



PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS,
ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS, CICLO 2001-2003.

**TGF- β 1, APOPTOSIS Y FIBROSIS INTERSTICIAL EN LA
NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA A.**

TUTOR: DR. JOSÉ RAMÓN PANIAGUA SIERRA.

COTUTORA: DRA. MARÍA DEL CARMEN AVILA CASADO.

COLABORADOR: BIÓLOGO ARMANDO MEDINA CRUZ.

Facultad de Medicina



ALUMNA: MARÍA VIRGILIA SOTO ABRAHAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

	PAG	
i	Abreviaturas	3
ii	Índice de tablas	4
iii	Índice de figuras	5
iv	Resumen	6
v	Abstract	7
1.	ANTECEDENTES	8
1.1	Ciclosporina A	8
1.2	Nefrotoxicidad	9
1.3	Fibrosis intersticial y arteriopatía renales	10
1.4	Patogenia	10
1.5	TGF- β 1	11
1.6	Apoptosis	12
1.7	Experiencia en México	14
2.	JUSTIFICACIÓN	16
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4.	HIPÓTESIS	18
5.	OBJETIVO	18
6.	PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO	19
6.1	Diseño del estudio	19
6.2	Universo de trabajo	19
6.3	Descripción de las variables	19
6.4	Selección de la muestra	22
6.4.1	Tamaño de la muestra	22
6.4.2	Criterios de selección	23
6.4.2.1	Criterios de inclusión	23
6.4.2.2	Criterios de no inclusión	24
6.4.2.3	Criterios de eliminación	24
6.5	Procedimientos	25
6.5.1	Tejido control	25
6.5.2	Histopatología y morfometría	25
6.5.3	Inmunohistoquímica	27
6.5.4	Técnica de TUNEL	28
6.6	Consideraciones éticas	28
6.7	Análisis estadísticos	28
7.	RESULTADOS	30
8.	DISCUSIÓN	42
9.	CONCLUSIONES	45
10.	BIBLIOGRAFÍA	46
11.	ANEXOS	51
11.1	Hoja de recolección de datos	51
11.2	Clasificación de Banff para la biopsia del injerto renal	52
11.3	Carta de consentimiento	53

ABREVIATURAS

Cs A: Ciclosporina A.

FNAT: Factor nuclear para la activación de linfocitos T.

IL-2: Interleucina-2.

MAP: Proteína de adherencia de macrófagos.

TGF- β 1: Factor transformador del crecimiento Beta 1.

TUNEL: TdT- mediated DNA nick end-labeled.

ÍNDICE DE TABLAS

		<u>PAG</u>
Tabla No. 1:	Características clínicas y de laboratorio de los 40 pacientes en las biopsias inmediata y en la de retiro de Cs A.	30
Tabla No. 2:	Características de la población trasplantada en el INCIC, incluida en el estudio.	32
Tabla No. 3:	Características microscópicas de las biopsias (inmediata y retiro).	32
Tabla No. 4:	Promedio de fibrosis intersticial cortical por grupos.	33
Tabla No. 5:	Promedio de TGF β -1 intersticial y vascular renal cortical por grupos.	36
Tabla No. 6:	Correlación entre el % de la fibrosis intersticial y el de TGF β -1 en la biopsia inmediata y en la de retiro.	37
Tabla No. 7:	Promedio de superficie intersticial cortical renal positiva con la técnica de TUNEL por grupos.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

		<u>PAG</u>
Figura No. 1:	Expresión del TGF β 1 en arteriolas preglomerulares, en el intersticio y en capilares peritubulares.	20
Figura No. 2:	Técnica de TUNEL para apoptosis.	20
Figura No. 3:	Arteriopatía por Cs A, engrosamiento de la pared, vacuolación del citoplasma del músculo de la capa media y depósitos nodulares hialinos.	21
Figura No. 4:	Fibrosis intersticial renal cortical de diferentes grados teñida en azul verdoso con tricrómico de Mallory.	22
Figura No. 5:	Distribución por grupos de edad de los receptores.	31
Figura No. 6:	Arteriopatía con engrosamiento leve, moderado y grave.	33
Figura No. 7:	Cortes histológicos de corteza renal teñidos con tricrómico de Mallory con fibrosis grado 0, grado I, grado II y grado III.	35
Figura No. 8:	Correlación entre el grado de fibrosis, TGF β 1 y BCL-6.	37
Figura No. 9:	Porcentajes de TGF β -1 y apoptosis cortical en las biopsias previas al retiro de Cs A por grupos de fibrosis.	39
Figura No. 10:	Porcentajes de TGF β -1 y apoptosis cortical en las biopsias inmediatas por grupo de fibrosis.	39
Figura No. 11:	Esquema comparativo entre los diferentes grados de fibrosis intersticial y la positividad obtenida con TGF β -1 y la técnica de TUNEL para apoptosis.	40

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La ciclosporina A (Cs A) es un medicamento inmunosupresor usado para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos. La principal complicación de su uso prolongado es la nefrotoxicidad. La forma más común es la crónica, que se caracteriza histológicamente por arteriopatía y por fibrosis intersticial. Se ha implicado en la patogenia de la fibrosis intersticial secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A al factor transformador del crecimiento Beta 1 (TGF- β 1). Este es una citocina profibrótica y un potente inductor de la apoptosis.

OBJETIVO: Demostrar si en las biopsias renales de pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado que presentan datos histológicos de toxicidad crónica por Cs A hay aumento de la expresión de TGF- β 1 y aumento en la cantidad de apoptosis intersticiales, en relación al grado de fibrosis intersticial.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se estudiaron 40 pacientes con TRDVR, al momento del injerto y previo retiro de Cs A después de cuando menos 6 meses de tratamiento. En cada biopsia fueron evaluados el porcentaje de arteriolas afectadas, la fibrosis intersticial y la expresión de Fas, BCL-2, BCL-6, BCL-X, Bak, Bax y TGF- β 1. El resultado de estas técnicas fue medido en un analizador de imágenes y expresado en porcentajes y se compararon con el tejido obtenido al momento del injerto.

RESULTADOS: Se revisaron los expedientes clínicos de 168 pacientes con trasplante renal, de los cuales se incluyeron 40 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión. El 33% fueron mujeres y el 66.6% hombres. El tiempo de trasplante fue en promedio de 10.6 ± 3.48 (6-18) meses. El número de glomérulos analizables en la primera biopsia fue de 12.8 ± 9.6 (1-25) y en la segunda biopsia fue de 11.9 ± 5.49 (1-23). El número de arteriolas preglomerulares engrosadas durante la primera biopsia en promedio fue de 0.35 ± 0.70 (0-3) y en la segunda biopsia fue de 4.55 ± 2.61 (1-15), observándose un incremento significativo en el número de arteriolas engrosadas ($p < 0.001$). Las biopsias inmediatas al injerto sin el efecto de la Cs A de los mismos casos fueron 40, 34 con fibrosis grado 0 y 6 casos con fibrosis grado I. El promedio de la fibrosis fue 6.10 ± 5.6 en la biopsia inmediata, con un aumento significativo ($p < 0.05$) en relación a la fibrosis en la biopsia para retiro de Cs A que tuvo un promedio de 24.89 ± 17.59 . La fibrosis intersticial y la expresión de TGF- β 1 mostraron una clara correlación. El coeficiente de correlación, entre el porcentaje de fibrosis intersticial en la primera biopsia (inmediata) sin el efecto de la administración de Cs A y el porcentaje de expresión de TGF- β 1 en la misma biopsia es de 0.336 ($p = 0.039$). Sin embargo, el coeficiente de correlación entre la fibrosis y la expresión de TGF- β 1 en la segunda biopsia (de retiro) ya con el efecto atribuible al inmunosupresor es de 0.809 ($p = < 0.001$). Se encontró correlación directa entre la magnitud de la fibrosis y la expresión de TGF- β 1 ($r=0.86$), con BCL-6 ($r=0.229$). Hubo un incremento significativo ($p < 0.001$) de la apoptosis intersticial en las biopsias de retiro (24.51 ± 7.2) en relación con las inmediatas (10.10 ± 7.5). Sin embargo, este incremento presentó un valor máximo de superficie cortical renal afectada en las biopsias previas al retiro de Cs A con fibrosis grado 1 y grado 2, con una disminución en las biopsias con fibrosis grado 3.

CONCLUSIONES: Los datos encontrados son compatibles con la hipótesis de que la toxicidad crónica por Cs A en el injerto renal está mediada por TGF- β 1 y con la inducción de apoptosis en el intersticio renal.

ABSTRACT

Frequency of acute and chronic Cyclosporine-A (CyA) nephrotoxicity varies from 15% to 30% in different series, depending of the criteria of the observant. Chronic toxicity is the most frequent and is characterized by acellular interstitial fibrosis and arteriolopathy. Interstitial fibrosis could be the result of an important profibrotic growing factor and apoptosis inductor, TGF- β 1.

Objective: To demonstrate that there is an increase in the expression of TGF- β 1 and in apoptosis in renal allograft biopsies taken by protocol of early CyA withdrawal in patients with histological data of CYA-toxicity.

Material and Method: Renal biopsies of 40 transplanted patients of living related donor were retrospectively reviewed. All patients have had a renal biopsy performed at the time of the transplant (immediate). Second biopsies were taken by protocol of early CyA withdrawal, at least after 6 months of treatment. Biopsies were reviewed looking for vascular (afferent and yuxtglomerular arterioles) or interstitial fibrosis as well as the expression of TGF- β 1, and immunomarkers of apoptosis: Fas, BCL2, BCL-6, BCL-X, Bak and Bax. Expression of immunomarkers was measured by morphometry using an image analyzer. Results (expressed in percentage) were compared with those biopsies taken immediately after transplantation.

Results: From 168 charts reviewed, only 40 patients fulfilled criteria for the study. Female gender corresponded to 33% and 66.6% to males. Recipient age at the time of transplantation was 31 ± 9.56 years (range 18 – 42) while donor age was 37 ± 12.11 years (range 20-60). Average time after transplantation was 10.6 ± 3.48 months (6-18). Number of glomeruli available per biopsy was 12.8 ± 9.6 (1-25) in the first biopsy and 11.9 ± 5.49 (1- 23) in the second biopsy. Average of the number of arterioles with vascular damage in the first biopsy was 0.35 ± 0.70 (0-3) while in the second biopsy was 4.55 ± 2.61 (1-15), $p < 0.001$. Vascular damage was scored as mild, moderate and severe. Each interstitial fibrosis group had ten samples. In the biopsies taken immediate after transplantation (40 cases), 34 had no fibrosis and were scored with 0 and the 6 resting cases had fibrosis scored as grade 1. Average of fibrosis was 6.10 ± 5.6 in the first biopsy while in the second biopsy was 24.89 ± 17.59 , marked increased ($p < 0.05$). There was a clear correlation between expression of TGF- β 1 and interstitial fibrosis. Pearson coefficient between the percentage of interstitial fibrosis and TGF- β 1 expression in the first biopsy was 0.336 ($p = 0.039$). However, this coefficient was of 0.809 in the second biopsy ($p < 0.001$), under the treatment with CyA. Indeed, there was a direct correlation between interstitial fibrosis and TGF- β 1 expression using ANOVA. There was a direct correlation between interstitial fibrosis and TGF- β 1 expression ($r = 0.86$) and with Bcl-6 ($r = 0.229$). TUNEL results showed an increase in apoptosis in the interstitium ($p < 0.001$) in the second biopsies (24.51 ± 7.2) compared to those biopsies taken immediately (10.10 ± 7.5). However, this value showed an affected cortex surface maximal increase in all those second biopsies with fibrosis scored grade 1 and 2, while there was a diminution in those biopsies scored as grade 3.

