



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Expresión génica de TNF alfa en células de
sangre periférica en niños con Nefritis por
púrpura de Henoch Schönlein y relación con
respuesta terapéutica a 12 meses

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

Dr. Horacio David Cruz Aquino

ASESORA DE TESIS:

DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F

Febrero 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

EXPRESIÓN GÉNICA DE TNF ALFA EN CÉLULAS DE SANGRE
PERIFÉRICA EN NIÑOS CON NEFRITIS POR PURPURA DE HENOCCH
SCHONLEIN Y RELACIÓN CON RESPUESTA TERAPEUTICA A 12

MESES

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

Dr. Horacio David Cruz Aquino

Asesor:

DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO

Co-Asesores:

Dra. Yolanda Fuentes Velazco

M en C María Ines del Pilar García Roca

MÉXICO , D.F.

JULIO 2012

ÍNDICE

1. Antecedentes.....	5
2. Marco teórico.....	17
3. Planteamiento del problema.....	20
4. Justificación.....	20
5. Objetivos	20
6. Hipótesis	21
7. Material y Métodos.....	21
8. Definición de Variables.....	23
9. Criterios de Inclusión.....	25
10. Criterios de Exclusión.....	25
11. Descripción de variables.....	25
12. Análisis Estadístico.....	25
13. Financiamiento.....	26
14. Resultados.....	26
15. Discusión	28
16. Conclusiones.....	28
17. Tablas.....	26
18. Gráficas	29
19. Bibliografía.....	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características Demográficas.....	30
Tabla 2. Tipo de lesión histológica al inicio y 12 meses según grupo de tratamiento.....	31
Tabla 3. Estadio de lesión histopatológica al inicio y 12 meses en los siete pacientes de cada grupo.....	31
Tabla 4. Creatinina sérica, proteinuria y velocidad de filtración glomerular al inicio y a los 12 meses de tratamiento.....	32
Tabla 5. Respuesta al tratamiento.....	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica 1. Proteinuria al inicio y 12 meses de tratamiento en 14 pacientes con nefritis por PHS.....	33
Gráfica 2. Respuesta a los 12 meses de tratamiento en 14 pacientes con nefritis por PHS.....	33
Gráfica 3. Expresión de TNF alfa basal y a los 12 meses de tratamiento en 14 pacientes con nefritis por PHS.....	34

1. ANTECEDENTES

INTRODUCCIÓN

La púrpura de Henoch-Schönlein (PHS) es una forma de vasculitis sistémica que involucra comúnmente los pequeños vasos en piel, intestino y glomérulo, asociado con púrpura, cólico abdominal, hematuria, artralgias y/o artritis; y en raras ocasiones involucro a otros órganos[1].

ASPECTOS HISTÓRICOS

Históricamente Heberden reportó el primer caso en un niño de 5 años en 1802. En 1832 Schönlein describió la presencia de exantema purpúrico asociado con artritis, a lo cual le dio el término de púrpura rubra; subsecuentemente Henoch reportó un caso que involucraba síntomas intestinales y la posibilidad de involucro de nefritis severa en un niño con PHS. En 1948 Gairdner estableció la existencia de este síndrome, con el primer estudio largo en adultos con PHS publicado en 1970. En 1969 Berger observó depósito de IgA en pacientes con nefritis por PHS[1].

EPIDEMIOLOGÍA

Es la vasculitis más frecuente en la infancia, con una incidencia anual de aproximadamente 13 a 22 casos por cada 100 000 niños, en Irlanda 13.5 por cada 100 000, en Dinamarca 18 por cada 100 000, Francia 21.75 por cada 100 000 [1],[2]. Aunque este padecimiento puede ocurrir desde los 6 meses de edad hasta la vida adulta, el 50% de los casos ocurren en niños menores de 5 años, y el 75% son menores de 10 años; siendo mas común en sexo masculino, con una relación de hasta 2:1 [3], [4]. Sin embargo en un estudio

retrospectivo realizado en 105 pacientes en el Hospital Infantil de México Federico Gómez; se encontró predominio del sexo femenino. Generalmente su incidencia disminuye con la edad; la mayor incidencia se presenta en otoño e invierno.

ETIOLOGÍA

Se ha asociado a infecciones virales o bacterianas, en algunos estudios se ha observado vinculación con Parvovirus B19, en algunos otros en donde los niños han presentado daño renal se ha observado involucro del estreptococo beta hemolítico del grupo A; así mismo se han vinculado diversos fármacos y toxinas [1].

PATOGENIA

Esta es desconocida; sin embargo se considera que se debe a un complejo mediado inmunologicamente, caracterizado por la presencia de IgA 1, con complejos ubicados predominantemente en piel, tracto gastrointestinal, y capilares glomerulares [2],[5]. Se sugiere una alteración en la síntesis de IgA, que al introducirse en la médula ósea provoca una respuesta inmunológica exagerada ante un antígeno. Se ha implicado una hipogalactosilación de la IgA, ya que se sabe que el aclaramiento de la IgA de la circulación es a través de una asialoglicoproteína hepática la cual se encarga de su excreción; la cual se sabe interactúa con proteínas glucosiladas por vía de la galactosa. Al limitarse su excreción, se eleva en la circulación sanguínea depositándose en el mesangio [1],[5]. Asimismo se ha reportado una hiperactividad por parte de las células B y T en respuesta a un estímulo

antigénico específico; implicándose antígenos infecciosos como inmunomoduladores, y algunos otros antígenos como proteínas de la dieta y componentes de la matriz extracelular. También se ha visto depósitos de C3 y properdina componentes de la vía alterna del complemento [4]. Se han descrito mecanismos inmunoalérgicos, postulándose que el estímulo de los mastocitos sensibilizados por antígenos específicos, en presencia de complejos inmunes de IgA puede llevar a la liberación de sustancias vasoactivas, incrementando la permeabilidad capilar, y el depósito perivascular de complejos de IgA[6].

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El Colegio Americano de Reumatología en 1990, identificó cuatro criterios para diferenciar a la PHS de otras vasculitis; de los cuales es necesario encontrar dos para poder hacer el diagnóstico; estos son: Edad de inicio menor de 20 años, púrpura palpable, angina intestinal (dolor abdominal difuso o isquemia intestinal usualmente con diarrea sanguinolenta), biopsia que evidencie granulocitos en las paredes de las arteriolas o vénulas [7]. Como síntomas generales regularmente presentan fiebre leve, así como disminución de peso [1], [3].

Involucro Dermatológico.

