



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD



“DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA”
UNIDAD MÉDICA DE INVESTIGACION EN INMUNOLOGIA E INFECTOLOGIA.
DELEGACIÓN 2 NORTE DEL D.F.

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE SUBESPECIALIDAD
EN:

REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA

**“Participación de HIF-1 α en la expresión de VEGF en
biopsias renales de niños con Nefritis lúpica clase IV y su
asociación con la evolución clínica”**

PRESENTA:

DR. RUBEN MARQUEZ MARIN

TUTOR:

DR. CESAR GONZALEZ BONILLA

CO-TUTOR:

DRA. En C. SARA HUERTA YEPEZ.

DRA. EUNICE SOLIS VALLEJO

DR. JOSE LUIS MATAMOROS TAPIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que intervinieron en la realización de este proyecto y a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología Centro Médico Nacional La Raza, México D. F. a los que colaboraron con todo su cariño para completar el presente trabajo así como a la participación valiosa y fundamental de la Dra. Sara Huerta Yopez.

INDICE

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCION.....	7
3. JUSTIFICACION.....	11
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
5. OBJETIVOS.....	13
6. HIPOTESIS.....	14
7. VARIABLES.....	15
8. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO.....	17
9. UNIVERSO DE TRABAJO.....	17
10. CRITERIOS DE SELECCION.....	17
11. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.....	18
12. RECURSOS.....	21
13. RESULTADOS.....	22
14. DISCUSION.....	24
15. CONCLUSIONES.....	27
16. ANEXOS.....	28
17. BIBLIOGRAFIA.....	34

1. RESUMEN

TITULO: Participación de HIF-1 α en la expresión de VEGF en biopsias renales de niños con Nefritis lúpica clase IV y su asociación con la evolución clínica.

JUSTIFICACIÓN: Hasta el momento las causas de la nefritis lúpica no han sido del todo conocidas. Existe evidencia de la participación de HIF-1 α en otras condiciones autoinmunes así como de VEGF pero estas no han sido asociadas ni se conoce la participación de ellas en los casos de nefritis lúpica en niños, por lo que al contar con los datos clínicos, tejidos y técnica de inmunohistoquímica se investigó cual sea su participación en esta enfermedad.

OBJETIVO: Determinar si HIF-1 α participa en la regulación de la expresión de VEGF en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica clase IV y cual es su asociación con la evolución clínica.

HIPÓTESIS: HIF-1 α regula negativamente la expresión de VEGF, y esto se asocia con el curso clínico e histológico en pacientes pediátricos.

IDENTIFICACION DE VARIABLES: HIF-1 α , VEGF, Lesión histopatológica renal

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Tipo de estudio observacional, transversal, analítico, retrolectivo.

METODOLOGIA: Se obtuvieron 18 bloques de parafina de biopsias renales de pacientes pediátricos, con LES y nefropatía clase IV así como 5 controles sanos. Se realizó inmunohistoquímica para evaluar la expresión de HIF-1 α y VEGF, y a partir de las inmunotinciones se realizó el análisis densitométrico. Se revisaron los expedientes de los pacientes para valorar las condiciones clínicas al momento de la biopsia. Se elaboró una base de datos y la información se procesó con el programa de análisis estadístico Prisma©. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas, se realizaron mediante ANOVA de una vía, considerándose como significativa $p \leq 0.05$

RESULTADOS: Se mostró la densidad de la expresión de HIF-1 α y VEGF en los túbulos contorneados de las biopsias con nefritis lúpica clase IV comparado con los controles sanos, encontrando VEGF alto y menor expresión de HIF-1 α ($p < 0.0001$) en tanto que en los glomérulos mostró la misma distribución con una menor expresión de HIF-1 α ($p < 0.0403$). Los resultados del análisis densitométrico demostró que existe una correlación entre la expresión de HIF-1 α y VEGF (Pearson $r = 0.7325$, $p = 0.0029$, $R = 0.5365$). Las alteraciones renales del grupo de VEGF con baja expresión presentaron un curso favorable, con menores cifras de proteinuria, hipertensión arterial, sin presencia de hematuria macroscópica, síndrome nefrótico, falla renal o IRC. En contraste, el grupo de VEGF alto presentó mayor frecuencia de alteraciones renales, presencia de hematuria macroscópica, proteinuria en rangos elevados, síndrome nefrótico/nefritico, hipertensión arterial, así como 1 paciente que evolucionó a falla renal concluyendo en IRC.

CONCLUSIONES: Existe una correlación entre la expresión de HIF-1 α y VEGF, lo cual sugiere HIF-1 α puede estar regulando la expresión de VEGF de manera transcripcional en esta enfermedad, asociando este hecho con mayores alteraciones renales lo cual sugiere la participación de HIF-1 α y VEGF en la fisiopatología de la nefritis lúpica en niños y por primera vez se muestran en tejido renal de niños con esta enfermedad.

2. INTRODUCCION

El lupus Eritematoso Sistémico (LES) es conocido como una enfermedad autoinmune, multisistémica, episódica, caracterizada por la inflamación de los vasos sanguíneos y tejido conectivo, así como presencia de anticuerpos antinucleares (ANAs) y anticuerpos anti-DNA. Sus manifestaciones clínicas son extremadamente variables y su curso es progresivo. Una de las manifestaciones comunes y graves es el daño renal (65-85%), pues se asocia con complicaciones que pueden llevar a la muerte sobre todo en pacientes con LES iniciado en la infancia. Se han determinado diversas formas histológicas de nefritis lúpica y la clasificación más frecuente utilizada es la de la OMS, cuya forma más grave es la clase IV.¹

Se ha descrito que diversas enfermedades autoinmunes cursan con un incremento de la muerte celular programada o existe una desregulación en estos procesos de apoptosis, en donde recientemente se ha reportado la participación de HIF en estas enfermedades de origen autoinmune.

2.1. HIF-1 α

El elemento principal de organización del sistema regulador de oxígeno es un factor de transcripción específico denominado factor inducido en hipoxia 1 (HIF-1). HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades (HIF-1 α y HIF-1 β) con pesos moleculares de 120-130 Kd y 91-94 Kd respectivamente. En presencia de oxígeno la subunidad alfa se modifica en hidroxilasas que constituyen el punto central del mecanismo sensor, induciendo su catabolismo por el proteosoma. En tanto que en hipoxia, o en presencia de algunos factores de crecimiento que incrementen su síntesis HIF-1 α se trasloca al núcleo, donde unido a HIF-1 β actúa como factor transcripcional de diversos genes con elementos de respuesta a hipoxia en su promotor, regulando la síntesis de una amplia serie de proteínas, desde enzimas respiratorias y transportadoras hasta hormonas involucradas en la regulación del organismo, eritropoyesis y además participa significativamente en los mecanismos de reparación celular.²