Conclusions: Data supports the hypothesis that CyA chronic toxicity in the renal allograft is mediated by TGF- β 1 and the apoptosis induction in the renal interstitium.

1. ANTECEDENTES

1.1. CICLOSPORINA

La ciclosporina A (Cs A) es un medicamento inmunosupresor usado por primera vez en 1978 para prevenir el rechazo en la cirugía del trasplante renal (1). Es un péptido cíclico neutro hidrófobo que se obtiene de un hongo; tiene 11 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 1203 (2). A pesar de su alto costo, en la práctica clínica tiene un gran impacto, ya que en las dos décadas pasadas, su uso mejoró impresionantemente el pronóstico funcional de los trasplantes de órganos previniendo la pérdida por rechazo (2). La diferencia más importante de la Cs A con otros agentes inmunosupresores es su nula mielotoxicidad (2). Sin embargo, sus efectos en la estructura y función del riñón (nefrotoxicidad) han limitado su uso (3). La actividad inmunosupresora de la Cs A se debe a la unión dependiente de calcio-calmodulina del complejo Cs A - ciclofilina con la fosfatasa de calcineurina (4). La inhibición de la calcineurina bloquea la transcripción de los genes que sintetizan el factor nuclear para la activación de linfocitos T (FNAT) y previene la activación de citocinas, incluyendo la interleucina-2 (IL-2) que es el principal factor de crecimiento autócrino en la cascada de la reacción para el reconocimiento de los antígenos (4). Con la inhibición de la activación de la IL-2 se ocasiona una modulación selectiva de la función de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Esto afecta inicialmente la diferenciación de las células T cooperadoras y finalmente el desarrollo de las células citotóxicas que potencialmente destruyen al injerto (4). La Cs A interfiere además con la liberación de otras linfocinas incluyendo el interferón gamma y el factor de activación de las células B. El resultado final es el bloqueo de la respuesta inmune (4).

1.2. NEFROTOXICIDAD

A pesar de ser un excelente inmunosupresor, el uso prolongado de Cs A produce nefrotoxicidad (2). Hay dos formas reconocidas de nefrotoxicidad, la primera es la aguda que se caracteriza por la disminución súbita del filtrado glomerular y microhematuria, con hipertensión arterial en el 47% de los casos (5). Esta alteración se presenta con la administración de Cs A en altas dosis aunque puede ser independiente de la misma (5). Microscópicamente, en la biopsia del injerto se puede observar vacuolación isométrica del epitelio tubular, apoptosis del músculo liso y edema endotelial arteriolar de tipo microangiopatía trombótica (5). Ya que es una lesión dependiente de la dosis, estos cambios son reversibles con la disminución de la dosis o la suspensión de la Cs A con cambio a otro tipo de inmunosupresor (6). La lesión aguda ocurre en 40% de los pacientes en los primeros 100 días después del trasplante (5). La nefrotoxicidad aguda por Cs A es secundaria a la lesión de la membrana basal producida por una vasoconstricción potente y prolongada de las arteriolas eferentes (5), que ocasiona una disminución del flujo sanguíneo y del filtrado glomerular (5). La segunda forma de nefrotoxicidad por Cs A, es la crónica, que es la forma más común (1). Esta lesión se caracteriza clínicamente por el deterioro crónico y progresivo de la función renal que es irreversible aún con la suspensión del medicamento (7). Se desconoce la mayor parte del mecanismo a través del cual se produce este tipo de lesión renal (3). Algunos estudios realizados en modelos experimentales sugieren que el daño vascular desempeña un papel importante en la patogenia de la nefrotoxicidad crónica por Cs A. Sin embargo, esto aún no ha sido comprobado (2).

1.3. FIBROSIS INTERSTICIAL Y ARTERIOLOPATÍA RENALES

La nefrotoxicidad crónica se caracteriza histológicamente por bandas corticales de fibrosis o fibrosis difusa intersticial que se divide en grados de acuerdo al porcentaje de superficie afectada (0: <10%, I: 10-25%, II: >25-40% y III: >40%) y se presenta en todos los pacientes (100%) que reciben Cs A por más de 6 meses (7,8). También se observa vacuolación tubular y arteriopatía. La arteriopatía consiste daño intenso manifestado por depósitos nodulares de una proteína hialina en la pared de las arteriolas hiliares y de las arterias interlobulares, con vacuolación del citoplasma de las células musculares lisas de los mismos vasos (7). La arteriopatía es la lesión morfológicamente más característica de la nefropatía crónica por Cs A y se presenta en el 70% de los pacientes trasplantados que reciben este medicamento por más de 6 meses (7). Después de la suspensión de la Cs A, se ha observado que la vacuolación tubular y la arteriopatía pueden disminuir en intensidad, a diferencia de la fibrosis que es irreversible e incluso puede aumentar después de la suspensión del medicamento (7). Por lo tanto, la fibrosis intersticial es considerada como la lesión directamente responsable de la pérdida del injerto (7). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual hay sustitución del intersticio renal normal por fibrosis.

1.4. PATOGENIA

La nefrotoxicidad crónica por Cs A puede inducirse en modelos animales (ratas) con dieta baja en sal, ya que así se incrementa su susceptibilidad a los efectos del medicamento y se facilita la producción de fibrosis intersticial (2). En modelos experimentales realizados en ratas de la manera antes descrita, se ha implicado en la patogenia de la fibrosis intersticial secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A a

ciertas proteínas de adherencia celular, específicamente a la proteína de adherencia de macrófagos (MAP) y al factor transformador del crecimiento beta 1 (TGF- β 1) (9).

1.5. TGF- β 1

El TGF- β 1 es una citocina profibrótica que produce aumento de la colágena intersticial a través de dos mecanismos: 1) estimulando la acción de los fibroblastos para la síntesis de colágena y fibronectina por incremento en la expresión de los genes encargados de la síntesis de estas (10) y 2) bloqueando la degradación de la matriz extracelular al inhibir la acción de las colagenasas y a los diferentes subtipos de gelatinasas (11). Además, se conoce que el TGF- β 1 inhibe la proliferación de células mesangiales y suprime la sintetasa del óxido nítrico (NOS) (12). Roberts y Sporn observaron un aumento en la expresión del RNA mensajero de TGF- β 1 en los glomérulos e intersticio de ratas diabéticas con glomeruloesclerosis (fibrosis glomerular) y con fibrosis intersticial (13). Recientemente, la manipulación genética del gen del TGF- β 1 en modelos experimentales ha sugerido que éste participa en el daño renal secundario a algunos medicamentos (9). Se especula que si la Cs A induce la expresión de TGF- β 1 *in vivo* e *in vitro*, la manipulación de los niveles de TGF- β 1 con anticuerpos monoclonales anti-TGF- β 1 podría disminuir los efectos nefrotóxicos crónicos de la Cs A (9, 14). En varios estudios *in vivo* se ha demostrado la importancia de la interacción de las moléculas de adherencia celular en la patogenia de algunos tipos de glomerulonefritis y la producción del daño tubulointersticial (15). Sin embargo, esto aún no ha sido estudiado en los pacientes que reciben Cs A de manera crónica y que desarrollan toxicidad. Cabe mencionar que en el hombre, en condiciones normales, el TGF- β 1 se expresa en las células intersticiales de la médula renal y en las mesangiales de los glomérulos, pero no se encuentra en el intersticio renal cortical (9). Grasl-Kraupp y colaboradores han

demostrado que el TGF- β 1 es un inhibidor de la proliferación celular y un potente inductor de la apoptosis en el hígado *in vitro* e *in vivo* después de la administración de altas dosis de TGF- β 1 a ratas con neoplasias hepáticas (23).

1.6. APOPTOSIS

Otro aspecto importante y poco estudiado en la nefrotoxicidad crónica por Cs A es la forma a través de la cual el intersticio renal es sustituido por fibrosis que finalmente es uno de los aspectos más importantes porque ocasiona la pérdida del injerto. En un modelo experimental en ratas con dieta hiposódica y con Cs A, se encontró que desarrollaron cambios histológicos similares a los del ser humano con arteriopatía con depósitos nodulares de proteína hialina, depósitos de matriz extracelular con fibrosis del intersticio y pequeños focos de infiltrado de linfocitos y macrófagos asociados a estas zonas de fibrosis; estos focos inflamatorios desaparecieron conforme aumentó la cantidad de fibrosis y de apoptosis (2). Este estudio concluyó que la pérdida del parénquima renal al ser sustituido por fibrosis se lleva a cabo a través de una apoptosis intensa y acelerada (2). El estudio de la apoptosis ha proporcionado un mejor entendimiento de los mecanismos de daño renal tanto a nivel glomerular como tubulointersticial (16). Se ha determinado que es importante para la remodelación del glomérulo después de una lesión inflamatoria, como sucede en las glomerulonefritis proliferativas, ya que disminuye paulatinamente la celularidad por medio de apoptosis en el periodo de recuperación y remodelación glomerular hasta llegar nuevamente a la celularidad normal (17). Se ha demostrado la participación de la apoptosis en el daño renal por diferentes estímulos que ocasionan insuficiencia renal aguda, en la endotoxemia, en diversos tipos de glomerulonefritis y en el daño nefrotóxico secundario a la administración de medicamentos como dexametasona, ciclofosfamida y melfalan

(14,18,19). La apoptosis es una forma de muerte celular "programada", que morfológicamente se distingue de la necrosis porque no hay destrucción celular (16). En la apoptosis la célula sufre una condensación nuclear y fragmentación celular, con preservación de las membranas celulares y de los organelos (16). Las células apoptóticas son eliminadas por fagocitosis que realizan las células nucleadas vecinas y no necesariamente por células fagocíticas, por lo tanto, en condiciones normales, el fenómeno de apoptosis protege a los tejidos vecinos de la inflamación y del daño tisular (16). Algunas funciones importantes de la apoptosis son la remodelación tisular durante la embriogénesis y la renovación de los tejidos después de alguna lesión (16). Existen múltiples genes responsables de la apoptosis, algunos como el *Fas*, *IL-1B*, *p53*, *c-Myc* y *Bak* inducen la apoptosis, otros en cambio, la disminuyen, como el *bcl-2*, *bcl-6*, *bcl-X* y *Bax* (14). La apoptosis en los tejidos puede valorarse de tres maneras: 1) a través de sus características histológicas con microscopía de luz (campo claro) que permite valorarla de manera cualitativa (16), 2) con anticuerpos monoclonales que detectan los productos de la expresión de los genes reguladores (inductores/inhibidores) de la apoptosis a través de inmunohistoquímica (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa) estas técnicas pueden valorarse de manera cualitativa (positivo-negativo) y cuantitativa, esta última a través de un analizador de imágenes, y 3) con el método de Gavrieli, mejor conocido como técnica de TUNEL (TdT-mediated DNA nick end-labeled) (20) que proporciona un resultado de apoptosis en porcentajes, también a través de un analizador de imágenes. En tejidos normales la cantidad de células en apoptosis es variable (21); utilizando métodos semicuantitativos se ha estimado que la cantidad de apoptosis en el riñón normal adulto no debe ser mayor del 15% (21), por lo que un porcentaje mayor a éste significaría una aceleración en la muerte celular. Otra de las técnicas para apoptosis, como la de electroforesis de DNA en gel de agarosa, no es aplicable para

medir apoptosis intersticial, pues requiere entre otras cosas, la eliminación de los glomérulos a través de microdissección, elemento que en sí mismo produce apoptosis (22).

