



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

**EVALUACIÓN DE LA PROGRESION DEL DAÑO  
RENAL POR PÚRPURA DE HENOCH-SHÖNLEIN EN  
NIÑOS MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACION  
Y FIBROSIS**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**NEFROLOGIA PEDIATRICA**

PRESENTA:

**Dr. Uriel Oswaldo Duarte Román**

TUTOR DE TESIS

**Dra. Mara Medeiros Domingo**

COTUTORES

**Dra Yolanda Fuentes Velazco**

**M. en C. Maria Inés Del Pilar García Roca**

**Dr Benjamín Romero Navarro**



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F.

Agosto 2007



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 NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GÓMEZ

**EVALUACIÓN DE LA PROGRESION DEL DAÑO RENAL POR PÚRPURA DE  
HENOCH-SHÖNLEIN EN NIÑOS MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACION Y FIBROSIS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**NEFROLOGIA PEDIÁTRICA**

PRESENTA:

**DR. Uriel Oswaldo Duarte Román**

Asesor:

**DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO**

Co-Asesores:

**Dr. Benjamín Romero Navarro**  
**M. en C. María Inés del Pilar García Roca**

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2007

**DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO**

Asesor de Tesis

Departamento de Nefrología Pediátrica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

**DR. BENJAMÍN ROMERO NAVARRO**

Asesor de Tesis

Jefe del Departamento de Nefrología Pediátrica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

**“EVALUACIÓN DE LA PROGRESION DEL DAÑO RENAL POR PÚRPURA DE  
HENOCH-SHÖNLEIN EN NIÑOS MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACION Y FIBROSIS”**

por

**Dr. Uriel Oswaldo Duarte Román**

Tesis propuesta para obtener el título en

**Nefrología Pediátrica**

**Universidad Nacional  
Autónoma de México**

**2007**

**“EVALUACIÓN DE LA PROGRESION DEL DAÑO RENAL POR PÚRPURA DE  
HENOCH-SHÖNLEIN EN NIÑOS MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACION Y FIBROSIS”**

por el **Dr. Uriel Oswaldo Duarte Román**

Asesor:

**Dra. Mara Medeiros Domingo**  
Departamento de Nefrología Pediátrica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Co-Asesores:

**Dr. Benjamín Romero Navarro**  
Jefe del Departamento de Nefrología Pediátrica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

**M. en C. María Inés del Pilar García Roca**  
Médico Adscrito al Departamento de Nefrología Pediátrica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la fuerza, la actitud y la paciencia para continuar adelante con mi preparación y poder terminar esta especialidad de nefrología pediátrica

Gracias:

A mis padres: Ángel Duarte Estrada y Rita Román de Duarte por su valioso apoyo tanto moral como económico, así como el de mis hermanos Ulises y Karla Duarte.

A mi hijo Ángel Oswaldo que es mi mayor estímulo para continuar adelante.

A mi compañera Mayra que con su incondicional apoyo, y actitud, me ha ayudado a afrontar los retos a pesar de la distancia.

A José Ávila, que su valiosa amistad ha influido en mis logros profesionales y en mi crecimiento como personal.

A mis maestros adscritos del servicio de nefrología del HIM Dr Benjamín Romero, Dra. Mara Medeiros, Dr Luis Velásquez Jones, Dr Saul Valverde, Dra Rebeca Gomezchico por su paciencia y valiosos conocimientos que son herramienta para mi superación.

A mis compañeros Dra Eunice Cuervo, Dra Verónica Resendiz, Dra Martha Portillo, Dr Yuri Vargas, Dr Isidro Franco que fueron mi como mi familia en este tiempo.

A la Dra Yolanda Fuentes, Dr. Omar Guadarrama, M. en C. Maria Ines del Pilar Garcia Roca por su incondicional apoyo en la realización de este trabajo.

A TODOS MIL GRACIAS.

# Índice

1	MARCO TEORICO.....	1
1.1	CLASIFICACION DE PHS .....	3
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
3	JUSTIFICACION .....	14
4	OBJETIVOS .....	15
4.1	GENERAL.....	15
4.2	ESPECIFICOS.....	15
5	HIPOTESIS.....	16
5.1	CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL ESTUDIO. ....	16
6	POBLACIÓN.....	18
7	MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
8	CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	20
9	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	20
10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
10.1	RECURSOS HUMANOS.....	21
10.2	RECURSOS MATERIALES.....	22
11	MÉTODOS .....	24
12	FINANCIAMIENTO .....	26
13	CONSIDERACIONES ETICAS .....	27
14	RESULTADOS.....	28
15	DISCUSION .....	43
16	BIBLIOGRAFIA.....	45



## Lista de Figuras

Figura 1.1. TECNICA DE ELISA. ....	10
Figura 1.2 ESQUEMA PCR. ....	12
Figura 14.1 PRESENCIA DE NEFRITIS. ....	29
Figura 14.2 RELACION MCP/1 Y PRESENCIA DE NEFRITIS.....	31
Figura 14.3 COMPARACION MCP Y PACIENTES CON BIOPSIA.....	32
Figura 14.4 RELACION ENTRE NIVEL DE MCP-1 Y LESION HISTOLOGICA.....	33
Figura 14.5 COMPARACION TNF- $\alpha$ Y PROTEINURIA.....	34
Figura 14.6 RELACION IL2 Y PROTEINURIA.....	35
Figura 14.7 RELACION DE IP10 Y PROTEINURIA. ....	36
Figura 14.8 RELACION TNF- $\alpha$ Y BIOPSIA RENAL.....	37
Figura 14.9 COMPARACION IL2 Y BIOPSIA RENAL.....	38
Figura 14.10 COMPARACION DE IP10 Y BIOPSIA RENAL.....	39
Figura 14.11 COMPARACION TNF $\alpha$ Y GRADO DE LESION HISTOLOGICA. ....	40
Figura 14.12 COMPARACION IL2 Y GRADO DE LESION HISTOLOGICA. ....	41
Figura 14.13 COMPARACION IP10 Y GRADO DE LESION HISTOLOGICA. ....	42

## **Lista de Tablas**

Tabla 5.1 CRONOGRAMA.....	17
Tabla 10.1 DESCRIPCION DE VARIABLES .....	23
Tabla 14.1 DEMOGRAFIA.....	28
Tabla 14.2 PACIENTES CON BIOPSIA RENAL.....	30

## RESUMEN

**MARCO TEORICO.**- La Nefritis es la complicación más frecuente y potencialmente más grave de la PHS se relaciona con la infiltración de macrófagos y monocitos en el tejido renal y expresión de factores quimiotácticos y quimocinas estimulan la migración celular como Quimocina atrayente de monocitos (MCP-1), TNF $\alpha$ , IL2 e IP10.

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**- Se ha descrito el uso de PCR en tiempo real en células de sangre total como herramienta diagnóstica en pacientes con rechazo del injerto renal. Consideramos que esta metodología puede emplearse en pacientes con glomerulopatías progresivas como en la PHS.

**JUSTIFICACION.**- Evaluar la progresión del daño renal por púrpura de Henoch-Shonlein mediante la determinación de marcadores de inflamación en sangre y orina sin necesidad de realizar biopsia renal.

**OBJETIVOS.**- Evaluar si la expresión de marcadores de inflamación en sangre y sobrenadante urinario por PCR en tiempo real y ELISA puede correlacionarse con la progresión del daño renal en pacientes pediátricos con púrpura de Henoch-Schönlein.

**HIPOTESIS.**-El aumento en la expresión de TNF- $\alpha$ , IL 2, IP 10 en RNA de sangre total por PCR en tiempo real y de MCP-1 en sobrenadante urinario por ELISA, permite distinguir a los pacientes con púrpura de Henoch-Schonlein que presentan nefropatía progresiva.

**MATERIAL Y METODOS.-** Se realiza un estudio prospectivo, descriptivo en pacientes con PHS que acuden al Hospital Infantil de México Federico Gómez se toman los siguientes exámenes en forma basal: EGO, proteinuria de 12 horas, colección de sobrenadante urinario, RNA en sangre total para medir por PCR en tiempo real la expresión de marcadores de progresión de daño renal.

**VARIABLES.-** edad, sexo, valores de expresión génica de TNF- $\alpha$ , IL2, IP10, MCP-1 urinario.

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN.-** Pacientes con PHS diagnosticada en los seis meses previos.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.-** Pacientes que en el seguimiento sean clasificados como otro tipo de vasculitis (LES, Kawasaki, Churg Strauss).

**ANALISIS ESTADISTICO.-** Se utilizó el programa SPSS versión 15.0 y Graph Pad versión 4.0. Se realizó: Estadística descriptiva, Tabla de frecuencias, Descripción de la población, Correlación entre niveles sericos de TNF, IP 10, IL2, con la presencia de proteinuria. Correlación entre TNF, IP 10, IL2 con el tipo de lesión histológica.

**RESULTADOS.-** De los 36 pacientes 19 fueron del sexo femenino, edad media de 8a (5-14 años), 10 pacientes ameritaron biopsia renal. La lesión histológica mas frecuente fue estadio IIIb (4/10) 1 paciente salio del estudio por diagnosticarse lupus eritematoso sistémico durante el seguimiento.

- Se determinó MCP-1 en sobrenadante urinario por ELISA en la visita basal y en relación con los pacientes que presentaban o no nefritis, se encontró una correlación positiva con una  $p= 0.0004$  en los pacientes que presentaron nefritis. Se encontró MCP-1 elevado en los pacientes que requirieron biopsia renal vs los pacientes que no requirieron biopsia con  $p=0.004$ . Así mismo en relación con el grado de severidad encontrado en la biopsia renal, se observa también que el MCP-1 se encuentra elevado con una  $p= 0.0039$  en pacientes que presentaron estadio IIIB en comparación a otros estadios menores. Se determinó TNF- $\alpha$ , IL2, IP10 por PCR en tiempo real encontrándose que el TNF- $\alpha$  muestra una correlación negativa en los pacientes con proteinuria, encontrándose disminuida en aquellos pacientes que presentan mayor proteinuria vs los pacientes que no presentan ( $p=0.0009$ ). La IL2 presenta una correlación negativa no significativa  $p=0.3$  en los pacientes con mayor proteinuria. El IP10, presenta también una correlación negativa encontrándose significativamente disminuida en pacientes con mayor proteinuria. ( $p=0.47$ ). En comparación con los pacientes que requirieron biopsia renal vs los que no, se encontró que el TNF- $\alpha$  de igual manera se encuentra significativamente disminuido en los pacientes que requirieron biopsia ( $p=0.022$ ).
- La IL2 no presenta diferencia significativa con  $p=0.673$  en los pacientes que requirieron biopsia vs los que no necesitaron. La expresión de IP10 tuvo diferencia significativa en los pacientes que requirieron biopsia vs. aquellos que no ( $p=0.045$ ).

# 1 MARCO TEORICO

La púrpura de Henoch-Schönlein (PHS) es la vasculitis más frecuente en la infancia, con una incidencia anual de aproximadamente 13 a 22 casos por cada 100,000 niños [1, 2]. Es una forma de vasculitis sistémica que involucra comúnmente los pequeños vasos en piel, intestino y glomérulo y asociado con púrpura, cólico, hematuria, artralgias o artritis. Generalmente su incidencia disminuye con la edad [3]. Si bien se desconoce la causa, se sabe que la inmunoglobulina A (IgA) juega un papel fundamental en la fisiopatología de la enfermedad, existe elevación en la concentración sérica de IgA en el 50-70% de los pacientes con PHS, principalmente en el inicio de la enfermedad y a expensas de la subclase IgA1. Se han reportado alteraciones en la glicosilación de la IgA1 en pacientes con PHS como son disminución en el contenido de galactosa y/o ácido siálico y que favorecen que las moléculas de IgA1 tengan una tendencia a agregarse formando complejos macromoleculares que se depositan en el riñón [4-6]. La incidencia es mayor en otoño e invierno. Se ha asociado a infecciones, virales, bacterianas así como a diversos fármacos y toxinas [7].

