biology og glomerular podocytes. *Uptodate*, En 2016. Disponible <http://www.uptodate.com>
5. Zhao L, Cheng J, Zhou J, Wu C, Chen J. Enhanced Steroid Therapy in Adult Minimal Change Nephrotic Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *Intern Med* [Internet]. 2015;54(17):2101–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26328632>
6. Neal CR. Podocytes... What's under yours? (Podocytes and foot processes and how they change in nephropathy). *Front Endocrinol (Lausanne)*.

2015;6(FEB):1–11.

7. Testagrossa L, Azevedo Neto R, Resende A, Woronik V, Malheiros D. Immunohistochemical expression of podocyte markers in the variants of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(1):91–8.