



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN RIÑÓN EN NIÑOS CON PÚRPURA
DE HENOCH-SCHÖNLEIN Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO**

**TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE:
PATÓLOGO PEDIATRA**

PRESENTA
DRA. SILENE MARGARITA GARCÍA DE LA CERDA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GUILLERMO RAMON GARCÍA
TUTOR METODOLÓGICO:
DRA MARA MEDEIROS DOMINGO
ASESOR:
DRA. YOLANDA FUENTES VELASCO
ASESOR:
DRA. ROSAURA RUTH HERNÁNDEZ MOTE



MÉXICO, D.F.

JULIO 2010



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN RIÑÓN EN NIÑOS CON PÚRPURA
DE HENOCH-SCHÖNLEIN Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO**

**TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE:
PATÓLOGO PEDIATRA**

**PRESENTA
DRA. SILENE MARGARITA GARCÍA DE LA CERDA**

**DR. GUILLERMO RAMON GARCÍA
DIRECTOR DE TESIS**

**DRA MARA MEDEIROS DOMINGO
TUTOR METODOLÓGICO**

**DRA. YOLANDA FUENTES VELASCO
ASESOR**

**DRA. ROSAURA RUTH HERNÁNDEZ MOTE
ASESOR**

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, por la paciencia, enseñanza y disponibilidad.

A mi familia, gracias por su gran apoyo.

ÍNDICE

Página

Resumen	1
1. Antecedentes	4
1.1 Epidemiología	4
1.2 Cuadro clínico	4
1.3 Anatomía patológica	5
1.4 Diagnóstico	7
1.5 Diagnóstico diferencial	8
1.6 Patogénesis	8
1.7 Pronóstico	9
1.8 Tratamiento	9
2. Marco teórico	11
3. Planteamiento del problema	19
4. Justificación	20
5. Objetivos	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. Hipótesis	22
7. Material y método	23
7.1 Tipo de estudio	23
7.2 Población de estudio	23
7.3 Tamaño de la muestra	23
7.4 Criterios de inclusión	23
7.5 Criterios de exclusión	23
7.6 Criterios de eliminación	23
7.7 Limitaciones del estudio	23
8. Descripción de variables	24
8.1 Definición operacional de variables	24
9. Metodología	27
10. Análisis estadístico	28

11. Resultados	29
11.1 Hallazgos histológicos	31
11.2 Infiltración por células CD68+ en glomérulos	33
11.3 Infiltración por células CD68+ en el intersticio	34
11.4 Inmunofluorescencia	38
12. Discusión	39
13. Conclusión	45
14. Anexo 1	46
15. Anexo 2	47
16. Referencias	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Tabla 1: Demografía y datos clínicos relevantes	29
Tabla 2: Estadios de lesión histológica bx basal vs bx al año por grupo de tratamiento	30
Tabla 3: Infiltrado por células CD68+ en glomérulos, bx basal vs bx al año por grupo de tratamiento	33
Tabla 4: Infiltrado por células CD68+ en intersticio, bx basal vs bx al año por grupo de tratamiento	35
Tabla 5: Estudio de inmunofluorescencia	38
Figura 1: Biopsia renal teñida con HE, proliferación endocapilar	31
Figura 2: Biopsia renal teñida con plata metenamina, proliferación extracapilar	32
Figura 3: Biopsia renal, con inmunoperoxidasa para CD68	32
Gráfica 1: Porcentaje de células CD68+ en glomérulos, bx basal vs bx al año por grupo de tratamiento	34
Gráfica 2: Porcentaje de células CD68+ en intersticio, bx basal vs bx al año por grupo de tratamiento	35
Gráficas 3 y 4: Relación del estadio ISKDC con el porcentaje de células CD68+ en glomérulos e intersticio, bx basal vs bx al año en micofenolato	36
Gráficas 5 y 6: Relación del estadio ISKDC con el porcentaje de células CD68+ en glomérulos e intersticio, bx basal vs bx al año en azatioprina	37

RESUMEN:

INFILTRACIÓN DE MACROFAGOS EN RIÑÓN EN NIÑOS CON PÚRPURA DE HENOCH-SCHÖNLEIN Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Protocolo HIM/2007/018

ANTECEDENTES: La púrpura de Henoch-Schönlein es una forma de vasculitis sistémica, con depósitos inmunes dominantes de IgA, que afecta vasos sanguíneos pequeños y múltiples órganos, entre ellos, piel, intestino y glomérulos. La sintomatología se resuelve generalmente en 8 semanas, sin embargo puede recurrir como nefritis (hematuria con o sin proteinuria). El daño renal en niños, aparece en el 20 al 56% y en más del 95% se presentan como hematuria. Microscópicamente, los glomérulos muestran desde cambios mínimos hasta una proliferación endocapilar difusa y medias lunas. En lesiones severas, que muestran actividad clínica e histológica, con formación de medias lunas y proliferación endocapilar difusa, se ha observado mayor infiltrado inflamatorio por leucocitos mononucleares, los cuales promueven la secreción de mediadores inflamatorios y a su vez mayor daño intersticial y glomerular. Esto se ha correlacionado con resultados desfavorables. Los macrófagos pueden ser identificados en los tejidos por medio del marcador de inmunoperoxidasa CD68. **MARCO TEÓRICO:** Se ha investigado la participación de los macrófagos en la progresión de varias enfermedades renales de niños, entre ellas, nefritis por púrpura de Henoch-Schönlein y la relación entre la población de macrófagos infiltrando los glomérulos y las medias lunas con un estado clínicamente activo de la enfermedad. Se ha visto que la infiltración por macrófagos en el glomérulo, los túbulos y el intersticio indica actividad clínica en grupos de glomerulonefritis proliferativa en niños. Diversos estudios han sugerido que los monocitos, directamente median el daño de la membrana basal glomerular por liberación de proteasas lisosomales, generando especies de oxígeno reactivo o afectando células endoteliales glomerulares. La presencia de estas células puede ser valorada utilizando el marcador de inmunohistoquímica CD68. **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:** La detección de macrófagos en biopsias renales de pacientes con nefritis por PHS, por medio de CD68, es útil como marcador de actividad y respuesta al tratamiento. **OBJETIVO:** Evaluar la presencia y número de células

monocitos/macrófagos en biopsias renales de niños con nefritis por PHS y su relación con el tratamiento de la nefritis. HIPÓTESIS: La presencia de células monocitos/macrófagos en biopsias renales de pacientes con nefritis por PHS, se correlaciona con datos histopatológicos de actividad y respuesta al tratamiento. MATERIAL Y MÉTODO: Estudio prospectivo, longitudinal, aleatorizado. Se revisaron las biopsias renales iniciales, de 17 niños con nefritis por PHS y la biopsia al año, posterior al tratamiento con dos medicamentos diferentes (azatioprina o micofenolato). Las biopsias fueron clasificadas de acuerdo al ISKDC y procesadas para la búsqueda de células positivas para el marcador de inmunohistoquímica CD68, las cuales fueron cuantificadas y expresadas en porcentaje en el intersticio y en glomérulos. Finalmente se correlacionó con los datos histológicos de actividad y respuesta al tratamiento. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Se empleó estadística descriptiva para variables numéricas empleando promedio y desviación estándar o mediana y rango, dependiendo de la distribución. Tablas de frecuencias para variables ordinales. Para valorar si existe regresión de la lesión por grupo de tratamiento, se utilizará Chi cuadrada. Se realizó análisis de correlación de la infiltración por células CD68 positivas y el grado de lesión histológica. Para comparar el porcentaje de infiltrado, se utilizará t pareada o prueba de Wilcoxon, de acuerdo a la distribución. RESULTADOS: La actividad de la lesión histológica, se correlacionó con el porcentaje de macrófagos en la biopsia renal. En ambos grupos de tratamiento, en la biopsia tomada a los 12 meses, se observó disminución de las células CD68+ en glomérulos e intersticio, sin embargo, en el grupo tratado con micofenolato, la disminución fue mas acentuada.

CONCLUSIONES:

1) El hallazgo histológico de macrófagos en las biopsias renales de niños con nefritis por Púrpura de Henoch-Schönlein, se correlaciona con mayor grado de lesión histológica, tanto glomerular como intersticial interpretado como estadios II y III de acuerdo a la clasificación propuesta por la ISKDC. 2) El tratamiento con antiproliferativos (Azatioprina o Mofetilmicofenolato) en combinación con prednisona, es eficaz para disminuir el porcentaje de macrófagos tanto en los glomérulos como el intersticio. Sin embargo, el grupo de pacientes tratados con micofenolato, tuvo una disminución significativa de células CD68+ en glomérulo

en la biopsia de 12 meses. 3) Será necesario continuar con el protocolo, incluyendo a un mayor número de pacientes y prolongando el seguimiento.

1. ANTECEDENTES:

La púrpura de Henoch-Schönlein (PHS), también conocida como síndrome de Schönlein-Henoch, nefritis de Schönlein-Henoch, púrpura anafilactoide y púrpura reumatoidea.

El nombre se debe a los médicos alemanes Johann Lukas Schönlein (1793-1864) y Eduard Heinrich Henoch (1820-1910). Algunos autores consideran que el nombre "Schönlein" debería ir en primer lugar debido a que fue la primera persona en reconocer la enfermedad (en 1837) o al menos eso se cree, ya que la condición parece haber sido primero descrita por Heberden en 1801. Henoch en 1868 reportó el primer caso de un paciente con cólico, diarrea sanguinolenta, artralgias y lesiones cutáneas [1].

Se considera una forma de nefropatía por IgA, con prominente compromiso extrarrenal. Es una vasculitis sistémica, con depósitos inmunes dominantes de IgA, que afecta vasos sanguíneos pequeños de piel, intestino y glomérulos.

1.1 EPIDEMIOLOGÍA:

Su presentación ocurre a cualquier edad, sin embargo es mayor en menores de 10 años. Con una relación hombre/mujer de 1.3:1 a 2.3:1 [1, 2].

Generalmente surge después de una infección aguda de vías respiratorias. Clínicamente se presenta como púrpura, afectando principalmente extremidades inferiores y glúteos, pero también puede observarse en brazos, cara y oídos. Hay artritis, dolor abdominal, sangrado de tubo digestivo y nefritis. La etiología de la enfermedad se cree que es multifactorial, con componentes genéticos, medioambientales y antigénicos. Muchos pacientes relatan antecedente de infección de vías respiratorias superiores, o gastrointestinales. También se informan casos de púrpura de HS después de ingestión de algunos medicamentos y de vacunas [1, 2].

1.2 CUADRO CLÍNICO:

La presentación clínica incluye un rash característico, poliartritis migratoria, compromiso renal y compromiso gastrointestinal. Después de síntomas prodrómicos se desarrollan las lesiones en piel, dolor abdominal, edema periférico, vómito y artritis, aunque sólo las lesiones en piel se presentan en el

100% de casos, siendo el síntoma de presentación inicial en el 50% de pacientes. Las lesiones consisten en máculas eritematosas, pápulas urticariales y placas (púrpura palpable). Estas lesiones cutáneas tienden a aparecer en extremidades inferiores, parte baja del abdomen y regiones glúteas. La erupción usualmente dura un promedio de 3 semanas. Hay síntomas gastrointestinales en hasta 85% de los pacientes, e incluyen dolor abdominal, náuseas y vómito, siendo el síntoma más común el dolor tipo cólico. El compromiso articular se presenta en cerca del 75% de casos y es el síntoma de presentación inicial en el 25%. Suelen afectarse articulaciones de rodilla y tobillos, presentando dolor y edema [3].