La afección renal es la complicación más frecuente y potencialmente más grave de la PHS, se presenta en 20 a 49% de los pacientes [8, 9] las manifestaciones renales aparecen generalmente en las primeras 4 semanas del inicio de la PHS y rara vez precede a la aparición de las lesiones dérmicas [10], sin embargo algunos pacientes pueden tener manifestaciones de nefritis hasta un año después de la púrpura [11].

Los datos clínicos de afección renal son hematuria, proteinuria, síndrome nefrítico, síndrome nefrótico y síndrome nefrótico-nefrítico.

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 los capilares y vénulas postcapilares de la dermis. La tinción con inmunofluorescencia revela la presencia de IgA, C3c, un complejo C4+C3c+C3d, fibrinógeno/fibrina. En el tubo digestivo, también se han reportado vasculitis leucocitoclástica acompañado de depósitos de IgA.

La clasificación histopatológica renal se encuentra en la Tabla I. La falta de correlación entre el resultado de la biopsia renal y la evolución a largo plazo que reportan varios autores, puede deberse en parte a que muchas de las lesiones de la nefritis por púrpura son focales y puede haber error de muestreo y también a que no se distinguen las lesiones agudas de las crónicas [12].

## 1.1 CLASIFICACION DE PHS

Clase I: Lesiones glomerulares mínimas, ausencia de medias lunas.

Clase II: Ausencia de medias lunas.

- IIa. Proliferación mesangial pura.
- IIb. Proliferación endocapilar focal y segmentaria.
- IIc. Proliferación endocapilar difusa.

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

- IIIa. En asociación con proliferación endocapilar focal y segmentaria.
- IIIb. Con proliferación endocapilar difusa.

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

- IVa. En asociación con proliferación endocapilar focal y segmentaria.
- IVb. Con proliferación endocapilar difusa.

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

- Va. En asociación con proliferación endocapilar focal y segmentaria.
- Vb. Con proliferación difusa.

Clase VI: Glomérulo nefritis pseudomembranoproliferativa.



En cuanto a los hallazgos de inmunofluorescencia, el depósito de IgA en mesangio se encuentra en 75 a 80% de los casos, también pueden encontrarse depósitos de C3 y componentes de la vía alterna, y rara vez se encuentran depósitos de factores de la vía clásica del complemento.

Si bien la púrpura es una vasculitis la principal complicación a largo plazo es renal por lo que el tratamiento debe ser siempre supervisado por un nefrólogo pediatra.

En el seguimiento de los pacientes, se observa evolución a insuficiencia renal crónica (IRC) 20-24 años después del diagnóstico en 9 a 35% de los niños, según diversas series [11, 13, 14]. El riesgo de desarrollar IRC está relacionado con la presentación clínica inicial, siendo más frecuente en aquellos pacientes que tuvieron síntomas renales más graves al inicio de la enfermedad, tales como síndrome nefrítico nefrótico, síndrome nefrótico y/o retención de azoados [1, 8]. Sin embargo se sabe que aún pacientes con alteraciones urinarias mínimas pueden llegar a IRC después de décadas. En una serie de 52 pacientes Ronkainen y col. Vieron que 17% de los pacientes tenían deterioro en la función renal en el seguimiento a 24 años, y que la gravedad de la biopsia inicial no se correlacionaba con el riesgo a una mala evolución. Es importante señalar que 70% de los embarazos de las mujeres que padecieron PHS en la infancia se complicaron con hipertensión y proteinuria [15].

En un estudio de capilaroscopia ungueal en 31 niños que tuvieron PHS se encontró que después de 16 meses del episodio agudo los pacientes continuaban con vasculitis crónica persistente a pesar de estar aparentemente libres de síntomas [16], la presencia de lesiones microvasculares crónicas pueden explicar el riesgo a desarrollar IRC, proteinuria e hipertensión arterial.

Estudios con análisis multivariado señalan que la severidad de los síntomas abdominales, la púrpura persistente, la disminución en la actividad del Factor XIII y edad mayor de 7 años son factores de riesgo para desarrollar afección renal [11]. Los reportes de PHS en adultos sugieren que la evolución es peor a mayor edad del paciente y más del 50% tiene afección renal que tiende a persistir [17, 18].

La enfermedad renal puede recurrir en el riñón trasplantado y llevar a pérdida del injerto renal en 11 a 35% de los pacientes a los 5 años post-trasplante [19].

En nuestra Institución se realiza biopsia renal cuando los pacientes presentan deterioro progresivo en la función renal así como cuando tienen proteinuria nefrótica inicial (mayor de 40mg/m<sup>2</sup>sc/h). También se considera hacer biopsia en los casos que cursan con proteinuria significativa (mayor de 4mg/m<sup>2</sup>sc/h) que persiste por más de 8 semanas. La hematuria macro o microscópica por sí sola no amerita biopsia renal.

A pesar de muchos intentos terapéuticos, no existe un consenso internacional para el tratamiento de la nefritis por PHS. No existen estudios prospectivos, aleatorios y controlados en esta patología. La interpretación de los resultados disponibles en la literatura es difícil ya que generalmente son series pequeñas de casos. Hay quien emplea tratamiento con esteroides para prevenir la nefritis [20], sin embargo otros autores no han visto que esta práctica provea beneficios [21]. Existe evidencia clínica de que los esteroides son útiles en el manejo de la artritis y el dolor abdominal pero no influyen en la púrpura, la duración de la enfermedad o la frecuencia de recurrencias [3, 22] Las formas más agresivas de tratamiento, tales como bolos de metilprednisolona, ciclofosfamida, azatioprina y plasmaféresis se han intentado en las formas graves con proliferación extracapilar difusa, ya que los pacientes tienen alto riesgo de evolucionar a uremia terminal.

En los casos de proteinuria persistente se ha sugerido el tratamiento con IECA y/o ATRA, ya que existe evidencia de que dichos medicamentos disminuyen la progresión del daño renal al disminuir la proteinuria [23].

Los iECA / ATRA causan vasodilatación de la arteriola eferente del glomérulo, disminuyendo de este modo la presión intraglomerular causante de la proteinuria [24, 25].

El deterioro progresivo de la función renal está relacionado con el desarrollo de fibrosis en el riñón.

Se sabe que el factor transformador de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) tiene una acción fibrogénica potente al estimular la producción de la matriz proteica, inhibir la degradación de la matriz y favorecer su depósito por aumento en la expresión de integrinas, y su participación en la fibrosis renal se ha demostrado en modelos animales y estudios de biopsias renales en pacientes con glomerulopatías progresivas [26-31].

No se cuenta con un examen de laboratorio que permita distinguir a los pacientes que van a progresar a insuficiencia renal crónica. Actualmente aplicando técnicas de biología molecular, el ácido ribonucleico puede aislarse fácilmente de las células del sedimento urinario y ser utilizado para medir la expresión de diversas moléculas en forma cuantitativa por medio de la PCR en tiempo real [32]. La determinación de la expresión de granzima B y perforina permite establecer el diagnóstico de rechazo agudo con una sensibilidad y especificidad de 80% sin necesidad de realizar una biopsia renal [33]. La búsqueda de otro tipo de moléculas tales como CD103 y IP-9 permite predecir el grado de infiltración tubular y provee información sobre la fisiopatología del rechazo [34, 35]. Consideramos que la aplicación de esta tecnología, estudiando la expresión de citocinas tales como Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleucina 2 (IL2), IP10, quimocinas

atrayentes de monocitos (MCP1), puede ser de utilidad en el seguimiento de los pacientes con púrpura de Henoch Schonlein.

Las citocinas son pequeñas glucoproteínas que actúan en la regulación de la respuesta inmune y estimulan la expresión de genes de sustancias que aumentan la progresión de la enfermedad renal.

El TNF- $\alpha$  no glicosilada producida principalmente por los macrófagos, induce crecimiento celular, diferenciación de tejidos e inmunorregulación, además induce cambios vasculares, afectando la adhesión de leucocitos y promoviendo la procoagulación [36].

Babel N. Y cols. Han reportado la asociación entre el polimorfismo de genes de citocinas y la progresión de la enfermedad en varios tipos de glomerulonefritis [36].

El polimorfismo de genes de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor transformador de crecimiento (TGF  $\beta$ ) e interleucina 10 (IL-10) son factores predisponentes en la progresión de daño renal [37].

La IL-2 es secretada por linfocitos T CD4+ y CD8+ activados en respuesta a un estímulo antigénico. Inicialmente se describió como factor de crecimiento de células T, ya que es el principal agente que controla su proliferación. Ejerce otros muchos efectos sobre el sistema inmune teniendo un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares. Es un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T B y NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK. Tras unirse a su receptor en linfocitos T, activa la secreción de IFN-alfa, linfotoxina, IL4, IL3, IL5 y GM-CSF. Sobre los linfocitos B estimula su crecimiento y diferenciación e incrementa la expresión de moléculas de MHC clase II [38].

Se encontró que el sIL-2R estaba significativamente incrementado en episodios de rechazo agudo durante el primer mes de trasplante en comparación con pacientes con injerto funcional ( $p=0.01$ ) y controles sanos ( $p=0.001$ ). Concluyendo que el análisis cuantitativo de sIL-2R ofrece herramientas adicionales diagnósticas y pronósticas para el seguimiento de pacientes trasplantados. De igual manera se intenta monitorizar a pacientes con PHS determinando la expresión de genes de IL2 [37].

Rodríguez et. al. demostraron la infiltración renal de macrófagos y monocitos en enfermedades no autoinmunes en modelos experimentales. La infiltración de células inmunocompetentes requiere de la expresión de factores quimiotácticos y de la expresión de moléculas de adhesión. Las quimiocinas constituyen uno de los grupos más importantes ya que no solo tienen la capacidad de estimular la migración celular, sino que bajo ciertas circunstancias pueden estimular también la proliferación celular, angiogenesis y la activación de leucocitos. Las dos subfamilias más numerosas son la C-X-C y C-C, esta última subfamilia atrae monocitos, células T, y células natural killer. De esta subfamilia C-C, las 2 citocinas más comúnmente implicadas en el daño renal son la quimiocina atrayente de monocitos (MCP1) y RANTES. El empleo de inmunosupresores como el micofenolato de mofetil ha probado ser benéfico en estos modelos experimentales de naturaleza no inmune al atenuar o prevenir la progresión de daño renal funcional e histológico. (Rodríguez B, Pons H, Herrera J, *Kidney Int* 2001) [39].

Recientemente se ha investigado la participación del sistema monocito-macrófago en las lesiones intraglomerulares e intersticiales en biopsias de pacientes con nefropatía por PHS donde se ha demostrado la presencia de un infiltrado importante de macrófagos en las etapas iniciales o agudas, aun antes de que aparezcan signos clínicos de enfermedad renal. Existe evidencia que la proteína inflamatoria de macrófagos alfa 1 (MIP) y la

quimiocina atrayente de monocitos (MCP1) se correlacionan con el porcentaje de semilunas celulares y con las semilunas fibrosas y fibrocelulares respectivamente en los pacientes con nefropatía por PHS a partir de estadios III de acuerdo a la clasificación ISKDC [40].

Los mecanismos responsables de la glomerulonefritis mesangioproliferativa es desconocido, pero se ha observado que el interferón- $\gamma$  induce una proteína de 10KD que inducía proliferación de las células mesangiales expresada por múltiples líneas celulares incluyendo las células mesangiales. Romagnani P y cols. estudiaron el efecto de IP10 en pacientes con glomerulonefritis membranoproliferativa.

Esta quimocina llamada IP10, no solo induce proliferación mesangial, sino que es quimiotactico de mononucleares produciendo inflamación [41].

La técnica inmunoenzimática ELISA forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. El ELISA, se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro.