1.7 EXPERIENCIA EN MÉXICO

En México se ha estimado que hay aproximadamente 100,000 pacientes afectados por insuficiencia renal crónica que requieren un trasplante renal (24). En nuestro país se realizan alrededor de 1,500 trasplantes renales al año (24). En el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, se efectúan aproximadamente 55-60 trasplantes renales al año. Se estos el 90 %, son de donadores vivos, el resto son de donadores cadavéricos.

En años recientes se han estudiado las consecuencias sobre la sobrevida del injerto de los pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez que usan Cs A, en un protocolo de retiro de la misma (21). Se evaluaron los cambios histológicos por la administración de Cs A en biopsias renales percutáneas tomadas por protocolo en pacientes con función renal estable para evaluar el retiro de la Cs A, desde 2.3 a 81 meses de la administración de Cs A. Se incluyó en este estudio a los pacientes quienes durante el periodo de administración de Cs A no presentaron signos clínicos o histológicos de rechazo. Los pacientes fueron divididos en tres grupos basados en la duración de la terapia con Cs A. En el grupo 1 los pacientes recibieron Cs A durante menos de 6 meses, en el grupo 2 entre 6 y 12 meses y en el grupo 3 la recibieron por más de 12 meses. Se analizaron 91 biopsias renales de pacientes incluidos en este protocolo para retiro de Cs A. En el grupo 1 se encontraron lesiones arteriolares en el 23% de las biopsias (6/26), en el grupo 2 se observó arteriopatía secundaria a Cs A en el 70% (35/50) y en el grupo 3 en el 100% (15/15). La fibrosis intersticial se encontró en el 58% de las biopsias del grupo 1 y fue considerada como grado 0 (< 10%), en el 58% y grado I en el 42%. En el grupo 2 se

encontró fibrosis grado I en el 84% y grado II en el 16%. En el grupo 3 hubo fibrosis en todos los casos, se consideró como grado II en el 53% y grado III en el 47%. Además se observó (por medio de una biopsia realizada seis meses después del retiro de la ciclosporina que en los pacientes que la recibieron por menos de 6 meses), que la mayor parte de los cambios histológicos disminuyeron o desaparecieron después del retiro de la Cs A en los pacientes que la recibieron por más de 6 meses (25).

2. JUSTIFICACION

En México existen 100,000 habitantes que presentan insuficiencia renal crónica por múltiples causas, que son candidatos a un trasplante renal pero solo se realizan 1,500 trasplantes al año, (90% de los cuales son de donador vivo relacionado). Esto explica la gran cantidad de pacientes mexicanos que se encuentran en espera de un trasplante de este órgano. Para evitar el rechazo del injerto se utilizan múltiples esquemas de inmunosupresión, el medicamento más utilizado es la Cs A, por su nula mielotoxicidad y su gran efectividad en la prevención de rechazo. Sin embargo, su uso prolongado ocasiona la pérdida del injerto por nefrotoxicidad crónica, lo que contribuye a la falla del injerto y a que los pacientes requieran un nuevo injerto renal. El resultado es el incremento en la cantidad de pacientes en espera de un trasplante renal, además, disminuye la función del injerto empobreciendo el pronóstico de estos pacientes. Los mecanismos a través de los cuales la Cs A ocasiona la arteriopatía y la fibrosis intersticial y a través del cual el parénquima renal es sustituido por fibrosis intersticial, en la nefrotoxicidad crónica por Cs A no han sido estudiados en el hombre. En modelos experimentales en ratas sometidas al uso de Cs A por tiempo prolongado, se ha encontrado un espectro de lesiones histológicas renales semejante al que se produce en la nefrotoxicidad crónica por Cs A en los pacientes. Estos estudios han demostrado la expresión de algunas moléculas de adherencia celular como el TGF- β 1, que como es bien conocido, estimula la síntesis de colágena y fibronectina porque es un factor mitogénico para los fibroblastos. También en estos modelos experimentales se ha encontrado un aumento de la apoptosis directamente relacionado con la cantidad de fibrosis intersticial. Como ya se mencionó, se ha encontrado, que en ratas con neoplasias hepáticas sometidas a niveles elevados de TGF- β 1, hay aumento de la apoptosis, lo que sugiere que actúa como un potente inductor de ésta. Todo esto no se

ha estudiado en las biopsias renales de pacientes. Si pudieran conocerse y demostrarse los mecanismos que intervienen en la nefropatía crónica por Cs A en humanos, podría ser el primer paso para en un futuro poder prevenir la pérdida del injerto secundaria al uso prolongado del medicamento.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿En los pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado con nefrotoxicidad crónica por Cs A, hay aumento de la expresión de TGF- β 1 y de la apoptosis en el intersticio, directamente relacionados con el grado de fibrosis?

4. HIPÓTESIS

En las biopsias renales de pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado que presentan datos histológicos de toxicidad crónica por Cs A, hay incremento de la expresión de TGF- β 1 y aumento en la cantidad de apoptosis en el intersticio relacionados directamente con el grado de fibrosis.

5. OBJETIVO

Demostrar si en las biopsias renales de pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado que presentan datos histológicos de toxicidad crónica por Cs A, hay aumento de la expresión de TGF- β 1 y aumento en la cantidad de apoptosis intersticiales, en relación al grado de fibrosis intersticial.

6. PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio transversal analítico.

6.2. UNIVERSO DE TRABAJO

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

6.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

1. Expresión del factor transformador del crecimiento $\beta 1$ en el intersticio, túbulos y arteriolas renales.
2. Apoptosis renal intersticial y arteriolar.
3. Fibrosis intersticial cortical secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A.

DESCRIPCIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

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

Escala de medición: cuantitativa de razón.

Tipo de variable: cuantitativa continua.

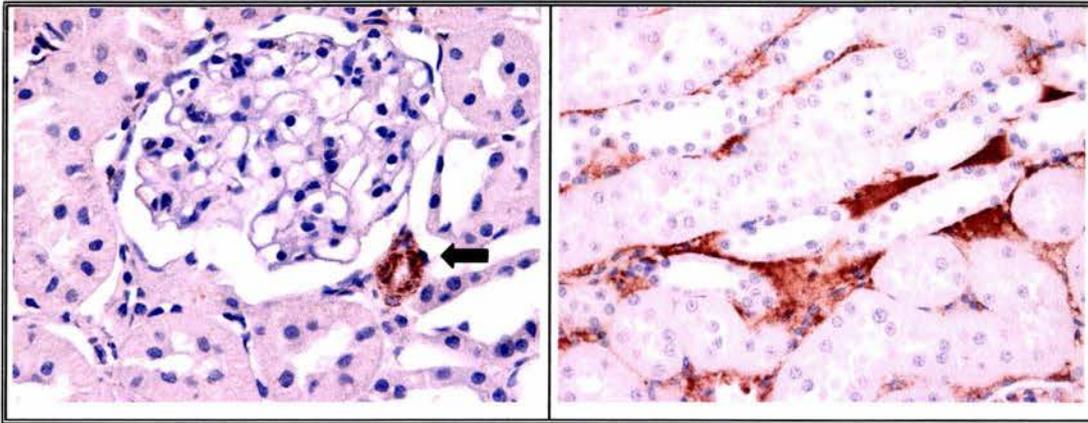


Fig. 1: Expresión del TGF β 1 en arteriolas preglomerulares (izquierda), en el intersticio y en capilares peritubulares (derecha) (400x).

Aumento de la cantidad de apoptosis intersticial: se evaluó a través de la técnica de TUNEL, (Fig. 2) de la que se obtuvo un porcentaje a través de un analizador de imágenes, de las células en apoptosis de todo el intersticio.

Escala de medición: cuantitativa de razón.

Tipo de variable: cuantitativa continua.

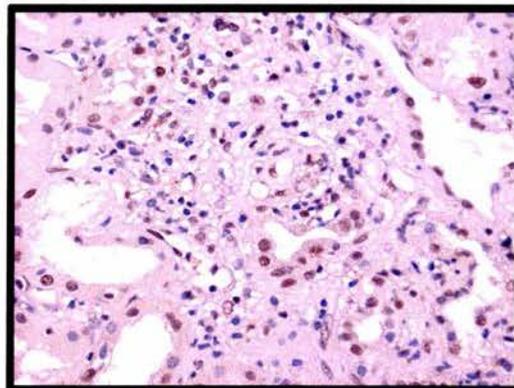


Fig. 2: Técnica de TUNEL para apoptosis, se observan los núcleos positivos en color café ocre. 400x

Nefrotoxicidad crónica por Cs A: alteraciones funcionales y cambios histológicos renales atribuibles a la administración por 6 o más meses de Cs A.

Cambios histológicos de toxicidad crónica por Cs A: vacuolación del epitelio tubular, arteriopatía, fibrosis intersticial en bandas o difusa.

Arteriopatía por toxicidad crónica por Cs A: afección de las arteriolas hiliares e interlobulares del riñón caracterizada microscópicamente por depósitos nodulares hialinos en la pared del vaso y/o vacuolación del citoplasma de las células musculares de la capa media (**Fig. 3**).