Las alteraciones renales se presentan entre el 30 y el 50% de pacientes. Los pacientes con nefritis, en más del 95%, presentan hematuria leve. También pueden tener proteinuria y en algunos casos oliguria y falla renal. Puede haber alteraciones renales permanentes en hasta el 20% de pacientes.

La sintomatología generalmente se resuelve en 6 a 8 semanas, sin embargo, puede recurrir manifestándose como nefritis (hematuria con o sin proteinuria), la cual aparece generalmente dentro de las 9 semanas posteriores al inicio de la dermatosis (se han reportado casos de aparición de nefritis hasta de 3 a 5 años posteriores a las manifestaciones dérmicas). Se consideran factores predisponentes púrpura de un mes, sangrado gastrointestinal y disminución del factor XIII [1, 3].

1.3 ANATOMÍA PATOLÓGICA:

Macroscópicamente, los riñones pueden ser grandes, la corteza pálida, con petequias en la superficie de la misma. Microscópicamente, los glomérulos pueden verse normales o presentar proliferación endocapilar difusa y medias lunas [3].

A través del tiempo se han utilizado diversas clasificaciones para la nefritis por PHS, Meadow et al, Heaton, Emancipator (1992), pero la clasificación actual para las lesiones renales es la propuesta por el ISKDC (International Study of Kidney Disease in Childhood), la cual se basa en la presencia de medias lunas (proliferación extracapilar) [1, 4].

I: Lesiones glomerulares mínimas, ausencia de medias lunas.

II: Ausencia de medias lunas

IIa. Proliferación mesangial pura.

IIb. Proliferación endocapilar focal y segmentaria

IIc. Proliferación endocapilar difusa.

III: Presencia de proliferación extracapilar en menos del 50% de los glomérulos.

IIIa. En asociación con proliferación endocapilar focal y segmentaria

IIIb. Con proliferación endocapilar difusa.

IV: Proliferación extracapilar en 50 – 75 % de los glomérulos.

IVa. En asociación con proliferación endocapilar focal y segmentaria

IVb. Con proliferación endocapilar difusa.

V: Proliferación extracapilar en más de 75% de los glomérulos.

Va. En asociación con proliferación endocapilar focal y segmentaria.

Vb. Con proliferación difusa

VI: Glomerulonefritis pseudomembranoproliferativa.

Los cambios tubulointersticiales se observan a la par de los glomerulares. En lesiones severas, con muchas medias lunas, hay edema e infiltrado inflamatorio intersticial, compuesto principalmente por leucocitos mononucleares aunque también pueden observarse eosinófilos. Células espumosas intersticiales pueden acompañar a la atrofia tubular y fibrosis intersticial. La arteritis necrosante es raramente vista en la biopsia renal [1, 2].

El depósito de IgA es el que predomina, aunque IgG e IgM pueden estar presentes, C3 también puede observarse en la mayoría de los casos. C1q y C4 están ausentes en muchos casos. Casi exclusivamente, se observa IgA1 y cadena J, se depositan en el mesangio, en algunos casos con depósitos periféricos en la pared capilar. El fibrinógeno, está presente en las medias lunas o asociado a lesiones necrosantes segmentarias. La tinción mesangial esta presente en muchos casos [1, 2].

La microscopía electrónica muestra complejos inmunes subendoteliales y menos subepiteliales que la nefropatía por IgA, también hay depósitos mesangiales e intramembranosos.

1.4 DIAGNÓSTICO:

El diagnóstico de la PHS en el niño es clínico. Es relativamente fácil en la forma de presentación clásica. Según los criterios del Colegio Americano de Reumatología, la presencia de una púrpura palpable, no trombocitopénica, de distribución fundamentalmente en extremidades inferiores, en un enfermo de edad inferior a 20 años, junto con uno de los siguientes signos o síntomas: artritis, dolor abdominal, hemorragia gastrointestinal o hematuria (macroscópica o microscópica), definen el diagnóstico de la PHS, con una sensibilidad 87.1% y especificidad de 87.7%. En el caso de presentación atípica o evolución no habitual, habría que recurrir al estudio histopatológico, mediante la constatación de vasculitis leucocitoclástica y los depósitos de inmunocomplejos de IgA. En ocasiones, es necesario realizar el diagnóstico diferencial con otro tipo de púrpuras, de causa hematológica, infecciosa o asociada a padecimientos autoinmunes. En general, un examen clínico y biológico riguroso nos permite realizar el diagnóstico sin dificultad [1, 4, 5].

Los datos de laboratorio en la PHS son inespecíficos. El hemograma es normal o presenta moderada leucocitosis. Las plaquetas, por definición, son normales. El tiempo de protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina activado son normales. Hasta en una 50% de los pacientes tienen disminución del nivel del factor XIII (factor estabilizador de la fibrina). Algunos estudios han relacionado la disminución del factor XIII con la presencia de dolor abdominal y hemorragia gastrointestinal. Algunos estudios encuentran signos de activación sérica del sistema del complemento por la vía alternativa (disminución de CH 50 y Properdina), pero otros estudios no han podido confirmar estos hallazgos. En la práctica, en la mayor parte de los niños con PHS no hay signos de activación del complemento. Otros datos, como anticuerpos antinucleares (ANA), factor reumatoide, ANCA IgG y ANCA IgA, son negativos en la gran mayoría de los casos [4-6].

1.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL:

El diagnóstico diferencial debe hacerse con vasculitis asociadas a ANCA (poliangeitis microscópica, granulomatosis de Wegener), lupus eritematoso sistémico, crioglobulinemia, glomerulonefritis postinfecciosa IgA dominante [3].

1.6 PATOGÉNESIS:

Dentro de la patogénesis, se postula que un antígeno desconocido estimula la producción e incremento de la IgA y que los complejos inmunes así formados se depositan localmente en muchos sitios del cuerpo activando inflamación y originando vasculitis necrosante. Otra posibilidad es con respecto al aumento de IgE, que muestra la mayoría de los pacientes, la cual se deposita en las células de Langerhans cutáneas y mastocitos. La unión de IgE con los mastocitos, sirve como fuente potencial de IL-8, un potente quimioatrayente para neutrófilos, lo cual origina la vasculitis leucocitoclástica [1, 3]. Hay evidencia de una glucosilación anormal de la IgA1, lo que contribuye al depósito mesangial en los glomérulos. La activación del complemento, en el glomérulo, ocurre a través de la vía alterna y de la lectinas-manosa [4].

Algunos investigadores, han sugerido, que la PHS, puede ser una forma sistémica de nefropatía primaria por IgA, o que la nefropatía IgA es una forma renal limitada de PHS. Esto, se deduce debido a la existencia de pacientes con biopsia renal diagnosticada como nefropatía por IgA y los cuales a los 2 a 13 años posteriores a la crisis renal, desarrollaron PHS.

La nefropatía por IgA y PHS, han sido reportadas en miembros de la misma familia, sin embargo, se sabe que la nefropatía por IgA es extensamente heterogénea en cuanto a su presentación clínica, expresión patológica y esto puede ser influenciado por factores genéticos o ambientales. Conforme se conozcan más de los mismos, se podrá concluir, si son entidades independientes o corresponden a una sola enfermedad con presentación clínica variable [1].

A diferencia de la nefropatía por IgA, no se han identificado, alteraciones genéticas específicas. Se sabe que las deficiencias de C4 y C2 (miembros del complemento), se asocian con mayor probabilidad de desarrollar PHS. Pacientes homocigotos para el alelo ACE D, son más susceptibles de presentar proteinuria persistente o significativa.

Se han asociado algunos antígenos HLA con aumento en la probabilidad de desarrollar PHS y nefritis secundaria [1, 5].

1.7 PRONÓSTICO:

Las alteraciones renales marcan el pronóstico de la enfermedad. Aproximadamente el 60% de pacientes presenta resolución de la enfermedad, usualmente en los primeros 6 meses; otro 15 a 20% presenta anormalidades urinarias menores sin deterioro de la función renal, y otro 20 a 25% presenta daño renal progresivo hasta falla renal terminal en 10 a 20 años. Hallazgos de mal pronóstico incluyen un curso clínico prolongado, proteinuria severa, hematuria macroscópica, hipertensión arterial, porcentaje de semilunas y en algunos trabajos, extensión de los depósitos subendoteliales [4].

Los pacientes con medias lunas en más del 50% de los glomérulos, o lesiones membranoproliferativas (IV o VI), tienen 35% de probabilidad de desarrollar insuficiencia renal crónica o morir en los siguientes 6 años a partir del diagnóstico de la nefritis. Comparada con 3% en estadios I o II. Otro factor pronóstico es la fracción de glomérulos con medias lunas, la infiltración por macrófagos y la inflamación intersticial, los cuales se correlacionan con un resultado desfavorable [2, 7].

1.8 TRATAMIENTO:

La PHS en muchas ocasiones no precisa ningún tratamiento más que observación y seguimiento clínico. Así ocurre en los casos que se presentan con sintomatología moderada, sin afectación renal o cuando ésta es leve (hematuria microscópica con proteinuria leve o sin ella). Los corticoesteroides pueden ser efectivos en el tratamiento del dolor abdominal y de la artritis. En cambio, no tienen ningún efecto sobre la púrpura y no modifican la duración del proceso o la aparición y frecuencia de las recidivas [1]. Cuando hay nefritis grave (con insuficiencia renal, síndrome nefrótico o más de 50% de los glomérulos con semilunas en la biopsia renal) el tratamiento es controvertido. Algunos autores creen que no hay un tratamiento efectivo, mientras que otros apoyan el tratamiento con corticoides, asociados o no a inmunosupresores, para prevenir la nefropatía crónica y mejorar los resultados finales. Asimismo, hay varios estudios retrospectivos que indican la mejoría de la lesiones renales

y/o la disminución del progreso de la mismas, mediante la asociación de corticoides y azatioprina o ciclofosfamida. Otros tratamientos, como la plasmaféresis o la administración de inmunoglobulinas intravenosas no superaran la categoría de tratamientos anecdóticos, que precisan de más estudios para poder ser recomendados. También son necesarios más estudios para comprobar la eficacia de la administración de factor XIII en el tratamiento del dolor abdominal y de la hemorragia gastrointestinal en la PHS [4, 5].

La enfermedad puede recurrir post-trasplante (53%), pero usualmente como depósitos de IgA sin deterioro de la función; se detecta nefritis clínica recurrente en aproximadamente 18% de casos; en 9% se producirá pérdida del injerto como consecuencia de la enfermedad [5].