El factor de transcripción inducido en hipoxia, juega un papel importante en el crecimiento celular al incrementar la resistencia a la apoptosis y estimular la producción de factores angiogénicos como VEGF. En relación a la función y al daño renal, las células epiteliales de los túbulos renales proximales responden a la hipoxia o a la exposición a Interleucina -1 beta (IL-1 β) con un incremento en la producción de VEGF. En la privación de oxígeno a nivel renal, HIF-1 α es el factor de transcripción más

importante que lleva a la expresión de VEGF, pero también IL-1 β puede estar involucrada en la estimulación y producción de VEGF. ³

Las principales áreas expuestas a hipoxia en el riñón senescente son la corteza renal, caracterizada por una fibrosis en el intersticio y la pérdida de capilares peritubulares lo cual correlaciona positivamente con el daño tubulointersticial propio del envejecimiento, asociado con la sobre regulación de los genes que involucra HIF, entre ellos VEGF. ⁴

Así mismo, estudios hechos por Kairaitis y colaboradores en un modelo murino de daño renal crónico en la Nefrosis por Adriamicina, demuestran la hipoxia de la corteza renal, encontrando un incremento en la localización nuclear de HIF-1 α en un contexto de gran daño glomerular y tubulointersticial, en contraparte a la expresión de VEGF la cual disminuyo significativamente después del tratamiento por el quimioterápico. ⁵

Se ha sugerido que la expresión de HIF-1 α puede ser independiente de la producción de VEGF. Acerca de esto, Namikoshi y colaboradores analizaron la expresión de VEGF y HIF-1 α en pacientes con Nefropatía por IgA mediante inmunohistoquímica a 23 biopsias renales con esta patología, encontrando que HIF-1 α no mostró una expresión paralela a la de VEGF, con una expresión débil de HIF-1 α en el epitelio tubular renal sugiriendo que la expresión de HIF-1 α es independiente de la producción de VEGF en la Nefropatía por IgA, y que esta última proteína se ha encontrado elevada en las etapas iniciales de esta Nefropatía sin resultar en mayor protección contra el daño tubular renal. ⁶

2.2 VEGF

La citocina angiogénica más importante que regula la permeabilidad vascular es el factor de crecimiento endotelial (VEGF) el cual es un importante factor de supervivencia para las células endoteliales en condiciones de hipoxia. La función de VEGF en el riñón continúa en estudio y se ha demostrado su expresión en el epitelio visceral y mesangial glomerular, así las áreas de expresión VEGF en tejido renal sano en humanos así como en túbulos colectores proximales en modelos murinos de daño renal. ^{7,8,9}. Estudios hechos por Ostendorf y colaboradores demostraron que al administrar un antagonista de VEGF (polietilenglicol) a ratas sanas y a otras con diferentes tipos de nefritis, ocasionó el daño glomerular y proteinuria en ratas sanas, disminuyendo la regeneración del endotelio glomerular e incrementando la muerte celular y la frecuencia de microaneurismas, identificando así el papel importante de este

factor de crecimiento en la supervivencia celular endotelial y regeneración glomerular.

10

Así mismo, una angiogénesis defectuosa con una expresión baja de VEGF ha sido reportada en un modelo murino de daño renal progresivo. Al respecto, Kang y colaboradores aplicaron VEGF a ratas, encontrando que el tratamiento con VEGF incrementó la proliferación celular endotelial glomerular, mejoró la función renal, redujo la fibrosis y disminuyó la mortalidad de las ratas comparada con el grupo control, implicando así el potencial efecto benéfico de este factor de crecimiento en las enfermedades renales.¹¹

De igual forma, se ha reportado una expresión disminuida de VEGF en el tejido renal de algunas enfermedades como Amiloidosis, Diabetes, Glomerulonefritis Crescentica, en donde el daño al epitelio visceral en estas enfermedades tendría el potencial para liberar grandes cantidades de VEGF a nivel local incrementando la permeabilidad glomerular y como es también un factor de crecimiento, la pérdida en el control de la secreción de VEGF después del daño al epitelio visceral, puede conducir a importantes alteraciones en la función de las células endoteliales glomerulares.⁷

Basados en el hecho de que VEGF incrementa la permeabilidad vascular se ha considerado que pueda estar relacionado al desarrollo de la proteinuria. En ese sentido, Horita y colaboradores examinaron un modelo murino de nefrosis mediante Hibridación In Situ e inmunohistoquímica al inyectar albúmina intraperitonealmente, encontrando una sobre expresión de VEGF RNAm en el glomérulo, en donde esta expresión alterada de VEGF es asociado a la proteinuria.¹²

En autoinmunidad, se ha descrito acerca de la importancia acerca de HIF y otras proteínas, las cuales han sido implicadas en ciertas enfermedades autoinmunes tales como Artritis reumatoide, y últimamente en tiroiditis autoinmne y lupus eritematoso sistémico.¹³

En el lupus eritematoso sistémico (LES) se ha medido los niveles de VEGF en plasma sanguíneo. Navarro C y colaboradores, estudiaron a 28 pacientes con LES, 10 con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) y 24 controles sanos, en los cuales midieron los niveles de VEGF en plasma mediante ELISA y realizaron su inmunolocalización en el tejido renal de los pacientes con LES y controles, encontrando niveles elevados en plasma de esta proteína en los pacientes con LES comparados con SAAF y controles sanos, con una intensa expresión a nivel renal en los pacientes con nefritis lúpica.¹⁴

Sin embargo hasta la fecha no se ha estudiado la implicación de HIF-1 α en la regulación de VEGF en tejido renal de niños con nefritis lúpica clase IV, la cual es la forma mas frecuente y con mayor daño renal, por lo que en este trabajo se investigó mediante inmunohistoquímica la expresión de HIF-1 α y VEGF en 18 biopsias renales de niños con nefritis lúpica clase IV, y la asociación clínica existente con la evolución de esta enfermedad.

3.- JUSTIFICACIÓN

El lupus Eritematoso sistémico es el prototipo de enfermedad autoinmune. A través de un mejor entendimiento de la patogénesis de este desorden, han sido hechos grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de otros problemas inmunológicos.

Una de las manifestaciones comunes y graves es el daño renal. Se ha determinado diversas formas histológicas de nefritis lúpica en donde la mayoría de los niños afectados presenta la forma más grave (Clase IV de la OMS) por lo que todos los esfuerzos en el diagnóstico oportuno, control de la enfermedad y manejo adecuado deben realizarse en estos pacientes.

Hasta este momento, no se conoce bien la etiología del LES, donde la información disponible sugiere causas multifactoriales la cual para expresarse requiere de predisposición genética, desregulación del sistema inmunitario, factores hormonales y ambientales.

Con los conocimientos actuales sobre inmunohistoquímica, el presente estudio se realizó para contribuir en la investigación del proceso fisiopatológico que ocurre en la nefropatía lúpica en niños y determinar si existe participación HIF-1 α y VEGF así como su asociación con el tipo de lesión histopatológica más frecuente en estos pacientes y contribuir en el conocimiento para un mejor manejo y control de esta enfermedad.

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha establecido la importancia de HIF-1 α y VEGF en la patogénia de las enfermedades autoinmunitarias. Sin embargo, no existen trabajos publicados en niños que muestren asociaciones entre ambas y su correlación con la lesión histopatológica renal.