El involucro cutáneo siempre esta presente y regularmente es el síntoma inicial. La púrpura es la principal manifestación dermatológica; que consiste en lesiones que se caracterizan por un rash no puriginoso, que inicialmente aparece como máculas eritematosas, que se desarrollan en pupúricas que no

blaquean a la digitopresión, no son pruriginosas, llegan a formar pápulas purpúricas las cuales en casos severos pueden llegar a ser confluentes. La aparición es principalmente en las extremidades, de predominio en las inferiores usualmente encontradas en la cara externa del maleolo, en la parte dorsal del pie los glúteos y en superficies extensoras de manera simétrica; sin embargo las lesiones pueden extenderse aún más. Así mismo se pueden observar equimosis lineales en sitios de presión. Se pueden observar otras lesiones como urticaria, nódulos, vesículas hemorrágicas, bulas hemorrágicas, pústulas, lívido reticularis entre otras [1].

Involucro Articular.

El involucro de las articulaciones se presenta en dos tercios partes de los pacientes (60-70%) y en 25% se presenta como primera manifestación. Es típicamente oligoarticular, simétrica, experimentándose artralgiás, edema periarticular que se autolimita, limitación a la movilidad; con afectación principal a rodillas, tobillos, hombros y muñecas. En adultos se ha observado la aparición de miositis, infrecuente en niños [1], [4].

Involucro Gastrointestinal.

Las manifestaciones gastrointestinales que se presentan en un 76%; precediendo al rash en un 14 a 36% de los pacientes. Siendo el dolor abdominal la presentación más frecuente, que se caracteriza por ser de tipo cólico, localizado frecuentemente en la región periumbilical, que se puede acompañar de náusea y vómito, hasta en 11- 17% de los pacientes. hasta hemorragia intestinal, intususcepción, pancreatitis, e hidrocolecisto. La

valoración endoscópica tanto del tracto digestivo superior como inferior puede proveer la topografía y la descripción de las lesiones las cuales pueden ser: adelgazamiento inflamatorio de la mucosa, pequeños hematomas submucosos, con una o múltiples úlceras de la mucosa, algún hematoma parietal que produzca estrechamiento de la luz intestinal, espacios amplios entre las asas intestinales indicativo de adelgazamiento ó edema localizado. La realización del estudio endoscópico esta indicado en pacientes con presencia de melena, hematemesis, o dolor epigástrico marcado. El involucreo del la segunda porción del duodeno es un indicador fuerte de la presencia de PHS. Se pueden utilizar estudios de imagen como ultrasonido y tomografía computada. La complicación quirúrgica como resultado de la vasculitis del tracto gastrointestinal, que tienden a ocurrir en un 95% de los pacientes entre los primeros 28 días posteriores al inicio de la púrpura. Siendo la intususcepción la complicación mas frecuente siendo esta la responsable del 80% de la complicaciones quirúrgicas en niños; cuyo diagnóstico se integra al palparse una masa abdominal con datos de oclusión intestinal. La intususcepción se presenta mas frecuentemente ileo-ileal (51.4%), íleo-cólica (38.6%), y también puede presentarse yeyuno-yeyunal (7%) y más raramente colónica (3%). Otra manifestación de vasculitis gastrointestinal es sangrado de tubo digestivo, manifestado por melena y/ó hematemesis [1],[3], [4].

Involucreo Renal.

El involucreo renal es la complicación más frecuente y potencialmente más grave de la PHS, presentándose hasta en un 20 a 49% de los pacientes. Las

manifestaciones renales aparecen generalmente en las primeras cuatro semanas del inicio de la PHS en un 90% de los niños, y rara vez precede a la aparición de las lesiones dérmicas, sin embargo algunos pacientes pueden tener manifestaciones de nefritis hasta un año después de la púrpura [2]. Los factores de riesgo para involucro renal incluyen edad menor de 5 años, sexo masculino, síntomas abdominales intensos así como la presencia de hematoquecia, púrpura persistente y disminución del factor XIII [1],[3]. El hallazgo más frecuentemente encontrado es hematuria con o sin proteinuria, de predominio macroscópico, sin embargo también se presenta microscópica; y que puede ser transitoria, persistente o recurrente. Otros datos clínicos de afección son proteinuria, síndrome nefrítico, síndrome nefrótico y síndrome nefrótico-nefrítico [3],[4]. En el involucro renal los hallazgos histológicos más comúnmente encontrados son: trombosis y necrosis fibrinoide de los capilares glomerulares, mesangiolisis, glomerulonefritis membranoproliferativa generalmente con depósito de IgA, glomerulonefritis exudativa con infiltración por neutrófilos, glomerulonefritis exudativa con infiltración por monocitos con depósito de IgA sin depósito mesangial y hemorragia intersticial extensa sin daño glomerular severo que produce insuficiencia renal aguda. Existen dos clasificaciones importantes para evaluar los cambios patológicos en nefritis por PHS:

La clasificación de Meadow adaptada por Lee que comprende 5 etapas [1]:

Etapas 1- Cambios glomerulares mínimos glomérulos normales ó áreas de adelgazamiento mesangial con ó sin proliferación celular.

Etapa 2- Glomerulonefritis mesangiopática en la que hay proliferación mesangial segmentaria o esclerosis que afecta <50% de los glomérulos, sin lesión tubulointersticial.

Etapa 3- Glomerulonefritis focal y segmentaria en la que se presente incremento moderado pero difuso de la matriz mesangial y con incremento de la celularidad, con variaciones focales y segmentarias, con sinequias capsulares, y pueden estar presentes semilunas segmentarias, con lesión tubulointersticial leve.

Etapa 4- Glomerulonefritis proliferativa difusa la cual consiste en proliferación mensangial difusa, con presencia de neutrófilos, semilunas, sinequias capsulares presentes en menos del 50% de los glomérulos, atrofia tubular, e infiltrado intersticial, y frecuentemente con esclerosis glomerular total o parcial.

Etapa 5- Se presenta el mismo aspecto histopatológico que en la etapa 4 sin embargo con mayor severidad, y presencia de más del 50% de los glomérulos con semilunas.