2. MARCO TEÓRICO:

La púrpura de Henoch-Schönlein es la vasculitis más frecuente en pediatría. Han existido diversas clasificaciones histológicas para la nefritis por PHS, las cuales gradúan la fracción de glomérulos con medias lunas [7]. La primera es la de Meadow et al, la cual consideró el grado de proliferación mesangial con extensión endo y extracapilar. Esta clasificación es similar a la propuesta por Lee et al para la nefropatía por IgA (excepto por que el grado IV en la clasificación de Meadow puede tener medias lunas en más del 50%, mientras que en la clasificación de Lee et al la afectación es en más del 45%) [1, 4].

Emancipator en 1992, revisó los criterios de Heaton y propuso una clasificación más detallada, con seis clases histológicas, distinguidas de acuerdo a la presencia o ausencia y extensión de la proliferación extracapilar, con subclases definiendo las características de las lesiones endocapilares.

Más comúnmente, se utiliza la clasificación ISKDC (International Study of Kidney Disease in Childhood), la cual se basa en la presencia de medias lunas [8].

Esta le da énfasis a la aparición de medias lunas en el glomérulo, siendo el único factor que determina los grados II, III, IV y V. Los estadios más frecuentes, son el II y III con muy pocos grados V o VI. En los grados I y II, los cambios tubulointersticiales y glomerulares son mínimos.

Recientemente se ha investigado la participación del sistema monocito-macrófago en las lesiones intraglomerulares e intersticiales en biopsias de pacientes con nefropatía por PHS donde se ha demostrado la presencia de un infiltrado importante de macrófagos en las etapas iniciales o agudas, aun antes de que aparezcan signos clínicos de enfermedad renal. Sin embargo existen diversas publicaciones acerca del papel que juegan los macrófagos en la nefritis por PHS así como en otras nefropatías que afectan a niños y adultos [5, 8].

Los macrófagos activados intraglomerulares, están involucrados en la glomerulonefritis de medias lunas por secreción de mediadores inflamatorios, citocinas y quimiocinas. Su asociación con células epiteliales glomerulares lleva

a la formación de medias lunas por la sobre regulación de moléculas de adhesión y formación de matriz. El MIP-1 α (macrophage inflammatory protein) es una quimiocina, proteína inflamatoria de macrófagos, secretada por linfocitos, neutrófilos, fibroblastos, astrocitos y mesangio. El MCP-1 (macrophage chemotactic protein) es una proteína quimioatrayente de los monocitos y está implicada en la patogénesis de glomerulonefritis humana. Durante un estudio realizado, los niveles de MCP-1 se correlacionaron con el grado de macrófagos en el intersticio, mostrando medias lunas fibrosas y fibrocelulares, además de ser un factor importante en la progresión de lesiones tubulointersticiales, correlacionándose bien con las células CD68 positivas en el intersticio [9].

Los niveles de MCP-1 urinarios, son indetectables en las nefropatías por cambios mínimos o lupus sistémico. Sin embargo, los niveles de MCP-1 se correlacionan con el grado de infiltración por macrófagos en el intersticio, mostrando medias lunas fibrosas o fibrocelulares. La proteína MIP-1 α , está involucrada en la fase aguda, mientras que MCP-1, está involucrado en la fase crónica [9].

La afectación renal en la púrpura de Henoch-Schönlein, es reportada en 10 a 100%, con media de 40%. Los macrófagos y monocitos, son detectados por inmunohistoquímica en lesiones necrosantes extracapilares. Este aspecto es similar al observado en otras formas de nefritis necrosante (vasculitis asociadas a ANCA, enfermedad anti-membrana basal glomerular, glomerulonefritis por IgA). El reclutamiento de los monocitos, parece ser mediado principalmente por una molécula de adhesión celular VCAM-1. Además, los monocitos-macrófagos (CD68) y linfocitos T (CD3), son generalmente observados en el intersticio [4].

En la orina de pacientes con glomerulonefritis acompañada por infiltración celular activa, incluyendo nefropatía por IgA, nefritis por púrpura de Henoch-Schönlein y glomerulonefritis asociada a ANCA, las células T junto con macrófagos, aparecen juntas. Las células T, aparecen en el espacio urinario y funcionan como células efectoras en lesiones inflamatorias renales. Estas células, infiltran los glomérulos, las medias lunas y provocan lesiones túbulointersticiales. La presencia de células T y macrófagos en orina, reflejan la reacción inmune celular, que ocurre en riñones de pacientes con

glomerulonefritis acompañada por infiltración activa de células. Esto indica que el ataque por células efectoras inmunes, sobre el tejido renal, puede ser orientado a las paredes capilares glomerulares o túbulos [10].

Se ha investigado la participación de los monocitos/macrófagos en la progresión de varias enfermedades renales de niños. Estas células fueron medidas en orina y en el tejido renal, de acuerdo al número de células CD68 positivas, infiltrando los glomérulos. La cantidad de monocitos/macrófagos, fueron significativamente más alta en PHS en comparación con síndrome nefrótico de cambios mínimos, una alta tendencia fue encontrada en la nefropatía por IgA, glomerulonefritis proliferativa y glomeruloesclerosis focal y segmentaria y glomerulonefritis membranoproliferativa. El número de monocitos/macrófagos en 1 ml de orina, se correlacionó significativamente con el infiltrado glomerular y tubulointersticial. De acuerdo a los resultados, se sugiere que la infiltración del tejido renal por macrófagos/monocitos, participa en el desarrollo de varias enfermedades renales, principalmente en un estado clínicamente activo de la enfermedad. Los monocitos/macrófagos en orina, reflejan el número de estas mismas células, infiltrando el glomérulo, los túbulos y el intersticio. Por lo tanto, se sugiere que el número de estas células en orina, indica la actividad clínica en grupos de glomerulonefritis proliferativa en niños [11].

En otro estudio realizado por K. Kurose en 1994, en nefropatía por IgA y en nefritis por púrpura de Henoch-Schönlein, se valoró la relación entre la población de macrófagos infiltrando los glomérulos y las medias lunas. Los macrófagos fueron teñidos con CD68. En el glomérulo con medias lunas, se observó que una considerable cantidad de macrófagos infiltraban el tejido renal en PHS y en los estadios tempranos de la nefropatía por IgA. El glomérulo con medias lunas celulares, mostró muchos macrófagos, comparado con aquellos con medias lunas fibrosas o fibrocelulares. Estos hallazgos sugieren que los macrófagos juegan un rol importante en la fase temprana con medias lunas celulares en nefropatía por IgA y en PHS [14].

En varios tipos de glomerulonefritis experimental, la infiltración intraglomerular de monocitos ha sido demostrada. Muchos investigadores han sugerido el

papel que estas células juegan en la inflamación glomerular y reparación. Se ha estudiado la acumulación de estas células en glomerulonefritis experimental humana (GN), por métodos histoquímicos como tinción de esterasa no específica, lisozima, alfa1-antitripsina, y por anticuerpos monoclonales. En este estudio, se examinó la presencia y el rol de los monocitos intraglomerulares en una gran serie de GN por medio de la reacción de esterasa no específica (NSE), utilizando alfa-naftil butirato y basándose en datos clínicos y patológicos [9, 10].

Sólo casos con más de tres glomérulos por corte tisular, fueron estudiados. El número total de células intraglomerulares NSE-positivas, fueron contadas en tres cortes y se calculó el número medio de estas células por glomérulo (índice monocito, MI).

En los resultados, se encontró un número prominente de monocitos intraglomerulares en GN proliferativa extracapilar, proliferativa endocapilar, nefritis lúpica y crioglobulinemia.

En la GN extracapilar con medias lunas, se detectaron células NSE positivas en los capilares glomerulares y en las medias lunas, así como en el intersticio. El índice MI, fue más alto en la GN extracapilar celular que en los grupos fibrocelulares o fibrosos. En la GN intracapilar, las células NSE-positivas se detectaron principalmente en la luz capilar y unos pocos monocitos fueron encontrados en el mesangio.

En los pacientes con nefritis por PHS, nefropatía por IgA y GN membranoproliferativa, el puntaje medio fue significativamente más alto que en las alteraciones glomerulares menores. En los casos de PHS con lesiones necrosantes, tenían puntajes de MI significativamente más altos ($n=4$, $MI=1.73\pm 1.05$) que aquellos sin necrosis ($n=7$, $MI=0.71\pm 0.63$). Los monocitos fueron detectados en distribución focal y segmentaria, correspondiendo con lesiones segmentarias.

En GN endocapilar, Monga et al, mostró un número significativo de células NSE positivas en los casos de hiper celularidad prominente y exudación dentro de las primeras 6 semanas desde el inicio de la enfermedad. En este estudio, los monocitos intraglomerulares, fueron también prominentes en proporción al grado de cambios exudativos histológicos, pero no hubo una correlación entre infiltración glomerular por monocitos y la duración de la crisis.

Diversos estudios en GN experimental han mostrado que los monocitos intraglomerulares podrían inducir proteinuria. Sin embargo puede ser el resultado de diversos mecanismos más que mediación directa por monocitos como se describió por Glassock et al. En PHS y nefropatía por IgA, se observó importante afectación intraglomerular, aparte de estas dos GN, la infiltración por monocitos fue vista en pacientes no solo con marcada proliferación, también en lesiones segmentarias, medias lunas, adhesiones a la cápsula de Bowman y necrosis. A pesar de estos estudios, el mecanismo involucrado en el influjo renal por monocitos y su rol, en cada GN, necesita discutirse y estudiarse más [12].

Otro estudio realizado por Takahiko O. y colaboradores [13] en 1996, se basó en la investigación del significado de la coagulación intraglomerular y fibrinolisis en nefropatía por IgA y nefritis por púrpura de Henoch-Schönlein, se examinó la distribución de la fibrina de unión cruzada intacta, modulada por la actividad de plasmina y fue investigada en 25 pacientes con nefropatía por IgA y en 12 con PHS. También se detectó la invasión de macrófagos intraglomerulares, usando el anticuerpo monoclonal KP1 contra CD68.

La coagulación es un evento importante en el desarrollo de glomerulonefritis proliferativa mesangial severa y por medias lunas. Se conoce que los macrófagos glomerulares, expresan actividad procoagulante en GN experimental. Pocos estudios en GN humana, han elucidado, la producción de fibrina intraglomerular debido a invasión por macrófagos. El depósito de fibrina, es más frecuentemente encontrada en glomérulos con PHS que en nefritis por IgA [14]. En el estudio, los macrófagos fueron detectados en cortes de parafina, utilizando el anticuerpo monoclonal CD68 (KP1).

De acuerdo al mecanismo de desarrollo de la formación de medias lunas glomerulares, se cree que la ruptura de la membrana basal capilar glomerular, puede contribuir al depósito de fibrinógeno en el espacio de Bowman y la aparición de proliferación celular extracapilar, estar relacionada con la precipitación de fibrina.

Holdworth y Tipping, reportaron que la extensión del depósito de fibrina en el glomérulo, fue asociada con los grados de acumulación de macrófagos glomerulares en glomerulonefritis experimental en conejos.

El número de macrófagos por glomérulo, fue significativamente mayor en el grupo que presentó positividad para fibrina de unión cruzada intacta (n=15; media \pm SD= 1.6 \pm 0.9), que en el grupo negativo (n=6; 0.5 \pm 0.6).