Por lo que se planteó la siguiente pregunta de Investigación:

¿HIF-1 α participa en la expresión de VEGF en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica clase IV y existe asociación con la evolución clínica?

5. -OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Determinar si HIF-1 α participa en la regulación de la expresión de VEGF en las biopsias renales de niños con nefritis lúpica clase IV y cual es su asociación con las alteraciones renales.

Objetivos secundarios:

Determinar los sitios de expresión de HIF-1 α en el tejido renal y cual es su asociación con las alteraciones renales.

Determinar los sitios de expresión de VEGF en el tejido renal y cual es su asociación con las alteraciones renales.

Comparar la expresión de HIF-1 α y VEGF entre los túbulos contorneados y los glomérulos y cual es su asociación con las alteraciones renales.

Evaluar las condiciones clínicas de la enfermedad al momento de la Biopsia renal.

6.-HIPÓTESIS

HIF-1 α regula negativamente la expresión de VEGF, y esto correlaciona con el curso clínico e histológico en pacientes pediátricos.

7.- VARIABLES.

HIF-1 α

DEFINICION CONCEPTUAL.

Es un factor de transcripción específico compuesto por dos subunidades (HIF-1 α y HIF-1 β) con pesos moleculares de 120-130 Kd y 91-94 Kd. Actúa como factor transcripcional de diversos genes con elementos de respuesta a hipoxia en su promotor, regulando la síntesis de una amplia serie de proteínas, desde enzimas respiratorias y transportadoras hasta hormonas involucradas en la regulación del organismo, eritropoyesis y además participa significativamente en los mecanismos de reparación celular

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Se evaluó en biopsias renales de niños, preparando los cortes histológicos para su manejo con soluciones químicas y a través de técnicas de inmunohistoquímica.

INDICADOR: Del 0 al 100%

ESCALA DE MEDICION: Escalar discreta (%)

VEGF

DEFINICION CONCEPTUAL.

Es la citocina angiogénica más importante que regula la permeabilidad vascular el cual es un importante factor de supervivencia para las células endoteliales en condiciones de hipoxia.

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Se analizó en biopsias renales de niños, preparando los cortes histológicos para su manejo con soluciones químicas y se evaluó a través de técnicas de inmunohistoquímica.

INDICADOR: Del 0 al 100%

ESCALA DE MEDICION: Escalar discreta (%)

LESIÓN HISTOPATOLOGICA RENAL.

DEFINICION CONCEPTUAL

Daño renal autoinmune caracterizado por severa proliferación celular a nivel glomerular con un curso progresivo y de difícil tratamiento. Complicación renal más frecuente con presencia de proteinuria persistente mayor a 0,5 g/ día, así como cilindros celulares y otras alteraciones en el examen general de orina. (1)

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Clase I (patrón normal, sin sitio específico en el depósito de complejos inmunitarios), Clase II (Patrón mesangial, con depósito de complejos inmunes únicamente a nivel mesangial), Clase III (Patrón proliferativa focal y segmentaria, con depósito de complejos inmunes en mesangio, subendotelio y subepitelio), Clase IV (Patrón proliferativo difuso, depósitos de complejos igual que el previo), Clase V (patrón membranoso, con depósito de complejos inmunes en mesangio y subepitelio), Clase VI Esclerosis.

INDICADOR: I-VI

ESCALA DE MEDICION: Nominal De clase

8. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

Tipo de estudio Observacional, transversal, analítico, retrolectivo realizado en una muestra de 18 biopsias con nefritis lúpica de pacientes pediátricos en etapa escolar y adolescente, manejados en el servicio de Reumatología Pediátrica del Centro Médico Nacional "Dr. Gaudencio González Garza" La Raza México D.F. UMAE, de enero de 1998 a julio del 2005 así como 5 controles de tejido renal de nefrectomías otorgados por el servicio de patología.

9. UNIVERSO DE TRABAJO

Se estudiaron a 18 biopsias de pacientes pediátricos de 6 a 15 años, masculinos o femeninos, con diagnóstico de nefritis lúpica corroborado por patólogo experto que tengan reporte histopatológico según la clasificación de la OMS, atendidos en el servicio de Reumatología Pediátrica del Centro Médico Nacional "Dr. Gaudencio González Garza", La Raza México D.F. UMAE, de enero de 1998 a julio del 2005, así como 5 controles de tejido renal de nefrectomías otorgados por el servicio de patología del mismo hospital.

10. CRITERIOS DE SELECCION

Criterios de inclusión:

-Biopsias renales de pacientes con nefritis lúpica clase IV de ambos sexos, en edad de 6 a 15 años que tengan este diagnóstico valorado por patólogo experto.

Criterios de exclusión:

-Biopsias renales que no capten el material empleado en la inmunohistoquímica

-Biopsias renales en las cuales se encontró dañado el material a estudiar.

11. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.

11.1 Muestras.

Se obtuvieron 18 bloques de parafina de biopsias renales de niños con nefritis lúpica, protocolizados por el servicio de Reumatología Pediátrica y archivados en el servicio de Patología del Hospital CMN La Raza. Se incluyeron aquellos que tuvieron mejor calidad y cantidad de tejido.

Con los bloques de parafina correspondientes se practicaron cortes de 4 a 8 μ de espesor para tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (H/E), y de 2 a 4 μ de espesor para las tinciones inmunohistoquímicas.

11.2 Reactivos para H/E

- Para la tinción de H/E:
- Grenetina Bacteriológica CTR SCIENTIFIC (Monterrey N.L. México).
- Hematoxilina de Harris, Merck (Naucalpan de Juárez, Edo. De Méx.).
- HCl 1%-Alcohol amoniacal al 1%.
- Eosina B Merck (Naucalpan de Juárez, Edo. de Méx.).
- Xileno.
- Eosina Y Merck (Naucalpan de Juárez, Edo. de Méx.).
- Resina sintética Goleen Bell (Zapopan Jal. México).

11.3 Para el método de inmunohistoquímica:

- Silane (Sigma, Cal. USA).
- Citrato de sodio (0.01 M pH 6.0).
- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Bloqueador Suero de Cerdo 2% (DAKO corporation).
- Biotina (Link, DAKO LSAB + kit, DAKO Corporation).
- Sustrato DAB (diamino benzidina) (DAKO LIQUID DAB + Substrate-Chromogen Solution. (DAKO corporation).

11.4 Anticuerpos.

- Anti HIF-1 α .
- Anti VEGF.
- Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR) (DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).

11.5 Tinción de H/E.

En los portaobjetos se montaron los cortes del tejido para la tinción de rutina H/E. Las laminillas fueron desparafinadas en un horno a 60° C e hidratadas mediante un tratamiento con alcohol a concentraciones decrecientes. Posteriormente el tejido fue teñido por 8 minutos con Hematoxilina de Harris, enjuagado con agua corriente y el color vira con HCl 1%, alcohol amoniacal al 1% en agua. Después el tejido es contrateñido con Eosina, finalmente deshidratado en alcohol a concentraciones crecientes y xileno, e inmediatamente cubiertos con resina sintética. Las muestras fueron analizadas mediante microscopia de campo claro.