La clasificación del Estudio Internacional de Enfermedades Renales en Niños (de sus siglas en inglés ISKDC) utiliza el porcentaje de semilunas como factor crítico[1]:

Estadio I: Lesiones glomerulares mínimas

Estadio II: Proliferación mesangial pura (focal ó difusa)

Estadio III: Proliferación mesangial (focal ó difusa) con semilunas y/ó lesiones segmentarias en <50% de los glomérulos

Estadio IV: Proliferación mesangial (focal ó difusa) con semilunas y/ó lesiones segmentarias (necrosis ó esclerosis) en 50 a 75% de los glomérulos

Estadio V: Groliferación mesangial (focal ó difusa) con semilunas y/ó lesiones segmentarias (necrosis ó esclerosis) en 75% de los glomérulos

Estadio VI: Glomerulonefritis pseudomembranoproliferativa

Los riesgos clínicos para desarrollar insuficiencia renal crónica en niños incluyen síndrome nefrótico ó cuando está asociada a función renal alterada, síndrome nefríticos, función renal inicial alterada, proteinuria no selectiva y/ó hipertensión. La presencia inicial de síndrome nefrótico y nefrítico son el predictor clínico más fuerte de pobre pronóstico. Los factores histopatológicos de mal pronóstico son: la etapa 5 de la clasificación de Meadow-Lee, quienes observaron insuficiencia renal crónica después de dos años, el estadio V de la clasificación de la ISKDC en la cual el 75% de los pacientes en esta etapa tuvieron insuficiencia renal crónica después de 10 años, el 48% de los pacientes con semilunas en más del 50% del glomérulo tenían insuficiencia renal terminal después de más de un año; y recientemente se ha visto que cambios tubulointersticiales se asociaron fuertemente con la severidad clínica en niños con nefritis por PHS. Se ha visto que aproximadamente 12% de los niños con nefritis por PHS tienen insuficiencia renal crónica en un tiempo promedio de 3-4 años después del inicio de la enfermedad. La remisión completa de la nefropatía (sin proteinuria, cuenta normal de eritrocitos en orina, cuenta normal de leucocitos, y una función renal normal), se observa en 59.5% de los niños [1].

Involucro a otros órganos.

En 1914 Osler fue el primero en reconocer manifestaciones neurológicas como síntomas iniciales; actualmente se sabe que manifestaciones pueden incluir cefalea que llega a presentarse de 25 a 43% de los niños, en caso de presentar convulsiones está indicado realizar estudio de neuroimagen. Algunas más infrecuentes son los déficit focales como corea, hemiplegia, paraplegia, y síndrome cerebelar. Se puede presentar involucro escrotal hasta en un 9%, que puede ser similar al dolor por torsión testicular; así mismo se puede presentar edema de pene, epididimitis y afectación a los vasos deferentes. Se ha reportado involucro ocular manifestado por uveítis y queratitis [1], [3].

DIAGNÓSTICO

Para la realización del diagnóstico no hay marcadores específicos, por lo que el diagnóstico es clínico tomándose en cuenta los criterios del Colegio Americano de Reumatología; sin embargo se ha encontrado en los pacientes con PHS elevación los reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva, la velocidad de sedimentación globular, se puede observar leucocitosis con predominio de neutrófilos, hipereosinofilia moderada, así como elevación de los niveles de IgA, y de la concentración sérica de la trombomodulina y del factor activador de plasminógeno. Se ha visto disminución en la actividad del factor XIII, aún cuando las pruebas de coagulación son normales. Histológicamente la HSP cutánea es una forma de vasculitis leucocitoclástica con necrosis de las paredes de los vasos y acumulación de células inflamatorias perivasculares, en su mayoría leucocitos polimorfonucleares y

células mononucleadas , rodeando a lo capilares y vénulas postcapilares de la dermis [1].

PRONÓSTICO.

Sabemos que el pronóstico depende mucho de la afectación renal así como del grado de afectación, por lo cual se han estudiado el valor de algunos marcadores séricos para determinar el pronóstico de la PHS, describiéndose que la relación IgA/C3 tenía una correlación significativa con los cambios en la severidad de lo hallazgos histopatológicos y del pronóstico clínico[8]. En otros estudios se ha observado que la falta de depuración de creatinina a $>70\text{ml/min/1.73m}^2$ a los 3 años de seguimiento así como el incremento de las cifras de proteinuria, se correlacionan mejor con el riesgo de progresión a daño renal crónico, comparado con la proteinuria severa, disminución de la función renal, hipertensión ó presencia de semilunas al inicio de la enfermedad. En otros estudios se han descrito como factores de riesgo para desarrollo de daño renal edad mayor a 4 años, persistencia de lesiones pupúricas por más de un mes, actividad disminuida del factor XIII, y dolor abdominal severo. Se ha descrito que la severidad de las lesiones histopatológicas en la presentación de la enfermedad, incrementan el riesgo de desarrollar daño renal crónico [6]. En un estudio realizado por observaron que el hallazgo de semilunas y de necrosis se relacionaba directamente con la supervivencia renal; así mismo la presencia de arterosclerosis hialina fue predictor de progresión del daño renal; y desarrollo de hipertensión, así como proteinuria [9]. En cuanto a la recurrencia post trasplante renal se ha descrito

en dos series en Bélgica, y Japón encontraron recurrencia del 35%; y pérdida del injerto en 11% a los 5 años de seguimiento [10].

TRATAMIENTO.

La PHS se autolimita en la mayoría de los casos. Se ha utilizado tratamiento con analgésicos, como los antiinflamatorios no esteroideos, en este caso el paracetamol para aliviar el dolor muscular, articular y para manejo de la fiebre. Se ha visto utilidad en el uso de ranitidina para acortar la duración del dolor abdominal y el tiempo en el sangrado de tubo digestivo subclínico [1]. Las guías KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) sugieren que en niños con nefritis por PHS, y proteinuria persistente, $>0.5\text{-}1\text{gr/d}$ por 1.73m^2 sean tratados con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, ó bloqueadores del receptor de angiotensina II [11].

La utilización de corticosteroides se debe a que se sabe que estos reducen la activación monocito-macrófago, y la producción de prostaglandinas y leucotrienos proinflamatorios; así como también atenúan la activación del complemento. En altas dosis inhiben la proliferación linfocitaria, reducen la síntesis de inmunoglobulinas, e inducen la apoptosis de los linfocitos activados. El tratamiento preventivo con corticosteroides es controvertida ya que algunos estudios han descrito que el uso a dosis bajas ($2\text{-}5\text{mg/kg/día}$) de 2-3 semanas reducían el riesgo de desarrollo de daño renal; sin embargo otros estudios han referido no haber beneficio. Está bien establecido que el beneficio del uso de esteroides es en pacientes con involucro gastrointestinal severo, recomendándose manejo con prednisona o prednisolona 2mg/kg/día en niños, el cual se continua por 1 a 3 semanas, con disminución