En la nefritis por PHS, el número de macrófagos por glomérulo (n=8; 1.9 \pm 1.0), fue más alta que en la nefritis por IgA (n=13; 0.9 \pm 0.9). La coagulación intraglomerular puede progresar de acuerdo con la infiltración por macrófagos, especialmente en PHS [13].

El sistema monocito/macrófago y el sistema coagulación/fibrinolisis, son generalmente aceptados como potentes mediadores en el daño glomerular [15]. Estudios de reducción de macrófagos o transferencia de células inflamatorias mononucleares en nefritis por suero neurotóxico, sugiere que estas células pueden directamente inducir proteinuria. En este estudio, se utilizó un anticuerpo monoclonal para fibrina de unión cruzada (XFb), ya que el depósito de esta, frecuentemente ocurre en los glomérulos de pacientes con nefritis por IgA y nefritis purpúrica.

Los monocitos fueron las más numerosas células que infiltraron los glomérulos en pacientes con nefritis por IgA y PHS, se usaron dos clases de anticuerpos monoclonales Mo2 y FMC 32. La tinción de monocitos con reacción esterasa no específica, fue menos sensible que la tinción con anticuerpos monoclonales. La población de monocitos fue más alta que la de células T CD4, CD8, o células B en el glomérulo de pacientes con nefritis por IgA o PHS. Cuando se comparó los monocitos en estas dos poblaciones de pacientes, con aquellos de nefritis proliferativa mesangial (no IgA) o MCNS (cambios mínimos) se notó un significativo aumento en el número de monocitos intraglomerulares en nefritis por IgA y en PHS [14, 15].

Hubo una significativa correlación entre monocitos intraglomerulares y proteinuria en pacientes con nefritis por IgA. Esta correlación no fue evidente en PHS. La infiltración por monocitos fue más prominente en pacientes con PHS para aquellos cuyas biopsias renales fueron hechas en fases tempranas de la enfermedad que aquellas tomadas en fases tardías. Por el contrario, los monocitos en pacientes con nefritis por IgA no cambiaron, con respecto al intervalo del tiempo entre el descubrimiento inicial de la hematuria/proteinuria y

la biopsia renal. Esto sugiere que el estímulo inmunológico disparador, para el influjo de monocitos es agudo y transitorio en PHS, mientras que en nefritis por IgA, el estímulo es más persistente.

La formación de medias lunas, hialinosis glomerular o poblaciones de monocitos en el glomérulo no se correlacionó con el depósito de fibrina de unión cruzada. En este estudio las muestras fueron comparadas con aquellas de tejidos normales, de pacientes con proliferación mesangial no IgA y síndrome nefrótico de cambios mínimos.

Demostraron que los monocitos son el tipo celular inmune predominante que infiltra los glomérulos en ambas nefritis por IgA y PHS. Otros estudios en nefritis experimental han sugerido que los monocitos, directamente median el daño de la membrana basal glomerular por liberación de proteasas lisosomales, generando especies de oxígeno reactivo o afectando células endoteliales glomerulares. La importante contribución de los monocitos para la inducción de proteinuria en GN humana ha sido sugerida por Ferrario et al 1985 [4]. Los datos de este estudio confirmaron esta hipótesis para el caso de nefritis por IgA.

Los monocitos/macrófagos expresan factor tisular procoagulante el cual puede iniciar la vía extrínseca de la coagulación, lo que lleva al depósito de fibrina. En este estudio no encontramos una correlación significativa entre la población de monocitos glomerulares y el depósito de XFb en nefritis por IgA o PHS [15].

El marcador de inmunoperoxidasa CD68, es una glucoproteína transmembrana, tipo I, de 110 KDa.

Holness y Simmons (1993) [17], aislaron clonas del cDNA codificando CD68 por expresión transitoria en células COS e inmunoselección, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD68. Tiene un dominio extracelular altamente glucosilado de 298 residuos, conteniendo 9 sitios potenciales de glucosilación, unidos a N y numerosos sitios de glucosilación unidos a O. El dominio extracelular consiste de dos regiones distintas, separadas por una bisagra rica en prolina: dominio distal tipo mucina, que consta de repeticiones de péptidos cortos y altamente enriquecidos con residuos de treonina, los cuales pueden llevar cadenas de glucanos de unión a O. Y un dominio proximal con

significante secuencia homóloga a la familia de proteínas de enlace de membrana plasmática/lisosomal (LAMP 1 y LAMP 2) [16].

CD68 es un miembro de la familia de moléculas hematopoyéticas tipo mucina, que incluye leucosialina/CD43 y antígeno de célula madre CD34.

Por el método de FISH, Jones et al (1998) encontró la unión de CD68 y EIF4A1 al cromosoma 17p13. La molécula de unión o asociada a CD68 es una lipoproteína de baja densidad, modificada oxidativamente.

La expresión es intracelular, en gránulos citoplasmáticos, pero puede ser detectado en pequeñas cantidades en la superficie de las células. Se puede observar en monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, mastocitos, en el subgrupo de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea (CD34+), células T activadas y en el 40% de los linfocitos B de sangre periférica y 50% de los linfocitos con inmunofenotipo B en LLA (aunque la tinción es débil).

También se puede observar en el citoplasma de células no hematopoyéticas, especialmente en hígado, glomérulos y túbulos renales. Se han encontrado, formas solubles de CD68 en suero y orina [17].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La detección de macrófagos en biopsias renales de pacientes con nefritis por PHS, por medio de CD68, es útil como marcador de actividad y respuesta al tratamiento

4. JUSTIFICACIÓN:

Actualmente hay pocos estudios acerca del significado de la infiltración por células monocitos/macrófagos en biopsias renales de pacientes con nefritis por PHS, su correlación con la evolución y su relación con el tratamiento.

5. OBJETIVOS:

5.1 OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la presencia de infiltrado por macrófagos en biopsias renales de niños con nefritis por PHS

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar si existe disminución del infiltrado, después del tratamiento ya sea con Prednisona/Azatioprina o Prednisona/mofetilmicofenolato.
- Comparar los resultados entre los dos grupos de tratamiento
- Realizar una asociación entre el porcentaje de infiltrado con el grado de lesión histológica

6. HIPÓTESIS:

- Existe infiltración por macrófagos en biopsias renales de pacientes con nefritis por PHS
- Los pacientes que responden al tratamiento médico tienen una disminución en el porcentaje de infiltración de macrófagos en la biopsia de control (12 meses)

7. MATERIAL Y MÉTODO:

7.1 Tipo de estudio:

Estudio prospectivo, ciego, longitudinal, descriptivo, comparativo

7.2 Población de estudio:

Las muestras de tejido renal recibidas en el servicio de Patología del Hospital Infantil de México, desde noviembre del 2006 a mayo 2010, de niños con diagnóstico de nefritis por PHS que participen en el protocolo HIM/2007/018, se aleatorizan para recibir un año de tratamiento con Azatioprina o con Mofetilmicofenolato.

7.3 Tamaño de la muestra:

17 pacientes y 34 biopsias renales

7.4 Criterios de inclusión:

1. Que cuenten con biopsia renal al año, posterior a la primera biopsia inicial
2. Que cuenten con tejido incluido en parafina, suficiente para la realización del estudio de inmunohistoquímica.
3. Grado histológico de I a III

7.5 Criterio de exclusión:

1. Pacientes con GMN endo y extracapilar difusa con semilunas en mas del 50% de los glomérulos (clase IV, V y VI de acuerdo al ISKDC)

7.6 Criterio de eliminación:

No exista tejido suficiente tanto en la biopsia inicial como al año

7.7 Limitaciones del estudio:

Tamaño de la muestra

Tiempo

8. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES:

Variable independiente:

Tratamiento

Variables dependientes:

Grado de lesión histológica

Positividad para CD68.

8.1 Definición operacional de variables

Marcador CD68: Es una glicoproteína transmembrana, utilizada como marcador de inmunoperoxidasa para macrófagos. Se interpretó como positivo cuando la membrana citoplasmática y el citoplasma se tiñeron color café ocre, en células del intersticio y de los glomérulos.

Clasificación ISKDC: International Study of kidney disease in childhood. Clasificación utilizada para determinar el grado de lesión histológica, se basa en la proliferación endocapilar y porcentaje de medias lunas en los glomérulos, se mencionan seis estadios (I A VI). Se valoró en el momento de la biopsia inicial y al año, después de recibir el tratamiento.

Edad: Manifestada en años. Cuantitativa continua

Sexo: Masculino o femenino. Determinado según fenotipo durante la exploración física. Cualitativa dicotómica nominal.

Nefritis: Inflamación del riñón. Causa más común de daño glomerular.

Hematuria: Más de cinco eritrocitos por campo seco fuerte o presencia de hemoglobina $\geq 1+$ en el examen general de orina macroscópica y microscópica

Proteinuria significativa: Definida como cifras de proteinuria de 4 a 40 mg/m²SC/h en colección de orina nocturna de 12 hrs

Proteinuria nefrótica: Definida como más de 40mg/m²SC/h en colección de orina nocturna de 12 horas

Síndrome nefrótico: Proteinuria mayor de 40mg/m²SC/h, hipercolesterolemia, hipoalbuminemia <2.5mg/dL, edema.

Síndrome nefrítico: Hematuria, cilindros hemáticos e hipertensión arterial

Depósitos de IgA: Valorados por medio de inmunofluorescencia, la presencia de los depósitos, fueron informados de acuerdo al grado de intensidad de la reacción con la luz UV en escala del 0 a +++ , se observan dos patrones de depósitos: granular y lineal. El primero a su vez puede ser granular o fino. Se reporta la localización de los depósitos en el mesangio o en la pared del asa capilar glomerular. El termino “escasos” se utilizó para aquellos depósitos de poca intensidad y extensión en el tejido valorado.

Tratamiento: Medicamento inmunosupresor, dado durante el periodo de 12 meses, en este estudio, se utilizó Prednisona/Azatioprina o bien Prednisona/mofetilmicofenolato

Prednisona:

60 mg/m²/día, administrada cada 24 horas durante las primeras 4 semanas. Posteriormente el esteroide se administra a 40mg/m²sc/en días alternos 2 meses. A partir de entonces:

30mg/m²SC 1 mes

20mg/m²SC 1 mes

10mg/m²SC 1 mes y suspender al cabo de 6 meses

Azatioprina:

2 mg/kg/día durante un año, reajustándose a una dosis mínima de 1mgkgdía en base a los efectos secundarios encontrados por el medicamento (leucopenia y/o alteración en la pruebas de funcionamiento hepático).

Micofenolato de mofetilo:

1000 mg/m² día, dividido en 2 tomas al día, durante un año, reajustándose a una dosis mínima de 900 mg/m² día en base a los efectos secundario por el medicamento (leucopenia y/o alteración en la pruebas de funcionamiento hepático).

9. METODOLOGÍA:

Se revisaron las biopsias renales iniciales y al año, de 17 pacientes con diagnóstico de nefritis por púrpura de Henoch-Schönlein. Cada biopsia recibida, fue valorada inicialmente en fresco, por microscopía de luz para determinar si el material era suficiente (más de 7 glomérulos) Se tomó muestra para inmunofluorescencia, así como para el laboratorio de inmunquímica del departamento de nefrología y el resto del tejido se fijó con formol-buffer al 10%. Una vez obtenidos los bloques de parafina, se procedió a realizar cortes de 4 micras de espesor y las tinciones de histoquímica de rutina, cada una por duplicado (hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff, tricrómico de Masson y Metenamina de plata).