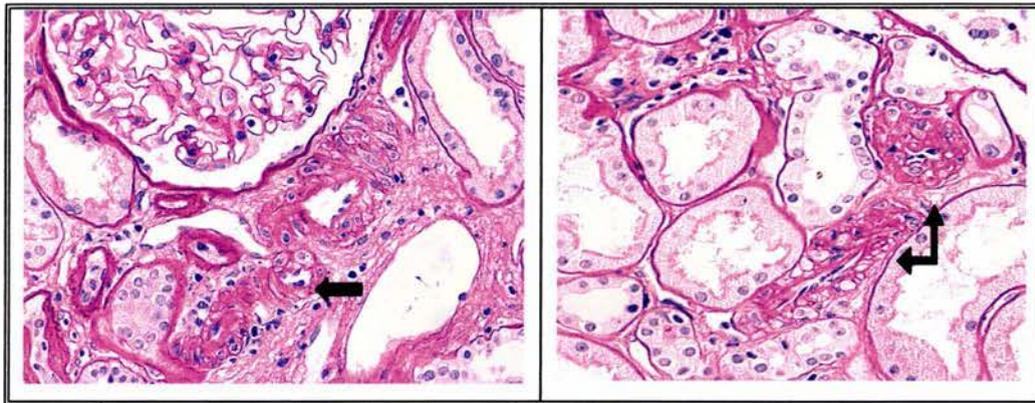


Fig. 3: Arteriopatía por Cs A. Engrosamiento de la pared, vacuolación del citoplasma del músculo de la capa media y depósitos nodulares hialinos (PAS.400x)

Fibrosis intersticial: sustitución del intersticio renal por fibroblastos y tejido conectivo. Estos datos fueron valorados con la tinción de tricrómico de Mallory porque ésta tiñe al tejido conectivo de color azul verdoso (**Fig. 4**). Se midió en porcentajes la superficie cortical afectada. Inicialmente con un método semicuantitativo calculando el porcentaje en el microscopio de luz de la siguiente manera: 1 a <10% (grado 0), 10 a 25% (grado I), >25 a 40% (grado II) y >40% (grado III). Posteriormente se midió a través de un analizador de imágenes, el resultado se obtuvo del porcentaje de superficie cortical afectada en 10 campos no cruzados a un aumento 400x.

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

Tipo de variable: cualitativa ordinal y cuantitativa continua.

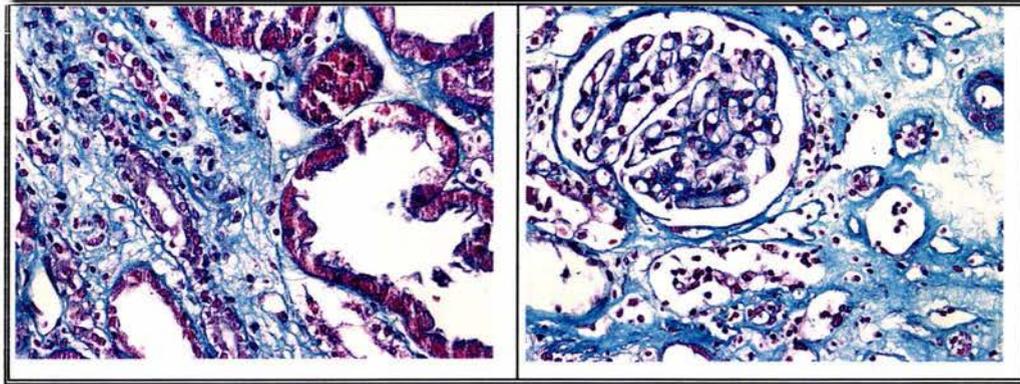


Fig. 4: Fibrosis intersticial renal cortical de diferentes grados teñida en azul verdoso con tricrómico de Mallory (400x).

6.4. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

6.4.1. TAMAÑO DE LA MUESTRA

No existen suficientes datos en la literatura para establecer la diferencia en la proporción esperada entre los grupos de comparación para el TGF- β 1 y la fibrosis intersticial. De acuerdo a un estudio piloto que se efectuó previamente con 9 biopsias renales con fibrosis intersticial cortical (3 de cada grupo: I, II y III) secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A, en el que comparamos el porcentaje de expresión del TGF- β 1 (excluyendo la expresión glomerular) y los grados de fibrosis intersticial cortical, se encontró lo siguiente: La expresión del TGF- β 1 en las biopsias con fibrosis grado I: fue 19.2% de superficie cortical positiva en promedio por campo 400x'. Para las biopsia con fibrosis grado II fue del 56.8% y para las biopsias con fibrosis grado III fue el 79.1%. Por lo tanto la diferencia entre el grado I y II es de 37.6%, y entre el grado II y III de 22.3%. Tomando la menor diferencia (22%), para un nivel de alfa de 0.05% y de beta de 0.20, se estimó el tamaño de la muestra en 10 casos para cada grupo, (4

grupos; de acuerdo al grado de fibrosis para estudiar un total de 40 pacientes diferentes y 80 biopsias renales en total). Cabe mencionar que en este estudio piloto no se incluyeron biopsias renales con fibrosis intersticial que tuvieran una superficie cortical afectada menor al 10% (grado 0). Por otra parte la diferencia esperada en la cantidad de apoptosis, evaluada en porcentajes de positividad, a través de la técnica de TUNEL entre los diferentes grados de fibrosis intersticial cortical es del 33%. Para un nivel de alfa de 0.05% y de beta de 0.20, se estima el tamaño de la muestra en 7 casos de cada grupo, para estudiar un total de 28 pacientes diferentes (56 biopsias renales en total) Con lo anterior concluimos estudiar 80 biopsias renales, 2 de cada paciente (inmediata y previa al retiro de Cs A), 10 por cada grupo de fibrosis intersticial cortical previamente clasificados en grados (grado 0, I, II y III).

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

6.4.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

6.4.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes que compartieran un haplotipo con el donador.
2. Ausencia de historia clínica de rechazo del injerto (dolor localizado en el sitio del injerto, hiperestesia local, disminución de volúmenes urinarios)
3. Función renal estable determinada por creatinina sérica.
4. Ausencia de datos histológicos de rechazo por medio de la biopsia del injerto, de acuerdo a los criterios histológicos actuales para rechazo renal (anexo 2) (26).
5. Seis o más meses con la terapia inmunosupresora a base de Cs A.
6. Administración del mismo esquema de inmunosupresión de rutina, [azatioprina (2 mg/kg), prednisona (200 mg 1 semana y posteriormente se disminuyó a una dosis de

0.25 mg/kg) y Cs A (con una dosis inicial de 5 mg/kg/día, que se inició el mismo día del trasplante renal y posteriormente se dió una dosis secundaria ajustada para mantener la concentración en sangre de Cs A en niveles entre 100-200 ng/ml)].

7. Contar con una biopsia inmediata del injerto sin alteraciones histológicas que ocasionaran fibrosis intersticial (glomerulopatía primaria, arteriolinefroesclerosis y daño tubulointersticial).
8. Aceptación para participar en el protocolo firmando una carta de consentimiento (anexo 3).

6.4.2.2. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

1. Cuando la biopsia renal del injerto previa al retiro de Cs A presentó datos histológicos de recidiva de la enfermedad primaria causante de insuficiencia renal crónica.
2. Cuando la biopsia renal del injerto previa al retiro de Cs A presentó datos histológicos de infección viral (citomegalovirus, herpes virus, poliomavirus).
3. Cuando las biopsias renales del injerto inmediata y/o la previa al retiro de Cs A del mismo paciente, no correspondieron histológicamente a corteza renal.

6.4.2.3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Cuando las biopsias renales del injerto inmediata y/o la previa al retiro de Cs A del mismo paciente, no estuvieron preservadas adecuadamente para realizar las técnicas de inmunohistoquímica y TUNEL.
2. Cuando las biopsias renales del injerto inmediata y/o la previa al retiro de Cs A del mismo paciente, fueron insuficientes para efectuar las técnicas de inmunohistoquímica y TUNEL.

6.5. PROCEDIMIENTOS

Se estudió a todos los pacientes del Servicio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, con transplante renal de donador vivo relacionado, con función renal estable, que entraron al protocolo para el retiro de Cs A. Se les solicitó su consentimiento para la participación en el protocolo. Todos los injertos renales fueron de donadores vivos relacionados que compartieran un haplotipo con el receptor y que hubieran utilizado Cs A por 6 o más meses continuamente desde el transplante. Como ya se mencionó, se utilizó un protocolo clásico de inmunosupresión consistente en: azatioprina (2 mg/kg), prednisona (200 mg 1 semana, se disminuyó a 0.25 mg/kg) y Cs A (que se administró con una dosis inicial de 5 mg/kg/día, que se inició el día del transplante y posteriormente se dió una dosis secundaria ajustada para mantener la concentración en sangre de Cs A en niveles entre 100-200 ng/ml). Se efectuó una biopsia renal percutánea un día antes del retiro de Cs A. Todas las biopsias se realizaron por punción con aguja automática bajo guía ultrasonográfica.

6.5.1. TEJIDO CONTROL

Como tejido control se utilizaron biopsias renales del injerto inmediatas, tomadas al momento del trasplante (biopsia inmediata del injerto renal).

6.5.2. HISTOPATOLOGÍA Y MORFOMETRÍA

Cada biopsia contenía de dos o tres cilindros de tejido renal, uno o dos se fijaron en formalina/buffer de fosfatos al 10% y fueron incluidos en parafina y otro cilindro se congeló a menos 80°C, en un tanque de nitrógeno líquido, para su inclusión en criopreservador (tissue-tek). Del tejido incluido en parafina se realizaron 8 cortes a 3 micras los cuales fueron teñidos con: hematoxilina y eosina (3) ácido peryódico de

Schiff (PAS) (3), tricrómico de Mallory (1) y metenamina de plata (1). Cada biopsia fue examinada por una Nefropatóloga quien desconocía la duración de la terapia con Cs A. Los signos vasculares y tubulointersticiales crónicos de la nefrotoxicidad por Cs A fueron independientemente registrados. El diagnóstico de arteriopatía relacionada con Cs A se realizó ante la presencia de vacuolas, gotas o depósitos hialinos en la capa media de las arteriolas pre y paraglomerulares. Para cada caso se evaluó el número de arteriolas afectadas contra las no afectadas. El diagnóstico de fibrosis asociada a la administración de Cs A se realizó en presencia de fibrosis difusa o bandas acelulares de fibrosis cortical. La cantidad de fibrosis fue inicialmente evaluada usando un método semicuantitativo con diferentes grados (grado 0: 1-9%, grado I: 10-24%, grado II: 25-40%, grado III: >40% del tejido cortical). Para determinar la certeza de esta evaluación semicuantitativa, la cantidad de fibrosis se cuantificó utilizando morfometría. Este método se basó en el análisis computarizado de imágenes. En concreto, para cada biopsia se tomaron 10 campos no cruzados de intersticio cortical renal examinados a 400 aumentos, utilizando un microscopio de campo claro (Olimpus BX50, objetivo 40X y oculares 10X) se estudió el 100 % de la corteza de cada muestra y cada campo se capturó con una cámara de vídeo digital (CoolSnap-Plus). Cada imagen fue procesada en una computadora usando Image-Pro-Plus, un software procesador de imagen (Image-Pro INC, Media Cybernetics). Utilizando la capacidad de reconocimiento de color en este software y la especificidad hacia el azul verdoso de la colágena en los cortes teñidos con tricrómico de Mallory se seleccionaron las áreas de fibrosis. Después de esta selección, las áreas de fibrosis fueron cuantificadas (con unidades pixel) usando el software del analizador de imágenes. Para cada campo la cantidad de fibrosis fue expresada en una fracción de área túbulo-intersticial (un área de fibrosis podía abarcar

un campo). Finalmente, para cada biopsia la cantidad de fibrosis cortical se obtuvo por los resultados de 10 campos, expresado en porcentaje.