progresivas de 2 a 3 semanas [1],[12],[13],. El uso de pulsos de esteroides se sugiere en pacientes con hemorragia intra alveolar, vasculitis cerebral severa; así mismo esta bien estudiado el beneficio de este manejo en formas graves de nefritis por PHS así como aquellos que desarrollan glomerulonefritis rápidamente progresiva; en donde se sugieren dosis de 10 a 30 mg/kg/día por 3 días consecutivos seguido de prednisona ó prednisolona vía oral a una dosis de 2 mg/kg/día. La ciclosporina se recomienda su uso en pacientes con nefritis por PHS resistentes a esteroides, con dosis inicial de 4-8 mg/kg/día con niveles de ciclosporina 150-200 µg/l, con dosis de mantenimiento 5mg/kg/día con niveles (80-100 µg/l); tratamiento que se acompaña de esteroides. El uso de ciclofosfamida se recomienda en formas graves de nefritis por PHS, en algunos estudios se ha utilizado vía oral en dosis 2-2.5 mg/kg/día por 12 semanas, asociado a metilprednisolona 10-30 mg/kg/día (dosis máxima 1g) 3 dosis diarias, asociado con esteroide vía oral. La utilización de azatioprina se ha utilizado como tratamiento en pacientes con nefritis por PHS a dosis de 2 mg/kg/día, asociándose el manejo con esteroides durante 8 meses, observándose mejoría en los hallazgos histopatológicos y con mejoría en el curso clínico. Se ha estudiado el uso de micofenolato de mofetilo en pacientes con nefritis por PHS, observando eficacia para el manejo utilizando dosis de 900-1200 mg/m²/día [13].

Se han descrito terapéuticas adicionales incluyendo plasmaféresis con la que se observó beneficio en pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresiva siendo efectiva para mejorar la función renal, reducir la proteinuria, mejorar el dolor abdominal.

También se ha descrito la utilización de inmunoglobulina intravenosa en adultos siendo de beneficio para mejorar la función renal, disminución significativa de la proteinuria, así como mejoría de la lesión histológica [12]. Los beneficios de atañen particularmente a que inhiben la diferenciación de las células B e inhiben al producción de anticuerpos IgA nefritogénicos; también modulan la función monocito-macrófago y modulan la producción de citocinas como TNFa e IL-6. En algunos otros protocolos se ha sugerido la terapia multifarmacológica; en algunos protocolos se ha utilizado metilprednisolona, ciclofosfamida, dipiridamol y prednisona en pacientes con glomerulonefritis progresiva [1, 3, 15].

2. MARCO TEÓRICO:

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), es un citoquina inflamatoria, principalmente producida por monocitos, macrófagos, y células T. La expresión de esta no se limita a las células hematopoyéticas; se ha descrito que las células renales incluyendo las células mesangiales, glomerulares, endoteliales, dendríticas y tubulares son capaces de producir esta citoquina. El TNF alfa tiene un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa, especialmente en los mecanismos de defensa del huésped contra bacterias intracelulares. Se ha evidenciado su papel como proinflamatorio y como inmunosupresor en pacientes con lupus eritematoso sistémico. El TNF alfa es separado en su forma soluble por una metaloproteinasa (enzima convertidora de TNF alfa), esta forma soluble se asocia mas con sus mecanismos proinflamatorios [16]. La función TNF alfa se encuentra regulada por sus dos receptores TNFR 1 y TNFR 2; la interacción con este

último parece estar involucrado en la apoptosis celular; entre otras de sus acciones ejercidas sobre las células renales como: estimulando activación de segundos mensajeros, factores de transcripción, síntesis de citoquinas, factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión, enzimas involucradas en la síntesis de otros mediadores inflamatorios, síntesis de proteínas de fase aguda; así como síntesis de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad [17]. Se sabe que el TNF alfa participa en la liberación de citoquinas y quimiocinas (MCP-1, IL-1, IL-6, IL-8); las cuales promueven la activación y el reclutamiento de células inflamatorias en el sitio del daño [12],[15],[18]. Se ha visto que los complejos inmunes que contienen IgA pueden mediar cambios en las citoquinas proinflamatorias circulantes como TNF alfa, IL-6, e IL-1; los cuales se han visto incrementados en las exacerbaciones de PHS [1], [19]. El TNF alfa es citotóxico para las células renales, y es capaz de inducir daño renal directo. Se ha reportado inducción de apoptosis, alteraciones en el flujo intraglomerular y en la tasa de filtración glomerular, como resultado de un desbalance entre los mediadores vasoconstrictores y vasodilatadores; describiéndose también alteraciones en la distribución de los receptores de adhesión celular, y en la formación de fibras de actina, resultando en alteración de la permeabilidad endotelial. Promueve la generación de especies reactivas de oxígeno, que alteran la pared de la membrana capilar glomerular, aumentando la permeabilidad a la albúmina. En ratas diabéticas se ha observado incremento en la excreción urinaria de TNF alfa, incremento en la retención de sodio e hipertrofia renal, que se previene al aplicar un agente anti-TNF alfa [16],[19]. Se ha visto aumento en la expresión glomerular del TNF alfa en pacientes con nefritis

asociada a vasculitis, pero no en pacientes sanos, incluso se ha visto implicada en la inflamación renal y el daño glomerular inducido por el depósito de inmunocomplejos. En modelos experimentales de nefritis con ratas, se ha observado, que la administración de TNF alfa exacerba el daño glomerular [16]. Se han hecho estudios en los cuales han observado niveles de TNF alfa más elevados en la fase aguda de pacientes con PHS, que en la fase de convalecencia; e incluso los estudios de inmunohistoquímica han revelado una marcada aparición del TNF alfa en las áreas de piel afectadas [20]. En modelos experimentales con ratas se ha observado la sobreexpresión del RNAm del TNF alfa, en biopsias renales durante el rechazo agudo y crónico; y en humanos la expresión del TNF alfa se ha encontrado incrementada en biopsias renales durante el rechazo agudo; e incluso se ha observado elevación de los niveles circulantes de TNF alfa 2 días antes de las manifestaciones clínicas de rechazo [21], [17].

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, hemos observado que a mayor expresión génica de TNF alfa en células de sangre periférica, menor daño renal, indicando que probablemente las células que expresan esta citocina no se encuentran en sangre periférica porque se han desplazado al órgano blanco (riñón)[22].