De acuerdo al informe dado por el patólogo, se estadificó la biopsia según la clasificación de la ISKDC.

Las muestras tomadas para inmunofluorescencia fueron procesadas de acuerdo a la técnica habitual (ver ANEXO 1) y valoradas, reportando grado de intensidad de la reacción con la luz UV en escala del 0 a +++, así como el patrón de depósito ya sea granular o lineal, fino o grueso. Los anticuerpos valorados fueron IgG, IgM, IgA, C3, C4, C1q y fibrinógeno.

Se realizó inmunotinción para el marcador CD68 (clona KP1) Biocare medical, Concord, CA, dilución 1:250, con recuperador de antígeno, mediante la técnica de inmunoperoxidasa (ver ANEXO 2). Se cuantificó en porcentaje la presencia de células positivas en el intersticio, se contó el número de glomérulos totales y el número de glomérulos que tenían células positivas, para obtener un porcentaje de glomérulos afectados. Finalmente, se contó el número de células positivas en cada glomérulo.

Durante la evaluación de las biopsias, el estudio fue ciego.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó estadística descriptiva para variables numéricas utilizando promedio y desviación estándar o mediana y rango, dependiendo de la distribución.

Tablas de frecuencias para variables ordinales.

Para valorar si existe regresión de la lesión por grupo de tratamiento, se utilizó Chi cuadrada.

Se realizó análisis de correlación de la infiltración por células CD68 positivas y el grado de lesión histológica.

Para comparar el porcentaje de infiltrado, se utilizó t pareada o prueba de Wilcoxon, de acuerdo a la distribución.

11. RESULTADOS:

Se revisaron 34 biopsias renales de 17 pacientes con diagnóstico de nefritis por PHS, cada uno con una biopsia basal y otra, tomada a los 12 meses después de haber iniciado el tratamiento. La demografía de los pacientes y el grupo de tratamiento se muestra en la Tabla 1. Diez pacientes recibieron esquema de prednisona/mofetilmicofenolato y siete prednisona/azatioprina. Del grupo total, el sexo masculino, predominó en el 76.4% (13 pacientes).

El rango de edad fue de 3 a 11 años, con una mediana de 7 años (41.1%).

Nueve casos (52.9%), presentaron daño renal manifestado como proteinuria significativa, siete casos (41.7%) como síndrome nefrótico y un caso (5.8%) como síndrome nefrítico.

	Azatioprina (n=7)	Mofetilmicofenolato (n=10)	Todos (n= 17)
Edad en años (mediana y rango)	7 (3 a 11)	7 (4 a 9)	7 (3 a 11)
Género (n, %):			
Masculino	4 (57.1)	9 (90)	13 (76.4)
Femenino	3 (42.8)	1 (10)	4 (23.5)
Presentación clínica (n, %):			
-Lesiones dérmicas	7 (100)	10 (100)	17 (100)
-Artralgias	3 (42.8)	7 (70)	10 (58.8)
-Dolor abdominal	5 (71.4)	7 (70)	12 (70.5)
-Sangrado de tubo digestivo	2 (28.5)	2 (20)	4 (23.5)
Indicación de biopsia (n, %):			
-Proteinuria significativa	3 (42.8)	6 (60)	9 (52.9)
-Síndrome nefrótico	3 (42.8)	4 (40)	7 (41.1)
-Retención de azoados	0	0	0
Creatinina sérica inicial mg/dL (promedio ± DS)	0.42 ± 0.09	0.49 ± 0.09	0.46 ± 0.09
Creatinina sérica 12 meses mg/dL (promedio ± DS)	0.48 ± 0.15	0.46 ± 0.06	0.47 ± 0.11

Tabla 1. Demografía de los pacientes y datos clínicos relevantes por grupo de tratamiento. No hubo diferencia significativa entre los grupos de tratamiento.

En las biopsias basales, se observó un caso (5.8%) en estadio I (cambios mínimos), 8 casos (47%) en estadio II (proliferación mesangial y endocapilar focal o difusa sin medias lunas) y 8 casos (47%) en estadio III (proliferación mesangial y endocapilar focal o difusa con medias lunas en menos del 50% de los glomérulos). Tabla 2.

En las biopsias renales tomadas al año posterior al tratamiento, se observaron en estadio I, 8 biopsias (47%), 8 biopsias para el estadio II (47%) y 1 biopsia en estadio III (5.8%). Tabla 2.

En micofenolato, 8 casos (80%) tuvieron regresión de la lesión histológica glomerular, un caso progresó de estadio I a IIA y otro caso no mostró modificación con respecto a su basal.

En el grupo tratado con azatioprina, 6 casos (85.7%) presentaron regresión y 1 caso, permaneció en estadio IIIB.

	Azatioprina n=7		Mofetilmicofenolato n=10		Todos n= 17	
	Basal	12 meses	Basal	12 meses	Basal	12 meses
Estadio ISKDC (n, %)						
I	0	4 (57.1)	1 (10)	4 (40)	1 (5.8)	8 (47)
IIA	3 (42.8)	0	2 (20)	4 (40)	5 (29.4)	4 (23.5)
IIB	0	1 (14.2)	1 (10)	1 (10)	1 (5.8)	2 (11.7)
IIC	1 (14.2)	1 (14.2)	1 (10)	1 (10)	2 (11.7)	2 (11.7)
IIIA	1 (14.2)	0	0	0	1 (5.8)	0
IIIB	2 (28.5)	1 (14.2)	5 (50)	0	7 (41.1)	1 (5.8)

Tabla 2. Estadios de lesión histológica de acuerdo a la clasificación de ISKDC, biopsia basal y al año y por grupo de tratamiento.

11.1 Hallazgos histológicos:

Los estadios de lesión histopatológica basales y al año de tratamiento se muestran en la tabla 2. Los cortes histológicos de las biopsias renales basales y al año, examinadas con hematoxilina y eosina, tinción de PAS, tinción de tricrómico de Masson y plata metenamina, tanto basales como al año, mostraron un espectro de lesiones glomerulares, que iban desde cambios mínimos, hasta proliferación endocapilar, con exudación de neutrófilos y formación de medias lunas. La mayoría de éstas, 77.7% eran celulares y el 22.2% fibrocelulares. También se observó esclerosis glomerular segmentaria y global, necrosis segmentaria y sinequias. Las lesiones tubulointersticiales son poco comunes en la nefritis por PHS, nosotros observamos atrofia tubular, fibrosis y edema intersticial leves. El infiltrado inflamatorio, era escaso o nulo, estaba constituido por linfocitos e histiocitos (Figuras 1 y 2).

Con la tinción de inmunoperoxidasa para CD68, tanto en las biopsias basales como al año, se observó que los macrófagos se localizaban en la luz de las asas capilares glomerulares, en el mesangio y en las medias lunas. En la mayoría de los casos, predominaron en las asas capilares. En el intersticio, se localizaban en los túbulos, en el epitelio y libres en la luz, así como en el interior de los capilares peritubulares y en el intersticio. Figura 3.

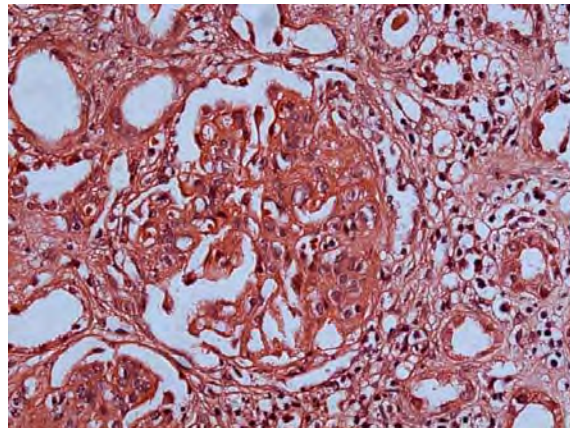


Figura 1. Corte histológico de biopsia renal teñido con HE, en el que se observa un glomérulo con proliferación endocapilar y fibrosis de la cápsula de Bowman, hay leve infiltrado por linfocitos y macrófagos en el intersticio. (20x).

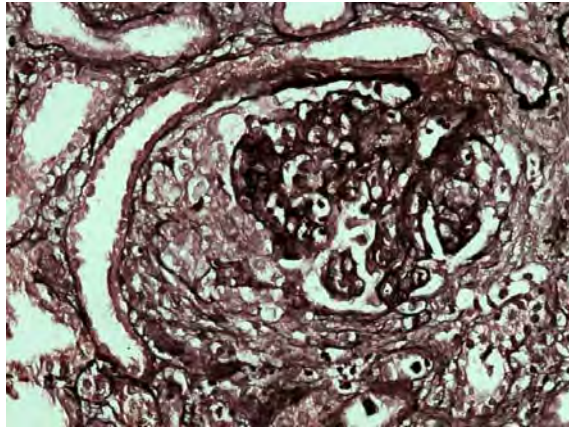


Figura 2. Corte histológico de biopsia renal, teñido con plata metenamina, en el que se observa un glomérulo con proliferación endocapilar y una media luna celular. (20x).

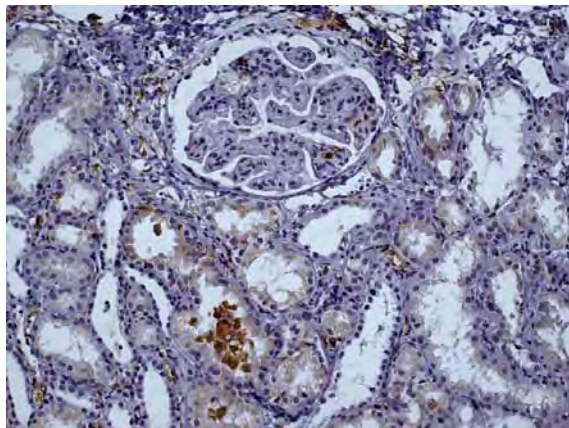


Figura 3. Corte histológico de biopsia renal con inmunoperoxidasa para CD68. Se observan macrófagos CD68+ en el glomérulo (mesangio y asas capilares) así como en el intersticio, luces tubulares e intraepiteliales. (10x).