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de antígenos es el modelo ELISA "Sandwich". En esta forma, la placa suele ya venir con un anticuerpo fijado (monoclonal ó policlonal) frente al antígeno problema, sobre el que se añadirá el macerado del órgano sospechoso, que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa,

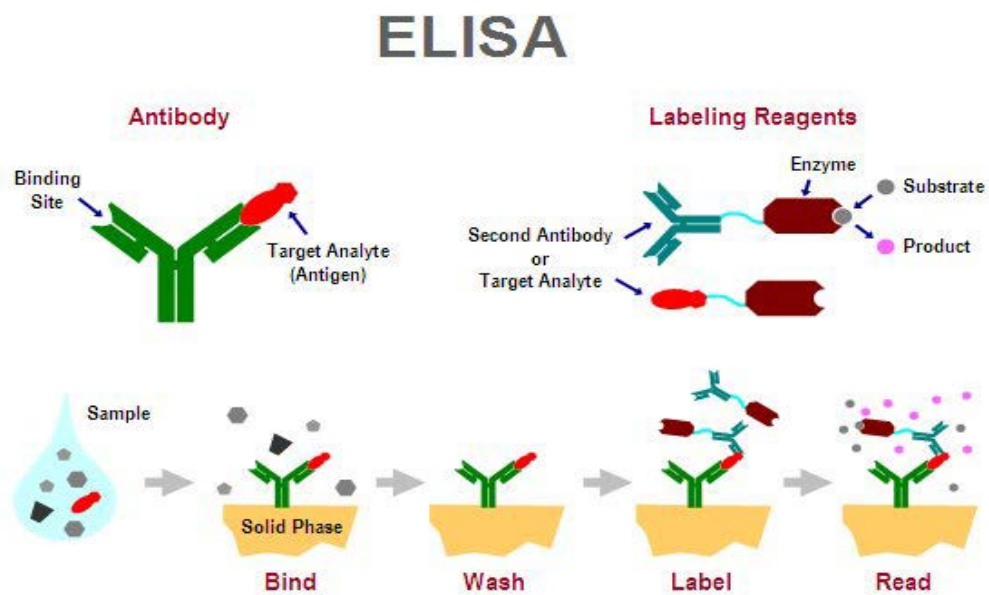
será puesto en evidencia tras la adición del segundo anticuerpo marcado con la enzima.

Por último, se añade el sustrato para revelar la reacción.

### ELISA por competición

En este sistema también es muy utilizado para la detección de anticuerpos específicos. Se parte de un anticuerpo (monoclonal o policlonal), frente a un antígeno conocido, que previamente ha sido inmovilizado en la placa. Se denomina de competición ya que el suero problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el antisuero fijado en la placa, y por tanto compite con él. Los pasos siguientes es la adición e incubación del conjugado, lavado y finalización con el sustrato y lectura.

**Figura 1.1. TECNICA DE ELISA.**



En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa o PCR que es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de DNA con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de DNA [39].

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariota realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5'→ 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar. Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- 1a.** Desnaturalización del ADN doble cadena.
- 2a.** Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.
- 3a.** Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

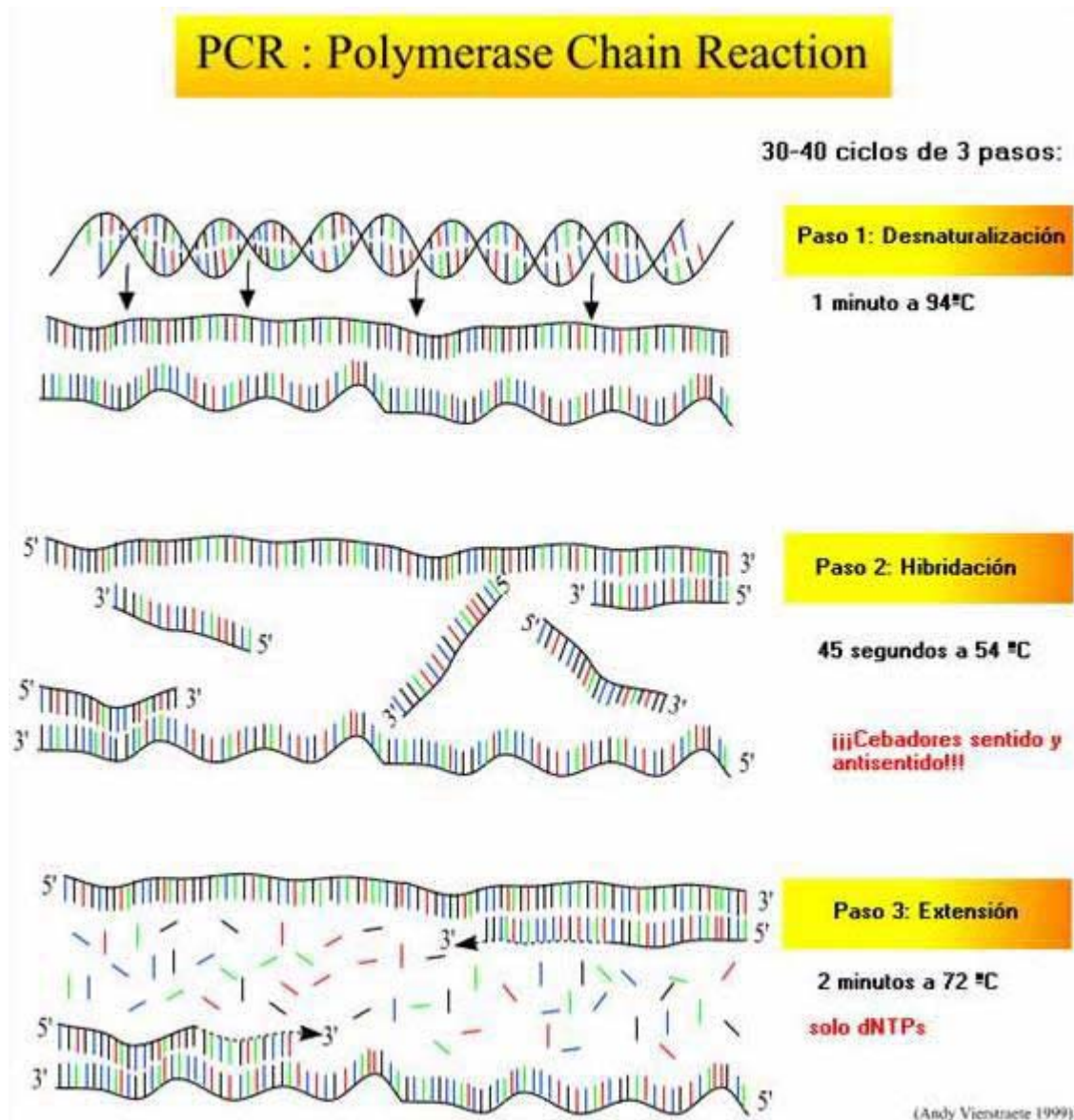
En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C).

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección



5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Todos estos pasos se pueden apreciar gráficamente [40].

**Figura 1.2 ESQUEMA PCR.**



**Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstraete 1999)**

## **2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La púrpura de Henoch-Schönlein (PHS) es la vasculitis más frecuente en la edad pediátrica y se caracteriza por depósitos en la pared vascular predominantemente de IgA, involucrando comúnmente a los pequeños vasos en piel, intestino y glomérulo.

La nefritis por PHS lleva a insuficiencia renal crónica (IRC) 20 años después del diagnóstico en más del 20% de los niños. El riesgo de IRC se ha relacionado con la presentación clínica inicial, siendo más frecuente en los pacientes que presentaron cuadro de síndrome nefrítico-nefrótico, pero también se ha encontrado en pacientes con alteraciones urinarias mínimas como hematuria microscópica. La biopsia renal está indicada cuando se sospecha una lesión progresiva, sin embargo tiene la desventaja de ser un procedimiento invasivo, sujeto a error de muestreo principalmente en las lesiones focales.

Recientemente se ha descrito el uso de la determinación de marcadores de inflamación y de fibrosis como herramienta diagnóstica en pacientes con rechazo del injerto renal [33]. Consideramos que esta metodología puede emplearse en pacientes con glomerulopatías progresivas como es el caso de la PHS.

### **3 JUSTIFICACION**

- La biopsia renal es un procedimiento invasivo sujeto a error de muestreo principalmente en lesiones focales.
- Generalmente se realiza cuando ya existe mucho daño renal.
- Se necesitan marcadores no invasivos capaces de identificar a los pacientes con riesgo de progresión del daño renal para dar tratamiento oportuno.

## **4 OBJETIVOS**

### **a. GENERAL**

- Evaluar si la expresión de marcadores de inflamación en sangre y sobrenadante urinario por PCR en tiempo real y ELISA puede correlacionarse con la progresión del daño renal en pacientes pediátricos con púrpura de Henoch-Schönlein.

### **b. ESPECIFICOS**

- Evaluar si la determinación de TNF- $\alpha$ , en RNA de sangre total por PCR en tiempo real puede correlacionarse con la progresión del daño renal en pacientes pediátricos con púrpura de Henoch-Schönlein.
- Evaluar si la determinación de IL-2 en RNA de sangre total por PCR en tiempo real puede correlacionarse con la progresión del daño renal en pacientes pediátricos con púrpura de Henoch-Schönlein.
- Evaluar si la determinación de IP10 en RNA de sangre total por PCR en tiempo real puede correlacionarse con la progresión del daño renal en pacientes pediátricos con púrpura de Henoch-Schönlein.
- Evaluar si la determinación de MCP-1, en sobrenadante urinario por ELISA puede correlacionarse con la progresión del daño renal en pacientes pediátricos con púrpura de Henoch-Schönlein.

## **5 HIPOTESIS**

El aumento en la expresión de TNF- $\alpha$ , IL 2, IP 10 en RNA de sangre total por PCR en tiempo real y de MCP-1 en sobrenadante urinario por ELISA, permite distinguir a los pacientes con púrpura de Henoch-Schonlein que presentan nefropatía progresiva.

### **a. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL ESTUDIO.**

El Hospital Infantil de México Federico Gómez es un instituto nacional de salud ubicado en la calle Dr. Márquez 162 colonia Doctores en la delegación Cuauhtémoc. Este hospital de tercer nivel atiende a población abierta referida de todas las instituciones de salud del distrito federal, área metropolitana y resto de la republica mexicana con cobertura las 24hrs del día y los 365 días del año.

**Tabla 5.1 CRONOGRAMA**

Etapa	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago
Planeación	X									
Material y métodos	X									
Registro y Autorización		X								
Ejecución de proyecto		X	X	X	X	X	X	X	X	
Recolección de datos									X	
Almacenamiento									X	
Análisis de datos								X	X	
Descripción de resultados									X	
Discusión de resultados									X	
Conclusiones del estudio									X	
Integración y revisión final									X	
Reporte final									X	

## **6 POBLACIÓN**

Todos los pacientes pediátricos con PHS diagnosticada en los meses previos, con diagnóstico basado en la clínica por púrpura palpable, no relacionada a trombocitopenia, acompañada artritis, dolor abdominal con o sin sangrado de tubo digestivo, y nefritis.

## **7 MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realiza un estudio prospectivo, descriptivo en pacientes con PHS que acuden al Hospital Infantil de México Federico Gómez para su atención. El proyecto fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética del Hospital Infantil de México y recibe recursos de Fondos Federales. Se obtiene consentimiento informado en todos los casos.

Se toman los siguientes exámenes en forma basal y posteriormente cada tres meses hasta completar 3 años de seguimiento:

Examen general de orina, proteinuria de 12 horas, creatinina sérica, creatinina urinaria, Colección de sobrenadante urinario, RNA en sangre total para medir por PCR en tiempo real la expresión de marcadores de progresión de daño renal.



## **8 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Pacientes con PHS diagnosticada en los seis meses previos.

El diagnóstico de PHS estará basado en la clínica, por la presencia de púrpura cutánea palpable, no relacionada a trombocitopenia, acompañada de alguno de los siguientes síntomas: artritis, dolor abdominal con o sin sangrado gastrointestinal y nefritis [1].

Aceptación por escrito para participar en el estudio.

## **9 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Pacientes que en el seguimiento sean clasificados como otro tipo de vasculitis (LES, Kawasaki, Churg Strauss).

Deseo voluntario de abandonar el estudio.