11.6 Inmunohistoquímica.

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un solo tiempo en todos los grupos. Los cortes se montaron en laminillas cubiertas con silane. Se mantuvo en una estufa bacteriológica a 62°C por 1 hora, para desparafinar con el siguiente procedimiento: Se hidrató la muestra: 3 baños en xileno, con duración de 8 minutos cada uno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 5 minutos.

Se hizo la recuperación de antígeno con citrato de sodio, por 20 min. en baño María y se hicieron lavados para eliminar el exceso de citrato.

Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos dos veces. Se bloqueó la unión no inmunológica de los

anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en suero normal de cerdo al 2%.

Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-VEGF -1 1:250 y anti- HIF-1 α 1:750. Después se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a Biotina link, con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR), por último el color se genera mediante la adición del substrato DAB (diamino benzidina) durante 3 minutos 30 segundos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñe con hematoxilina 15 seg.

Después el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y Xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

11.7 Análisis morfométrico

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes con el programa Imagen-Pro® Plus de Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA.

11. 8 Procesamiento de los datos.

Se elaboró una base de datos y la información se procesa utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentan mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizó mediante ANOVA de una vía. Se utilizó análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre grupos con $p \leq 0.05$ considerada como significativa.

12. RECURSOS

Los recursos presentes para la investigación fueron los siguientes.

Biológicos: 18 biopsias renales de niños en etapa escolar y adolescente atendidos en el servicio de reumatología pediátrica, así como 5 controles de tejidos renales de nefrectomías otorgados por el servicio de patología del mismo hospital.

Físicos: Microscopios de luz, Kit para la técnica de inmunohistoquímica y analizador de imágenes.

Humanos: 1 Reumatólogo Pediatra, 1 reumatólogo, 2 Especialistas en apoptosis, 1 Residente de reumatología pediátrica de 2o año, 1 Químico farmacobiólogo, 1 patólogo experto en biopsias renales, 1 cortador de muestras de parafina.

Químicos: Soluciones químicas para lavar y preparar los tejidos renales y anticuerpos para la inmunohistoquímica.

13. RESULTADOS

13.1 Análisis Clínico

Se revisaron los expedientes de niños con diagnóstico de LES de acuerdo a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología, los cuales presentaron afección renal, por lo que se les realizó biopsia. Se incluyeron 18 biopsias con nefritis lúpica tipo IV, de acuerdo a la clasificación morfológica de la OMS. En relación a la distribución por género, 15 fueron del sexo femenino (84%) y 3 del masculino (16 %). La edad promedio fue de 13 años (rango de 6 a 15 años). Las características clínicas se muestran en la Tabla 1. Para fines de la evaluación, nuestra población de estudio fue dividida en dos grupos, de acuerdo a la expresión de VEGF. El grupo 1 incluyó expresión baja de VEGF, y el grupo 2 expresión alta de VEGF. En el grupo 1, que incluyó 6 pacientes, el 100% tuvo hematuria microscópica, el 66 % presentó proteinuria (1-2 gr. / 24hrs), y 50% presentó depuración de creatinina menor a 50 ml/min./1.73m²sc y complemento bajo así como azoados elevados. El 16% presentó síndrome nefrótico y ninguno de los pacientes tuvo hematuria macroscópica, falla renal o IRC

Del grupo de VEGF alto (12 pacientes), el 58% presentó macrohematuria, el 75% tuvo proteinuria de 2-3 gr. / 24hrs, el 100% tuvo depuración de creatinina menor a 50 ml/min./1.73m²sc, 75% tuvo complemento bajo e hipertensión arterial. El 66% tuvo azoados elevados y manifestó síndrome nefrótico. Dos pacientes (17%) presentaron falla renal inicial y uno de ellos evolucionó a IRC.

13.2 Hallazgos inmunohistoquímicos.

Se encontró expresión de VEGF en 80 a 90% de células positivas en los túbulos contorneados proximales y distales (Figura 2C, 2D, 2E) tanto de la médula como en la corteza renal. La expresión de esta proteína en el epitelio visceral y mesangial de los glomérulos fue mayor al 70% en relación a la expresión de HIF-1 α . (Figura 2C, 2D, 2E, 2F). En los controles renales sanos se encontró una menor expresión en los mismos sitios (Figura 2A, 2B). VEGF se expresó con grados variables de intensidad en relación a la proliferación celular, con expresión baja (<60% de células positivas) y alta (70-100% de células positivas) ver figura 2C, 2D, 2E, 2F. En cuanto a la inmunotinción HIF-1 α , se expresó principalmente en los túbulos contorneados proximales (50-60% de

células positivas) y con menor expresión en los distales, en el citoplasma de las células tubulares predominando en la corteza renal en donde se expresó en el núcleo (Figura 1C, 1D, 1E, 1F). En el glomérulo las lesiones con mayor proliferación celular mostraron tinción positiva para HIF-1 α , con una distribución en el epitelio visceral y en la matriz mesangial (Figura 1D, 1F). Los controles renales sanos mostraron una expresión en los mismos sitios (Figura 1A, 1B), aunque claramente menor que en los pacientes con nefritis.

13.3 Análisis densitométrico de los hallazgos inmunohistoquímicos

El análisis densitométrico de las tinciones para HIF-1 α y VEGF permitió elaborar graficas de la densidad de expresión, las cuales se procesaron utilizando el programa de análisis estadístico Prisma©. En la figura 3 se muestra la densidad de la expresión de HIF-1 α y VEGF en los túbulos renales comparada con los glomérulos en las muestras de niños con nefritis lúpica tipo IV y los controles. En la figura 3A se muestra la densidad de la expresión de HIF-1 α y VEGF en los túbulos contorneados de las biopsias con nefritis lúpica tipo IV comparados con los túbulos contorneados de los controles sanos y observamos una relación que revela VEGF alto y menor expresión de HIF-1 α mediante ANOVA de una vía. ($p < 0.0001$)

En la figura 3B se muestra la densidad de expresión de HIF-1 α y VEGF en los glomérulos de las biopsias con nefritis lúpica tipo IV y se compara la expresión de estas dos proteínas con los respectivos en los controles sanos con una relación que muestra VEGF alto y menor expresión de HIF-1 α mediante ANOVA y Kruskal-Wallis ($p < 0.0403$)

Los resultados del análisis densitométrico demostró que existe una correlación entre la expresión de HIF-1 α y VEGF Pearson $r = 0.7325$, P value 0.0029 R 0.5365 .

