

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O. D.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA FIBROSIS INTERSTICIAL  
RENAL Y CORRELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE TGF- $\alpha$ 1 EN  
LA NEFROPATIA CRÓNICA DEL INJERTO.

TESIS DE POSGRADO  
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:  
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA  
PRESENTA:  
DR. VÍCTOR HUGO RODRÍGUEZ LÓPEZ

TUTORA DE TESIS: DRA. MARÍA VIRGILIA SOTO ABRAHAM

ASESORES: DRA. MARÍA DEL CARMEN AVILA CASADO  
DR. JUAN SORIANO ROSAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# ÍNDICE

	PAG	
i	Abreviaturas	3
ii	Índice de tablas	4
iii	Índice de figuras	5
iv	Resumen	6
1.	ANTECEDENTES	7
2.	JUSTIFICACIÓN	12
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4.	HIPÓTESIS	13
5.	OBJETIVO	13
6.	PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO	14
6.1	Diseño del estudio	14
6.2	Universo de trabajo	14
6.3	Descripción de las variables	14
6.4.1	Selección de la muestra	15
6.4.2	Criterios de selección	16
6.4.2.1	Criterios de inclusión	16
6.4.2.2	Criterios de no inclusión	16
6.4.2.3	Criterios de eliminación	16
6.5	Procedimientos	17
6.5.1	Histopatología y morfometría	17
6.5.2	Estudios de inmunohistoquímica	18
6.6	Consideraciones éticas	19
6.7	Análisis estadísticos	19
7.	RESULTADOS	20
8.	DISCUSIÓN	24
9.	CONCLUSIÓN	26
10.	BIBLIOGRAFÍA	27
11.	ANEXOS	30
11.1	Hoja de recolección de datos	30
11.2	Carta de consentimiento	31

## ABREVIATURAS

IRC: Insuficiencia renal crónica

NCI: Nefropatía crónica del injerto

Cs A: Ciclosporina A.

FNAT: Factor nuclear para la activación de linfocitos T.

IL-2: Interleucina-2.

MAP: Proteína de adherencia de macrófagos.

TGF- $\beta$ 1: Factor transformador del crecimiento beta 1

## ÍNDICE DE TABLAS

	<u>PAG</u>
Tabla No1. Características clínicas y de laboratorio de los 120 pacientes en las biopsias de retiro de Cs A.	20
Tabla No. 2: Características microscópicas de las biopsias.	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>PAG</u>
Figura No. 1: Fibrosis intersticial renal cortical de diferentes grados teñida en azul verdoso con tricrómico de Mallory.	15
Figura No. 2: Correlación entre el grado de fibrosis y el TGF- $\beta$ 1.	22
Figura No. 3: Comparación entre la fibrosis intersticial con la positividad obtenida con TGF- $\beta$ 1.	23

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La ciclosporina A (Cs A) es un medicamento inmunosupresor usado para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos. La principal complicación de su uso prolongado es la nefrotoxicidad. La forma más común es la crónica, que se caracteriza histológicamente por arteriopatía y por fibrosis intersticial.

**OBJETIVO:** Demostrar si en las biopsias renales de pacientes con trasplante renal que presentan datos histológicos de toxicidad crónica por Cs A, hay aumento en la fibrosis intersticial que correlaciona con la expresión intersticial de TGF- $\beta$ 1.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se estudiaron 120 pacientes con trasplante renal a quienes se les tomó biopsia previa al retiro de Cs A después de cuando menos 6 meses de tratamiento. En cada biopsia fueron evaluados el porcentaje de la fibrosis intersticial y la correlación entre ésta y la expresión intersticial de TGF- $\beta$ 1.

**RESULTADOS:** Se revisaron los expedientes clínicos de 300 pacientes con trasplante renal, de los cuales se incluyeron 120 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión. El 33% fueron mujeres y el 66.6% hombres. El tiempo de trasplante fue en promedio de  $10.6 \pm 3.48$  (6-18) meses. El número de glomérulos analizables fue de  $11.9 \pm 5.49$  (1-23). El número de arteriolas preglomerulares engrosadas fue de  $4.55 \pm 2.61$  (1-15). El promedio de la fibrosis fue de  $24.89 \pm 17.59$ . El coeficiente de correlación por el método de Pearson, entre el porcentaje de fibrosis intersticial y la expresión de TGF- $\beta$ 1, ya con el efecto atribuible al inmunosupresor fue de 0.809 con un valor de  $p = <0.001$ . Utilizando un ANOVA Se encontró correlación directa entre la magnitud de la fibrosis y la expresión de TGF- $\beta$ 1 ( $r=0.86$ ).

**CONCLUSIONES:** Los datos encontrados son compatibles con la hipótesis de que la toxicidad crónica por Cs A en el injerto renal está en relación con el grado de fibrosis y la expresión de TGF- $\beta$ 1.

## 1. ANTECEDENTES

En México se ha estimado que hay aproximadamente 100,000 pacientes afectados por insuficiencia renal crónica (IRC) que requieren un trasplante renal (1). En 1998 la IRC ocupaba el decimotercer sitio en las principales causas de muerte en México, sin embargo, su prevalencia ha ido en aumento alcanzando el décimo lugar en 1999. La tasa de mortalidad por este padecimiento es de 10.9 casos por cada 100, 000 habitantes, de acuerdo a las estadísticas de la Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades de la Secretaría de Salud. Actualmente, según datos de la Secretaría de Salud, la insuficiencia renal ocupa el lugar número nueve dentro de las principales causas de mortalidad entre los mexicanos.