## **10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el programa SPSS versión 15.0 y Graph Pad versión 4.0. Se realizó:

- Estadística descriptiva
- Tabla de frecuencias
- Descripción de la población
- Correlación entre niveles sericos de TNF, IP 10, IL2, con la presencia de proteinuria.
- Correlación entre TNF, IP 10, IL2 con el tipo de lesión histológica.
- Correlación entre niveles MCP 1. y la presencia de nefritis.

### **10.1 RECURSOS HUMANOS**

3 licenciados en química uno de ellos con maestría en ciencias.

2 Médicos pediatras con especialidad en nefrología pediátrica.

1 pasante del servicio social de medicina general.

1 residente de 2º año de la especialidad de nefrología pediátrica.

## 10.2 RECURSOS MATERIALES

- Tubos cónicos de 50ml esterilizados
- Microtubos de 1.7ml esterilizados
- Puntas para micropipeta 100-1000 $\mu$
- Puntas para micropipetas de 1-10  $\mu$
- Micropipetas volumen variable.
- Jeringas 10 ml
- Agua libre RNasa
- PAX GENE KIT
- Kit taq Man (Reverse Transcription reagents) Applied Biosystems
- Iniciadores y sonda fluorogénica para TNF  $\alpha$ , IL2, IP10, 18S rRNA
- Campana de flujo laminar
- 1 microcentrifuga
- 1 Vortex
- 1Nanodrop
- 1 termociclador
- 1 equipo de tiempo real
- 1 computadora personal Toshiba M45S169
- KIT ELISA para MCP-1 (R&D Systems)

**Tabla 10.1 DESCRIPCION DE VARIABLES**

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
Edad	Tiempo de vida de un individuo expresado en meses	meses cumplida	Cuantitativa continua
Sexo	Fenotipo de una persona	1. femenino 2. masculino	Cualitativa dicotomica
Valores de expresión genética TNF $\alpha$ , IL2, IP10 en muestras prospectivas	Copias expresadas de RNA	Copias por $\mu$ g de RNA total	Cuantitativa
Valor de expresión de MCP-1	Cantidad de proteína	pg/mL	Cuantitativa
Proteinuria	Cantidad de proteínas totales eliminadas por orina	mg/m <sup>2</sup> /hr	Cuantitativa
Biopsia renal	Toma de tejido para estudio histopatológico	Grado de daño glomerular.	Cualitativa

# 11 MÉTODOS

En cada visita se anota el tratamiento recibido, peso, talla, presión arterial y exámenes de laboratorio (ver hoja de vaciamiento de datos). El costo de la consulta, y los exámenes de laboratorio (creatinina sérica, examen general de orina y proteinuria de 12 hrs.) son cubiertos con recursos del fondo de estudio.

## *Colección del sedimento urinario*

Un mínimo de 50mL de orina fueron colectados por paciente. La orina se colocó en tubos cónicos de 50mL y centrifugada a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se obtuvo y se almaceno a -80 °C hasta la determinación del MCP-1.

## *Aislamiento de ARN*

El ARN fue obtenido a partir del PAX GENE KIT.

La cantidad de ARN obtenida fue cuantificada por espectrofotometría (Nanodrop modelo ND-1000) y se realizo la transcripción reversa de 1µg de ARN total para obtener el ADN complementario (cDNA) utilizando un kit comercial (Taqman reverse transcription kit, Applied Biosystems).

## *PCR en tiempo real*

La secuencia de los iniciadores y la sonda fluorogénica para la cuantificación de la expresión para la determinación de TNF  $\alpha$  y 18S ARN ribosomal IL2, e IP 10, fueron diseñados con el programa Primer Express. La cuantificación se hizo, en un PCR Tiempo Real (modelo 7500 Applied Biosystems).

Se realizó una hoja de captura de datos en el programa Excel donde se recolectaron los datos de cada paciente donde se incluían nombre, numero de expediente, edad, sexo, fecha de inicio PHS, sintomatología (lesiones dermicas, artritis, dolor abdominal, nefritis)

fecha de seguimiento, signos vitales, creatinina depuración de Swartz, presencia y clasificación de proteinuria, presencia y tipo de nefritis, hematuria, tratamiento, valor de MCP-1, número de copias TNF  $\alpha$ , IL2, IP10 y 18s rRNA.

Para la expresión de IL2 e IP10 cuando no se encontró valor detectable. Se asignó un valor igual a la mitad del valor mínimo observado del gen /18S rRNA (control interno).

Los valores de expresión génica se convirtieron a logaritmo para normalizar los datos.

Para realizar el análisis de la expresión génica y proteinuria, se utilizó las pruebas de Spearman, y para la correlación de la expresión génica y clasificación histopatológica, se utilizó Kruskal Wallis.

## **12 FINANCIAMIENTO**

-Protocolo financiado por el proyecto Evaluación de la progresión del daño renal por purpura de Henoch Sxhonlein en niños mediante la determinación de expresión genica en celulas urinarias por PCR en tiempo real. “HIM/2006/033

-Estudio multicéntrico de comparación de 2 esquemas de tratamiento para la nefritis por purpura de Henoch Shoenlein y su efecto sobre la excrecion de MCP-1 en orina. - HIM/2007018.

## **13 CONSIDERACIONES ETICAS**

El protocolo se apega a las normas internacionales de investigación en seres humanos.

El estudio se realizó en base a los siguientes reglamentos:

- Declaración de Helsinki, adaptada por la 18ª. Asamblea Médica Mundial. Helsinki, Finlandia en 1964 y revisada por la 29ª. Asamblea Médica Mundial (Tokio, Japón) en 1975.
- Reglamentación de la investigación biomédica por el código sanitario mexicano, Artículo 1º. Al 14º.
- Constitución política mexicana, Artículo 4º.
- Ley general de salud, Artículo 2º, Fracción VII, Artículo 35 o, Fracción IX, Título V, Capítulo único, Artículo del 96 al 103.

El estudio fue realizado por profesionales de la salud con conocimientos y experiencia para el manejo de material biológico-infeccioso, bajo la responsabilidad de la institución que cuenta con los recursos humanos y materiales para la preservación del material biológico y garantizar el bienestar de los pacientes prevaleciendo siempre el criterio de respeto a la dignidad y protección de los derechos individuales.

**14**



## 14 RESULTADOS

- Se incluyeron 36 pacientes con el diagnóstico de PHS de acuerdo a los criterios del colegio americano de reumatología.
- De los 36 pacientes 19 fueron del sexo femenino y 17 del sexo masculino, con edad media de 8<sup>a</sup> (5-14<sup>a</sup>). (Tabla 14.1 y Fig. 14.1)

Tabla 14.1 DEMOGRAFIA.

**Tabla 1. Datos demográficos y clínicos**

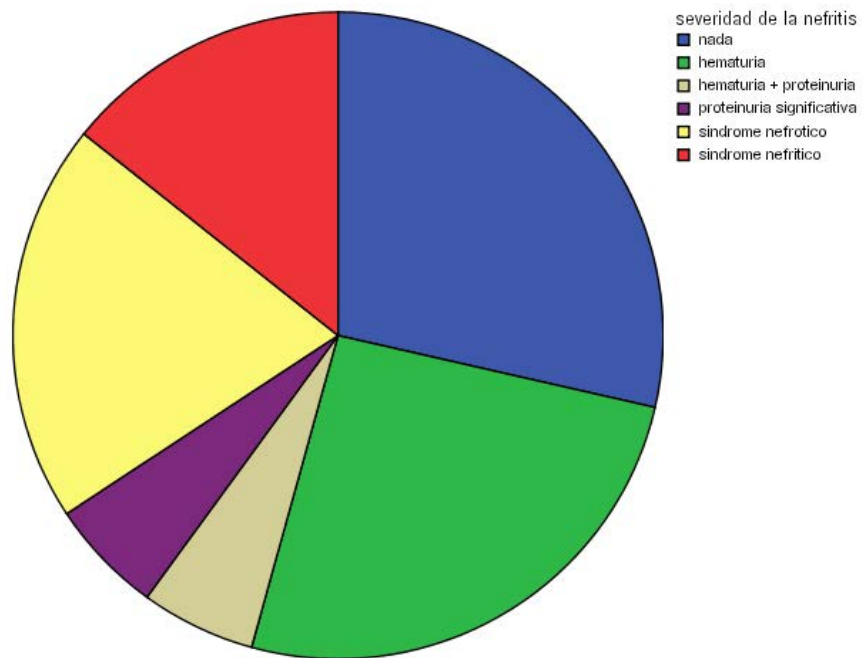
<i>n (%)</i>	<i>Total 35</i>	<i>Nefritis 25 (71.4)</i>	<i>No nefritis 10 (28.6)</i>
Masculino	16 (45.7)	10 (40)	6 (60)
Femenino	19 (54.3)	15 (60)	4 (40)
<b><i>Edad</i></b>			
Media±DS	8±2.7	8.6±0.56	7.1±0.7
<b><i>Manifestaciones clínicas</i></b>			
Lesiones dérmicas	35 (100)	25 (71.4)	10 (28.6)
Artralgias/artritis	17 (48.6)	10 (28.6)	7 (20)
Dolor abdominal	26 (74.3)	18 (51.4)	8 (22.9)
Sangrado de tubo digestivo	6 (17.1)	5 (14.3)	1 (2.9)
Edema miembros inferiores	10 (28.6)	7 (20)	3 (8.6)
<b><i>MCP-1 Basal (pg/mL)</i></b>			
Mediana (min, max)		132.3 (0,2000)	80.4 (0,106.4)

- En relación a la presencia de nefritis se observó que el 28% (15 pacientes) no mostraron manifestaciones renales, nueve pacientes (25%) presento hematuria, y dos pacientes (5.7%) presentaron proteinuria y hematuria. Otros dos (5.7%) proteinuria significativa, dos (5.7%) síndrome nefrotico y cinco pacientes presentaron síndrome nefrítico (14.2%).

**Figura 14.1 PRESENCIA DE NEFRITIS.**

## PRESENCIA DE NEFRITIS

- Nada 15 (28%)
- Hematuria 9 (25%)
- Hemat.+prot 2(5.7%)
- Prot. sig. 2 (5.7%)
- Sind. Nefrotico2(5.7%)
- Sind. Nefritico 5(14.2%)



- De los 36 pacientes, 26 (72%) no requirieron biopsia, a 10 pacientes se les realizó biopsia renal por presentar proteinuria en rango nefrotico o proteinuria significativa por mas de 8 semanas, encontrándose que 3 pacientes presentaron un estadio II (8.3%), 3 pacientes (8.3%) estadio IIIa, y 4 pacientes (11%) estadio IIIb.

Siendo la lesión histológica más frecuente (4/10).