14. DISCUSIÓN

Se sabe que HIF-1 α participa en diversas enfermedades autoinmunes como Artritis reumatoide, Dermatomiositis, Esclerosis sistémica, Tiroiditis autoinmune y recientemente en Lupus eritematoso sistémico^{13,15,16} enfermedades en las cuales se ha sugerido que la deficiencia de HIF-1 α deprime la función de los linfocitos T citotóxicos y bloquea el desarrollo de las células B en la médula ósea, a los linfocitos de origen fetal, y pueda llegar a producir autoanticuerpos y autoinmunidad.¹⁷ Esta proteína juega un papel importante en el crecimiento celular al incrementar la resistencia a la apoptosis y estimular la producción de factores angiogénicos como VEGF, considerado como la citocina angiogénica más importante que regula la permeabilidad vascular el cual es un factor importante de supervivencia para las células endoteliales en condiciones de hipoxia pero también IL-1 β puede estar involucrada en la estimulación y producción de VEGF en las células epiteliales de los túbulos renales proximales^{10,3}

Una angiogénesis defectuosa con una baja expresión de VEGF ha sido reportada en un modelo murino de daño renal, así como al aplicar un antagonista de VEGF, con variados efectos adversos a nivel renal, implicando así el potencial efecto benéfico de este factor de crecimiento en las enfermedades renales y el papel importante de este factor de crecimiento en la supervivencia celular endotelial y regeneración glomerular.^{10,11} Al respecto, se ha reportado una expresión disminuida de VEGF en el tejido renal de algunas enfermedades como Amiloidosis, Diabetes, Glomerulonefritis Crescentica, en donde el daño al epitelio visceral en estas enfermedades tendría el potencial para liberar grandes cantidades de VEGF a nivel local incrementando la permeabilidad glomerular y como es también un factor de crecimiento, la pérdida en el control de la secreción de VEGF después del daño al epitelio visceral, puede conducir a importantes alteraciones en la función de las células endoteliales glomerulares.⁷

Sin embargo en el lupus eritematoso sistémico (LES) se ha medido los niveles de VEGF en plasma sanguíneo encontrando niveles elevados, en donde los niveles séricos de VEGF y sVEGFR-1 se han reportado mayores en los pacientes con lupus activo comparado con los inactivos encontrando una reducción significativa en los niveles de VEGF RNAm en los que respondieron a tratamiento farmacológico y elevados en los que no^{14,18,19} lo cual es consistente con los datos reportados por nuestro estudio en niños con VEGF elevado y curso clínico desfavorable, en donde las características clínicas de nuestra población estudiada con lupus de inicio en la infancia (18 pacientes) se

relaciona con lo reportado en la literatura, pues se encontró que la nefritis tipo IV es la predominante y en el sexo femenino, con una edad promedio de 12 años sin afectar a niños menores de 5 años. El diagnóstico de LES cumplió con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología y se corroboró por la presencia de anticuerpos antinucleares y anti-DNA de doble cadena en todos los pacientes. El 72% presentó además consumo del complemento. El grupo de grupo de VEGF con baja expresión presentó un curso clínico favorable, menores cifras de proteinuria y menor frecuencia de Hipertensión arterial, sin hematuria macroscópica, síndrome nefrótico, falla renal o IRC. En contraste, el grupo de VEGF alto presentó mayor frecuencia alteraciones renales con presencia de Hematuria macroscópica, Proteinuria en rangos elevados, presencia de síndrome nefrótico/nefrítico, hipertensión arterial, así como 1 paciente con falla renal que evolucionó a IRC.

De igual forma, La expresión baja de HIF-1 α encontrada en nuestro estudio en niños con nefritis lupica asociada a menores alteraciones renales y curso favorable, se asocia a lo publicado a cerca de que HIF-1 α pueda participar en la atenuación de la glomerulonefritis en un modelo murino de daño renal proponiéndolo como un factor de protección renal.²⁰

Dentro de los datos clínicos reportados en nuestro estudio, la presencia de hipertensión arterial en el grupo con VEGF con mayores casos, puede asociarse con lo descrito sobre la Angiotensina II, la cual incrementa la expresión de VEGF y la producción de HIF-1 α en modelos murinos²¹ pero se ha demostrado en modelos murinos que al infundir Angiotensina II en etapas tempranas del daño renal, puede inducir la expresión de factores de crecimiento angiogénico como VEGF y Angioproteína-1(Ang-1) resultando en un incremento del área capilar glomerular, conduciendo potencialmente a la recuperación de las células endoteliales glomerulares dañadas.²²

Así mismo, los rangos elevados de proteinuria en el grupo de VEGF elevado, se asocia a lo descrito acerca de VEGF, el cual incrementa la permeabilidad vascular por lo que se ha considerado que puede estar relacionado al desarrollo de la proteinuria.¹²

En relación a los hallazgos histopatológicos, las áreas de expresión VEGF en tejido renal sano en humanos ha sido identificada en las células epiteliales viscerales glomerulares, así como en túbulos colectores proximales en modelos murinos de daño renal.^{7,8,9} y para HIF-1 α las principales áreas son la corteza renal, en las células epiteliales de los túbulos renales proximales^{3,4,5,8} en donde lo reportado por nuestro

estudio correlaciona con lo descrito siendo el caso en humanos y por primera vez en niños, con la implicación de estas dos proteínas en esta enfermedad en los sitios descritos.

En el análisis densitométrico encontramos que existe una correlación entre la expresión de HIF-1 α y VEGF (figura 5) lo cual sugiere que HIF-1 α puede estar regulando la expresión de VEGF de manera transcripcional en esta enfermedad, contrario a lo publicado por Tamehachi y colaboradores en donde sugieren que la expresión de HIF-1 α puede ser independiente de la producción de VEGF tal como lo muestran en un estudio de nefropatía por IgA ⁶, en donde esta implicación pueda diferir según la fisiopatología de cada enfermedad, por lo que nuestro estudio muestra a estas proteínas por primera vez en niños en donde HIF-1 α parece estar jugando un papel como regulador en la transcripción de VEGF en nefritis lúpica en niños, contribuyendo al estudio de la patogénia de esta enfermedad y dilucidar sobre objetivos terapéuticos eficaces.

15. CONCLUSIONES

Estos hallazgos muestran la implicación existente de HIF-1 α en la expresión de VEGF en biopsias renales de niños con nefritis lúpica, asociando la expresión elevada de VEGF en el tejido renal con un curso clínico desfavorable. Existe una correlación entre la expresión de HIF-1 α y VEGF, lo cual sugiere que HIF-1 α puede estar regulando la expresión de VEGF de manera transcripcional en esta enfermedad, demostrando que HIF-1 α y VEGF participa en la fisiopatología de la nefritis lúpica en niños, hecho que no se había explorado con anterioridad. Este trabajo requiere un estudio más extenso para valorar su participación en otras enfermedades autoinmunes tanto en niños como adultos, contribuyendo al estudio de la patogénia en esta enfermedad autoinmune así como ofrecer nuevos enfoques terapéuticos.