Actualmente en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se lleva a cabo el protocolo HIM/2007/18 en el cual se incluyen niños con nefritis por PHS, aleatorizándose a recibir doce meses de tratamiento con Azatioprina o Micofenolato.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Se ha observado involucro de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, y TNF alfa, en la patogenia de la Púrpura de Henoch Schönlein; sin embargo los factores que determinan, y median la severidad, así como el involucro renal aun permanecen pobremente comprendidos. Se han realizado estudios en niños con Púrpura de Henoch Schönlein, en donde se ha observado un mayor incremento de los niveles séricos de TNF alfa (proteína) durante la fase aguda, comparado con los niveles séricos durante la fase de convalecencia; y la expresión génica en sangre periférica es mayor en los pacientes que no requieren biopsia renal, es decir, menor daño renal, sin embargo no se ha evaluado la evolución de la expresión TNF alfa en células de sangre periférica, según el tipo de tratamiento antiproliferativo y respuesta terapéutica.

4. JUSTIFICACIÓN:

La afección renal es la complicación mas frecuente y grave. Siendo la nefritis por PHS la causa de insuficiencia renal crónica (IRC) 20 años después del diagnóstico en más del 20% de los niños. No se ha descrito cómo es la evolución de la expresión génica de TNF alfa en niños con nefritis por PHS y si se modifica según el tratamiento y respuesta terapéutica.

5. OBJETIVO GENERAL:

Medir la expresión génica de TNF alfa en pacientes con nefritis por Púrpura de Henoch Schönlein, al inicio y a los 12 meses de tratamiento con prednisona, y Azatioprina ó Micofenolato.

5.1. OBJETIVO ESPECÍFICO:

Comparar el comportamiento de la expresión del RNAm de TNF alfa en células de sangre periférica según tratamiento con Azatioprina ó Micofenolato, basal y a los 12 meses de seguimiento.

Conocer si la expresión de TNF alfa en células de sangre periférica se modifica según la respuesta terapéutica.

Comparar la respuesta, así como describir los hallazgos histopatológicos al inicio y 12 meses de tratamiento con Azatioprina ó Micofenolato.

6. HIPÓTESIS:

La expresión génica de TNF alfa en sangre periférica aumenta en los pacientes que responden al tratamiento antiproliferativo y es similar en aquellos tratados con Azatioprina que con Micofenolato.

7. MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron niños con Nefritis por PHS que sean diagnosticados en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” por biopsia a partir de Enero de 2007 hasta Junio de 2010. Los pacientes fueron asignados por el método de aleatorización para recibir cualquiera de los 2 grupos de tratamiento (I, II), que fueron administrados durante los primeros 12 meses de seguimiento.

GRUPO I: TRATAMIENTO PREDNISONA Y AZATIOPRINA:

Prednisona:

60 mg/m²SC/día, administrada cada 24 horas durante las primeras 4 semanas. Posteriormente el esteroide se administró 40mg/m²SC/en días

alternos 2 meses; posteriormente 30mg/m²SC 1 mes, continuando con 20mg/m²SC 1 mes, y 10mg/m²SC 1 mes hasta suspender al cabo de 6 meses.

Azatioprina:

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

GRUPO II: TRATAMIENTO CON PREDNISONA Y MICOFENOLATO DE MOFETILO

Prednisona:

60mg/m²SC/día, administrada cada 24 horas durante las primeras 4 semanas. Posteriormente el esteroide se administró 40mg/m²SC/en días alternos 2 meses; posteriormente 30mg/m²SC 1 mes, continuando con 20mg/m²SC 1 mes, y 10mg/m²SC 1 mes hasta suspender al cabo de 6 meses.

Micofenolato de mofetilo:

1000mgm²SC/día, dividida en 2 tomas al día, durante un año, reajustándose a una dosis mínima de 900mgm²SC/día en base a los efectos secundarios por el medicamento (leucopenia y/o alteración en la pruebas de funcionamiento hepático)

El seguimiento de los pacientes para ambos grupos de tratamiento se llevó a cabo en 16 visitas programadas con la siguiente periodicidad:

Primer mes: 4 visitas semanales

Segundo mes: 2 visitas cada 2 semanas

Del tercero al sexto mes: 4 visitas mensuales

A partir del sexto hasta completar 12 meses : visitas trimestrales

En cada visita se registró peso, talla, presión arterial y datos clínicos de edema. En cada visita se determinaron las siguientes pruebas de laboratorio: Biometría hemática, química sanguínea: glucosa, BUN, creatinina, colesterol, triglicéridos; electrolitos séricos: sodio, potasio, cloro, calcio, CO₂ total; examen general de orina, proteinuria de 12 horas, depuración de creatinina; pruebas de función hepática: proteínas totales, albúmina, bilirrubinas total, directa e indirecta, TGO, TGP. Solamente al inicio del estudio: Inmunoglobulinas: G, M, A; fracciones del complemento: C3, C4

Se obtuvo el RNA a partir del PAX GENE KIT, cuantificándose el RNA por espectrofotometría (Nanodrop modelo ND-1000) y se realizó la transcripción reversa de 1µg de RNA total para obtener el DNA complementario (cDNA) utilizando un kit comercial (Taqman reverse transcription kit, Applied Biosystems). En este DNA complementario se realizó la cuantificación del TNF alfa por PCR en tiempo real (modelo 7500 Applied Biosystems). El control interno se hizo con el gen 18S rRNA. Finalmente se realizó una biopsia renal de control a los 12 meses de tratamiento.

8. DEFINICIÓN DE VARIABLES:

Nefritis: presencia de hematuria monosintomática con o sin proteinuria

Hematuria: más de cinco eritrocitos por campo seco fuerte, ó más 500 eritrocitos/mm³ o presencia de hemoglobina > o = 1 + en el examen general de orina

Proteinuria nefrótica: >40mg/m²SC/hr en una recolección de orina de 12 horas

Proteinuria significativa: $> 4\text{mg/m}^2\text{SC/hr}$ en una recolección de orina de 12 hrs.

Función renal normal: Depuración de creatinina determinada por el método de Schwartz $> 80\text{ ml/min/m}^2\text{/hr}$ al inicio del estudio.

Síndrome nefrótico: proteinuria en rango nefrótico, edema, dislipidemias.

Síndrome nefrítico: Hematuria, hipertensión arterial

Insuficiencia Hepática: elevación de las cifras de transaminasas 2 veces por arriba del basal (TGO, TGP) y / o elevación de la bilirrubina total por arriba de 2 o aumento en un 20% del nivel basal de la bilirrubina directa.

Leucopenia.- Disminución de leucocitos a menos de $4000/\text{mm}^3$. la muestra será procesada en el Laboratorio central.