**Tabla 14.2 PACIENTES CON BIOPSIA RENAL.**

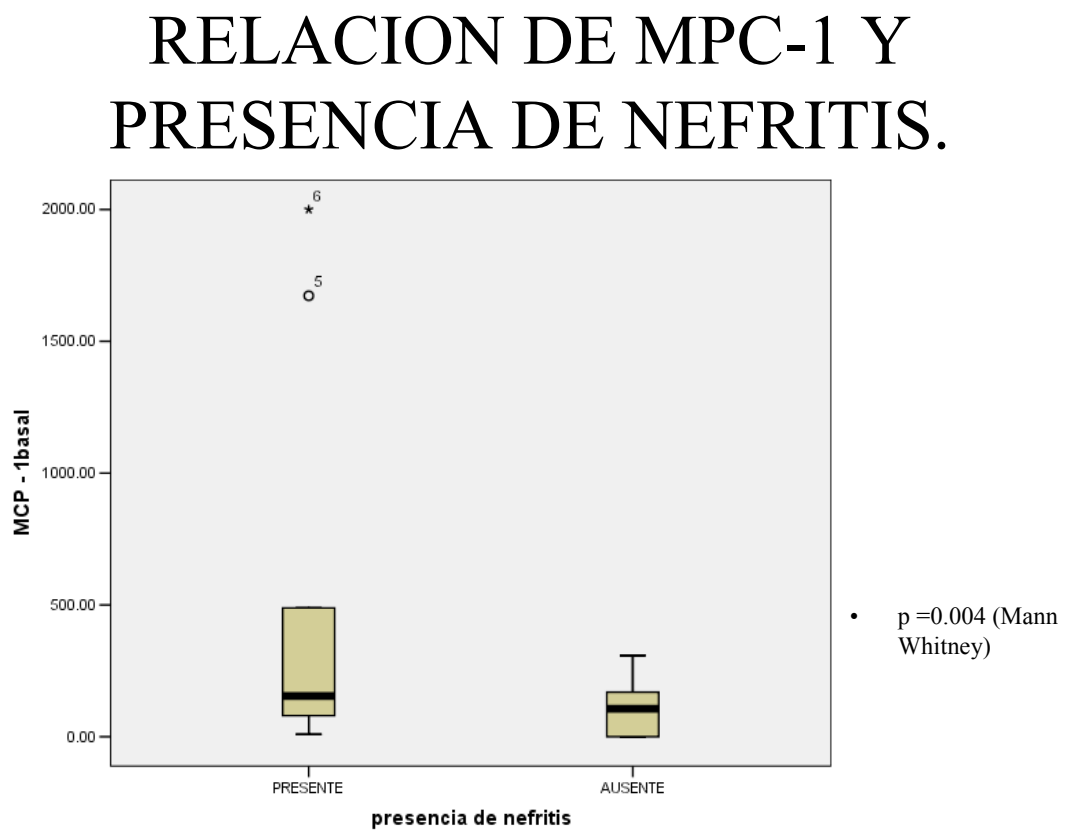
## PACIENTES CON BIOPSIA RENAL

### Lesion histologica

		Frequenc y	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	nada	26	72.0	75.0	75.0
	estadio II	3	8.3	5.6	80.6
	estadio IIIa	3	8.3	8.3	88.9
	estadio IIIb	4	11.1	11.1	100.0
	Total	36	100.0	100.0	

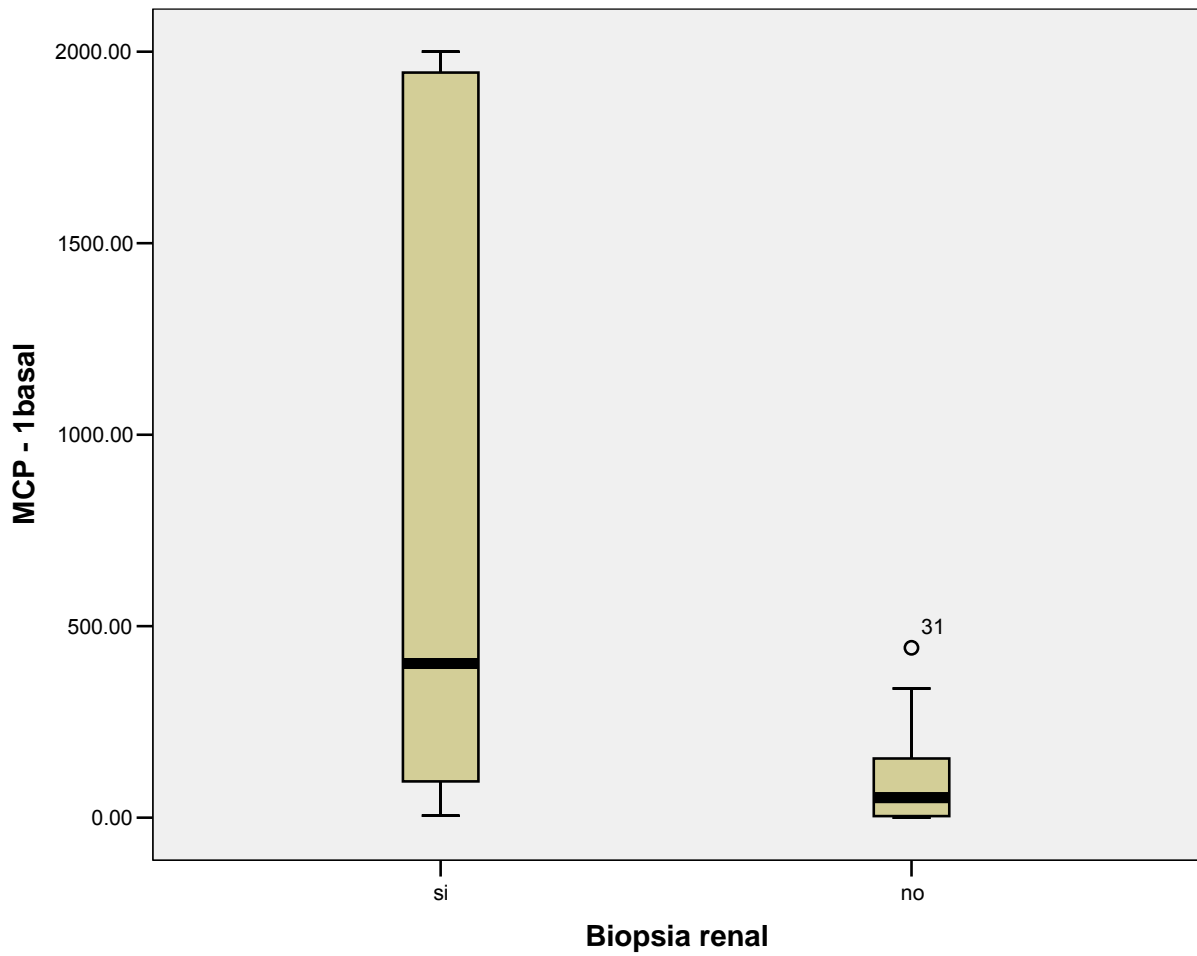
- Se determinó MCP-1 en sobrenadante urinario por ELISA en la visita basal y en relación con los pacientes que presentaban o no nefritis, se encontró una correlación positiva con una  $p=0.0004$  en los pacientes que presentaron nefritis.

**Figura 14.2 RELACION MCP/1 Y PRESENCIA DE NEFRITIS.**



- Se encontró MCP-1 elevado en los pacientes que requirieron biopsia renal vs con los pacientes que no requirieron biopsia con  $p=0.004$ .

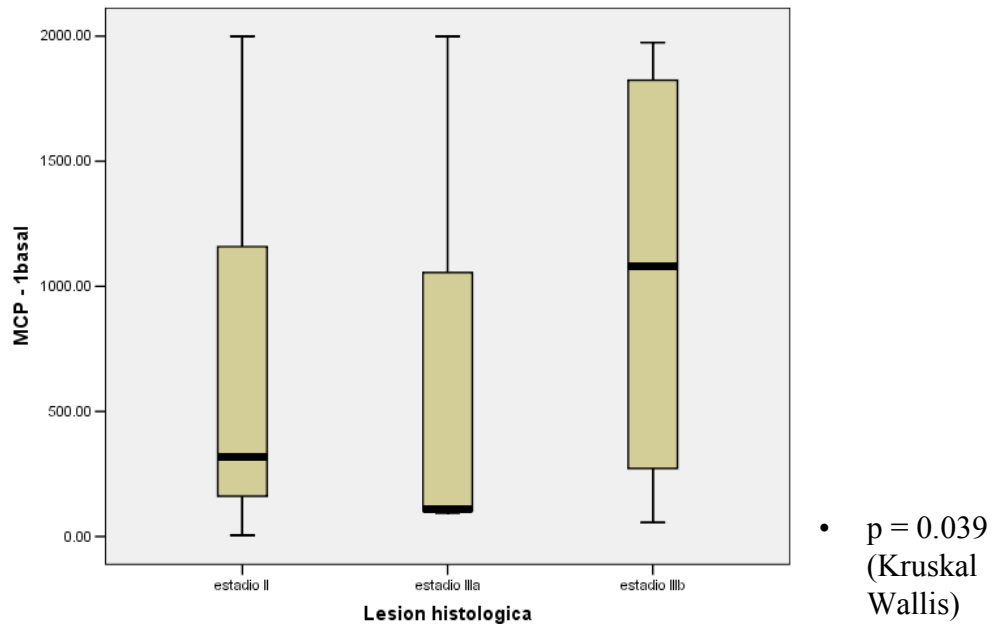
**Figura 14.3 COMPARACION MCP Y PACIENTES CON BIOPSIA.**



- Así mismo en relación con el grado de severidad encontrado en la biopsia renal, se observa también que el MCP-1 se encuentra elevado con una  $p= 0.0039$  en pacientes que presentaron estadio IIIB en comparación a otros estadios menores.

**Figura 14.4 RELACION ENTRE NIVEL DE MCP-1 Y LESION HISTOLOGICA.**

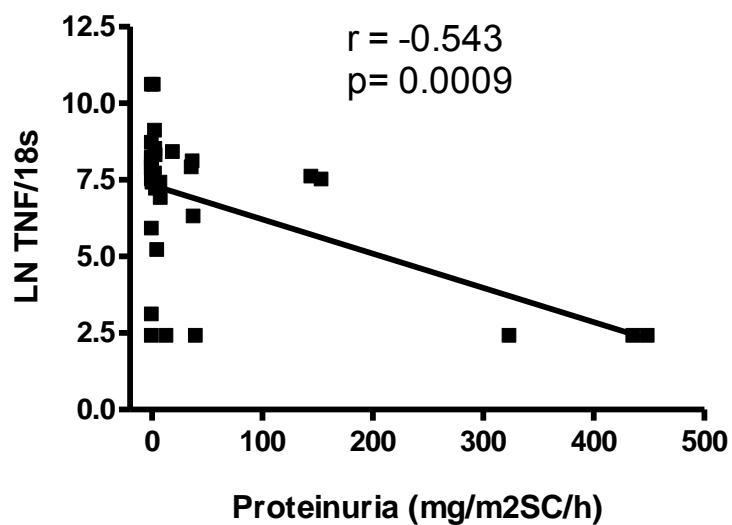
## RELACION ENTRE NIVEL DE MPC-1 Y LESION HISTOLOGICA



- Un paciente salió del estudio por diagnosticarse lupus eritematoso sistémico durante el seguimiento.

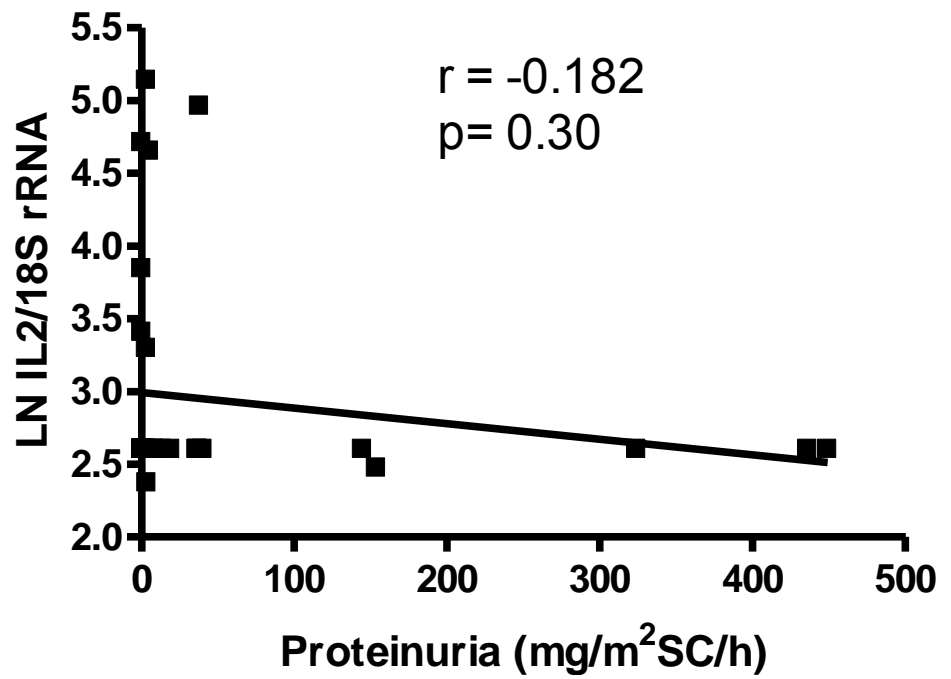
- Se determinó TNF- $\alpha$ , IL2, IP10 por PCR en tiempo real a los 35 pacientes restantes, encontrándose que el TNF- $\alpha$  muestra una correlación negativa en los pacientes con proteinuria, encontrándose disminuida en aquellos pacientes que presentan mayor proteinuria vs los pacientes que no presentan ( $p=0.0009$ ) (Fig. 14.5)

**Figura 14.5 COMPARACION TNF- $\alpha$  Y PROTEINURIA.**



- La IL2 de igual manera presenta una correlación negativa no significativa  $p=0.3$  en los pacientes con mayor proteinuria.