11.2 Infiltrado por células CD68+ en glomérulos:

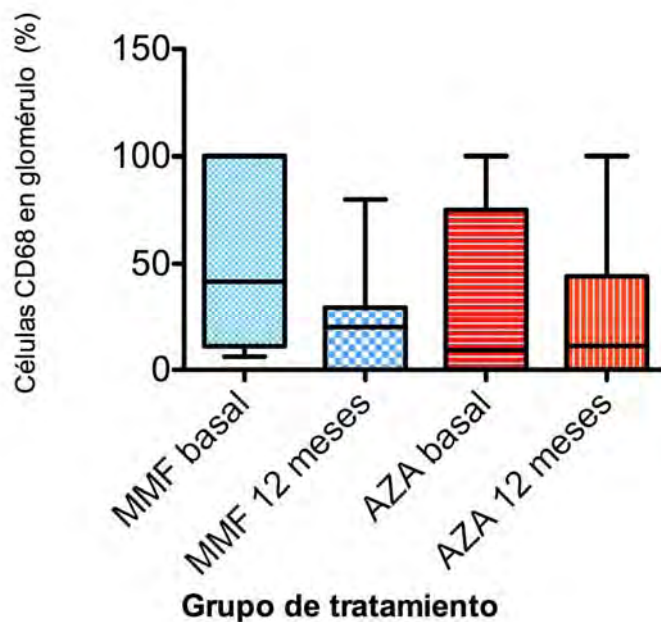
El infiltrado de células en los glomérulos de los pacientes tratados con micofenolato y azatioprina basal y al año se muestran en la Tabla 3. El porcentaje de glomérulos en la biopsia basal, con células CD68+ fue del 33.3%, al año fue del 11.7%.

Por grupo de tratamiento en la biopsia basal, en micofenolato 41.6% de los glomérulos tenían células CD68+ y 9% en el grupo de azatioprina. Al año, micofenolato, tuvo 20.4% de glomérulos positivos y azatioprina 8.3%. (Tabla 3).

En dos pacientes de micofenolato y en un paciente con azatioprina no hubo glomérulos en la muestra disponible para inmunohistoquímica. Sin embargo, en el grupo de MMF disminuyó tanto el número de pacientes con infiltración a glomérulo como la intensidad de dicho infiltrado ($p=0.03$ por prueba de Wilcoxon), no así en el grupo de Azatioprina, en quienes aumentó el número de pacientes con infiltrado y se mantuvo la intensidad del mismo ($p=0.56$ por prueba de Wilcoxon). Gráfica 1.

	MMF		AZATIOPRINA	
Paciente	Basal	12 meses	Basal	12 meses
1	100%	20%	Negativo	100%
2	100%	Negativo	SG	8%
3	SG	27%	100%	11%
4	SG	Negativo	9%	Negativo
5	100%	37%	37%	20%
6	33.0%	22%	75%	44%
7	29.00%	Negativo	Negativo	Negativo
8	100%	80%		
9	12.50%	20%		
10	50%	Negativo		

Tabla 3. Infiltrado por células CD68+ en glomérulos, por grupo de tratamiento, en la biopsia basal y al año. SG= sin glomérulos en el tejido disponible.



Grafica 1. Porcentaje de células CD68+ en los glomérulos, por grupo de tratamiento en la biopsia basal y al año. Hubo diferencia en el infiltrado en el grupo que recibió micofenolato (MMF), Wilcoxon $p = 0.03$, mientras que en el grupo de Azatioprina (AZA) no hubo diferencia en el basal vs. 12 meses ($p = 0.56$).

11.3 Infiltrado por células CD68+ en el intersticio:

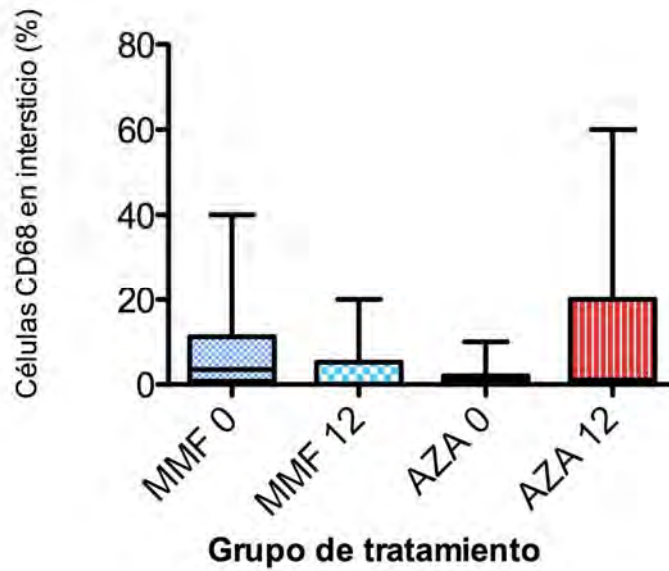
En las biopsias basales, el intersticio mostró una mediana del 1% de infiltrado CD68+, esta misma cifra, se observó al año postratamiento.

Por grupo de tratamiento, en la biopsia basal, micofenolato mostró 4% de positividad y 1% para azatioprina, al año, micofenolato disminuyó al 0% y azatioprina permaneció en 1%.

El infiltrado CD68+ en el intersticio por grupo de tratamiento, no mostró diferencia estadísticamente significativa, sin embargo hay una tendencia a mejorar o disminuir en el grupo tratado con micofenolato (Tabla 4, Grafica 2).

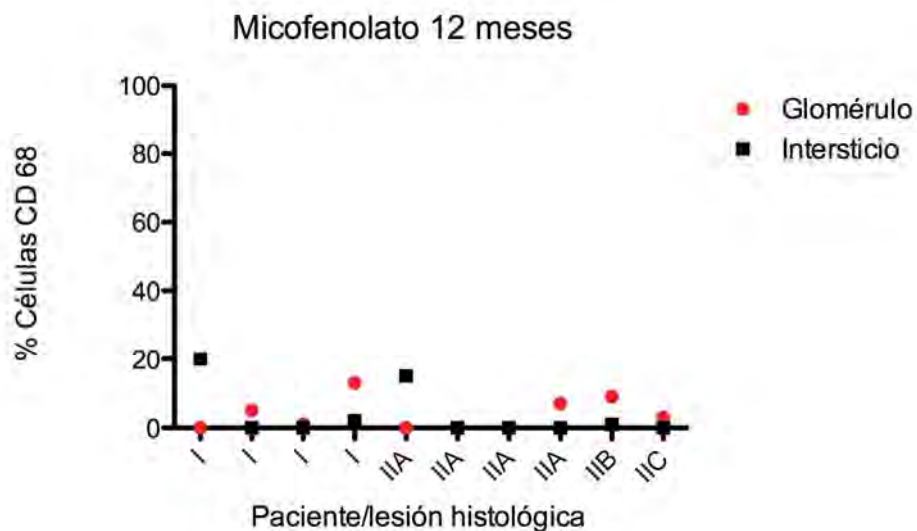
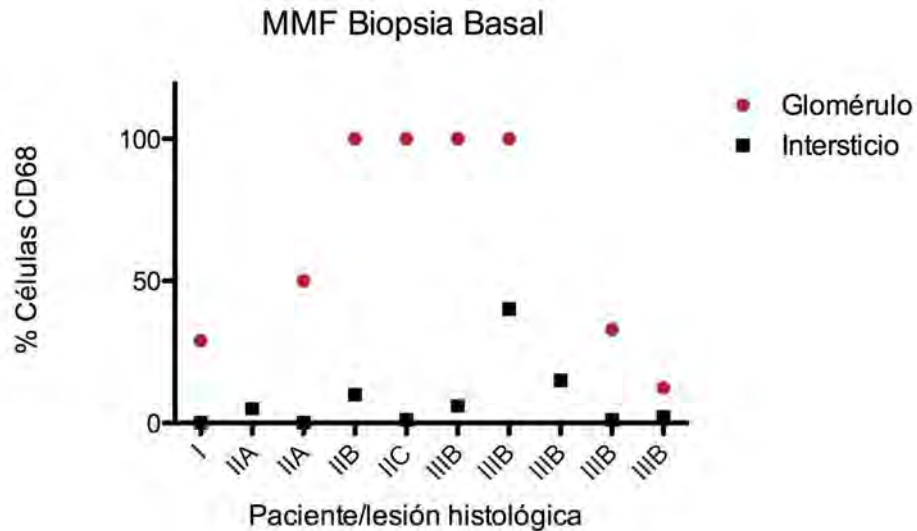
Paciente	MMF		AZATIOPRINA	
	Basal	12 meses	Basal	12 meses
1	6%	0	10%	60%
2	40%	0	0	20%
3	15%	0	2%	2%
4	5%	0	0	0
5	10%	0	1%	1%
6	1%	0	1%	1%
7	0	15%	0	0
8	1%	1%		
9	2%	2%		
10	0%	20%		

Tabla 4. Infiltrado por células CD68+ en intersticio, por grupo de tratamiento, en la biopsia basal y al año.

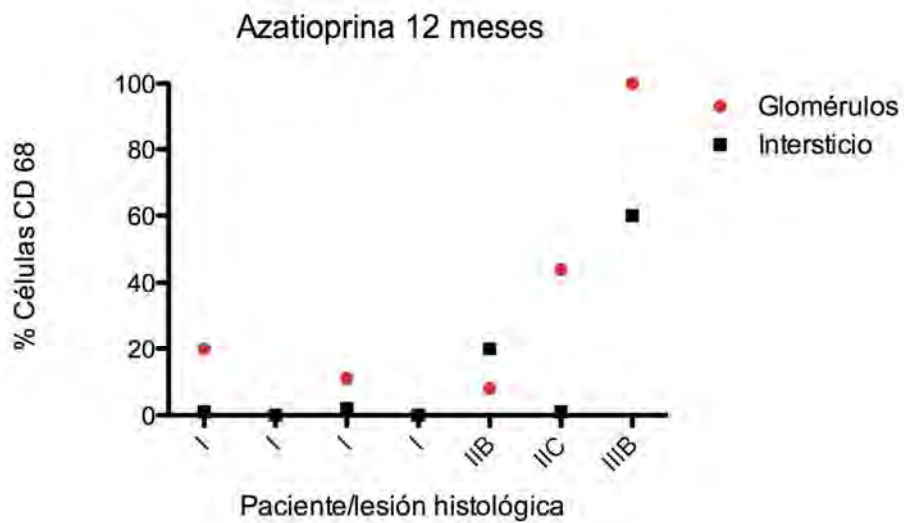
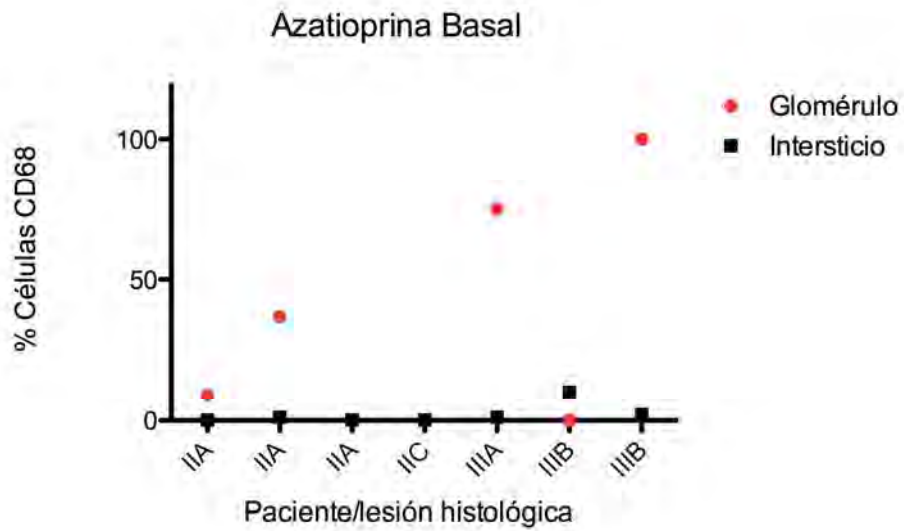


Gráfica 2. Porcentaje de células CD68 positivas en el intersticio por grupo de tratamiento en la biopsia basal y al año. (MMF 0 vs. 12 Wilcoxon $p=0.24$, AZA 0 vs. 12 meses Wilcoxon $p=0.25$)

De los 14 casos que mostraron regresión histológica, 13 (92.8%) se relacionaron con disminución en el número de glomérulos con células CD68+. Sin embargo al comparar si existió diferencia en la regresión de la lesión, por grupo de tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Graficas 3 y 4. Estadio de lesión histológica según la clasificación de la ISKDC y su relación con el porcentaje de infiltración por células CD68 en glomérulos e intersticio, en biopsia basal y al año, en el grupo tratado con MMF.