Peso, talla, superficie corporal, expresión génica de TNF alfa

9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- 1.Cualquier género
- 2.Menores de 18 años
- 3.Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado
- 4.Que cuenten con biopsia renal realizadas en las 2 semanas previas al ingreso del estudio
- 5.Que presenten proteinuria nefrótica inicial o significativa después de 8 semanas
- 6.Función renal normal.

10. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Pacientes con GMN endo y extracapilar difusa con semilunas en mas del 50% de los glomérulos (clase IV y V de acuerdo al ISKDC)
2. Paciente que presenten insuficiencia hepática de cualquier índole
3. Pacientes que en su seguimiento sean clasificados como otro tipo de vasculitis (Lupus eritematoso sistémico, Kawasaki, Churg Strauss).

11. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Intolerancia al medicamento en estudio
2. Deseo voluntario de abandonar el estudio
3. Pacientes que no cuenten con muestras de RNA en sangre periférica basal y a los 12 meses

12. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES:

Variable independiente: Número de copias de TNF alfa en células de sangre periférica

Variables dependiente: nefritis o no nefritis, biopsia o no biopsia, tipo de lesión histológica.

Variables confusoras: sexo.

Variables cuantitativas continuas: peso, talla, superficie corporal, proteinuria.

13. ANALISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó estadística descriptiva. Las variables con distribución normal se expresaron en promedio y desviación estándar. La expresión génica del TNF alfa en células de sangre periférica se normalizó sobre la expresión del

control interno 18S rRNA, por no tener una distribución normal se empleó el logaritmo natural del número de copias de TNF alfa por microgramo de RNA/número de copias de 18S rRNA por femtogramo de RNA. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p fue menor de 0.05.

14. FINANCIAMIENTO

Recibió financiamiento de Fondos Federales con el proyecto: “Estudio multicéntrico de comparación de 2 esquemas de tratamiento para la nefritis por Púrpura de Henoch Schönlein y su efecto sobre la excreción de MCP1 en orina” , protocolo HIM/2007/018

15. RESULTADOS

Se estudiaron 14 niños de los cuales siete recibieron Azatioprina, de estos dos pertenecían al sexo masculino, y cinco al sexo femenino; con edad promedio de 6.2 años. Siete niños se trataron con Micofenolato de los cuales: cuatro pertenecían al sexo masculino, y tres al sexo femenino; con edad promedio de 7 años, la presentación clínica de la nefritis fue: el 57% como síndrome nefrótico, en el 34% como hematuria y proteinuria en rango no nefrótico, y en el 7% como síndrome nefrítico, estas características demográficas se describen en la **Tabla 1**. Mostramos la lesión histológica de ambos grupos al inicio, así como en la biopsia de control realizada después de los 12 meses de tratamiento ya sea con Azatioprina, y con Micofenolato en la **Tabla 2**. Los detalles de la lesión histológica en los siete pacientes incluidos en cada brazo de tratamiento se describen en la **Tabla 3**, dos

pacientes de cada grupo empeoraron la lesión histológica a pesar de la mejoría clínica.

La evolución de la creatinina sérica, proteinuria y velocidad de filtración glomerular se muestra en la **Tabla 4**. No hubo cambios en creatinina ni en la tasa de filtración glomerular. Encontramos disminución significativa de la proteinuria, con ambos tratamientos (AZA basal vs. 12 p=0.01 y MMF basal vs. 12 meses p= 0.0021); un paciente del brazo con Azatioprina aún persistía con proteinuria en rango nefrótico (139mg/m²SC/h); otro niño había mostrado disminución de la proteinuria solo a rango significativo (18 mg/m²SC/h) (**Gráfico 1**) .

Encontramos una diferencia significativa en los niveles de proteinuria en ambos grupos de tratamiento (p=0.001) siendo con Azatioprina el promedio basal de 122.7±97.4mg/m²SC/h, y promedio a los 12 meses de 22.3±51.6 mgm²SChr. En el grupo que recibió Micofenolato con promedio basal de 99.9±123mg/m²SC/h, y promedio a los 12 meses de 0.95±1.88mg/m²SC/h (**Gráfico 2**); sin embargo al comparar la proteinuria entre ambos grupos no encontramos diferencia estadísticamente significativa.

En relación a la expresión génica de TNF alfa en células de sangre periférica disminuyó de manera significativa en ambos grupos (p=0.006) (**Gráfico 3**). El valor negativo significa que se obtuvo un valor menor a un microgramo por RNA total. Al comparar los grupos tanto en forma basal como a los 12 meses no encontramos diferencia estadísticamente significativa.

16.DISCUSIÓN

Está bien establecido que el daño renal es la complicación más frecuente y potencialmente más grave de la PHS, presentándose hasta en un 20 a 49% de los pacientes; generalmente aparece en las primeras cuatro semanas del inicio de la PHS en 90% de los niños. La nefritis por PHS puede evolucionar a insuficiencia renal crónica en aproximadamente 12% de los niños en un tiempo promedio de 3-4 años después del inicio de la enfermedad. Se ha observado que el TNF alfa tiene efectos citotóxicos sobre las células renales, y que puede ocasionar daño renal directo. Se han realizado estudios en niños con Púrpura de Henoch Schönlein, en donde se observó un mayor incremento de los niveles séricos de TNF alfa (proteína) durante la fase aguda, comparado con los niveles séricos durante la fase de convalecencia. En este presente estudio observamos que la expresión del TNF alfa en células de sangre periférica normalizado por el gen control interno 18S rRNA disminuyó de manera significativa a los 12 meses de tratamiento tanto con Azatioprina como con Micofenolato, sin encontrar diferencia entre ambos grupos de tratamiento. Además con ambos medicamentos observamos descenso significativo de la proteinuria a los 12 meses de tratamiento.

17.CONCLUSIONES.

La expresión génica del TNF alfa en células de sangre periférica con el tratamiento antiproliferativo (Azatioprina ó Micofenolato) disminuye de manera significativa, sin embargo, esta disminución no se correlaciona estrictamente con la remisión de la nefritis, ya que el 14% (2 niños)

continuaban con proteinuria a pesar de encontrarse con expresión baja de TNF alfa en células de sangre periférica.

El tratamiento a 12 meses con Azatioprina ó Micofenolato disminuye la proteinuria de manera significativa.

Todos los niños con Micofenolato respondieron al tratamiento (remisión de proteinuria) mientras que 28% de los tratados con Azatioprina persistieron con proteinuria.

La lesión histológica empeoró a los 12 meses en dos pacientes de cada brazo.

Es necesario incluir a un mayor número de pacientes y prolongar el seguimiento.