Antes de 1970 las opciones terapéuticas para los pacientes con IRC, eran limitadas, solo un pequeño número de pacientes recibían diálisis de manera regular, los motivos eran, la ausencia de centros especializados y que solo eran candidatos a este tratamiento, los pacientes que no tenían padecimientos concomitantes. En la década de los 80s, la disponibilidad de diálisis se incrementó de manera considerable, por lo que cada vez una mayor cantidad de pacientes tenían éste beneficio. Sin embargo, la sintomatología urémica y los padecimientos co-mórbidos, como la enfermedad cardiovascular y las enfermedades óseas, entre otras, aparecieron al aumentar el tiempo de sobrevida.

En los últimos años la mayor demanda de trasplante renal, como alternativa de tratamiento en los pacientes con IRC, ha provocado que el sistema de Salud Mexicano se reorganice y haya dado origen a dependencias que regulan y controlan esta opción de tratamiento. El Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) es el órgano regulador. Según las estadísticas de éste organismo, en nuestro país se habían realizado desde



1989 hasta 2002, 12198 trasplantes renales, se realizan aproximadamente 1,500 trasplantes renales al año (1). Para la mayoría de los pacientes con IRC, el trasplante es la única opción que ofrece una rehabilitación completa, que les permita reincorporarse a su vida productiva de manera satisfactoria. Sin embargo, a pesar de un trasplante renal exitoso, los pacientes aún son susceptibles a las consecuencias a largo plazo del tiempo que estuvieron en diálisis, consecuencias de la exposición a la uremia, complicaciones inherentes al procedimiento del trasplante y al manejo crónico de inmunosupresores, lo que hace que éstos pacientes tengan una elevada morbilidad y requieran una monitorización constante. Desde 1998 ha habido un incremento importante en la sobrevida a corto y largo plazo, tanto en los pacientes trasplantados de donador vivo, como de cadáver. Actualmente, la sobrevida a un año alcanza un 96% y 86%, respectivamente.

Dentro de los factores que se han involucrado en la pérdida del injerto durante el primer año destacan: rechazo activo (agudo), glomerulopatía *de novo* o recurrente y nefrotoxicidad a medicamentos, especialmente los inmunosupresores. Mientras que la pérdida a largo plazo, está determinada principalmente, por la presentación de la nefropatía crónica del injerto (NCI). La prevalencia de NCI varía según el tiempo de seguimiento en las diferentes series. Ahora se sabe, que es la principal causa de pérdida del injerto renal, con una prevalencia de hasta el 86%. La NFC es un diagnóstico histológico que se puede hacer evidente clínicamente por un deterioro lento y progresivo de la función renal, el cual frecuentemente es asociado a la presencia de proteinuria, hipertensión y generalmente se hace presente después de 90 días del trasplante. La NCI es el resultado de múltiples factores, dentro de los que destacan rechazos activos (agudos), enfermedad vascular del donador y toxicidad de medicamentos inmunosupresores como los inhibidores de la calcineurina. Uno de los

inmunosupresores, inhibidor de la calcineurina, más ampliamente usado es la ciclosporina A (Cs A).

La Cs A es un medicamento usado por primera vez en 1978 para prevenir el rechazo en la cirugía del trasplante renal (2). A pesar de su alto costo, en la práctica clínica tiene un gran impacto, ya que en las dos décadas pasadas, su uso mejoró impresionantemente el pronóstico funcional de los trasplantes de órganos previniendo la pérdida por rechazo (3). La diferencia más importante de la Cs A con otros agentes inmunosupresores es su nula mielotoxicidad (3). Sin embargo, sus efectos en la estructura y función del riñón (nefrotoxicidad) han limitado su uso (4). La actividad inmunosupresora de la Cs A se debe a la unión dependiente de calcio-calmodulina del complejo Cs A - ciclofilina con la fosfatasa de calcineurina (5). La inhibición de la calcineurina bloquea la transcripción de los genes que sintetizan el factor nuclear para la activación de linfocitos T (FNAT) y previene la activación de citocinas, incluyendo la interleucina-2 (IL-2) que es el principal factor de crecimiento autócrino en la cascada de la reacción para el reconocimiento de los antígenos (5).

A pesar de ser un excelente inmunosupresor, el uso prolongado de Cs A produce nefrotoxicidad (3). Hay dos formas reconocidas de nefrotoxicidad, la primera es la aguda que se caracteriza por la disminución súbita del filtrado glomerular y microhematuria, con hipertensión arterial en el 47% de los casos (6). Esta alteración se presenta con la administración de Cs A en altas dosis aunque puede ser independiente de la misma (6). Microscópicamente, en la biopsia del injerto se puede observar vacuolación isométrica del epitelio tubular, apoptosis del músculo liso y edema endotelial arteriolar de tipo microangiopatía trombótica (6). Ya que es una lesión dependiente de la dosis, estos cambios son reversibles con la disminución de la dosis o la suspensión de la Cs A con cambio a otro tipo de inmunosupresor (7). La lesión aguda ocurre en 40% de los

pacientes en los primeros 100 días después del trasplante (6). La segunda forma de nefrotoxicidad por Cs A, es la crónica, que es la forma más común (2). Esta lesión se caracteriza clínicamente por el deterioro crónico y progresivo de la función renal que es irreversible con la suspensión del medicamento (8). Forma parte de las lesiones que contribuyen a la NCI. Algunos estudios realizados en modelos experimentales sugieren que el daño vascular juega un papel importante en la patogénesis de la nefrotoxicidad crónica por Cs A, sin embargo, esto aún no ha sido comprobado (3).