6.5.3. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

De cada biopsia se efectuaron cortes a 3 micras de tejido fijado en formalina al 10% y procesado en parafina para estudio de inmunohistoquímica por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional utilizando el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa (ABC). Se marcaron con anticuerpos primarios contra: Fas, BCL-2, BCL-6, BCL-X, Bak y Bax (DAKO) y TGF- β 1 (Bioselec, Santa Cruz Biotechnology, Inc). La interpretación del resultado de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta realizada con todos los anticuerpos se llevó a cabo con el analizador de imágenes descrito anteriormente utilizando 10 campos no cruzados examinados a 400 aumentos. Se efectuaron los anticuerpos primarios contra Fas, BCL-2, BCL-6, BCL-X, Bak, Bax exclusivamente como método de control de la calidad del tejido y de la técnica de apoptosis (TUNEL) descrita posteriormente. El resultado final de cada caso, se expresó en porcentajes.

El tejido fijado en nitrógeno líquido fue utilizado para efectuar cortes de 5 micras a través de un crióstato y por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa, incubando el tejido con anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína contra IgG, IgA, IgM, C1q, C3c, C3d, fibrinógeno, albúmina, kappa y lambda. Estos cortes se revisaron en un microscopio de fluorescencia (Olimpus BX50), con filtro azul. Para descartar la presencia de complejos inmunes que formaran parte de una glomerulopatía del donador (en la biopsia inmediata) o una recidiva de la enfermedad primaria (biopsia previa al retiro de Cs A).

6.5.4. TÉCNICA DE TUNEL (20)

Con tejido fijado en formalina se realizaron cortes histológicos a cuatro micras, se desparafinaron y rehidrataron con etanol, seguido por un pretratamiento con ácido cítrico (pH=6.0, 10mM), se incubaron con proteinasa K (6.2 microgramos/ml, (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA), seguida por deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) (300 unidades/ml; Pharmacia Botech, Alameda, CA, USA) y con ATP biotinilado, (Bio-14-dATP) (0.94 nm; Gibo BR, Grand Island, NY, USA), este último se detectó usando un complejo avidina-biotina (Vectastin Elite). La positividad se expresó en porcentajes.

6.6. CONSIDERACIONES ETICAS

La realización del estudio no significó algún riesgo para el paciente, ya que no se efectuaron procedimientos adicionales o diferentes a los recomendados para pacientes en programa de trasplante renal en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Se tomaron en cuenta los lineamientos para las investigaciones biomédicas vigentes en México, publicadas por la Secretaría de Salud a través del Diario Oficial de la Federación. El protocolo fue aprobado y registrado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

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

6.7. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Se expresaron las variables cuantitativas continuas en promedio, como medida de tendencia central y desviación estándar como medida de dispersión. Se utilizó tanto el programa de Excel para el análisis estadístico, SPSS versión 10 para Windows y el

programa GraphPad Prism 3.02, para la realización de figuras. Para el análisis entre los valores del TGF- β 1 y la fibrosis intersticial se utilizó inicialmente una prueba no paramétrica bivariada de Pearson. Posteriormente para la comparación entre los valores de TGF- β 1, del TUNEL y de los diferentes marcadores de apoptosis con el porcentaje de fibrosis intersticial se practicaron pruebas de normalidad y se utilizó análisis de variancia (ANOVA).

7. RESULTADOS

Se revisaron los expedientes clínicos de 168 pacientes con trasplante renal, de los cuales se incluyeron 40 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión; 10 de cada grado de fibrosis intersticial en las biopsias previas al retiro de Cs A, (80 biopsias renales en total). Los datos recolectados de los expedientes (características clínicas y exámenes de laboratorio de los pacientes) fueron capturados inicialmente en una hoja de cálculo del programa Excel. Se codificó y ordenó la base de datos para posteriormente ser analizada en el programa SPSS 10.0 para Windows. Primero se efectuó un análisis exploratorio de la base para conocer las características clínicas y de laboratorio de los pacientes en el momento de la biopsia inmediata y en el de la biopsia previa al retiro de Cs A (**tabla No. 1**). Se observó que las condiciones clínicas y de laboratorio de los pacientes sometidos a trasplante renal eran muy semejantes, sin diferencias significativas, en la biopsia inmediata del injerto renal y cuando se les efectuó la biopsia para retiro des Cs A.

TABLA No. 1: CARACTERISTICAS CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LOS 40 PACIENTES EN LAS BIOPSIAS INMEDIATA Y EN LA DE RETIRO DE Cs A

Característica	BX INMEDIATA		BX DE RETIRO	
	Media \pm DS	Intervalo	Media \pm DS	Intervalo
Presión arterial sistólica (mmHg)	135.43 \pm 20.61	104-200	127.7 \pm 17.14	108-200
Presión arterial diastólica (mmHg)	87.33 \pm 12.42	58-122	81.83 \pm 8.82	68-100
Creatinina sérica (mg/dL)	1.50 \pm 0.30	0.94-1.93	1.66 \pm 0.42	1.14-2.75
Nitrógeno de urea (mg/dL)	25.36 \pm 10.06	12.4-5.9	23.98 \pm 9.95	14-61.1
Ácido úrico sérico (mg/dL)	4.84 \pm 1.04	3-6.8	7.44 \pm 1.78	4.15-10.35
Colesterol (mg/dL)	198.7 \pm 51.83	125-59.9	190.6 \pm 45.65	123-336
Triglicéridos (mg/dL)	176.71 \pm 104.40	57-460	183.66 \pm 67.47	95-389
Depuración de creatinina (ml/min)	55.31 \pm 18.93	32-99	53.9 \pm 15.88	29.1-90

De los 40 pacientes estudiados, el 33% fueron mujeres y el 66.6% hombres. La edad del receptor al momento del trasplante fue de 31.5 ± 9.56 años, el grupo de edad más numeroso fue el de 25 a 30 años. La edad máxima fue de 56 años y la mínima de 18. La gráfica hace evidente la distribución de la muestra. (Fig. No. 5). El tiempo desde el trasplante al momento del retiro de Cs A fue en promedio de 10.6 ± 3.48 (6-18) meses. Con un tiempo de espera en lista de trasplante renal de 13.71 ± 4.40 meses (Tabla No. 2).

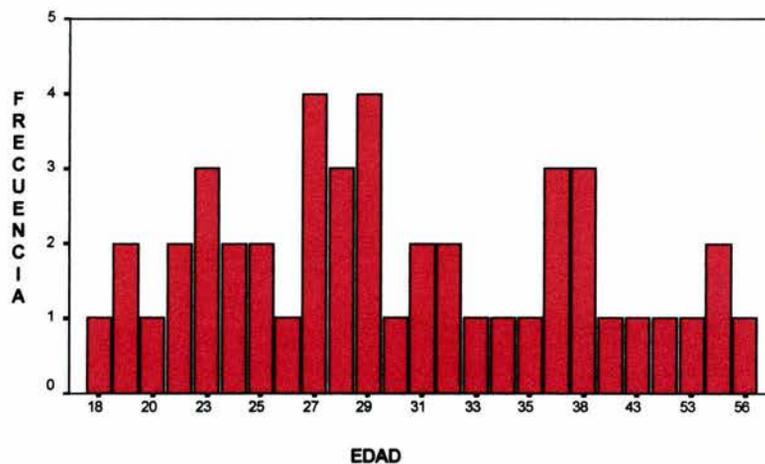


Fig. No. 5 : Distribución por grupos de edad de los receptores.

En el análisis de las características demográficas de los donadores del injerto renal (todos DVR), se observó que la edad del donador al momento de la nefrectomía fue de 37 ± 12.11 (20-60) años. Otro dato de importancia de las condiciones de los receptores es el índice de masa corporal, que tuvo un promedio de 24.3 ± 4.1 que es adecuado (Tabla No. 2).

TABLA No. 2: CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN TRASPLANTADA EN EL INCICH, INCLUIDA EN EL ESTUDIO.

CARACTERÍSTICA	PROMEDIO	D. E.	MÍNIMO	MAXIMO
Edad(en meses)	31.5	9.56	18.0	56.0
Tiempo en diálisis (en meses)	13.7	14.40	0	72.0
Tiempo con Cs A (en meses)	12.7	6.21	4.0	32.0
Talla (cm)	160.9	8.24	140.0	178.0
Peso (Kg.)	62.5	10.39	43.6	94.9
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	24.3	4.41	15.2	37.1
Superficie corporal (m ²)	1.7	0.15	1.4	2.1

En la evaluación microscópica de las biopsias se encontró que el número de glomérulos analizables en la primera biopsia (inmediata) fue de 12.8 ± 9.6 (1-25) y en la segunda biopsia (pre-retiro) fue de 11.9 ± 5.49 (1-23). El número de arteriolas preglomerulares engrosadas durante la primera biopsia en promedio fue de 0.35 ± 0.70 (0-3) y en la segunda biopsia fue de 4.55 ± 2.61 (1-15), observándose un incremento significativo en el número de arteriolas engrosadas ($p < 0.001$). Se determinó el engrosamiento de las arteriolas preglomerulares, el que se categorizó en leve, moderado y grave. Las características microscópicas de las dos biopsias se presentan en la **tabla No.3** y **Fig. No.6**.

TABLA No. 3: CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LAS BIOPSIAS (INMEDIATA Y RETIRO).

Característica	BX inmediata	BX retiro
No. de glomérulos	12.8 ± 7.09 (1-25)	11.90 ± 5.49 (1-23)
No. arteriolas normales	3.93 ± 2.58 (1-11)	1.73 ± 1.36 (0-4)
No. arteriolas engrosadas	0.35 ± 0.70 (0-3)	4.55 ± 2.61 (1-15)
No. arteriolas con engrosamiento leve.	0.28 ± 0.64 (0-3)	0.50 ± 0.85 (0-4)
No. arteriolas con engrosamiento moderado.	$7.50E-02$ (0-1)	1.10 ± 1.01 (0-4)
No. arteriolas con engrosamiento grave.	0	2.73 ± 2.03 (0-8)

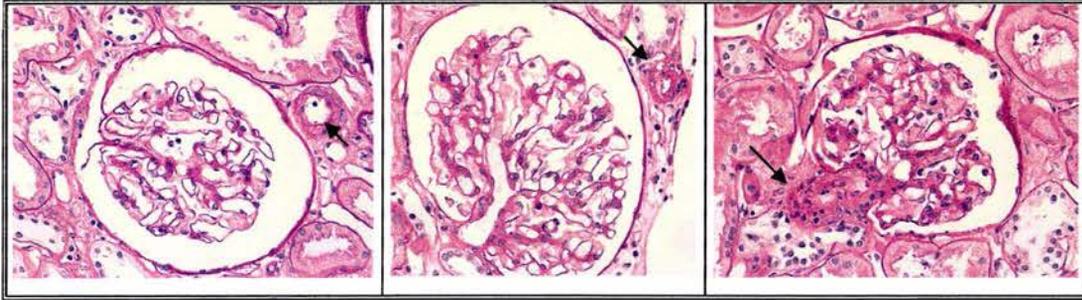


Fig. 6: De izquierda a derecha: Arteriopatía con engrosamiento leve, moderado y grave (PAS 400x).