18.TABLAS.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

	AZATIOPRINA N=7	MICOFENOLATO N=7	TOTAL N=14
Género (n,%)			
Masculino	2 (14%)	4(28%)	6(42%)
Femenino	5(35%)	3(21%)	8(57%)
Edad (años) (mínimo-máximo)			
	6 (4-9)	7 (4-11)	4 (4-11)
Presentación Clínica			
Lesiones Dérmicas	7(50%)	7(50%)	14(100%)
Dolor abdominal	6(42%)	4(28%)	10(71%)
Artralgias	3(21%)	6(42%)	9(64%)
Sangrado de tubo digestivo	3(21%)	1(7%)	4(28%)
Edema	2(14%)	1(7%)	3(21%)
Presentación Clínica de Nefritis			
Hematuria/Proteinuria	2(14%)	3(21%)	5(34%)
Síndrome Nefrótico	4(28%)	4(28%)	8(57%)
Síndrome Nefrítico	1(7%)	0	1(7%)

TABLA 2 . TIPO DE LESIÓN HISTOLÓGICA AL INICIO Y 12 MESES SEGÚN GRUPO DE TRATAMIENTO .

	AZATIOPRINA		MICOFENOLATO	
Estadio Lesión Histológica	Inicio	12 meses	Inicio	12 meses
Clase I	0	2	1	0
Clase IIA	3	0	0	3
Clase IIB	1	1	1	3
Clase IIC	1	1	0	1
Clase IIIA	1	0	2	0

TABLA 3. ESTADIO DE LESIÓN HISTOPATOLÓGICA AL INICIO Y 12 MESES EN LOS SIETE PACIENTES DE CADA GRUPO.

	AZATIOPRINA		MICOFENOLATO	
Paciente	Inicio	12 meses	Inicio	12 meses
1	IIB	IIIB	IIIB	IIA
2	IIIB	IIIB	IIIB	IIA
3	IIC	IIB	IIIB	IIC
4	IIA	Insuficiente	I	IIA
5	IIA	I	IIIA	IIB
6	IIIA	IIC	IIIA	IIB
7	IIA	I	IIB	IIB

TABLA 4. CREATININA SÉRICA, PROTEINURIA Y VELOCIDAD DE FILTRACIÓN GLOMERULAR AL INCIO Y A LOS 12 MESES DE TRATAMIENTO

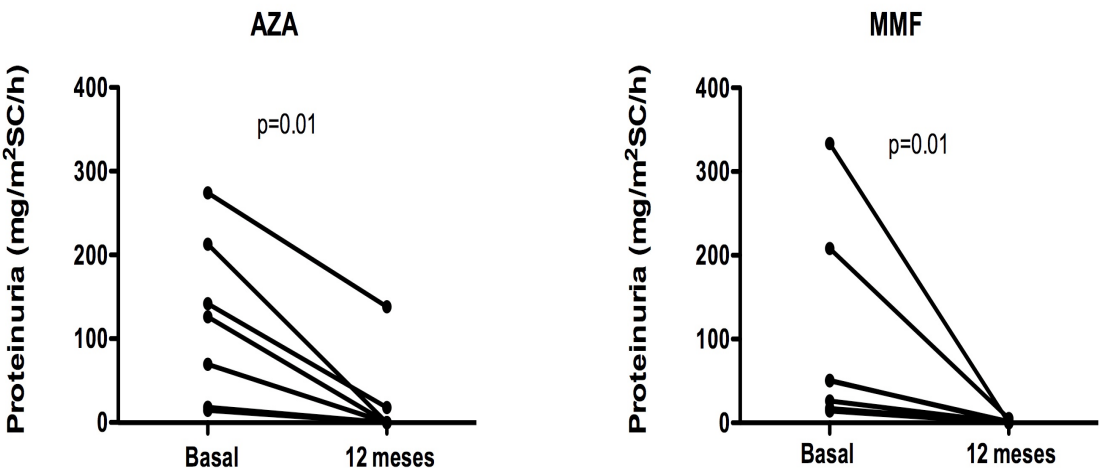
	AZATIOPRINA	MICOFENOLATO	Valor de P
Creatinina (mg/dL)			
Inicio	0.44 ± 0.11	0.47 ± 0.11	0.64
12 meses	0.50 ± 0.14	0.44 ± 0.07	0.36
Proteinuria (mg/m²SC/hr)			
Inicio	126 (18, 213)	50 (17, 208)	0.56
12 meses	0 (0,18)	0 (0,1.6)	0.81
Tasa de Filtración Glomerular (Schwartz) ml/min/1.73m²			
Inicio	156.14 ± 36	150.2 ± 32	0.89
12 meses	148.7 ± 40	164.7 ± 20	0.22

TABLA 5. RESPUESTA AL TRATAMIENTO

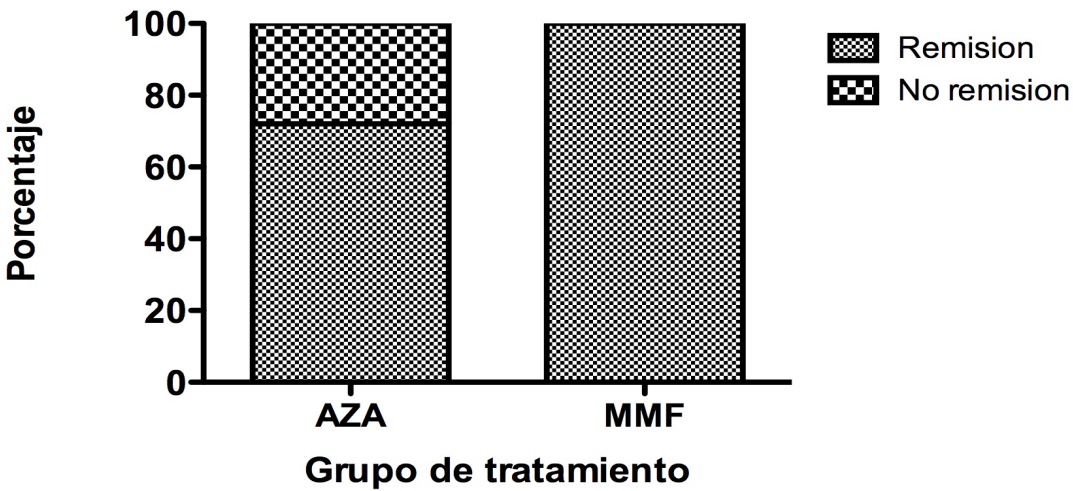
	AZATIOPRINA	MICOFENOLATO	Total
Remisión total	5(35%)	7(50%)	10(71%)
Remisión parcial	1(14%)	0	3(21%)
Sin respuesta	1(14%)	0	1(7%)

19.GRÁFICAS.