La nefrotoxicidad crónica se caracteriza histológicamente por bandas corticales de fibrosis o fibrosis difusa intersticial que se divide en grados de acuerdo al porcentaje de superficie afectada (0: <10%, I: 10-25%, II: >25-40% y III: >40%) y se presenta en todos los pacientes (100%) que la reciben por más de 6 meses Cs A (8,9). También se observa vacuolación tubular y arteriopatía. La arteriopatía consiste en el daño vascular intenso que se manifiesta con depósitos nodulares de una proteína hialina en la pared de las arteriolas hiliares y de las arterias interlobulares con vacuolación del citoplasma de las células musculares lisas de los mismos vasos (8). La arteriopatía es la lesión morfológicamente más característica de la nefropatía crónica por Cs A y se presenta en el 70% de los pacientes transplantados que reciben este medicamento por más de 6 meses (8). Posterior a la suspensión de la Cs A, se ha observado que la vacuolación tubular y la arteriopatía pueden disminuir en intensidad, a diferencia de la fibrosis que es irreversible e incluso puede aumentar después de la suspensión del medicamento (8). Por lo tanto, la fibrosis intersticial es considerada como la lesión directamente responsable de la pérdida del injerto (8). Recientemente en modelos experimentales realizados en ratas, se ha implicado en la patogénesis de la fibrosis intersticial secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A ciertas proteínas de adherencia

celular, específicamente a la proteína de adherencia de macrófagos (MAP) y al factor transformador del crecimiento beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (10).

El TGF- $\beta$ 1 es una citocina profibrótica que produce aumento de la colágena intersticial a través de dos mecanismos: 1) estimulando la acción de los fibroblastos para la síntesis de colágena y fibronectina por incremento en la expresión de los genes encargados de la síntesis de estas (11) y 2) bloqueando la degradación de la matriz extracelular al inhibir la acción de las colagenasas, entre estas, los diferentes subtipos de gelatinasas (17). En varios estudios realizados *in vivo* se ha demostrado la importancia de la interacción de las moléculas de adherencia celular en la patogénesis de algunos tipos de glomerulonefritis y la producción del daño tubulointersticial (15).

En años recientes se han estudiado las consecuencias sobre la sobrevida del injerto de los pacientes con transplante renal de donador vivo relacionado del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” que usan Cs A, en un protocolo de retiro de la misma (21). Se evaluaron los cambios histológicos por la administración de Cs A en biopsias renales percutáneas tomadas por protocolo en pacientes con función renal estable para evaluar el retiro de la Cs A, desde 2.3 a 81 meses de la administración de Cs A. Se incluyó en este estudio a los pacientes quienes durante el periodo de administración de Cs A no presentaran signos clínicos o histológicos de rechazo. Los pacientes fueron divididos en tres grupos basados en la duración de la terapia con Cs A. En el grupo 1 los pacientes recibieron Cs A durante menos de 6 meses, en el grupo 2 entre 6 y 12 meses y en el grupo 3 la recibieron por más de 12 meses. Se analizaron 91 biopsias renales de pacientes incluidos en este protocolo para retiro de Cs A. La fibrosis intersticial se encontró en el 58% de las biopsias del grupo 1 y fue considerada como grado 0 (< 10%), en el 58% y grado I en el 42%. En el grupo 2 se encontró fibrosis grado I en el

84% y grado II en el 16%. En el grupo 3 hubo fibrosis en todos los casos, se consideró como grado II en el 53% y grado III en el 47%.

## 2. JUSTIFICACION

En México existen 100,000 habitantes que presentan insuficiencia renal crónica por múltiples causas, que son candidatos a un transplante renal pero solo se realizan 1,500 trasplantes al año, (90% de los cuales son de donador vivo relacionado). Esto explica la gran cantidad de pacientes mexicanos que se encuentran en espera de un transplante de este órgano. Para evitar el rechazo del injerto se utilizan múltiples esquemas de inmunosupresión, el medicamento más utilizado es la Cs A, por su nula mielotoxicidad y su gran efectividad en la prevención de rechazo. Sin embargo, su uso prolongado ocasiona la pérdida del injerto por nefrotoxicidad crónica, lo que contribuye con la falla del injerto y a que los pacientes requieran un nuevo injerto renal. El resultado es el incremento en la cantidad de pacientes en espera de un transplante renal, además, disminuye la función del injerto empobreciendo el pronóstico de estos pacientes. Dentro de los mecanismos a través de los cuales la Cs A ocasiona la fibrosis intersticial se ha implicado a moléculas profibróticas como el TGF- $\beta$ 1.

La evolución de la fibrosis intersticial en la nefrotoxicidad inducida por Cs A en los pacientes con transplante renal de donador vivo, es la responsable de la pérdida del injerto.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿En los pacientes con trasplante renal y con nefrotoxicidad crónica por Cs A, hay aumento en la fibrosis intersticial que correlaciona con la expresión intersticial de TGF- $\alpha$ 1?

### 4. HIPÓTESIS

En las biopsias renales de pacientes con trasplante renal que presentan datos histológicos de toxicidad crónica por Cs A, hay incremento en el la fibrosis intersticial que correlaciona con la expresión intersticial de TGF- $\alpha$ 1.

### 5. OBJETIVO

Demostrar si en las biopsias renales de pacientes con trasplante renal que presentan datos histológicos de toxicidad crónica por Cs A, hay aumento en la fibrosis intersticial que correlaciona con la expresión intersticial de TGF- $\alpha$ 1.

## 6. PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

### 6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio descriptivo.

### 6.2. UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluyeron a todos los pacientes del servicio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez con trasplante renal de donador vivo relacionado, función renal estable, que recibieron un esquema de inmunosupresión consistente en azatioprina, prednisona y Cs A, participantes del protocolo para retiro de Cs A y contaran con biopsia renal del injerto previa al retiro de Cs A.

### 6.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

1. Expresión del factor transformador del crecimiento  $\beta 1$  en el intersticio.
2. Fibrosis intersticial cortical secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A.

### DESCRIPCIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

1. Expresión del factor transformador del crecimiento  $\beta 1$ : se utilizó un corte de tejido fijado en formalina/buffer de fosfatos al 10% e incluido en parafina, de 3 micras de espesor. A través de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta se marcaron las células que expresaran positividad para TGF- $\beta 1$ . Esta se midió a través de un analizador de imágenes con el que se obtuvo un promedio de 10 campos no cruzados de intersticio a 400 aumentos (40x). El valor normal en el intersticio renal cortical en humanos es de 0.

Escala de medición: cuantitativa de razón.

Tipo de variable: cuantitativa continua.

2. Fibrosis intersticial: sustitución del intersticio renal por fibroblastos y tejido conectivo. Estos datos fueron valorados con la tinción de tricrómico de Mallory porque ésta tiñe al tejido conectivo de color azul verdoso (Fig. 1). Se midió en porcentajes la superficie cortical afectada. Inicialmente con un método semicuantitativo calculando el porcentaje en el microscopio de luz de la siguiente manera: 1 a <10% (grado 0), 10 a 25% (grado I), >25 a 40% (grado II) y >40% (grado III). Posteriormente se midió a través de un analizador de imágenes, el resultado se obtuvo del porcentaje de superficie cortical afectada en 10 campos no cruzados a 400 aumentos (40x).

Escala de medición: Cualitativa ordinal (grados de fibrosis) y cuantitativa de razón (porcentaje de superficie cortical afectada).

Tipo de variable: cualitativa ordinal y cuantitativa continua.

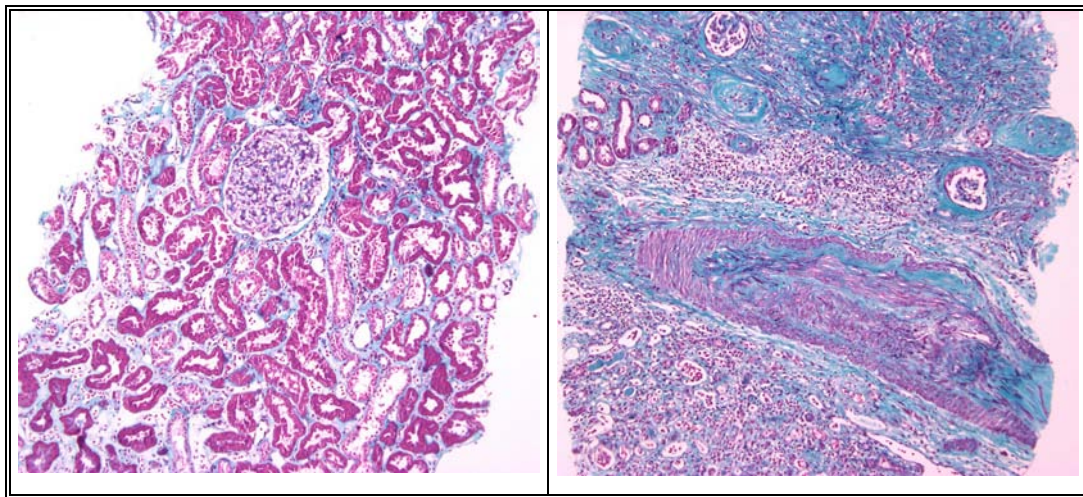


Fig. 1: Fibrosis intersticial renal cortical de diferentes grados teñida en azul verdoso con tricrómico de Mallory (100 aumentos).

#### 6.4.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se estudiaron 120 biopsias renales, 30 por cada grupo de fibrosis intersticial cortical previamente clasificados en grados (grado 0, I, II y III).



Se incluyeron en el estudio los tejidos obtenidos por muestreo no probabilístico de casos consecutivos, hasta completar el tamaño de la muestra.

#### 6.4.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

##### *6.4.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN*

1. Pacientes que tuvieran 6 o más meses con la terapia inmunosupresora a base de Cs A.
2. Pacientes que desde el momento del trasplante recibieron el mismo esquema de inmunosupresión de rutina, [azatioprina (2 mg/kg), prednisona (200 mg 1 semana y posteriormente se disminuyó a una dosis de 0.25 mg/kg) y Cs A (con una dosis inicial de 5 mg/kg/día, que se inició el mismo día del trasplante renal y posteriormente se dió una dosis secundaria ajustada para mantener la concentración en sangre de Cs A en niveles entre 100-200 ng/ml)].
3. Pacientes que aceptaran participar en el protocolo firmando una carta de consentimiento (anexo 2).

##### *6.4.2.2. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN*

1. Cuando la biopsia renal del injerto previa al retiro de Cs A presentó datos histológicos de infección viral (citomegalovirus, herpes virus, poliomavirus).
2. Cuando la biopsia renal del injerto previa al retiro de Cs A, no correspondió histológicamente a corteza renal.

##### *6.4.2.3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN*

1. Cuando la biopsia renal del injerto previa al retiro de Cs A, no estuvo preservada adecuadamente para el estudio histológico.

2. Cuando las biopsia renal del injerto previa al retiro de Cs A, fue insuficiente para efectuar el estudio histológico.

## 6.5. PROCEDIMIENTOS

Se estudió a todos los pacientes del servicio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, con trasplante renal, con función renal estable, que entraron al protocolo para el retiro de Cs A. Se les solicitó su consentimiento para la participación en el protocolo. Se utilizó un protocolo clásico de inmunosupresión consistente en: azatioprina (2 mg/kg), prednisona (200 mg 1 semana, se disminuyó a 0.25 mg/kg) y Cs A (que se administró con una dosis inicial de 5 mg/kg/día, que se inició el día del trasplante y posteriormente se dió una dosis secundaria ajustada para mantener la concentración en sangre de Cs A en niveles entre 100-200 ng/ml). Se efectuó una biopsia renal percutánea un día antes del retiro de Cs A. Todas las biopsias se realizaron por punción con aguja automática bajo guía ultrasonográfica.