Los 4 grupos de fibrosis intersticial de las biopsias previas al retiro de Cs A tuvieron una n=10. Las biopsias inmediatas (sin el efecto de la Cs A) de los mismos casos fueron 40 casos, 34 con fibrosis grado 0 y 6 casos con fibrosis grado I. El promedio de los porcentajes de fibrosis en total como grupo y para cada grado de fibrosis para las biopsias inmediatas y para las previas al retiro de la Cs A se muestra en **la tabla No. 4**. El promedio de la fibrosis fue 6.10 ± 5.6 en la biopsia inmediata, con un aumento significativo ($p < 0.05$) en relación a la fibrosis en la biopsia para retiro de Cs A que tuvo un promedio de 24.89 ± 17.59 .

TABLA No. 4: PROMEDIO DE FIBROSIS INTERSTICIAL CORTICAL POR GRUPOS.

	BX INMEDIATA		BX RETIRO	
	n	promedio \pm desv. est.	n	promedio \pm desv. est.
TOTAL EN LOS 4 GRUPOS	n = 40	6.10 ± 5.6	n = 40	24.89 ± 17.59
POR GRADOS:				
GRADO 0	n = 34	4.14 ± 2.9	n = 10	2.8 ± 2.0
GRADO 1	n = 6	17.19 ± 4.1	n = 10	17.41 ± 5.2
GRADO 2	n = 0		n = 10	31.08 ± 4.5
GRADO 3	n = 0		n = 10	48.21 ± 6.4

En la **Fig. No. 7** se observan los 4 grados de fibrosis intersticial en las biopsias para el retiro de Cs A valoradas a través de la tinción tricrómica de Mallory. Las diferencias en la cantidad de fibrosis, son muy sutiles a simple vista, la cuantificación efectuada con el analizador de imágenes, facilitó esta clasificación en porcentajes, ya que hizo más objetiva esta medición. Sin embargo, esta técnica requiere de la selección de los campos analizables y de las áreas que se deben excluir de cada uno, ya que como podemos observar en la figura, la presencia de glomérulos en cada fotografía es un factor que aumenta la cantidad de color azul verdoso y por lo tanto aumenta el valor de la medición, pues el software solo tiene la capacidad de detectar el color que se le indique (en este caso el azul verdoso de la fibrosis intersticial) pero no de discriminar entre las áreas que corresponden a intersticio y las que son glomérulos. En estos casos, fue necesario extraer (borrar manualmente) de la medición de cada campo, a los glomérulos, para garantizar que el valor obtenido fuera exclusivamente de la fibrosis intersticial.

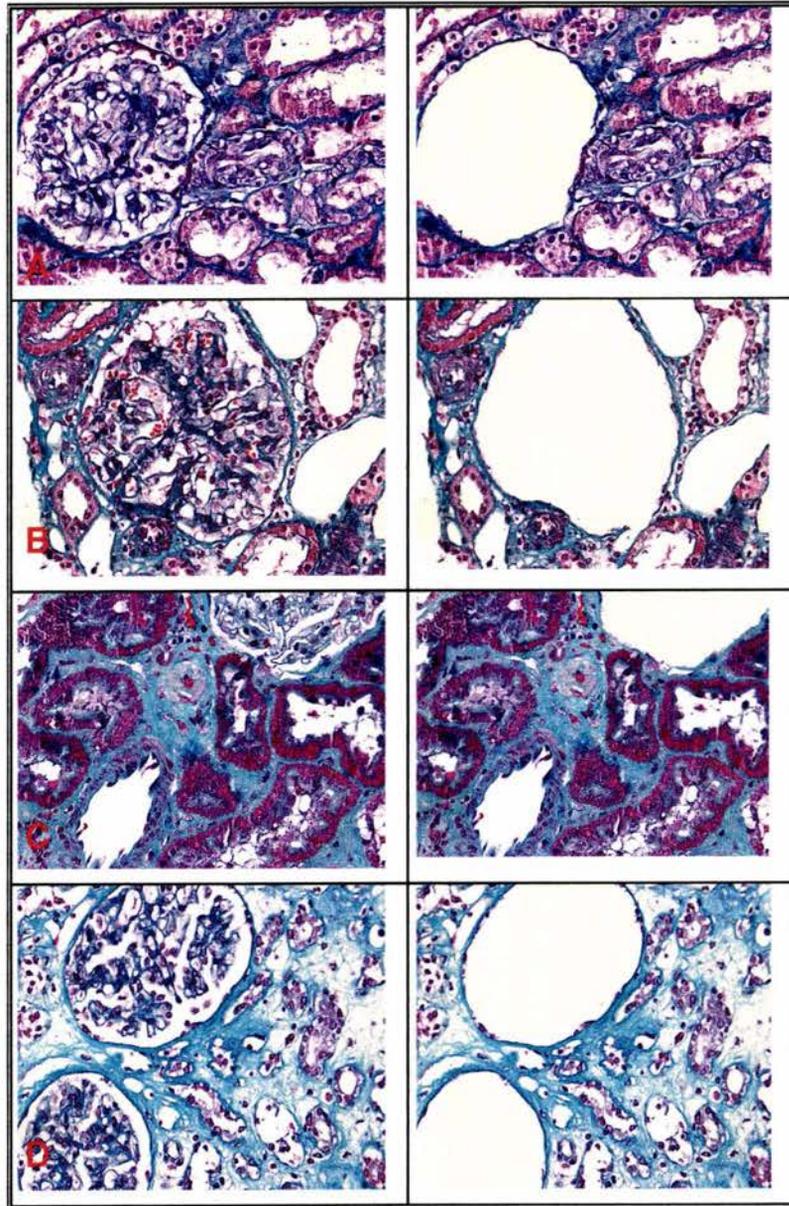


Fig. 7 : Cortes histológicas de corteza renal teñidos con tricrómico de Mallory (400x).
A) Con fibrosis grado 0 (3%), B) Grado I (14%), C) Grado II (34.8%) , D) Grado III (62%).

La fibrosis intersticial y la expresión de TGF β 1 mostraron una clara correlación de todas las formas en las que se analizó. En la **tabla No. 5** se observa que para los dos tipos de biopsias (inmediata y de retiro) separados por grados de fibrosis intersticial hubo un aumento significativo del promedio de TGF β 1 de acuerdo al aumento de la fibrosis intersticial.

TABLA No. 5: PROMEDIO DE TGF β -1 INTERSTICIAL Y VASCULAR RENAL CORTICAL POR GRUPOS.

	BX INMEDIATA		BX RETIRO	
TOTAL EN LOS 4 GRUPOS	n = 40	5.78 \pm 5.9	n = 40	22.41 \pm 15.39
POR GRADOS:				
GRADO 0	n = 34	5.03 \pm 5.16	n = 10	10.20 \pm 5.4
GRADO 1	n = 6	10.03 \pm 8.6	n = 10	14.84 \pm 5.8
GRADO 2	n = 0		n = 10	22.91 \pm 7.4
GRADO 3	n = 0		n = 10	41.68 \pm 16.32

En la **tabla No. 6** podemos observar que el coeficiente de correlación de Pearson, entre el porcentaje de fibrosis intersticial en la primera biopsia (inmediata) sin el efecto de la administración de Cs A y el porcentaje de expresión de TGF β 1 en la misma biopsia es de 0.336 con un valor de $p = 0.039$. Sin embargo, el coeficiente de correlación entre la fibrosis y la expresión de TGF β 1 en la segunda biopsia (de retiro) ya con el efecto atribuible al inmunosupresor es de 0.809 con un valor de $p = <0.001$.

TABLA No. 6: CORRELACIÓN ENTRE EL % DE LA FIBROSIS INTERSTICIAL Y EL DE TGFβ-1 EN LA BIOPSIA INMEDIATA Y EN LA DE RETIRO.

		% de fibrosis en biopsia inicial	% de fibrosis en segunda biopsia	% de expresión de TGF-beta en biopsia inicial	% de expresión de TGF-beta en segunda biopsia
% de fibrosis intersticial en biopsia inicial	Correlación de Pearson	1.000	.598**	.336*	.347*
	Valor de P	.	.000	.039	.033
% de fibrosis intersticial en la segunda biopsia	Correlación de Pearson	.598**	1.000	.533**	.809**
	Valor de P	.000	.	.001	.000
% de expresión de TGF-beta en biopsia inicial	Correlación de Pearson	.336*	.533**	1.000	.630**
	Valor de P	.039	.001	.	.000
% de expresión de TGF-beta en la segunda biopsia	Correlación de Pearson	.347*	.809**	.630**	1.000
	Valor de P	.033	.000	.000	.

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Además se encontró correlación directa entre la magnitud de la fibrosis y la expresión de TGF -β1 ($r=0.86$) y con bcl-6 ($r=0.229$) (Fig. No. 8).

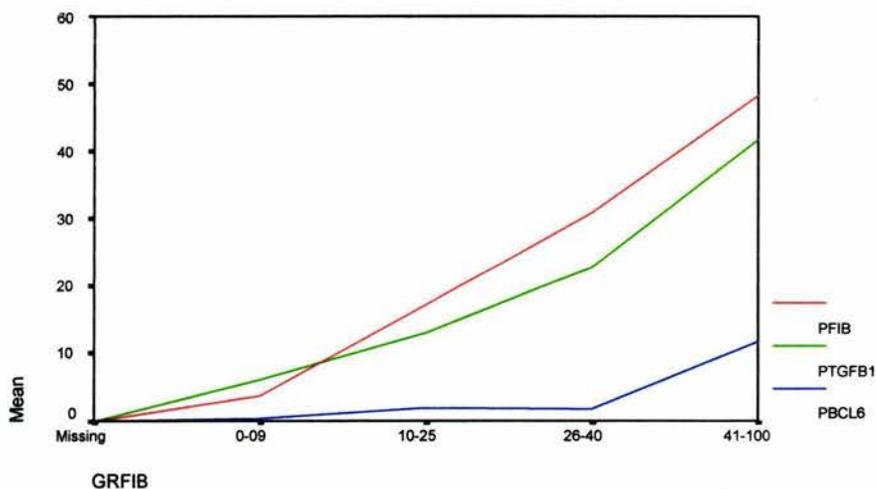


Fig. No. 8 : Correlación entre el grado de fibrosis, TGF -β1 y bcl-6.

Con el resto de los marcadores de apoptosis a través de inmunohistoquímica no se encontraron diferencias significativas entre la biopsia inmediata y la de retiro.

Con la técnica de TUNEL, que es un procedimiento que permite evaluar las células en apoptosis de manera confiable en tejido, se observó un incremento significativo ($p < 0.001$) de la apoptosis intersticial en las biopsias de retiro (24.51 ± 7.2) en relación con las inmediatas (10.10 ± 7.5). Sin embargo, este incremento presentó un valor máximo de superficie cortical renal afectada en las biopsias previas al retiro de Cs A con fibrosis grado 1 y grado 2, con una disminución en las biopsias con fibrosis grado 3 (Tabla No. 7, Fig. No. 9 y 10).