16. ANEXOS

ALTERACIONES DE LABORATORIO. Población infantil con Nefritis lúpica clase IV.	VEGF BAJO n= 6	VEGF ALTO n= 12	TOTAL n =18
ALTERACIONES DEL SEDIMENTO URINARIO	6 (100%)	12 (100%)	100%
MICROHEMATURIA	6 (100%)	5 (41%)	61%
MACROHEMATURIA	0	7 (58%)	39%
PROTEINURIA < 1 GR/24H	2 (33%)	1 (8%)	17%
PROTEINURIA 1-2 GR/24H	4 (66%)	2 (16%)	33%
PROTEINURIA + 3 GR/24H	0	9 (75%)	50%
HIPERTENSIÓN	2 (33%)	9 (75%)	61%
SÍNDROME NEFROTICO/NEFRÍTICO	1 (16%)	8 (66%)	50%
DEPURACIÓN DE CREATININA < 50MLmin/1.73m2sc	3 (50%)	12 (100%)	83%
ANEMIA	4 (66%)	9 (75%)	72%
LEUCOPENIA	2 (33%)	6 (50%)	36%
LINFOPENIA	4 (66%)	10 (83%)	78%
PLAQUETOPENIA	1 (16%)	6 (50%)	39%
COMPLEMENTO BAJO C3 (80-120), C4 (18-25)	3 (50%)	9 (75%)	67%
AZOADOS ELEVADOS	3 (50%)	8 (66%)	61%

TABLA 1. Comportamiento clínico de los niños al momento de la toma de biopsia renal.

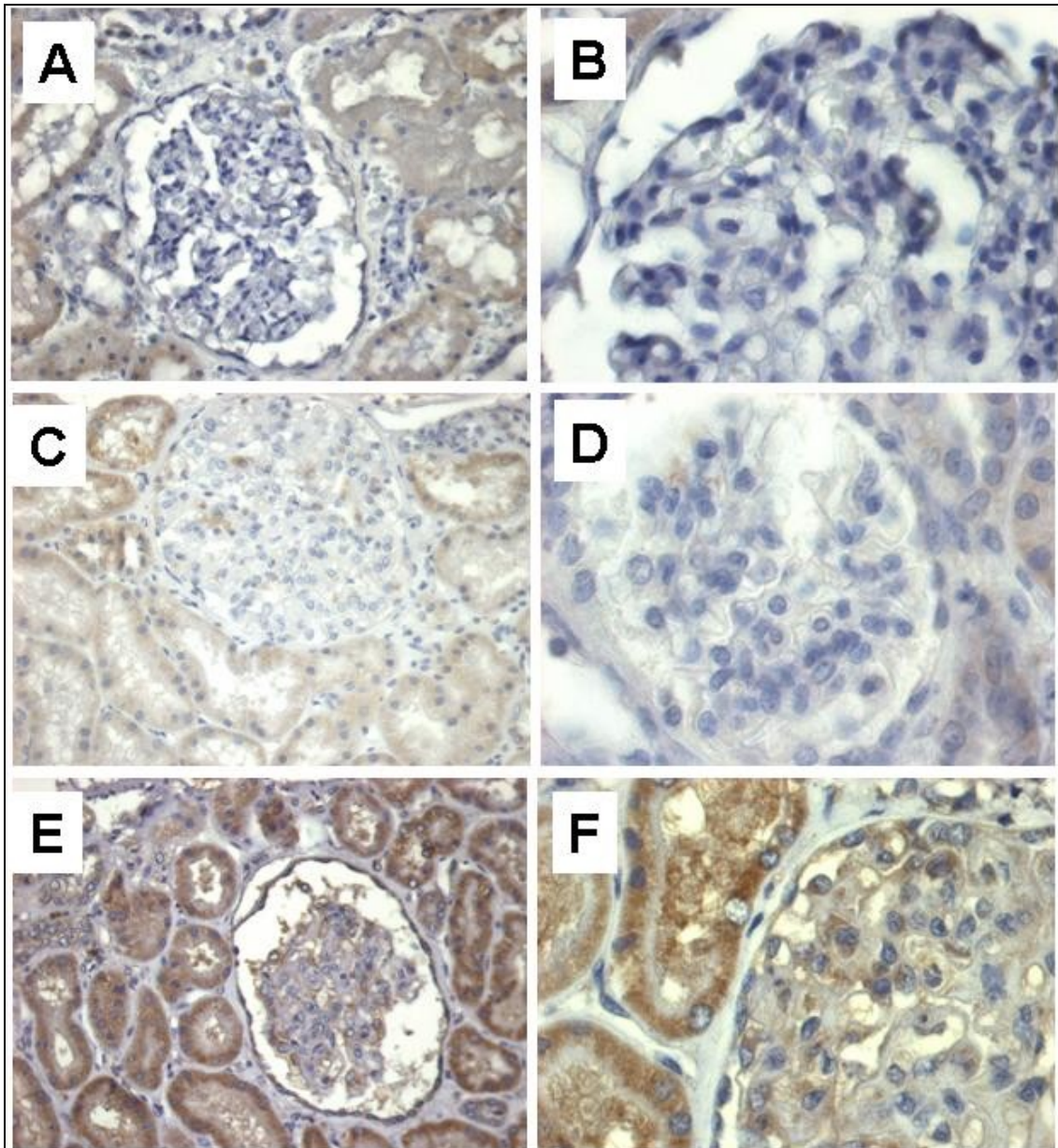


Figura 1. Fotografía representativa de la inmunotinción de **HIF-1 α** en una biopsia de niño con nefritis lúpica clase IV y control sano. **A.** Expresión baja de HIF-1 α en túbulos contorneados proximales y distales del control sano (40X). **B.** Negativo en el glomérulo del control sano (100X). **C.** Expresión baja para HIF-1 α en los túbulos contorneados proximales y distales así como en el mesangio glomerular (40X). **D.** Se observa expresión baja de HIF-1 α en el mesangio del glomérulo (100X). **E.** Intensa expresión de HIF-1 α en túbulos contorneados proximales y distales así como en el mesangio del glomérulo (40X). **F.** Intensa expresión de HIF-1 α en el citoplasma de túbulos contorneados proximales y glomérulo en donde se aprecia algunos núcleos positivos (100X).