### 6.5.1. HISTOPATOLOGÍA Y MORFOMETRÍA

Cada biopsia estuvo formada de dos o tres cilindros de tejido renal, uno o dos se fijaron en formalina/buffer de fosfatos al 10% y fueron incluidos en parafina y otro cilindro se congeló a menos 80°C, en un tanque de nitrógeno líquido, para su inclusión en tissuetek, de acuerdo al procedimiento convencional, para las biopsias renales del servicio de Patología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Del tejido incluido en parafina se realizaron 8 cortes a 3 micras los cuales fueron teñidos con: hematoxilina y eosina (3) ácido peryódico de Schiff (PAS) (3), tricrómico de Mallory (1) y metenamina de plata (1).

El diagnóstico de fibrosis asociada a la administración de Cs A se realizó en presencia de fibrosis difusa o bandas acelulares de fibrosis cortical. La cantidad de fibrosis fue inicialmente evaluada usando un método semicuantitativo con diferentes grados (grado 0: 1-9%, grado I: 10-24%, grado II: 25-40%, grado III: >40% del tejido cortical). Para determinar la certeza de esta evaluación semicuantitativa, la cantidad de fibrosis se cuantificó utilizando morfometría. Este método se basó en el análisis computarizado de imágenes. En concreto, para cada biopsia se tomaron 10 campos no cruzados de intersticio cortical renal examinados a 400 aumentos, utilizando un microscopio de campo claro (Olympus BX51, objetivo 40X y oculares 10X) se estudió el 100 % de la corteza de cada muestra y cada campo se capturó con una cámara de vídeo digital (CoolSnap-Plus). Cada imagen fue procesada en una computadora usando Image-Pro Plus, versión 5.0, un software procesador de imagen (Image-Pro INC, Media Cybernetics). Utilizando la capacidad de reconocimiento de color en este software y la especificidad hacia el azul verdoso de la colágena en los cortes teñidos con tricrómico de Mallory se seleccionaron las áreas de fibrosis. Después de esta selección, las áreas de fibrosis fueron cuantificadas (con unidades pixel) usando el software del analizador de imágenes. Para cada campo la cantidad de fibrosis fue expresada en una fracción de área túbulo-intersticial (un área de fibrosis podía abarcar un campo). Finalmente, para cada biopsia la cantidad de fibrosis cortical se obtuvo por los resultados de 10 campos, expresado en porcentaje.

#### 6.5.2. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

De cada biopsia se efectuaron cortes a 3 micras de tejido fijado en formalina al 10% y procesado en parafina para estudio de inmunohistoquímica por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional utilizando el complejo streptavidina-biotina-

peroxidasa (ABC) con el anticuerpo primario TGF- $\beta$ 1 (Bioselec, Santa Cruz Biotechnology, Inc). La interpretación del resultado de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta se llevó a cabo con el analizador de imágenes descrito anteriormente utilizando 10 campos no cruzados examinados a 400 aumentos.

#### 6.6. CONSIDERACIONES ETICAS

La realización del estudio no significó algún riesgo para el paciente, ya que no se efectuaron procedimientos adicionales o diferentes a los recomendados para pacientes en programa de transplante renal en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Se tomaron en cuenta los lineamientos para las investigaciones biomédicas vigentes en México, publicadas por la Secretaría de Salud a través del Diario Oficial de la Federación.

Además se tomaron en cuenta los artículos para el manejo, procesamiento y eliminación de tejidos y residuos biológicos, vigente, en la Ley General de Salud.

#### 6.7. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Se expresaron las variables cuantitativas continuas en promedio, como medida de tendencia central y desviación estándar como medida de dispersión. Se utilizó tanto el programa de Excel para el análisis estadístico, SPPSS versión 10 para Windows y el programa GraphPad Prism 3.02, para la realización de figuras.

## 7. RESULTADOS

Se revisaron los expedientes clínicos de 300 pacientes con trasplante renal, de los cuales se incluyeron 120 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión; 30 de cada grado de fibrosis intersticial. Los datos recolectados de los expedientes (características clínicas y exámenes de laboratorio de los pacientes) fueron capturados inicialmente en una hoja de cálculo del programa Excel. Se codificó y ordenó la base de datos para posteriormente ser analizada en el programa SPSS 10.0 para Windows. Primero se efectuó un análisis exploratorio de la base para conocer las características clínicas y de laboratorio de los pacientes (tabla No. 1).

TABLA No. 1: CARACTERISTICAS CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LOS 120 PACIENTES EN LA BIOPSIA DE RETIRO DE Cs A

Característica	Media $\pm$ DS	Intervalo
Presión arterial sistólica (mmHg)	127.7 $\pm$ 17.14	108-200
Presión arterial diastólica (mmHg)	81.83 $\pm$ 8.82	68-100
Creatinina sérica (mg/dL)	1.66 $\pm$ 0.42	1.14-2.75
Nitrógeno de urea (mg/dL)	23.98 $\pm$ 9.95	14-61.1
Ácido úrico sérico (mg/dL)	7.44 $\pm$ 1.78	4.15-10.35
Colesterol (mg/dL)	190.6 $\pm$ 45.65	123-336
Triglicéridos (mg/dL)	183.66 $\pm$ 67.47	95-389
Depuración de creatinina (ml/min)	53.9 $\pm$ 15.88	29.1-90

De los 120 pacientes estudiados, el 33% fueron mujeres y el 66.6% hombres. En la evaluación microscópica de las biopsias se encontró que el número de glomérulos analizables en las biopsias fue de 11.9  $\pm$  5.49 (1-23). El número de arteriolas

preglomerulares engrosadas fue de  $4.55 \pm 2.61$  (1-15). Se determinó el engrosamiento de las arteriolas preglomerulares, el que se categorizó en leve, moderado y grave. Las características microscópicas se presentan en la tabla No. 2.