TABLA No. 7: PROMEDIO DE SUPERFICIE INTERSTICIAL CORTICAL RENAL POSITIVA CON LA TÉCNICA DE TUNEL POR GRUPOS.

	BX INMEDIATA		BX RETIRO	
TOTAL EN LOS 4 GRUPOS:	n = 40	10.10 ± 7.5	n = 40	24.51 ± 7.2
POR GRADOS:				
GRADO 0	n = 34	7.73 ± 4.3	n = 10	18.95 ± 4.7
GRADO 1	n = 6	23.53 ± 7.80	n = 10	30.08 ± 5.8
GRADO 2	n = 0		n = 10	27.67 ± 7.2
GRADO 3	n = 0		n = 10	21.34 ± 5.2

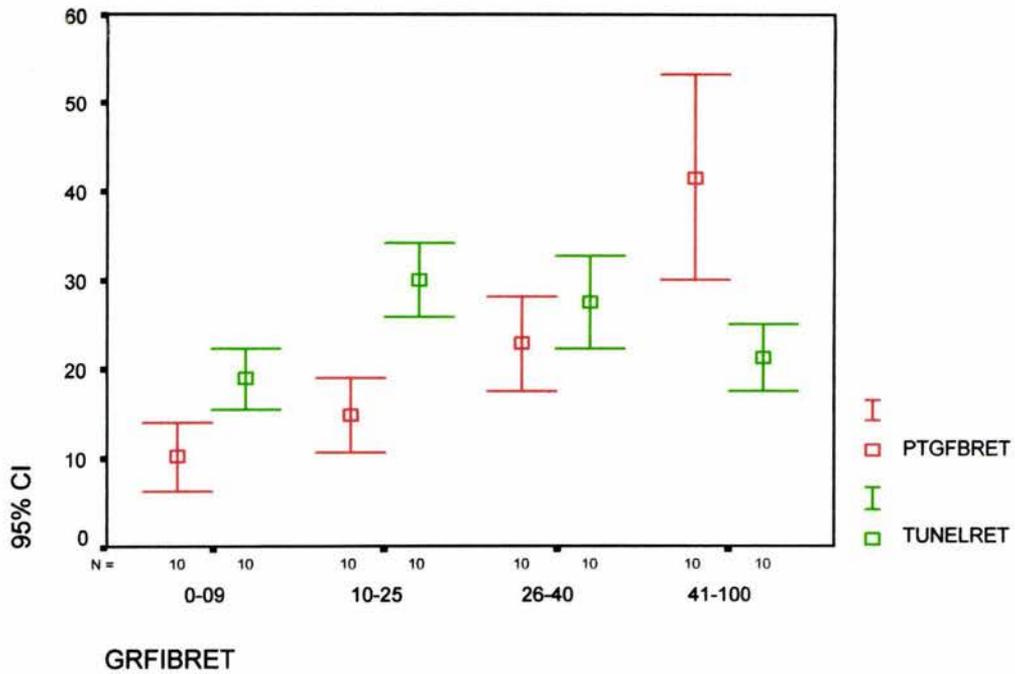


Fig. No. 9: Porcentajes de TGFβ-1 y apoptosis cortical en las biopsias previas al retiro de Cs A por grupos de fibrosis.

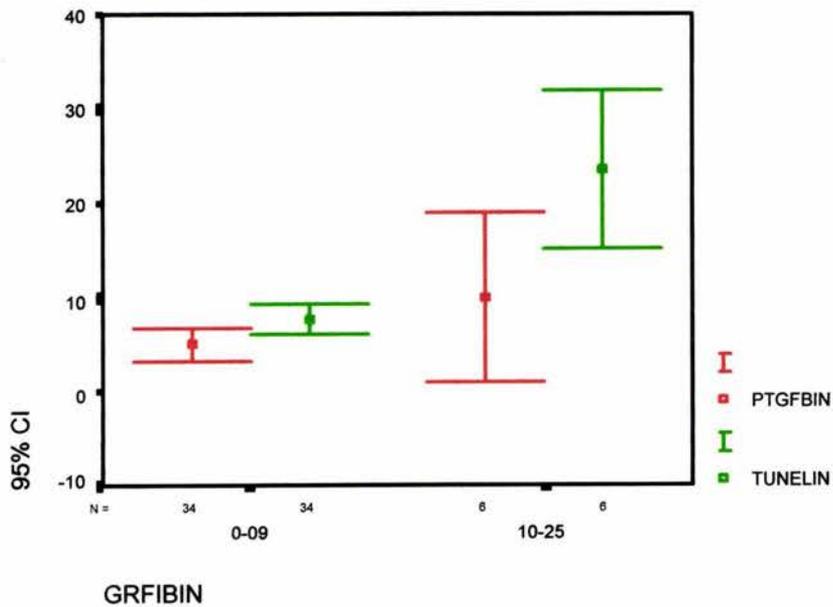


Fig. No. 10: Porcentajes de TGFβ-1 y apoptosis cortical en las biopsias inmediatas por grupo de fibrosis.

La expresión tisular del TGF β -1 en los diferentes grados de fibrosis intersticial cortical renal en las biopsias con el efecto de la administración crónica de Cs A, mostró una correlación directa (entre más fibrosis más expresión de TGF β -1). Estos resultados son explicables recordando que el TGF β -1 es una molécula profibrótica, que estimula la acción de fibroblastos. Este mismo fenómeno (relación directa) no fue encontrado al analizar los valores de la fibrosis intersticial y de la apoptosis, valorada esta última a través de la técnica de TUNEL. Aunque se observó un incremento de la apoptosis del grupo 0 al 1 de fibrosis intersticial, es en este último donde se encuentra el valor máximo ya que los valores para el grado 2 y 3 disminuyeron (**Fig. No. 9 y 11**).

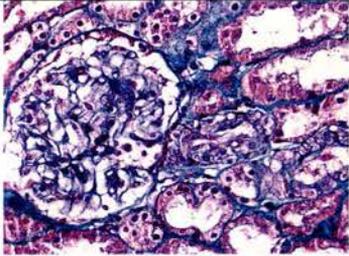
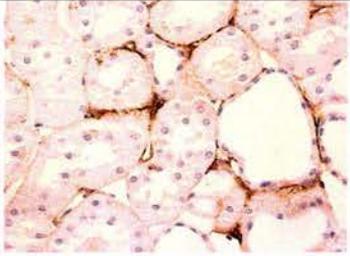
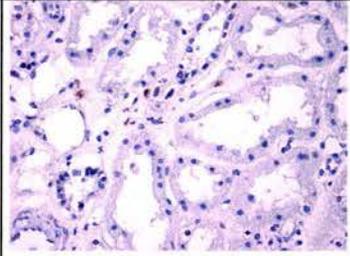
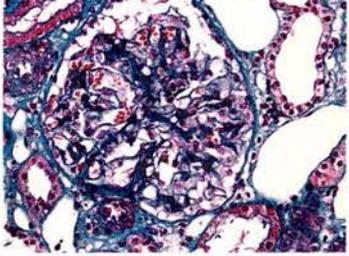
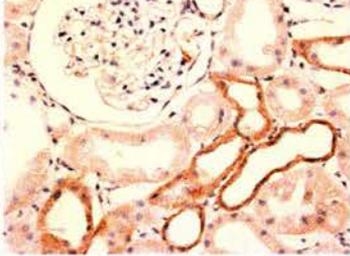
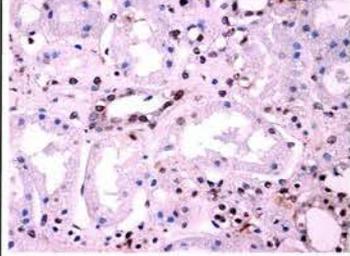
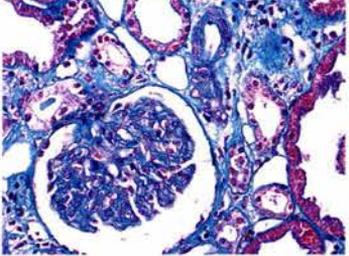
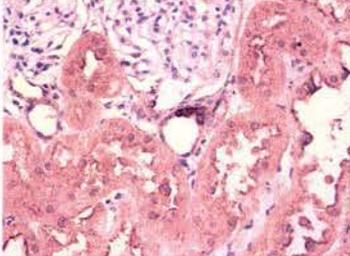
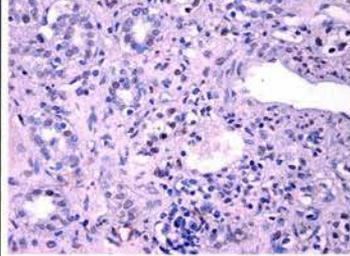
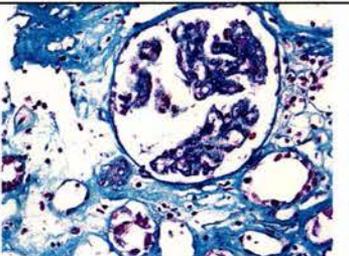
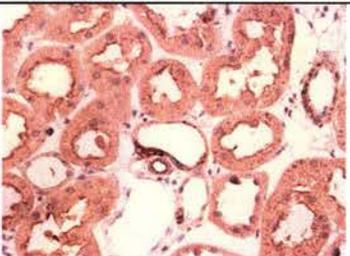
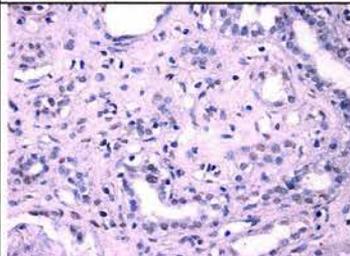
	FIBROSIS	TGFβ-1	TUNEL
GRADO 0			
GRADO 1			
GRADO 2			
GRADO 3			

Fig. No. 11: Esquema comparativo entre los diferentes grados de fibrosis intersticial y la positividad obtenida con TGFβ-1 y la técnica de TUNEL para apoptosis.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años la sobrevida de los pacientes con trasplante renal ha aumentado de manera considerable. Esto ha sido consecuencia de un aumento en la disponibilidad de los medicamentos inmunosupresores, mejor manejo médico y quirúrgico de los pacientes, detección oportuna y tratamiento apropiado de los eventos de rechazo activo, entre otras causas (29). Sin embargo a pesar de haber mejorado notablemente la sobrevida a corto plazo, los pacientes experimentan una serie de complicaciones crónicas como consecuencia del manejo inmunosupresor, del tiempo de administración de los medicamentos y del tipo de estos. La Cs A es un medicamento inmunosupresor que actúa inhibiendo a la calcineurina (4), bloqueando de esta manera la respuesta inmune. Produce cambios en la estructura y función del riñón (nefrotoxicidad) (3). La forma crónica de nefrotoxicidad por Cs A, es la forma más común (1). En el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, se efectúan aproximadamente 55-60 trasplantes renales al año, de estos el 90 %, son de donadores vivos, el resto son de donadores cadavéricos. Se utiliza un esquema de inmunosupresión de manera rutinaria con Cs A.