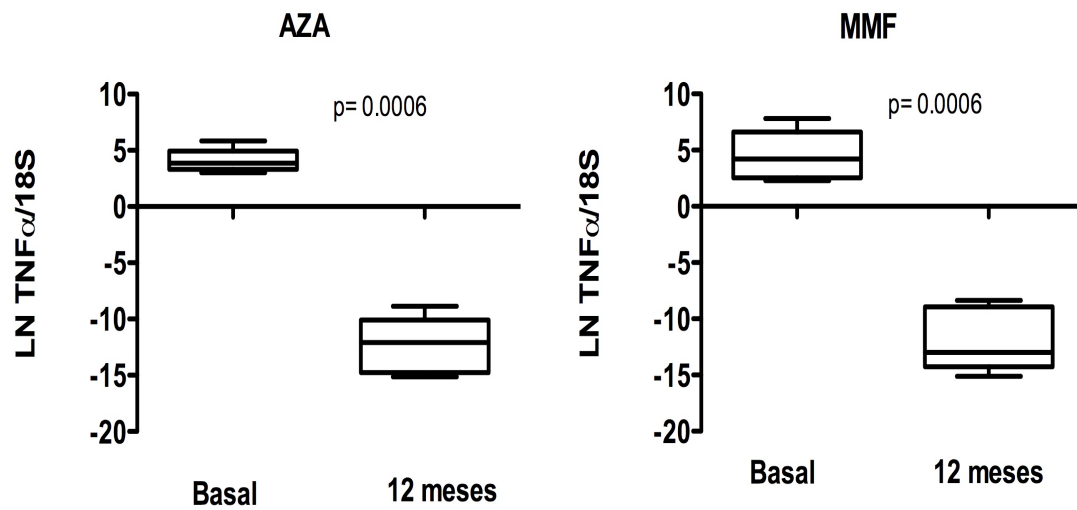
GRÁFICA 1. PROTEINURIA AL INCIO Y 12 MESES DE TRATAMIENTO EN 14 PACIENTES CON NEFRITIS POR PHS



GRÁFICA 2. RESPUESTA A LOS 12 MESES DE TRATAMIENTO EN 14 PACIENTES CON NEFRITIS POR PHS



GRÁFICA 3. EXPRESIÓN DE TNF ALFA BASAL Y A LOS 12 MESES DE TRATAMIENTO EN 14 PACIENTES CON NEFRITIS POR PHS



20. BIBLIOGRAFÍA

1. Rostoker, G., *Schonlein-henoch purpura in children and adults: diagnosis, pathophysiology and management*. BioDrugs, 2001. 15(2): p. 99-138.
2. Cáceres J, F.Y., Hernández A, Ortiz L, et al, *Henoch-Shönlein Purpura in Children: Report of 105 patients*. Bol Med Hosp Infant Mex 2006. 63(5): p. 7.
3. Tizard, E.J. and M.J. Hamilton-Ayres, *Henoch Schonlein purpura*. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2008. 93(1): p. 1-8.
4. Rai, A., C. Nast, and S. Adler, *Henoch-Schonlein purpura nephritis*. J Am Soc Nephrol, 1999. 10(12): p. 2637-44.
5. Lau, K.K., et al., *Pathogenesis of Henoch-Schonlein purpura nephritis*. Pediatr Nephrol. 25(1): p. 19-26.
6. Davin, J.C., *Henoch-Schonlein purpura nephritis: pathophysiology, treatment, and future strategy*. Clin J Am Soc Nephrol. 6(3): p. 679-89.
7. Mills, J.A., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schonlein purpura*. Arthritis Rheum, 1990. 33(8): p. 1114-21.
8. Shin, J.I. and J.S. Lee, *Prognostic serological markers of Henoch-Schonlein nephritis*. Qjm, 2006. 99(11): p. 801.
9. Szeto, C. C., et al., *Grading of Acute and Chronic Renal Lesions in Henoch-Schönlein Purpura*. Mod Pathol, 2001. 14(7):635-40.
10. Chadban, S., *Glomerulonephritis recurrence in the renal graft*. J Am Soc Nephrol, 2001. 12(2): p. 394-402.
11. Willis K, C.M., Slifer S., *KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis*. Kidney International Supplements, 2012. 2(2): p. 218-220.
12. Cockwell, P., et al., *In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis*. Kidney Int, 1998. 54(3): p. 827-36.
13. Zaffanello, M., Brugnara, M., and Franchini, M. *Therapy for children with henoch-schonlein purpura nephritis: a systematic review*. ScientificWorldJournal. 2007.10(7): 20-30.

14. Nikibakhsh, A. A., et al., *Treatment of Complicated Henoch-Schönlein Purpura with Mycophenolate Mofetil: A Retrospective Case Series Report*. Int J Rheumatol. 2010 p. 254316
15. McCarthy, H.J. and E.J. Tizard, *Clinical practice: Diagnosis and management of Henoch-Schonlein purpura*. Eur J Pediatr. 169(6): p. 643-50.
16. Hernandez, T. and T.N. Mayadas, *Immunoregulatory role of TNFalpha in inflammatory kidney diseases*. Kidney Int, 2009. 76(3): p. 262-76.
17. Navarro-Gonzalez, J.F. and C. Mora-Fernandez, *The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2008. 19(3): p. 433-42.
18. Sanders, J.T. and R.J. Wyatt, *IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis*. Curr Opin Pediatr, 2008. 20(2): p. 163-70.
19. Yang, Y.H., et al., *The level of IgA antibodies to human umbilical vein endothelial cells can be enhanced by TNF-alpha treatment in children with Henoch-Schonlein purpura*. Clin Exp Immunol, 2002. 130(2): p. 352-7.
20. Ha, T.S., *The role of tumor necrosis factor-alpha in Henoch-Schonlein purpura*. Pediatr Nephrol, 2005. 20(2): p. 149-53.
21. Stasikowska, O. and M. Wagrowska-Danilewicz, *Chemokines and chemokine receptors in glomerulonephritis and renal allograft rejection*. Med Sci Monit, 2007. 13(2): p. RA31-6.
22. Duarte U, M.M., Fuentes Y, Romero B. , *Evaluación de la progresión del daño renal por púrpura de Henoch Schönlein en niños mediante la determinación de la expresión de marcadores de inflamación y fibrosis.*, in *Nefrología Pediátrica 2007*, Universidad Nacional Autónoma de México: Mexico