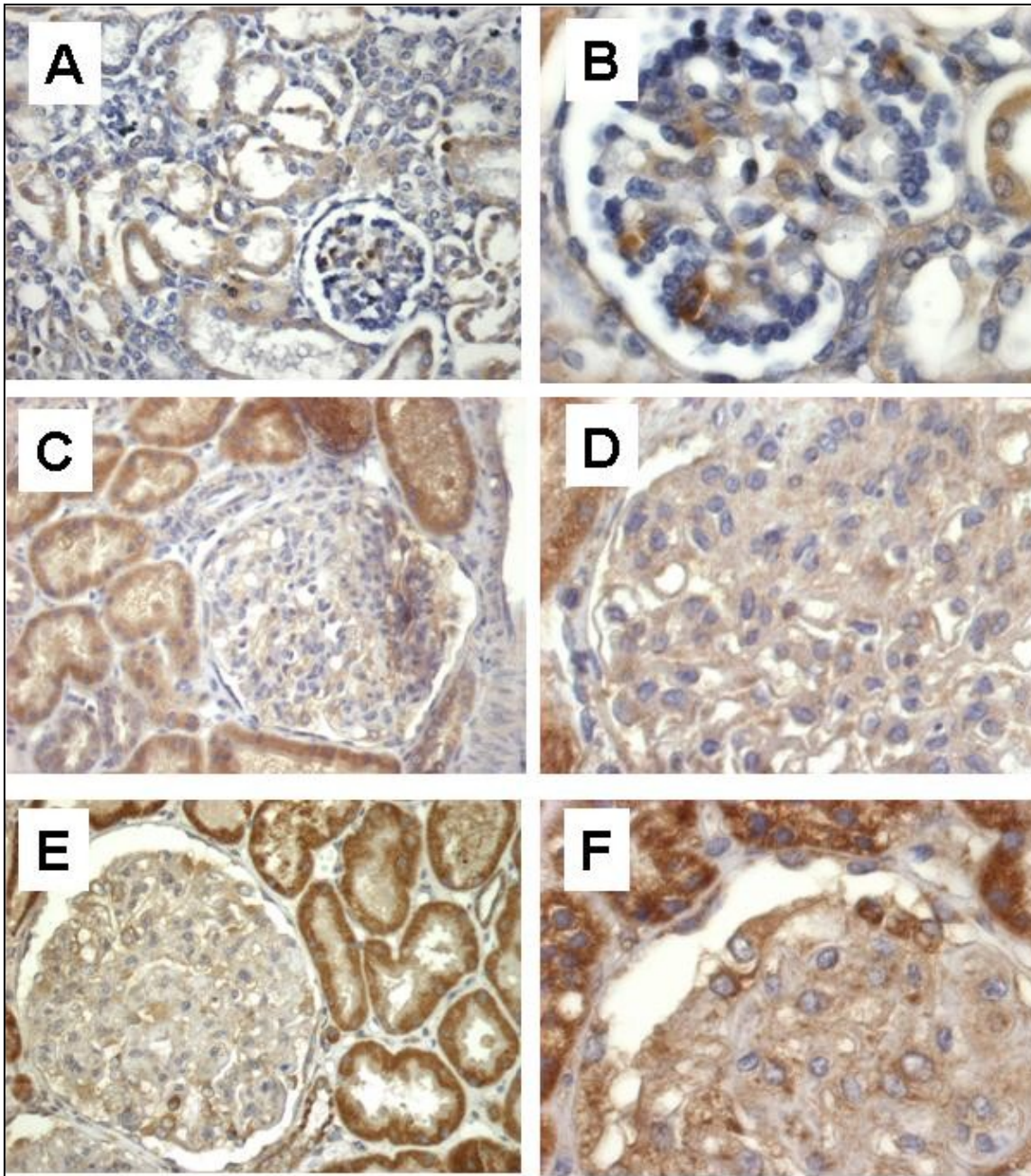


Figura 2. Fotografía representativa de la inmunotinción de VEGF en una biopsia de niño con nefritis lúpica clase IV y control sano. **A.** Expresión baja de VEGF en túbulos contorneados proximales y distales así como en el mesangio del glomérulo del control sano (40X). **B.** Expresión baja en el glomérulo del control sano (100X). **C.** Expresión baja para VEGF en los túbulos contorneados proximales y distales así como en el mesangio glomerular (40X). **D.** Se observa expresión baja de VEGF en el mesangio del glomérulo (100X). **E.** Intensa expresión de VEGF en túbulos contorneados proximales y distales así como en el mesangio del glomérulo (40X). **F.** Intensa expresión de VEGF en el mesangio del glomérulo (100X).

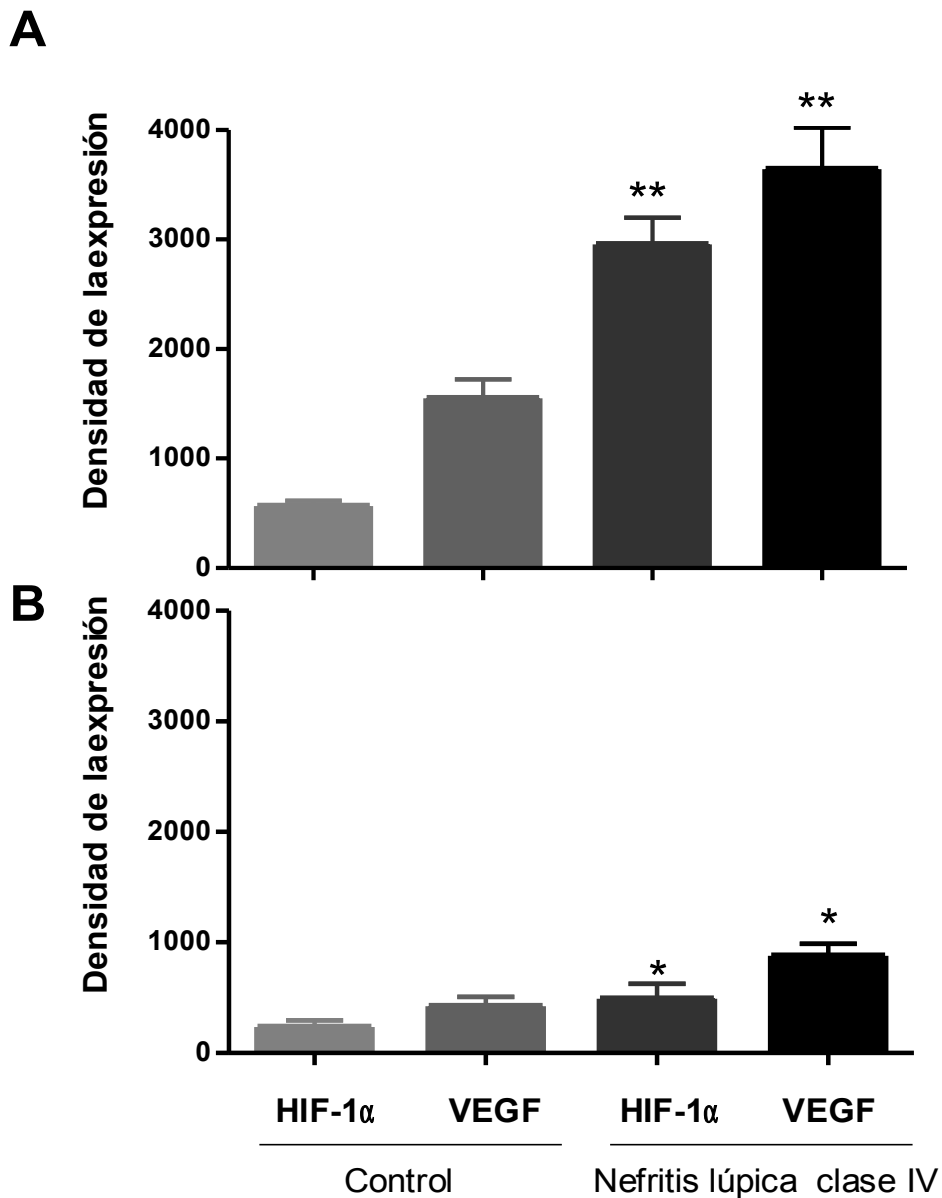


Figura 3. La gráfica muestra la densidad de expresión de HIF-1 α y VEGF en los túbulos contorneados comparada con los glomérulos en las muestras de niños con nefritis lúpica clase IV y los controles sanos. **3A** Se muestra la densidad de la expresión de HIF-1 α y VEGF en los túbulos contorneados de las biopsias con nefritis lúpica comparados con los túbulos contorneados de los controles sanos con una relación que muestra VEGF alto y menor expresión de HIF-1 α ($p < 0.0001$). **3B** Se muestra la densidad de expresión de HIF-1 α y VEGF en los glomérulos de las biopsias con nefritis lúpica y se compara con los respectivos en los controles sanos con una relación que muestra VEGF alto y menor expresión de HIF-1 α ($p < 0.0403$)