Gráficas 5 y 6. Estadio de lesión histológica según la clasificación de la ISKDC y su relación con el porcentaje de infiltración por células CD68 en glomérulos e intersticio, en biopsia basal y al año, en el grupo tratado con azatioprina.

11.4 Estudio de inmunofluorescencia:

De las 34 biopsias renales, 27 tuvieron glomérulos en el material estudiado para inmunofluorescencia, en 3 casos no hubo tejido para el estudio y en 4 biopsias no se observaron glomérulos.

Solo se tomaron en cuenta las 27 biopsias renales con glomérulos, 18 fueron de mofetilmicofenolato y 9 de azatioprina.

De las biopsias basales, 12 tuvieron glomérulos, de estas, 11 mostraron depósitos de IgA (91.6%) y un caso fue negativo. IgG se encontró en 6 casos (50%), IgM con 3 casos (25%), fibrinógeno en 7 casos (58.3%) y C1q en un caso (8.3%).

De las biopsias al año, 15 tuvieron glomérulos, de estas, 10 mostraron depósitos de IgA (66.6%) y 5 casos fueron negativos. IgG e IgM se encontró en 6 casos (40%) cada una, C3 en 5 casos (33.3%), C1q en un caso (6.6%) y fibrinógeno en 6 casos (40%). El patrón de reacción en todos los casos fue granular fino en mesangio. Tabla 5.

	Azatioprina		Mofetilmicofenolato		Todos	
	Basal n =4	12 meses N =5	Basal n =8	12 meses n =10	Basal n =12	12 meses n =15
Inmunofluorescencia (n, %)						
IgG	2 (50)	2 (40)	4 (50)	4 (40)	6 (50)	6 (40)
IgA	4 (100)	4 (80)	7 (87.5)	6 (60)	11 (91.6)	10 (66.6)
IgM	1 (25)	2 (40)	2 (25)	4 (40)	3 (25)	6 (40)
C3	0	2 (40)	0	3 (30)	0	5 (33.3)
C4	0	1 (20)	0	0	0	1 (6.6)
C1q	0	0	1 (12.5)	1 (10)	1 (8.3)	1 (6.6)
Fibrinógeno	2 (50)	3 (60)	5 (62.5)	3 (30)	7 (58.3)	6 (40)

Tabla 5. Estudio de inmunofluorescencia

12. DISCUSIÓN:

La finalidad del presente estudio fue el evaluar la presencia de macrófagos en las biopsias renales de niños con nefritis por PHS, que fueron aleatorizados para recibir tratamiento con prednisona/azatioprina o prednisona/mofetilmicofenolato, tanto en la biopsia basal como en la biopsia tomada a los 12 meses posteriores al tratamiento. La identificación de estas células fue más evidente utilizando el marcador CD68 de inmunohistoquímica.

De forma similar a lo reportado en la literatura, [1, 2] la edad de presentación más frecuente fue de 7 años, siendo el sexo masculino el más afectado con una relación 3.2:1. La presentación clínica más común de la nefritis fue como proteinuria significativa.

Actualmente, el único hallazgo histológico aceptado como indicador de mal pronóstico o evolución desfavorable de la nefritis por PHS, es la presencia de medias lunas, siendo el factor que determina la clasificación de los estadios que utiliza la ISKDC (International Study of Kidney Disease in Childhood). Los estadios más frecuentes de presentación son el II y III [1, 9, 18].

Tanto en las biopsias basales como en las biopsias al año, aquellas que tenían mayor grado de lesión histopatológica y por lo tanto mayor estadio de acuerdo a la clasificación de la ISKDC, mostraron mayor cantidad de glomérulos con células CD68+, las cuales se localizaban en las asas capilares, en el mesangio y en las medias lunas, al igual que en el intersticio, en el que además de macrófagos, había linfocitos, siendo este el infiltrado inflamatorio más comúnmente reportado [4, 10, 12].

Esto es de esperarse, ya que los macrófagos, están involucrados en la lesión aguda o etapa inicial de la glomerulonefritis con medias lunas debido a la secreción de mediadores inflamatorios, citocinas y quimiocinas. Diversos estudios en nefritis experimental han sugerido que los monocitos, directamente median el daño de la membrana basal glomerular por liberación de proteasas lisosomales, generando especies de oxígeno reactivo o afectando células

endoteliales glomerulares [15] por lo tanto, el daño puede estar orientado a las paredes capilares glomerulares o túbulos [10].

En la literatura, no se especifica el significado que tiene la localización de los macrófagos dentro del glomérulo o en el intersticio, sin embargo, nosotros encontramos que la mayoría de estas células, se encontraban en la luz de las asas capilares glomerulares.

El análisis de las biopsias al año posterior al tratamiento mostraron regresión del estadio histopatológico en 14 casos (82.3%).

Al comparar los resultados por grupo de tratamiento, encontramos que los pacientes que recibieron micofenolato tuvieron una disminución significativa del infiltrado de CD68 intraglomerular, no así el grupo que recibió azatioprina. También vale la pena resaltar que los pacientes aleatorizados a recibir micofenolato tuvieron mayor proporción de lesiones estadio IIIB (5 pacientes, 50%), vs. 2 pacientes en el grupo de Azatioprina (28.5%). A los 12 meses de tratamiento, todos los pacientes con lesiones IIIB del grupo de micofenolato habían mejorado, y sólo un paciente con este tipo de lesión en el grupo de azatioprina.

Al valorar el porcentaje de macrófagos en intersticio, pudimos observar que existió una tendencia a ser menor en el grupo tratado con micofenolato a diferencia de los casos de azatioprina, sin embargo la n es pequeña y la diferencia no fue estadísticamente significativa.

La inflamación intersticial juega un rol importante en la pérdida de la función renal en enfermedad renal crónica. Risdon et al, [19] reportó hace ya casi cuatro décadas, que la severidad del daño tubular tenía una mayor correlación con la reducción en la depuración de creatinina, que el índice de daño glomerular. Se ha reportado la relación del infiltrado inflamatorio con el incremento del volumen intersticial, fibrosis, reducción de los capilares peritubulares, cambios morfológicos en el epitelio tubular y finalmente deterioro renal. La mejoría observada como resultado de las terapias dirigidas directa o

indirectamente para reducir el infiltrado inflamatorio, sugiere de forma importante un rol patogénico de la inflamación en el desarrollo de un riñón con daño crónico.

Los trabajos de Kriz y LeHir, [20] han mostrado la formación de puentes entre los podocitos y la cápsula de Bowman en sitios de adhesiones capsulares y disminución del espacio urinario, esto permite fuga del ultrafiltrado a las áreas tubulointersticiales. La inflamación periglomerular y fibrosis, rodean al túbulo, lo cual causa atrofia tubular y eventualmente desconexión con su glomérulo y remanentes tubulares aglomerulares. Conforme la inflamación y la fibrosis se desarrollan, aparecen cambios estructurales y aumenta la distancia entre las células tubulares, los capilares peritubulares muestran alteración en la difusión y aumento del déficit de oxígeno. A su vez, la hipoxia es un potente estímulo para el desarrollo de mediadores proinflamatorios, aumento de miofibroblastos y depósito de colágena y reducción en la degradación de la matriz.

Una importante contribución al entendimiento de la relación entre la inflamación tubulointersticial y el daño glomerular, fue informada por Sánchez-Lozada et al, [21] quien demostró que la acumulación de células inflamatorias en las áreas tubulointersticiales fue asociada con cambios fenotípicamente proliferativos en las arteriolas aferentes, lo que ocasiona rearrreglo de las proteínas de la matriz extracelular y reducción en la respuesta de las células de músculo liso vasculares a los estímulos contráctiles. Además de que las citocinas inflamatorias, dañan la autorregulación del flujo sanguíneo glomerular [22].

El tratamiento de la nefritis por PHS es controversial y las recomendaciones están basadas en series pequeñas y a menudo no controladas. La mayoría de los pacientes no tienen compromiso renal o solo presentan microhematuria, proteinuria leve y función renal normal. Estos pacientes no requieren terapia esteroidea y el desorden es manejado solo sintómicamente. Algunos estudios sugieren que la administración temprana de prednisona puede ser útil en prevenir el desarrollo de nefropatía en PHS. Otro grupo sugiere tratar pacientes con factores de riesgo para compromiso renal con glucocorticoides al comienzo de la enfermedad. Como inmunosupresores, se han utilizado las

inmunoglobulinas, ciclofosfamida, azatioprina y micofenolato de mofetilo, pero hasta que no se dispongan de estudios prospectivos controlados, el tratamiento de la PHS con afectación renal y/o intestinal, seguirá siendo controvertido [23, 24].

El tratamiento de la nefritis por PHS, para el tipo rápidamente progresiva o de medias lunas, se basa en protocolos actuales, que incluyen la prescripción de un único tratamiento específico inmunosupresor, con esteroides, ciclosporina A y ciclofosfamida. Otros refieren el uso de doble terapia inmunosupresora incluyendo esteroides-ciclofosfamida, esteroide-azatioprina y esteroide ciclosporina A. La terapia triple fue de esteroide-ciclofosfamida-azatioprina y esteroide-azatioprina- mofetil micofenolato [25].

La azatioprina es un derivado de la 6-mercaptopurina. Es un análogo de las purinas que interfiere con la síntesis de DNA y por lo tanto inhibe la proliferación de células T y B. Actualmente el empleo de azatioprina ha sido sustituido en muchos centros hospitalarios del mundo por micofenolato de mofetilo (MMF) como antimetabolito primario. Cabe destacar que en muchos centros de nuestro país se sigue utilizando azatioprina como parte del esquema de inmunosupresión, fundamentalmente por el costo económico de este fármaco. No obstante debemos precisar que en pacientes de mayor riesgo inmunológico (segundos trasplantes, panel reactivo de anticuerpos $\geq 30\%$, enfermedad renal primaria de origen inmunológico) es altamente recomendable incluir MMF [26].