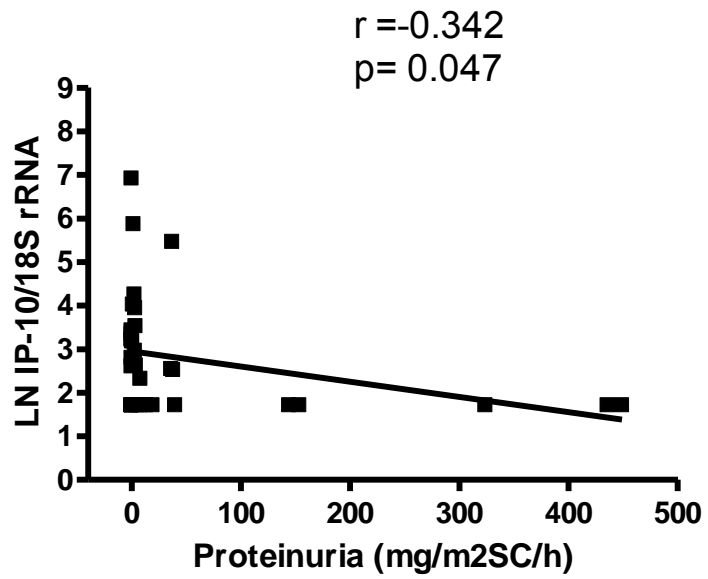
**Figura 14.6 RELACION IL2 Y PROTEINURIA.**





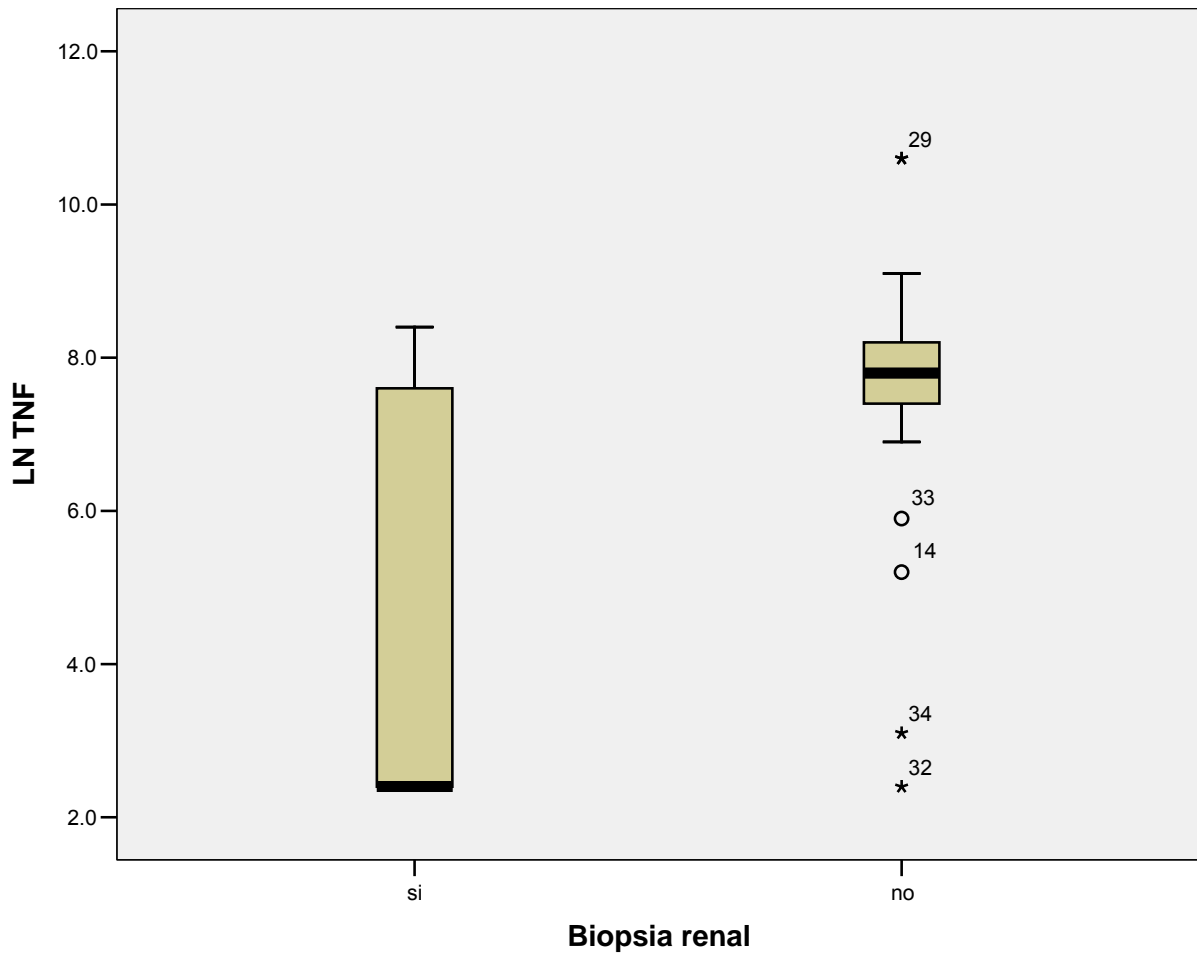
- El IP10, presenta también una correlación negativa encontrándose significativamente disminuida en pacientes con mayor proteinuria ( $p=0.47$ ).

**Figura 14.7 RELACION DE IP10 Y PROTEINURIA.**



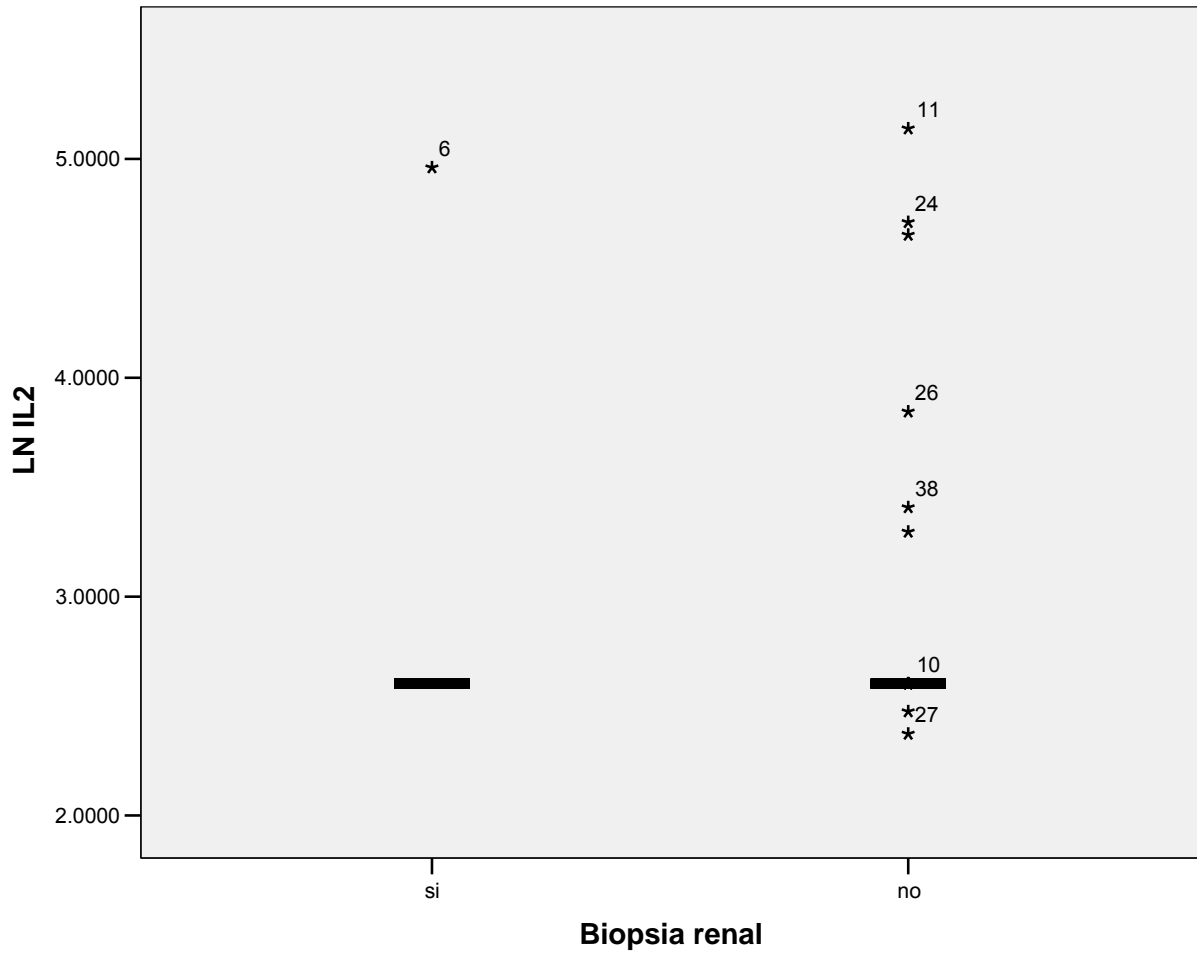
- En comparación con los pacientes que requirieron biopsia renal vs los que no, se encontró que el TNF- $\alpha$  de igual manera se encuentra significativamente disminuido en los pacientes que requirieron biopsia ( $p=0.022$ ).

**Figura 14.8 RELACION TNF- $\alpha$  Y BIOPSIA RENAL.**



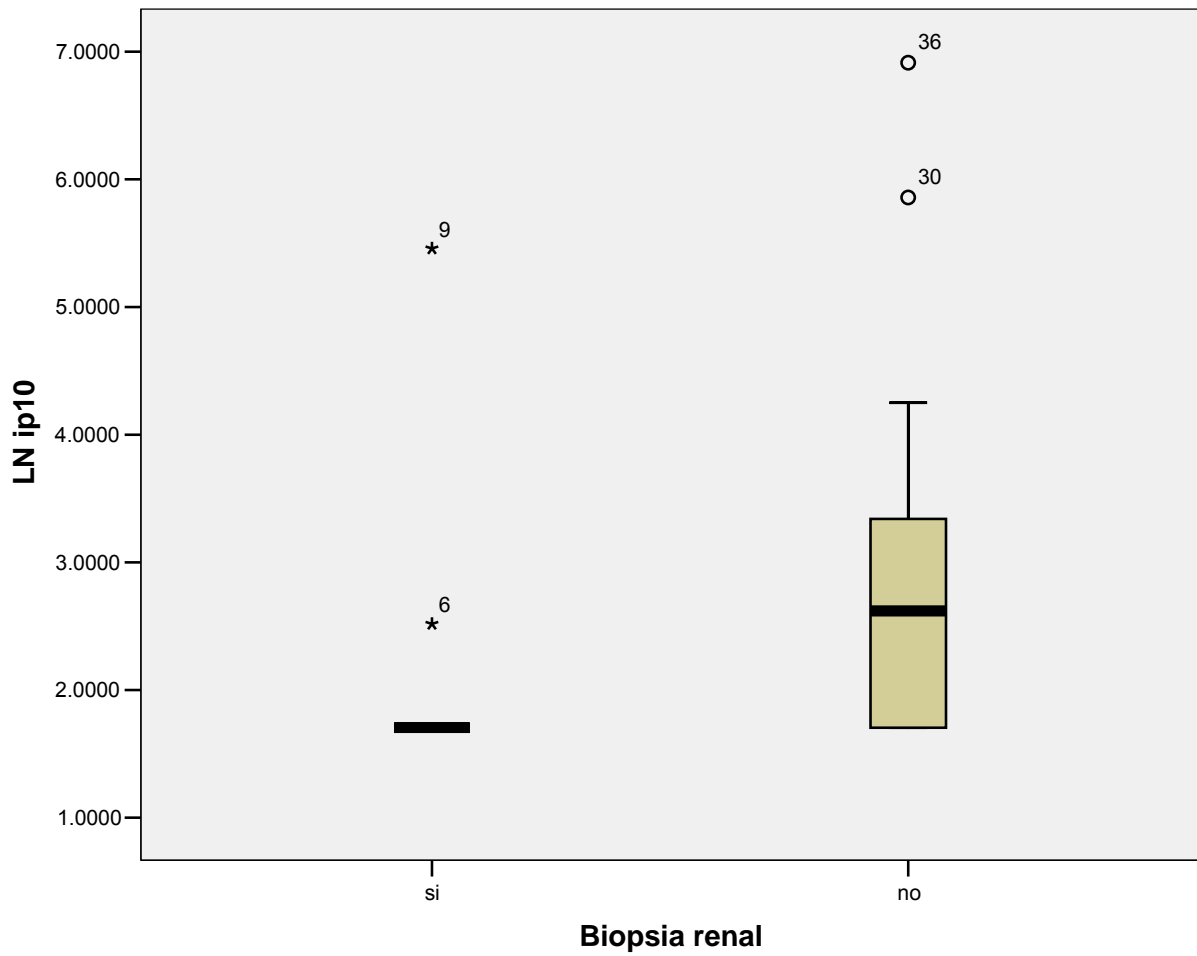
- La IL2 no presenta diferencia significativa con  $p=0.673$  en los pacientes que requirieron biopsia vs los que no necesitaron.