Algunos estudios realizados en modelos experimentales sugieren que el daño vascular desempeña un papel importante en la patogenia de la nefrotoxicidad crónica por Cs A (2) y se ha implicado al TGF- β 1 en la patogenia de la fibrosis intersticial secundaria a nefrotoxicidad crónica por Cs A (9). Desde hace varios años se ha investigado el papel que desempeña el TGF- β 1 en procesos patológicos tanto en modelos animales como en los seres humanos; en episodios de rechazo agudo se ha demostrado que la expresión tanto del TGF- β 1 y de su receptor se encuentran aumentadas en el intersticio renal, siendo un reflejo de la actividad proinflamatoria de esta sustancia, al aumentar el

reclutamiento de leucocitos. Se ha demostrado que los inhibidores de calcineurina son capaces de inducir la activación de genes profibróticos y a su vez mayor expresión de TGF- β 1, lo que explicaría que nuestros resultados muestren una correlación directa y significativa entre el porcentaje de fibrosis y la expresión de TGF- β 1.

Los resultados de la técnica de TUNEL, procedimiento que permite identificar a las células en apoptosis de manera confiable en tejido, mostró un incremento significativo ($p < 0.001$) de la apoptosis intersticial en las biopsias de retiro (24.51 ± 7.2) en relación con las inmediatas (10.10 ± 7.5). Sin embargo, este incremento presentó un valor máximo de superficie cortical renal afectada en las biopsias previas al retiro de Cs A con fibrosis grado 1 y grado 2, con una disminución en las biopsias con fibrosis grado 3. Esto último contrasta con lo mencionado previamente en la literatura ya que en varios estudios experimentales se ha encontrado una correlación directa entre el aumento de la fibrosis intersticial, la expresión del TGF- β 1 y la apoptosis.

La expresión tisular del TGF β -1 en los diferentes grados de fibrosis intersticial cortical renal en las biopsias con el efecto de la administración crónica de Cs A que mostró una relación directa (entre más fibrosis más expresión de TGF β -1) con una $r=0.86$, es explicable ya que se trata de una molécula profibrótica. No se encontró relación directa entre la cantidad de fibrosis y la de apoptosis valorada esta última a través de la técnica de TUNEL. Aunque se observó un incremento de la apoptosis del grupo 0 al 1 es en este último donde se encuentra el valor máximo ya que los valores para el grado 2 y 3 disminuyen (Fig. No. 11 y 12).

El sentido biológico de esta observación puede ser explicado tomando en cuenta que las biopsias con fibrosis grado 1 presentan el mayor número de células intersticiales

“normales” (fibroblastos activos) potencialmente sustituibles por fibrosis en comparación con las biopsias de pacientes clasificadas como fibrosis grado 3 en las que hay extensas áreas de superficie cortical acelular reemplazada ya por proteínas extracelulares que forman parte del tejido conectivo de la fibrosis y las células intersticiales (fibroblastos activos) es mínima. Es decir, que aunque la expresión de TGF β -1 en el tejido esté aumentada considerablemente y existan múltiples datos de daño renal por Cs A no hay células intersticiales en las que el mecanismo de apoptosis se active.

9. CONCLUSIONES

1. En la nefrotoxicidad relacionada con la administración crónica de Cs A en pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado hay aumento de la expresión del TGF $-\beta$ 1 en el intersticio renal cortical que correlaciona directamente con el aumento en la fibrosis intersticial.
2. En la nefrotoxicidad relacionada con la administración crónica de Cs A en pacientes con trasplante renal de donador vivo relacionado el aumento en la apoptosis celular no presenta una correlación directa con la fibrosis intersticial cortical, ya que el porcentaje de apoptosis es mayor en los grados de fibrosis 1-2 y disminuye en el grado 3.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

9. Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosepund JD. TGF- β : A link between immunosuppression, nephrotoxicity and Cs A. *Transplantation Proc* 1998; 30: 944-945.
10. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Noble NA, Border WA, Franceschini N, Bennett WM. Role of transforming growth factor-beta 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 1996; 49: 1141-1151.
11. Mo W, Brecklin C, Garber S, Song RH, Pegoraro AA, Au J, Arruda J, Dunea J, Singh A. Changes in collagenases and TGF- β precede structural alterations in a model of chronic renal fibrosis. *Kidney Int.* 1999; 56: 145-153.
12. Wolf G, Thaiss F, Rolf A, Stahl K. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor- β in renal cells. *Transplantation* 1995;60: 237-241.
13. Roberts AB, Sporn MB. Growth factors. *Int Rev Exp Pathol.* 1998; 23: 34-43.
14. Pankewycz O, Miao L, Isaacs R, Guan J, Pruett T, Haussmann G, Stutgill BC. Increased renal tubular expression of transforming growth factor beta in human allografts correlates with cyclosporine toxicity. *Kidney Int.* 1996; 50: 1634-1640.
15. Roy-Chaudhury P, Wu B, King G, Campbell M, Macleod AM, Haites NE, Simpson JG, Power DA. Adhesion molecule interaction in human glomerulonephritis: Importance of the tubulointerstitium. *Kidney Int* 1996; 49: 127-134.
16. Ávila- Casado MC. Apoptosis y riñón. (Apoptosis and the Kidney) *Rev. Fac. Med. UNAM.* 2000; 43: 12-25.
17. Shimizu A, Kitamura H, Mazuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995; 47: 114-121.

18. Truong LD, Petrusevska G, Yang G, Gurpinar T, Shapell S, Lechago J, Rouse D, Suki WN. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int* 1996; 50: 200-207.
19. Heidenreich S, Schmidt M, Bachmann J, Harrach B. Apoptosis of monocytes cultured from long term hemodialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49:792-799.
20. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson J, Savil J. Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *Clin Invest*. 1994; 11: 2105-2116.
21. Laine J, Etelamaki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997; 63: 101-5.
22. Thomas SE, Andoh T, Pichler R, Shankland S, Couser W, Bennett W, Johnson R. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int*. 1998; 53: 897-908.
23. Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecky B, Müllauer L, Kammerer B, Bursch W, Schulte-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998; 28: 717-726.
24. Registro Nacional de Transplantes, Informe año 2000.
25. Avila- Casado MC, Tack I, Striker L, Herrera –Acosta J, Striker G. Time course and incidence of cyclosporine a induced arteriolopathy (CsA-Ap) in renal transplant patients with stable renal function. *Enviado a Transplantation*.
26. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renalallograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993: 411-422

27. Calle E, Thun MJ et al. Body mass index and mortality in a prospective cohort of US adults NEJM 1999; 341:1097-1105.
28. Levey AS, et al. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. Ann Intern Med 1999;130:462-70.
29. Monaco AP, Burke J F, et al. Current Thinking on chronic renal allograft rejection: issues, concerns and recommendations from 1997 roundtable discussion. Am J Kidney Dis 1999;33:150-160.
30. Kendrick Elizabeth. Cardiovascular Disease and the renal transplant recipient. Am J Kidney Dis 2001;38 : S36-S43.
31. McLaren AJ, Jassem W, et al. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. Clin Transplant 1999;13:266-272.
32. Flechner SM, Modlin CS, et al. Determinants of chronic renal allograft rejection in cyclosporine – treated recipients. Transplantation 1996;62:1235-41.
33. Opelz G, Wujciak T, et al. Association of chronic graft failure with recipient blood pressure. Kidney Int 1998;53:217-228.
34. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft and patient death. Transplantation 2003;27:249-256.
35. Meier-Friesche HU, Vaghela M, et al. The effect of body mass index on long-term renal allograft survival. Transplantation 1999;68:1294-7.
36. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. Am J Kidney Dis 1992;20:1-17.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

37. Marcussen N, Guan J, Pruett T, Haussmann G. Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:74-75.
38. Pagtalunan ME, Oberbauer R, Haas M, et al. Atubular glomeruli in patients with chronic allograft rejection. *Transplantation* 1996;61:1166-71.
39. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Noble NA, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 1996; 49: 1141-1151.

11. ANEXOS

1.1. ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Registro:

Tiempo de tx con Cs A _____ meses. Grupo: _____

DATOS DE RECHAZO

Tubulitis: Si ___ No ___ Endotelitis: Si ___ No ___ Vasculitis: Si ___ No ___

DATOS DE TOXICIDAD POR Cs A

VASCULARES:

No. de arteriolas paraglomerulares:

No. de arteriolas no afectadas:

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

INTERSTICIALES:

Fibrosis difusa: Si ___ No ___ Fibrosis en bandas: Si ___ No ___

Grado de fibrosis: 0 ___ I ___ II ___ III ___

Fibrosis por morfometría: _____%

MOL. DE ADHERENCIA

TGF- β : _____%

APOPTOSIS

p53: _____%

c-Myc: _____%

Fas: _____%

bcl-2: _____%

bcl-6: _____%

bcl-X: _____%

Bak: _____%

Bax: _____%

_____ % (TEC. TUNEL)

11.2. ANEXO 2

Clasificación de Banff para la biopsia del injerto renal (26).

1. Normal
2. Rechazo acelerado
3. Cambios limítrofes: datos de rechazo tubulointersticial leve (tubulitis focal y mínima)
4. Rechazo activo
 - Grado I: Rechazo activo leve: casos con un infiltrado intersticial significativo (>25% del parénquima afectado) y focos con moderada tubulitis (>4 células mononucleares/túbulo)
 - Grado II: Rechazo activo moderado: casos con abundante infiltrado intersticial y múltiples focos de tubulitis (>10 células mononucleares/túbulo) y/o moderada endotelitis.
 - Grado III: Rechazo activo grave: casos con los datos del grado I y II, con endotelitis abundante, infiltración transmural del vaso, con necrosis fibrinoide de la pared y necrosis del músculo de la capa media. Puede haber infartos focales recientes y hemorragia reciente intersticial.
5. Nefropatía crónica del injerto: lesiones vasculares y glomerulares, con fibrosis arterial de la íntima, con fibrosis intersticial y esclerosis glomerular.
 - Grado I: con fibrosis intersticial y atrofia tubular leves.
 - Grado II: con fibrosis intersticial y atrofia tubular moderadas.
 - Grado III: con fibrosis intersticial y atrofia tubular avanzadas.

Se considerará rechazo tubulo-intersticial a la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo linfoide con afección tubular (tubulitis) (26). Se considerará ausencia de rechazo a la ausencia de tubulitis. Se considerará rechazo vascular a la presencia de endotelio reactivo, endotelitis o vasculitis con necrosis fibrinoide (26).

11.3. ANEXO 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHAVEZ”

SERVICIOS DE NEFROLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA.

México D. F. a

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

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

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

Voluntariamente acepto participar en el estudio.

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma del médico: _____

Nombre y firma del testigo: _____

Nombre y firma del testigo: _____