El MMF es un derivado semisintético de una especie de hongo *Penicillium*, y su metabolito activo es el ácido micofenólico. El ácido micofenólico es un inhibidor efectivo y reversible de la inosin monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima necesaria para la síntesis de purinas por la *vía de novo*; dichas purinas son indispensables para la formación de células T y B. Disminuye las reservas de trifosfato guanosina en linfocitos y monocitos así como la proliferación de linfocitos. De igual forma es conocido su efecto inhibitorio sobre la producción de anticuerpos por células B [27]. Además, inhibe la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, disminuye la extravasación de células

inflamatorias y en contraste con otras drogas inmunosupresoras no es nefrotóxico. Se ha visto que reduce el infiltrado por macrófagos y linfocitos, así como la expresión de antígenos MHC e ICAM-1 [28].

Aunque el MMF es un inmunosupresor con mecanismo similar al de la azatioprina, ambos utilizados en diversas enfermedades de tipo autoinmune, hay informes que refieren una actuación más rápida, efectiva y con seguridad aparentemente superior [27, 29].

Un estudio prospectivo de 12 pacientes con PHS quienes se presentaron con glomerulonefritis rápidamente progresiva sugirió beneficio de terapia intensiva multidroga, en el cual, se utilizó metilprednisolona, ciclofosfamida, dipiridamol y prednisona. La mejoría clínica con terapia combinada de glucocorticoides y azatioprina es sugerida por otro estudio de 21 niños con nefritis severa por PHS. De acuerdo con un grupo, prednisona y ciclofosfamida indujeron y mantuvieron remisión completa en siete de ocho pacientes con nefritis por PHS comprobada por biopsia. Otro estudio no controlado mostró beneficio de un régimen de prednisolona, ciclofosfamida, heparina/warfarina, y dipiridamol en pacientes con PHS quienes tenían cambios histológicos glomerulares severos [27].

Shenoy describió el uso combinado de azatioprina, ciclofosfamida y plasmaféresis para los casos de nefritis extracapilar [30].

Los reportes acerca de la efectividad de la terapia inmunosupresora en la nefritis por PHS, utilizando azatioprina y micofenolato de mofetilo y su relación con la evolución de la lesión histopatológica, son escasos.

Los resultados del presente estudio con solo 17 pacientes, demostraron que la lesión histológica de la biopsia renal basal, mostró regresión en el 82.3% con el uso del tratamiento inmunosupresor antiproliferativo.

Este estudio forma parte de un protocolo, el cual continúa incluyendo pacientes con nefritis por PHS y valorando la presencia y significado de los macrófagos,

en relación con la respuesta al grupo de tratamiento, además de valorar otros aspectos de la enfermedad. Es necesario incluir a más pacientes para tener resultados mas sólidos.

13. CONCLUSIONES:

1) El hallazgo histológico de macrófagos en las biopsias renales de niños con nefritis por Púrpura de Henoch-Schönlein, se correlaciona con mayor grado de lesión histológica, tanto glomerular como intersticial interpretado como estadios II y III de acuerdo a la clasificación propuesta por la ISKDC.

2) El tratamiento con antiproliferativos (Azatioprina o Mofetilmicofenolato) en combinación con prednisona, es eficaz para disminuir el porcentaje de macrófagos tanto en los glomérulos como el intersticio. Sin embargo, el grupo de pacientes tratados con micofenolato, tuvo una disminución significativa de células CD68+ en glomérulo en la biopsia de 12 meses.

3) Será necesario continuar con el protocolo, incluyendo a un mayor número de pacientes y prolongando el seguimiento.

14. ANEXO 1

TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA:

Después de elegir el tejido y haberse mantenido apropiadamente en congelación, se realizaron cortes en el criostato de 3 a 4 micras, los cortes, se montaron sobre laminillas tratadas con poli-L-lisina, se dejaron secar y se fijaron con acetona-etanol 1:1, a 4°C durante 10 min, se dejaron secar y posteriormente se volvieron a hidratar, se utilizó un panel de anticuerpos completo que incluye IgG, IgA, IgM, C3, C4, C1q y fibrinógeno, los cuales estaban conjugados con isotocianato de fluoresceína. Se incubó durante 30 min, en oscuridad, después de lo cual se lavaron con PBS, se contrastaron con azul de Evan al 1%, durante 1min. Se montaron con glicerina-amortiguador 1:1 y se guardaron en oscuridad y refrigeración. La evaluación, se realizó en un microscopio, de fluorescencia, marca Leica, con epifluorescencia, equipado con filtros apropiados [31-33].

Nota: La luz UV o luz ambiental ocasiona pérdida de la fluoresceína, por lo cual se sugiere evaluar las laminillas dentro de las primeras semanas de almacenamiento, sin estar expuestas a la luz.

15. ANEXO 2

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

Se elige el bloque de parafina y se realizan cortes delgados a 4 micras. Se colocaron sobre laminillas tratadas con poli-L-lisina (catálogo Sigma Aldrich, P8920). Posteriormente, se mantienen en la estufa a 60°C durante media hora. Después se desparafinó con xilol y se deshidrató con alcoholes graduales, las laminillas se colocaron en amortiguador de citratos al 0.01% (recuperador de antígeno) y se les aplicó una presión de 20 libras durante 5 min, en una olla de presión. Se dejaron enfriar durante 20 min, se lavaron con agua destilada y se les agregó peróxido de hidrógeno al 7%, durante 10 min, se lavaron y se les agregó bloqueador de proteínas (catálogo Dako X0909), durante 5 a 10 min. Posteriormente se le agregó el anticuerpo CD68 (clona KP1, Biocare medical, Concord, CA, dilución 1:250) y se incubó durante 20 min. Para evidenciar la tinción, se utilizó el kit de detección MACH 4 HRP polímero, Biocare medical (para evitar la interferencia de biotina) y se reveló con diaminobencidina, utilizando el kit Dako K3468. Finalmente las laminillas se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron [34, 35].

16. REFERENCIAS:

1. Jennette, C. J., et al, *Heptinstall's Pathology of the kidney*. 6a ed. Vol. 1. 2007, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 462-474.
2. Brenner, B.M., *El Riñon Tratado de Nefrologia*. 7a ed. Vol. 1. 2005: Saunders Elsevier. 1411-1414.
3. Fogo, A., *Fundamentals of Renal Pathology*. 2006: Springer. 61-69.
4. Ferrario, F., et al., *The detection of monocytes in human glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1985. 28(3): p. 513-9.
5. Mongil Ruiz, I., *Púrpuras. Púrpura de Schönlein-Henoch. Púrpura trombocitopénica idiopática*. *Pediatría Integral*, 2004. 8: p. 420-434.
6. Ibels, L.S. and A.Z. Gyory, *IgA nephropathy: analysis of the natural history, important factors in the progression of renal disease, and a review of the literature*. *Medicine (Baltimore)*, 1994. 73(2): p. 79-102.
7. Caceres-Mosquera, J., et al., *Púrpura de Henoch-Schönlein. Reporte de 105 pacientes pediátricos*, *Bol Med Hosp Infant Mex*, 2006. 63: p. 314-321.
8. Meadow, S.R., et al., *Schonlein-Henoch nephritis*. *Q J Med*, 1972. 41(163): p. 241-58.
9. Wada, T., et al., *MIP-1alpha and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1999. 56(3): p. 995-1003.
10. Sakatsume, M. and Gejyo, F., *Effector T cells and macrophages in urine as a hallmark of systemic vasculitis accompanied by crescentic glomerulonephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. 18(3): p. 607-9.
11. Saitoh, A., et al., *[Investigation of CD68 positive monocytes/macrophage(CD68+ Mo/M phi) in urine and infiltrated tissue of various kidney diseases in children]*. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 2002. 44(8): p. 798-805.
12. Kobayashi, M., et al., *Intraglomerular monocytes in human glomerulonephritis*. *Nephron*, 1991. 59(4): p. 580-5.
13. Ono, T., et al., *Intraglomerular deposition of intact cross-linked fibrin in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis*. *Nephron*, 1996. 74(3): p. 522-8.
14. Kurose, K., *[Macrophage infiltration in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis--3. Relationship to crescents]*. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 1994. 36(9): p. 997-1002.
15. Yoshioka, K., et al., *Monocyte infiltration and cross-linked fibrin deposition in IgA nephritis and Henoch-Schoenlein purpura nephritis*. *Clin Nephrol*, 1989. 32(3): p. 107-12.
16. OMIM®, *Macrophage antigen CD68*, in *153634.
17. Holness, C.L. and Simmons, D.L., *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins*. *Blood*, 1993. 81(6): p. 1607-13.
18. Rai, A., Nast, C. and Adler, S., *Henoch-Schonlein purpura nephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(12): p. 2637-44.

19. Risdon, R.A., Sloper, J.C. and De Wardener, H.E., *Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis*. Lancet, 1968. 2(7564): p. 363-6.
20. Kriz, W. and LeHir, M., *Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models*. Kidney Int, 2005. 67(2): p. 404-19.
21. Sánchez-Lozada, L., Johnson, R., Rodriguez-Iturbe, B. and Herrera-Acosta, J., *Glomerular hemodynamic changes associated with arteriolar lesions and tubulointerstitial inflammation*. Kidney International 2003. 64.
22. Rodriguez-Iturbe, B. and Garcia Garcia, G., *The Role of Tubulointerstitial Inflammation in the Progression of Chronic Renal Failure*. Nephron Clin Pract, 2010. 116(2): p. c81-c88.
23. Weiss, P.F., et al., *Effects of corticosteroid on Henoch-Schonlein purpura: a systematic review*. Pediatrics, 2007. 120(5): p. 1079-87.
24. Cantillo, J., López, R., Andrés Díaz, J. , *Nefritis de la pùrpura de Henoch-Scholein en adultos. A propòsito de cinsco casos en Colombia*. Acta Mèdica Colombiana, 2007. 32: p. 85-92.
25. Zaffanello, M. and V. Fanos, *Treatment-based literature of Henoch-Schonlein purpura nephritis in childhood*. Pediatr Nephrol, 2009. 24(10): p. 1901-11.
26. Sievers, T.M., et al., *Mycophenolate mofetil*. Pharmacotherapy, 1997. 17(6): p. 1178-97.
27. Alberu, J. and Urrea, E., *[Immunosuppression for kidney transplant recipients: current strategies]*. Rev Invest Clin, 2005. 57(2): p. 213-24.
28. Rodriguez-Iturbe, B., et al., *Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases*. Kidney Int, 2001. 59(5): p. 1626-40.
29. Meier-Kriesche, H.U., et al., *Long-term use of mycophenolate mofetil is associated with a reduction in the incidence and risk of late rejection*. Am J Transplant, 2003. 3(1): p. 68-73.
30. Shenoy, M., et al., *Outcome of Henoch-Schonlein purpura nephritis treated with long-term immunosuppression*. Pediatr Nephrol, 2007. 22(10): p. 1717-22.
31. Song, L., et al., *Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy*. Biophys J, 1995. 68(6): p. 2588-600.
32. Ono, M., et al., *Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy*. J Histochem Cytochem, 2001. 49(3): p. 305-12.
33. Striker, G., *The renal biopsy major problems in pathology* 3a ed. 1997: W.B Saunders Company MPP8. 40-42.
34. Key, M., *Education Guide, Immunohistochemical staining methods*, 4a edition, California, 2006, DAKO. p. 47-53.
35. Chilosi, M., et al., *A rapid immunostaining method for frozen sections*. Biotech Histochem, 1994. 69(4): p. 235-9.