**Figura 14.9 COMPARACION IL2 Y BIOPSIA RENAL.**



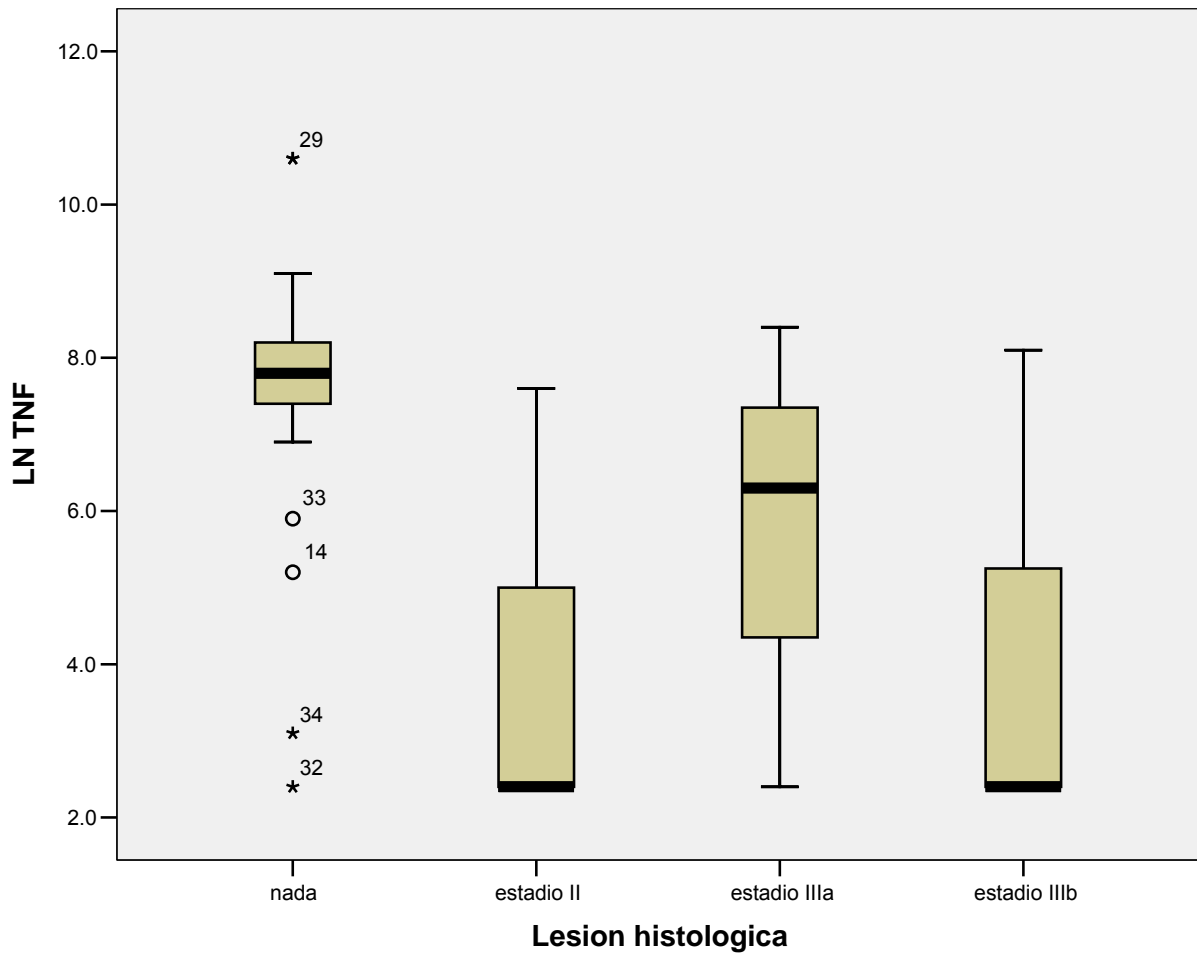
- La expresión de IP10 tuvo diferencia significativa en los pacientes que requirieron biopsia vs. aquellos que no ( $p=0.045$ ).

**Figura 14.10 COMPARACION DE IP10 Y BIOPSIA RENAL.**



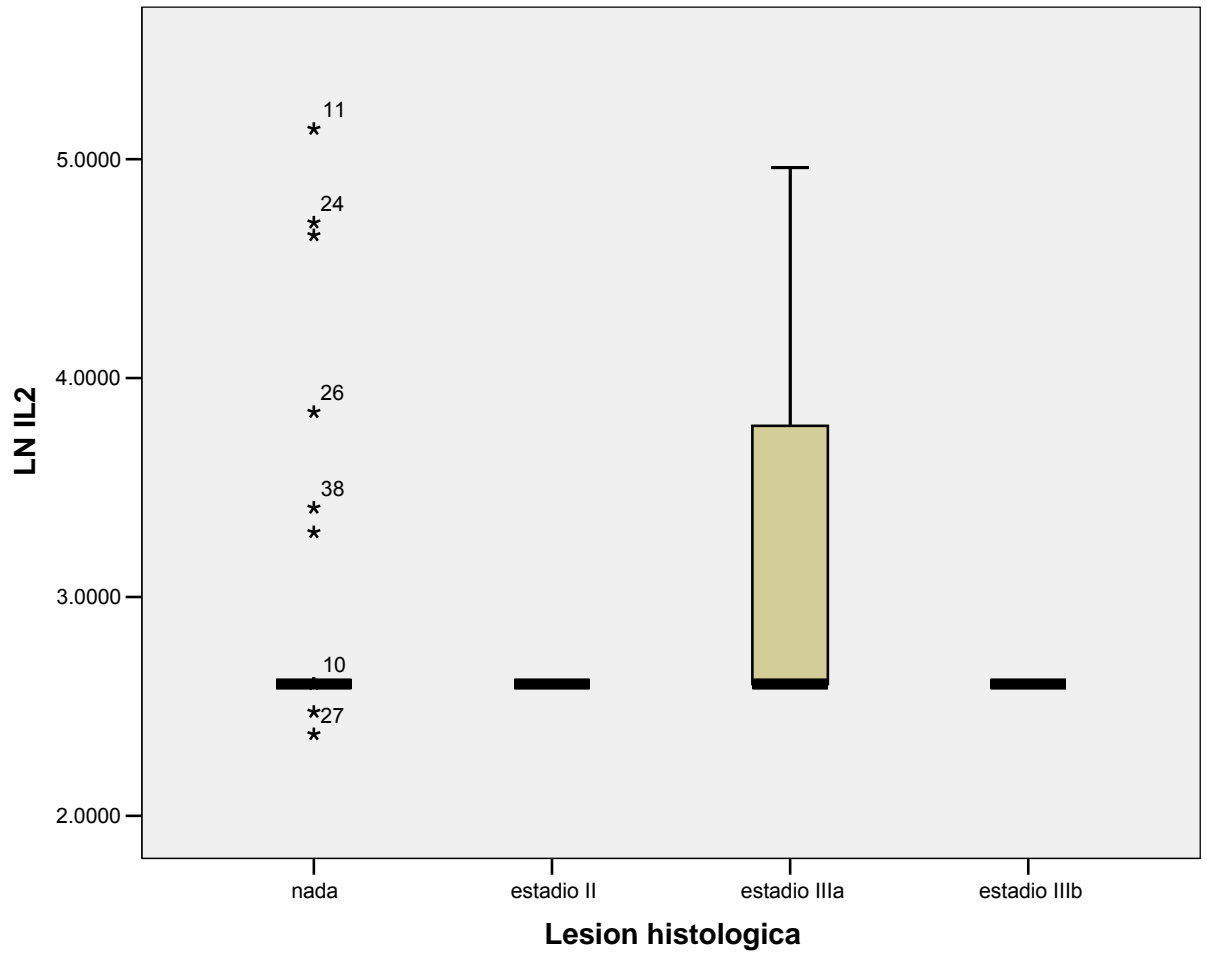
- En relación con la severidad de la nefritis, se encuentra que el TNF- $\alpha$  se encuentra significativamente disminuido en pacientes con estadio IIIb en comparación de los que no requirieron biopsia ( $p=0.004$ ).

**Figura 14.11 COMPARACION TNF $\alpha$  Y GRADO DE LESION HISTOLOGICA.**



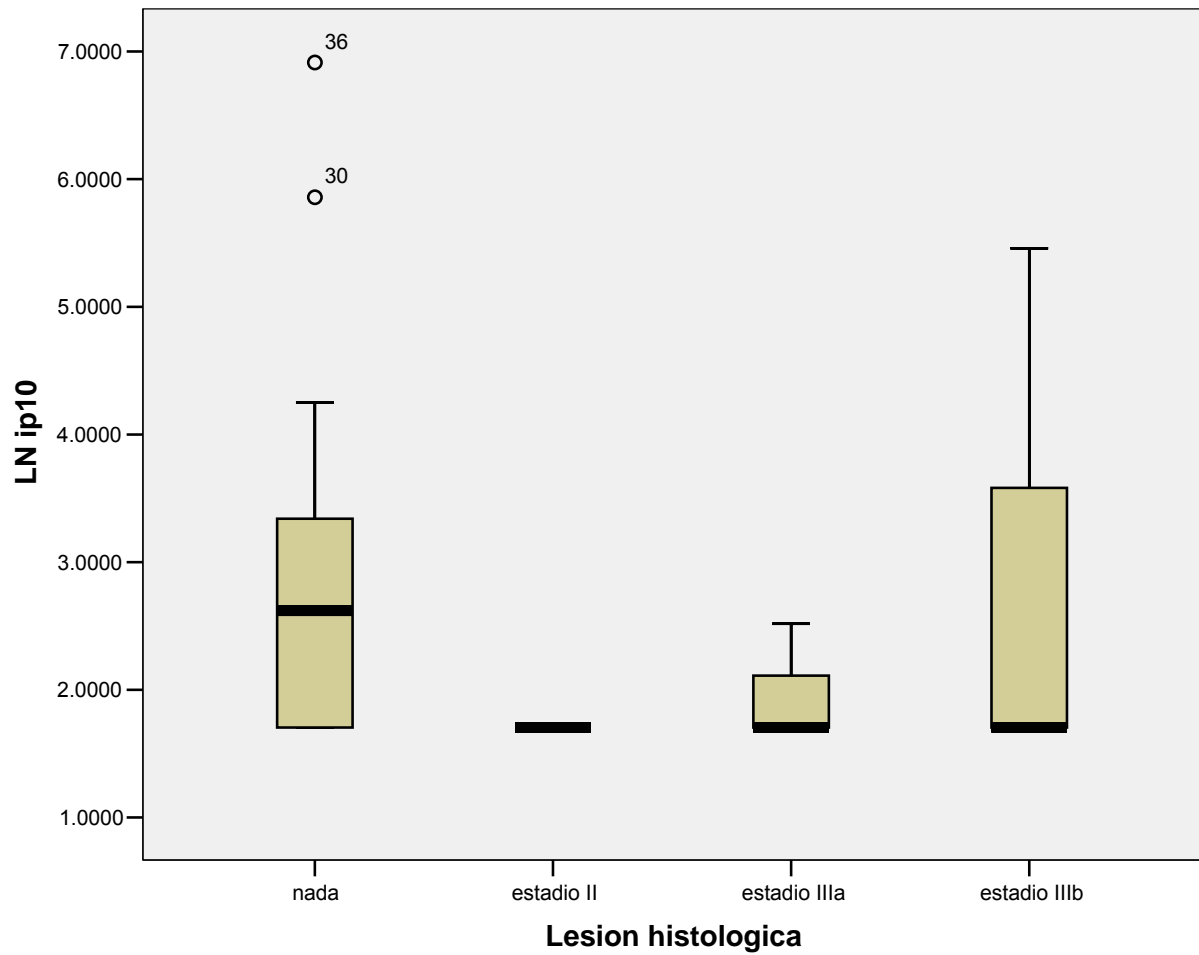
- La IL2 se encuentran también disminuida en los pacientes con estadio IIIb pero no es significativo  $p=0.797$ .