TABLA No. 2: CARACTERISTICAS MICROSCÓPICAS DE LAS BIOPSIAS.

Característica	
No. de glomérulos	$11.90 \pm 5.49$ (1-23)
No. arteriolas normales	$1.73 \pm 1.36$ (0-4)
No. arteriolas engrosadas	$4.55 \pm 2.61$ (1-15)
No. arteriolas con engrosamiento leve.	$0.50 \pm 0.85$ (0-4)
No. arteriolas con engrosamiento moderado.	$1.10 \pm 1.01$ (0-4)
No. arteriolas con engrosamiento grave.	$2.73 \pm 2.03$ (0-8)

En la Fig. No. 2 se observan los 4 grados de fibrosis intersticial en las biopsias para el retiro de Cs A valoradas a través de la tinción tricrómica de Mallory. Las diferencias en la cantidad de fibrosis, son muy sutiles a simple vista, la cuantificación efectuada con el analizador de imágenes, facilitó esta clasificación en porcentajes, ya que hizo más objetiva esta medición. Sin embargo, esta técnica requiere de la selección de los campos analizables y de las áreas que se deben excluir de cada uno, ya que como podemos observar en la figura, la presencia de glomérulos en cada fotografía es un factor que aumenta la cantidad de color azul verdoso y por lo tanto aumenta el valor de la medición, pues el software solo tiene la capacidad de detectar el color que se le indique (en este caso el azul verdoso de la fibrosis intersticial) pero no de discriminar entre las áreas que corresponden a intersticio y las que son glomérulos. En estos casos, fue necesario extraer (borrar manualmente) de la medición de cada campo, a los glomérulos, para garantizar que el valor obtenido sea exclusivamente de la fibrosis intersticial.

Con el coeficiente de correlación por el método de Pearson, entre el porcentaje de fibrosis intersticial y la expresión de TGF  $\beta$ 1, ya con el efecto atribuible al inmunosupresor es de 0.809 con un valor de  $p = <0.001$ .

Utilizando un ANOVA Se encontró correlación directa entre la magnitud de la fibrosis y la expresión de TGF  $\beta$ 1 ( $r=0.86$ ) (Fig. No. 3).

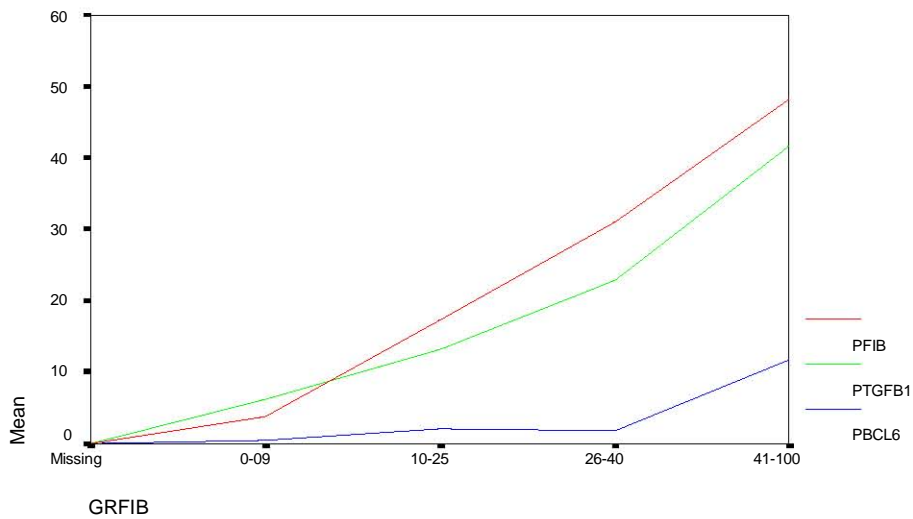


Fig. No. 2 : Correlación entre el grado de fibrosis y el TGF  $\beta$ 1.