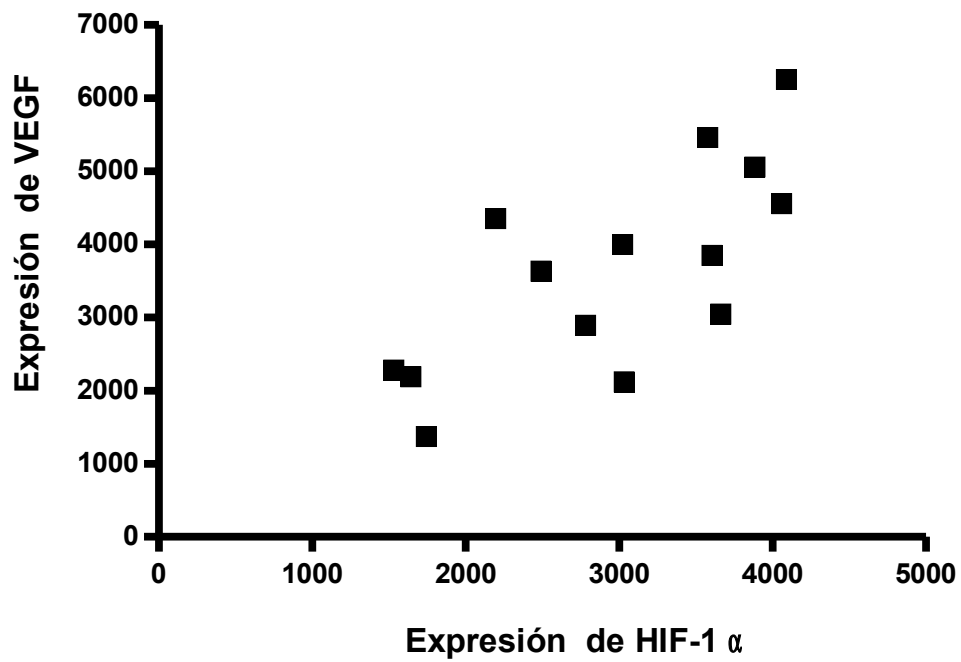


Figura 4.

Análisis densitométrico que muestra la correlación positiva que existe entre la expresión de HIF-1 α y VEGF Pearson r 0.7325, P value 0.0029 R 0.5365.

BIBLIOIGRAFÍA

1. James T. Cassidy. Ross E. Petty Textbook of Pediatric Rheumatology. Fifth edition. WB Saunders. Pp. 2005
2. Carlos Caramelo, Juan J. Peña Deudero, Ángeles Castilla, Soledad Justo, Alain J. De Solís, Fernando Neria, Silvia Peñate, Francisco R, Gonzalez –Pacheco. Respuesta a la Hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina*. 2006; 66, 2: 155-164.
3. Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Katschinski DM, Marxsen J, Kreft B, Jelkmann W. VEGF production by primary human renal proximal tubular cells: requirement of HIF-1, PI3-kinase and MAPKK-1 signaling. *Cell Physiol Biochem*. 2005; 15(1-4):99-108.
4. Tanaka T, Kato H, Kojima I, Ohse T, Son D, Tawakami T, Yatagawa T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Hypoxia and expression of hypoxia-inducible factor in the aging kidney. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006 Aug;61(8):795-805.
5. Kairaitis LK, Wang Y, Gassmann M, Tay YC, Harris DC. HIF-1alpha expression follows microvascular loss in advanced murine adriamycin nephrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jan;288(1):F198-206.
6. Namikoshi T, Satoh M, Horike H, Fujimoto S, Arakawa S, Sasaki T, Kashihara N. Implication of peritubular capillary loss and altered expression of vascular endothelial growth factor in IgA nephropathy. *Nephron Physiol*. 2006;102(1):p9-16.
7. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 1996 May;7(5):661-6
8. Yoshida T, Kuwahara M, Maita K, Harada T. Immunohistochemical study on hypoxia in spontaneous polycystic liver and kidney disease in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2001 Jun;53(2-3):123-8.
9. Katavetin P, Miyata T, Inagi R, Tanaka T, Sassa R, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidative stress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2006 May;17(5):1405-13.
10. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, Henninger DD, Janjic N, Floege J. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(7):913-23.
11. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration

- reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jul;12(7):1448-57.
12. Horita Y, Miyazaki M, Koji T, Kobayashi N, Shibuya M, Razzaque MS, Cheng M, Ozono Y, Kohno S, Taguchi T. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein-overload nephrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 1998 Oct;13(10):2519-28.
 13. Sigal LH. Basic science for the clinician 37: Protecting against autoimmunity-tolerance: mechanisms of negative selection in the thymus. *J Clin Rheumatol*. 2006 Apr;12(2):99-101.
 14. Navarro C, Candia-Zuniga L, Silveira LH, Ruiz V, Gaxiola M. Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2002;11(1):21-4
 15. Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, Athanassou N, Papazoglou D. Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(4):R193-201.
 16. Konttinen YT, Mackiewicz Z, Povilenaite D, Sukura A, Hukkanen M, Virtanen I. Disease-associated increased HIF-1, alpha v beta 3 integrin, and Flt-1 do not suffice to compensate the damage-inducing loss of blood vessels in inflammatory myopathies. *Rheumatol Int*. 2004 Nov;24(6):333-9.
 17. Kojima H, Sitkovsky MV, Cascalho M. *Curr Pharm Des*. HIF-1 alpha deficiency perturbs T and B cell functions. 2003;9(23):1827-32
 18. Robak E, Sysa-Jedrzejewska A, Robak T. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm*. 2003 Oct;12(5):293-8.
 19. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int*. 2006 Feb;69(4):747-53.
 20. Kudo Y, Kakinuma Y, Mori Y, Morimoto N, Karashima T, Furihata M, Sato T, Shuin T, Sugiura T. Hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in the attenuation of experimentally induced rat glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol*. 2005;100(2):e95-103.
 21. Sanchez-Lopez E, Lopez AF, Esteban V, Yague S, Egido J, Ruiz-Ortega M, Alvarez-Arroyo MV. Angiotensin II regulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1alpha induction and redox mechanisms in the kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1275-84.

22. Takazawa Y, Maeshima Y, Kitayama H, Yamamoto Y, Kawachi H, Shimizu F, Matsui H, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H Infusion of angiotensin II reduces loss of glomerular capillary area in the early phase of anti-Thy-1.1 nephritis possibly via regulating angiogenesis-associated factors. *Kidney Int.* 2005 Aug;68(2):704-22.