**Figura 14.12 COMPARACION IL2 Y GRADO DE LESION HISTOLOGICA.**



- Así mismo el IP10 no resulto significativo con la severidad de la nefritis (p=0.139).

**Figura 14.13 COMPARACION IP10 Y GRADO DE LESION HISTOLOGICA.**



## 15 DISCUSIÓN

Como es bien sabido la PHS es una entidad en la cual la enfermedad puede ser progresiva hasta llegar a la insuficiencia renal.

En este estudio se intento tratar de encontrar marcadores de inflamación que sirvan como herramienta para detectar progresión de la enfermedad o estadio de la enfermedad, sin necesidad de realizar biopsia renal.

En relación con MCP-1 y la presencia y grado de nefritis, se encontraron valores de esta proteína significativamente elevados en desde etapas iniciales en pacientes con formas graves de PHS, por lo que se podría utilizar como biomarcador en estos pacientes.

La cantidad e MCP-1 en orina también tuvo relación con la gravedad de la lesión histológica.

En cambio la expresión génica en células de sangre total de TNF- $\alpha$  e IP10, mostraron que la mayor expresión génica de estas citocinas, menor proteinuria. Pacientes con menor expresión de estos genes tuvieron lesiones más graves en la biopsia.

El hallazgo en la expresión génica de TNF- $\alpha$  e IP10 es opuesto a lo que esperábamos (mayor expresión mayor daño renal.). Sin embargo puede explicarse si se considera que los leucocitos salen del torrente sanguíneo durante la fase aguda de la enfermedad en aquellos pacientes con daño renal causando nefritis.

No encontramos relación entre IL2 y proteinuria o severidad histológica.

La IL2 es importante para la activación de linfocitos T, y probablemente estos no tengan un papel importante en la fisiopatología de la PHS.

En cambio el MCP-1 se encontró elevado en paciente con proteinuria y esta citosina atrae macrófagos, y se ha visto que estas células son importantes en los infiltrados renales



de varias glomerulonefritis, y su presencia se relaciona con la severidad del daño renal [40].

Los resultados de este trabajo indican que a mayor expresión génica de TNF e IP10 en sangre al inicio de la enfermedad menor daño renal, y a mayor cantidad de MCP1 en orina basal mayor afección renal.

Para poder determinar el impacto que tiene la medición de estas citocinas en sangre y orina sobre la progresión de la enfermedad renal se debe realizar un seguimiento prolongado de estos pacientes e incluir mayor número de pacientes.

## 16 BIBLIOGRAFIA.

1. Ballinger S: Henoch-Schonlein purpura. *Curr Opin Rheumatol* 15:591-594, 2003
2. Gardner-Medwin JM, Dolezalova P, Cummins C, Southwood TR: Incidence of Henoch-Schonlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins. *Lancet* 360:1197-1202, 2002
3. Saulsbury FT: Henoch-Schonlein purpura. *Curr Opin Rheumatol* 13:35-40, 2001
4. Allen AC, Willis FR, Beattie TJ, Feehally J: Abnormal IgA glycosylation in Henoch-Schonlein purpura restricted to patients with clinical nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 13:930-934, 1998
5. Hiki Y, Kokubo T, Iwase H, Masaki Y, Sano T, Tanaka A, Toma K, Hotta K, Kobayashi Y: Underglycosylation of IgA1 hinge plays a certain role for its glomerular deposition in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 10:760-769, 1999
6. Novak J, Vu HL, Novak L, Julian BA, Mestecky J, Tomana M: Interactions of human mesangial cells with IgA and IgA-containing immune complexes. *Kidney Int* 62:465-475, 2002
7. Fervenza FC: Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Int J Dermatol* 42:170-177, 2003
8. Sano H, Izumida M, Shimizu H, Ogawa Y: Risk factors of renal involvement and significant proteinuria in Henoch-Schonlein purpura. *Eur J Pediatr* 161:196-201, 2002
9. Rostoker G: Schonlein-henoch purpura in children and adults: diagnosis, pathophysiology and management. *BioDrugs* 15:99-138, 2001
10. Mrusek S, Kruger M, Greiner P, Kleinschmidt M, Brandis M, Ehl S: Henoch-Schonlein purpura. *Lancet* 363:1116, 2004
11. Kaku Y, Nohara K, Honda S: Renal involvement in Henoch-Schonlein purpura: a multivariate analysis of prognostic factors. *Kidney Int* 53:1755-1759, 1998
12. Szeto CC, Choi PC, To KF, Li PK, Hui J, Chow KM, Leung CB, Lui SF, MacMoune Lai F: Grading of acute and chronic renal lesions in Henoch-Schonlein purpura. *Mod Pathol* 14:635-640, 2001
13. Coppo R, Mazzucco G, Cagnoli L, Lupo A, Schena FP: Long-term prognosis of Henoch-Schonlein nephritis in adults and children. Italian Group of Renal Immunopathology Collaborative Study on Henoch-Schonlein purpura. *Nephrol Dial Transplant* 12:2277-2283, 1997
14. Scharer K, Krmar R, Querfeld U, Ruder H, Waldherr R, Schaefer F: Clinical outcome of Schonlein-Henoch purpura nephritis in children. *Pediatr Nephrol* 13:816-823, 1999
15. Ronkainen J, Nuutinen M, Koskimies O: The adult kidney 24 years after childhood Henoch-Schonlein purpura: a retrospective cohort study. *Lancet* 360:666-670, 2002
16. Martino F, Agolini D, Tsalikova E, Bederti O, Principessa L, Martino E, Carnevali E, Giardini O: Nailfold capillaroscopy in Henoch-Schonlein purpura: a follow-up study of 31 cases. *J Pediatr* 141:145, 2002
17. Lahita RG: Influence of age on Henoch Schonlein purpura. *Lancet* 350:1116-1117, 1997

18. Pillebout E, Thervet E, Hill G, Alberti C, Vanhille P, Nochy D: Henoch-Schonlein Purpura in adults: outcome and prognostic factors. *J Am Soc Nephrol* 13:1271-1278, 2002
19. Meulders Q, Pirson Y, Cosns JP, Strihou vYD: Course of Henoch-Schonlein nephritis after renal transplantation. Report of 10 patients and review of the literature. *Transplantation* 58:1179-1186, 1994
20. Mollica F, Li Volti S, Garozzo R, Russo G: Effectiveness of early prednisone treatment in preventing the development of nephropathy in anaphylactoid purpura. *Eur J Pediatr* 151:140-144, 1992
21. Saulsbury FT: Corticosteroid therapy does not prevent nephritis in Henoch-Schonlein purpura. *Pediatr Nephrol* 7:69-71, 1993
22. Rosenblum ND, Winter HS: Steroid effects on the course of abdominal pain in children with Henoch-Schonlein purpura. *Pediatrics* 79:1018-1021, 1987
23. Tryggvason K, Pettersson E: Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J Intern Med* 254:216-224, 2003
24. Campbell R, Sangalli F, Perticucci E, Aros C, Viscarra C, Perna A, Remuzzi A, Bertocchi F, Fagiani L, Remuzzi G, Ruggenti P: Effects of combined ACE inhibitor and angiotensin II antagonist treatment in human chronic nephropathies. *Kidney Int* 63:1094-1103, 2003
25. Woo KT, Lau YK, Wong KS, Chiang GS: ACEI/ATRA therapy decreases proteinuria by improving glomerular permselectivity in IgA nephritis. *Kidney Int* 58:2485-2491, 2000
26. Border WA, Noble NA: Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 31:181-188., 1998
27. Bitzer M, Sterzel RB, Bottinger EP: Transforming growth factor-beta in renal disease. *Kidney Blood Press Res* 21:1-12, 1998
28. Branton MH, Kopp JB: TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1:1349-1365., 1999
29. Campistol JM, Inigo P, Larios S, Bescos M, Oppenheimer F: Role of transforming growth factor-beta(1) in the progression of chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 16:114-116., 2001
30. Ledbetter S, Kurtzberg L, Doyle S, Pratt BM: Renal fibrosis in mice treated with human recombinant transforming growth factor-beta2. *Kidney Int* 58:2367-2376., 2000
31. Sharma K, Ziyadeh FN: The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. *Am J Physiol* 266:F829-842., 1994
32. Medeiros M, Sharma VK, Ding R, Yamaji K, Thangamani M, Valverde-Rosas S, A.M. H, Muñoz R, Suthanthiran M: Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNAlater. *J Immunol Methods* 279:135-142, 2003
33. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M: Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 344:947-954., 2001
34. Ding R, Li B, Muthukumar T, Dadhanian D, Medeiros M, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Sharma VK, Kapur S, Suthanthiran M: CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 75:1307-1312, 2003

35. Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Volk HD, Reinke P, Kapur S, Suthanthiran M: Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 75:1565-1570, 2003
36. Aguilón JC, Escobar A, Ferreira V, Aguirre A, Ferreira L, Molina MC et al. Daily production of human tumor necrosis factor in lipopolysaccharide (LPS) - stimulated *ex vivo* blood culture assays. *Eur Cytokine Netw* 2001; 12: 105-10.
37. Panigrahi A, Deka R, Bhowmik Dm Dash S, Tiwari S, Guleria S, Metha S, Mehra N. Funcional assessment of immune markers of graft rejection: a comprehensive study in live-related donor renal transplantation. *Clinical Transplantation*. 20(1):2006:85-90.
38. Humar I, Slavicek J; Puretic Z; Pasini J; Kerhin V, Marekovic Z. Serial Monitoring of pre and posttrasplant TH1 cytokine following renal transplantation. *Transplantation* 2004, 78(2) (suppl 1):731.
39. Rodríguez B, Pons H, Herrera J, Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* 56: 1626-1640, 2001
40. Wada T, Furuich K, Segawa-Takeda C, Shimizu M, Sakai M, Takeda SI, et al, MIP-alpha and MCP-1 contribte to creserts and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney int*1999, 56:995-1003.
41. Romagnani P. Beltrame Ch. Annunziato F. Role for Interactions Between IP10/Mig and CXCR3 in Proliferative Glomerulonephritis *J Am Soc Nephrol* 1999, 10: 2518-2526
42. Teo, I.A., Shaunak, S. 1995. «PCR *in situ*: aspects which reduce amplification and generate false-positive results». *Histochem. J.* 27:660.
43. Higuchi R, Kwork S. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-8