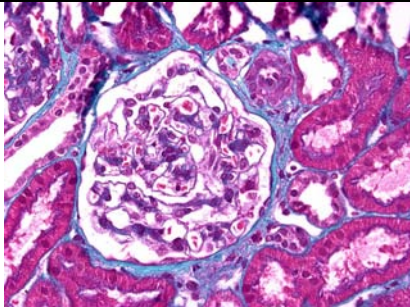
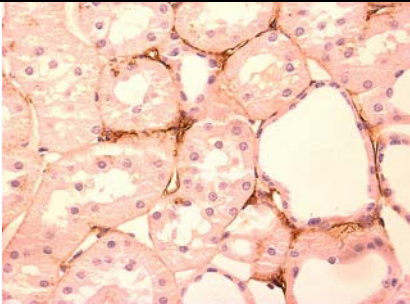
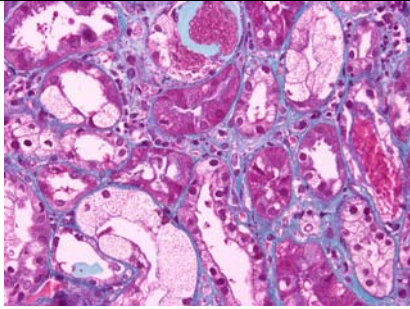
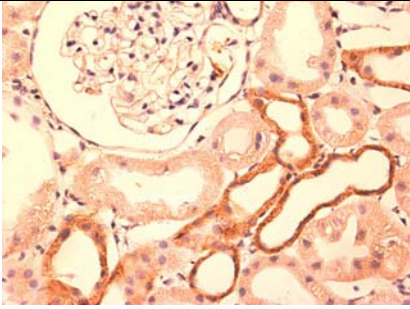
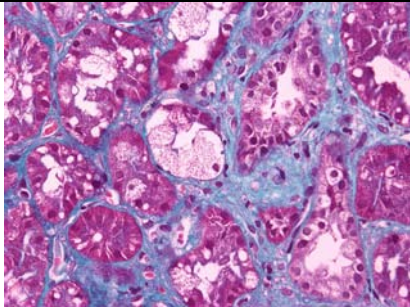
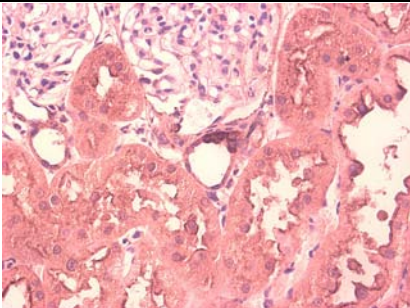
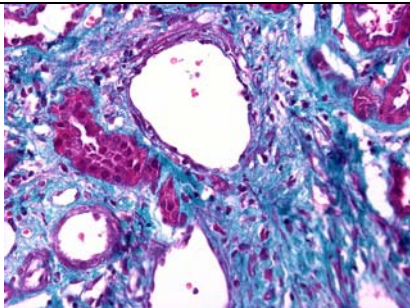
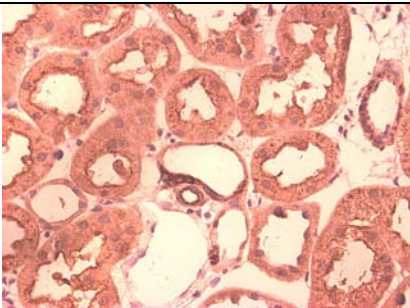
	FIBROSIS	TGFβ-1
GRADO 0		
GRADO 1		
GRADO 2		
GRADO 3		

Fig. 3 : Columna izquierda: Cortes histológicos de corteza renal teñidos con tricrómico de Mallory (400x). A) Con fibrosis grado 0 (3%), B) Grado I (14%), C) Grado II (34.8%), D) Grado III (62%). Comparando con la positividad obtenida con TGF-β1 (Columna derecha).



## 8. DISCUSIÓN

En los últimos años la sobrevida y el pronóstico de los pacientes con trasplante renal ha aumentado de manera considerable. Esto ha sido consecuencia de un aumento de disponibilidad de los medicamentos inmunosupresores, mejor manejo médico y quirúrgico de los pacientes, detección oportuna y tratamiento apropiado de los eventos de rechazo activo, entre otras causas (16). Sin embargo a pesar de haber mejorado notablemente la sobrevida a corto plazo, los pacientes experimentan una serie de complicaciones crónicas como consecuencia del manejo inmunosupresor, del tiempo de administración de los medicamentos y del tipo de estos. La Cs A es un medicamento inmunosupresor que actúa inhibiendo a la calcineurina (5), bloqueando de esta manera la respuesta inmune. Produce cambios en la estructura y función del riñón (nefrotoxicidad) (4). La forma crónica de nefrotoxicidad por Cs A, es la forma más común (2). En el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, se efectúan aproximadamente 55-60 trasplantes renales al año, de estos el 90 %, son de donadores vivos, el resto son de donadores cadavéricos. Se utiliza un esquema de inmunosupresión de manera rutinaria con Cs A.

Algunos estudios realizados en modelos experimentales sugieren que el daño vascular juega un papel importante en la patogénesis de la nefrotoxicidad crónica por Cs A (3) y se ha implicado en la patogénesis de la fibrosis intersticial secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A al TGF- $\beta$ 1 (10). Desde hace varios años se ha investigado el papel que desempeña el TGF- $\beta$ 1 en procesos patológicos tanto en modelos animales como en humanos; en episodios de rechazo agudo se ha demostrado que la expresión tanto del TGF- $\beta$ 1 y de su receptor se encuentran aumentadas en el intersticio renal, siendo un reflejo de la actividad proinflamatoria de esta sustancia, al aumentar el reclutamiento de leucocitos. Se ha demostrado que los inhibidores de calcineurina son capaces de

inducir la activación de genes profibróticos y a su vez mayor expresión de TGF- $\beta$ 1, lo que explicaría que nuestros resultados muestren una correlación directa y significativa entre el porcentaje de fibrosis y la expresión de TGF- $\beta$ 1, ( $r = 0.809$  con un valor de  $p = <0.001$ ).

Utilizando un ANOVA se encontró correlación directa entre la magnitud de la fibrosis y la expresión de TGF - $\beta$ 1 ( $r=0.086$ ) muy semejante a la obtenida por métodos no paramétricos.

## 9. CONCLUSIÓN

1. En la nefrotoxicidad crónica inducida por la administración de Cs A en pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado hay aumento de la expresión del TGF- $\beta$ 1 en el intersticio renal cortical que correlaciona directamente con el aumento en la fibrosis intersticial.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Registro Nacional de Transplantes, Informe año 2000.
2. Mihatsch MJ, Antonovych T, Bohman SO, Habib R, Helmchen U, Noel LH, et. al. Cyclosporin A nephropathy: standardization of the evaluation of kidney biopsies. *Clin Nephrol* 1994; 41 (1): 23-32.
3. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, Alpers ChE. Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48: 431-438.
4. Antonovych TT, Sabnis SG, Austin HA, et al. Cyclosporine A-induced arteriopathy. *Transplant Proc* 1988; 20 (3 Suppl): 951-958.
5. Morozumi K, Thiel G, Gudat F, Mihatsch. Studies on morphological outcome of cyclosporine-associated arteriopathy after discontinuation of cyclosporine in patients with renal allografts. *Transplant Proc* 1993; 25 (1): 537-539.
6. Skorecki KL, Rutledge WP, Schrier RW. Acute cyclosporine nephrotoxicity-Prototype for a renal membrane signalling disorder. Editorial Review. *Kidney Int* 1992; 42: 1-10.
7. Collins BS, Davis CL, Marsh CL, McVicar JP, Perkins JD, Alper Ch E. Reversible cyclosporine arteriopathy.. *Transplantation* 1998; 46: 732-738.
8. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Hayry P. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int* 1992; 41 (1): 155-160.
9. Stillman IE, Brezis M, Grenfeld Z, Ransil BJ, Heyman SN, Rosen S. Cyclosporine nephropathy: Morphometric analysis of medullary thick ascending limb. *Am J of Kidney Dis.* 1992; 20: 162-167.

10. Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosepund JD. TGF- $\beta$ : A link between immunosuppression, nephrotoxicity and Cs A. *Transplantation Proc* 1998; 30: 944-945.
11. Roy-Chaudhury P, Wu B, King G, Campbell M, Macleod AM, Haites NE, Simpson JG, Power DA. Adhesion molecule interaction in human glomerulonephritis: Importance of the tubulointerstitium. *Kidney Int* 1996; 49: 127-134.
12. Avila- Casado MC, Tack I, Striker L, Herrera –Acosta J, Striker G. Time course and incidence of cyclosporine a induced arteriopathy (CsA-Ap) in renal transplant patients with stable renal fuction. *Enviado a Transplantation*.
13. Solez K, Axelsel RA, Benediktsson H et al. International standarization of criteria for the histologic diagnosis of renalallograft recetion: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993: 411-422
14. Calle E, Thun MJ et al. Body mass index and mortality in a prospective cohort of US adults *NEJM* 1999; 341:1097-1105.
15. Levey AS, et al. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *Ann Intern Med* 1999;130:462-70.
16. Monaco AP, Burke J F, et al. Current Thinking on chronic renal allograft rejection: issues, concerns and recomendations from 1997 roundtable discusi3n. *Am J Kidney Dis* 1999;33:150-160.
17. Mo W, Brecklin C, Garber S, Song RH, Pegoraro AA, Au J, Arruda J, Dunea J, Singh A. Changes in collagenases and TGF- $\beta$ 1 precede atructural alterations in a model of chronic renal fibrosis. *Kidney Int.* 1999; 56: 145-153.

18. Kendrick Elizabeth. Cardiovascular Disease and the renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis* 2001;38 : S36-S43.
19. Mc.Laren AJ, Jassem W, et al. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. *Clin Transplant* 1999;13:266-272.
20. Flechner SM, Modlin CS, et al. Determinants of chronic renal allograft rejection in cyclosporine – treated recipients. *Transplantation* 1996;62:1235-41.
21. Opelz G, Wujciak T, et al. Association of chronic graft failure with recipient blood pressure. *Kidney Int* 1998;53:217-228.
22. Laine J, Etelamaki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997; 63: 101-5.
23. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft and patient death. *Transplantation* 2003;27:249-256.
24. Meier-Friesche HU, Vaghela M, et al. The effect of body mass index on long-term renal allograft survival. *Transplantation* 1999;68:1294-7.
25. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1992;20:1-17.
26. Marcussen Neils. Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:74-75.
27. Pagtalunan ME, Oberbauer R, Haas M, et al. Atubular glomeruli in patients with chronic allograft rejection. *Transplantation* 1996;61:1166-71.

## 11. ANEXOS

### 11.1. ANEXO 1

#### HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Registro:

Tiempo de tx con Cs A \_\_\_\_\_ meses. Grupo: \_\_\_\_\_

#### DATOS DE RECHAZO

Tubulitis: Si\_\_\_ No\_\_\_ Endotelitis: Si\_\_\_ No\_\_\_ Vasculitis: Si\_\_\_ No\_\_\_

#### DATOS DE TOXICIDAD POR Cs A

##### VASCULARES:

No. de arteriolas paraglomerulares:

No. de arteriolas no afectadas:

No. de arteriolas con gotas hialinas, vacuolas o nódulos hialinos:

##### INTERSTICIALES:

Fibrosis difusa: Si\_\_\_ No\_\_\_ Fibrosis en bandas: Si\_\_\_ No\_\_\_

Grado de fibrosis: 0\_\_\_ I\_\_\_ II\_\_\_ III\_\_\_

Fibrosis por morfometría: \_\_\_\_\_%

TGF- $\beta$ : \_\_\_\_\_%

11.2. ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHAVEZ”

SERVICIOS DE NEFROLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA.

México D. F. a

He sido informado (a) por el médico abajo firmante, acerca del tipo, objetivo y curso del estudio que lleva el título “Expresión del factor transformador del crecimiento  $\beta 1$ , apoptosis y fibrosis intersticial en la nefrotoxicidad por ciclosporina”. Se me ha explicado a mi entera satisfacción la razón del estudio, el tipo de información que se obtendrá de mi expediente clínico y que se utilizará exclusivamente el tejido proveniente de mis biopsias renales (inmediata al transplante y la previa al retiro de ciclosporina A), para además del diagnóstico, realizar los estudios necesarios para el proyecto de investigación.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta que me surja con relación al estudio. Además se me ha asegurado que los estudios que se tengan que realizarse en mis biopsias para el proyecto, no retrasarán ni perjudicarán el diagnóstico de estas.

Estoy enterado (a) también, de que puedo retirarme del proyecto si así lo decido y seguiré siendo atendido sin ningún problema.

Voluntariamente acepto participar en el estudio.

Nombre y firma del paciente: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del médico: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo: \_\_\_\_\_