

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



*Expresión de TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, Perforina, región VP1 del virus BK y 18S en células del sedimento urinario en pacientes pediátricos en el primer año postrasplante renal y su relación con la presencia de rechazo.*

**TESIS**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN  
PEDIATRÍA**

**PRESENTA:**

**DRA. MAGDA VIANNEY SEGUNDO RUBIO  
ASESOR DE TESIS: DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO**

**MÉXICO, DF. SEPTIEMBRE 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**TESIS**

*Expresión de TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, Perforina, región VPI del virus BK y 18S en células del sedimento urinario en pacientes pediátricos en el primer año postrasplante renal y su relación con la presencia de rechazo.*

---

**DR. JULIO JOSÉ FRENK MORA**  
**SECRETARIO DE SALUD**

---

**DR. JOSÉ I. SANTOS PRECIADO**  
**DIRECTOR GENERAL**

**TESIS**

*Expresión de TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, Perforina, región VP1 del virus BK y 18S en células del sedimento urinario en pacientes pediátricos en el primer año postrasplante renal y su relación con la presencia de rechazo.*

---

**DRA. VESTA RICHARDSON-COLLADO**  
**DIRECTOR MÉDICO**

---

**DR. JOSÉ D. GAMBOA MARRUFO**  
**SUBDIRECTOR DE ASISTENCIA MÉDICA**

---

**DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO**  
**DIRECTORA DE TESIS**

## *AGRADECIMIENTOS*

*Doy gracias a Dios por darme la oportunidad y la salud para alcanzar mis metas.*

*Gracias a mis padres por todo su amor, comprensión y apoyo incondicional en todo momento, en especial a mi madre por darme la vida y fortaleza para cumplir mis metas*

*Gracias a mis hermanos y sobrinos porque con su presencia y amor me han dado la alegría y motivación para seguir adelante.*

*Gracias Dra. Medeiros por apoyarme y enseñarme tanto en este proyecto así como darme la oportunidad de descubrir las innovaciones de la biología molecular, su aplicación y la importancia de su desarrollo en beneficio de nuestros niños.*

*Gracias a todos mis maestros por haberme brindado sus conocimientos y experiencias con las cuales he llegado a ser lo que soy.*

*Sobre todo gracias a todos los niños que me dieron la oportunidad de conocerlos, convivir con ellos y enriquecer con su amor mi vida me los llevo en el corazón.*

*Magda Vianney.*

## INDICE

1. Portada.....	1
2. Firmas.....	2
3. Agradecimientos.....	4
4. Índice.....	5
5. Objetivos.....	6
6. Antecedentes.....	7
7. Marco teórico.....	10
8. Planteamiento del problema.....	17
9. Justificación.....	18
10. Hipótesis.....	19
11. Características del lugar donde se desarrolló el estudio.....	20
12. Tipo de estudio.....	21
13. Limitaciones del estudio.....	22
14. Cronograma.....	23
15. Población.....	24
16. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	25
17. Plan de análisis estadístico.....	26
18. Definición de las variables con escala de medición.....	27
19. Material.....	28
20. Métodos.....	29
21. Financiamiento.....	31
22. Factibilidad y aspectos éticos.....	32
23. Medidas de seguridad.....	33
24. Análisis estadístico.....	34
25. Resultados.....	36
26. Conclusiones.....	48
27. Discusión.....	49
28. Bibliografía.....	50

## OBJETIVOS:

- General:
  - Valorar la expresión de moléculas en orina como TGF- $\beta_1$ , Perforina, virus BK y I8S en pacientes pediátricos post operados de trasplante renal.
- Específicos:
  - Conocer la expresión de TGF- $\beta_1$  en pacientes post-operados de trasplante renal con rechazo crónico.
  - Conocer la expresión de perforina en pacientes post-operados de trasplante renal con rechazo agudo.

## ANTECEDENTES:

La enfermedad renal crónica tiene implicaciones diferentes en los niños que en los adultos, ya que afecta directamente el desarrollo normal. Actualmente el trasplante renal es un tratamiento bien establecido de la insuficiencia renal terminal. Se estima en unos 250.000 los trasplantes renales efectuados hasta ahora en el mundo, en nuestro país suman cerca de 1.500. Se reporta que en el HIMFG el 57% de los pacientes trasplantados entre 1967-1981 fallecieron por rechazo y sepsis, aunque se ha observado que la sobrevida del injerto se ha incrementado y que es mejor en los pacientes con riñón de donador vivo relacionado que en los pacientes con riñón cadavérico (80% contra un 68% respectivamente). Los niños tienen la mejor sobrevida del injerto sobrepasando la que tienen los adultos receptores de riñón con HLA idéntico, sin embargo los adolescentes tienen la menor sobrevida del injerto a largo plazo y se ha atribuido a mala adherencia terapéutica. La mortalidad en el HIMFG ha mostrado una disminución drástica, siendo actualmente 4.3%, similar a la que presenta NAPRTCS de 4.8% esta mejoría se atribuye a una mejor inmunosupresión y vigilancia en el periodo pos-trasplante<sup>(1)</sup>.

A los tres años pos-trasplante casi 70% de nuestros pacientes han presentado un rechazo agudo comparado con 60% de NAPRTCS cabe mencionar que si se analiza por año de trasplante cada vez tenemos menor incidencia de rechazo gracias a los nuevos esquemas de inmunosupresión que incluyen el uso de anti-CD25 (basiliximab), inhibidores de calcineurina, mofetil micofenolato y sirolimus<sup>(1)</sup>.

La biopsia renal es el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo, pero aunque se han disminuido las complicaciones asociadas al procedimiento tales como hematuria, anuria, hematoma perirenal, sangrado, choque, fistulas arteriovenosas, y pérdida del injerto no se han erradicado por completo, por lo que es de gran importancia diseñar métodos diagnósticos no invasivos con la finalidad de disminuir estos riesgos. En los últimos años muchos investigadores se han encargado de describir nuevas estrategias para el seguimiento de los pacientes con trasplante renal, entre las que destacan la aplicación de técnicas de biología molecular, todo esto gracias al proyecto genómico<sup>(2,3)</sup> que contó con el objetivo fundamental de revelar la totalidad de los genes que comprenden el genoma humano, identificándose 30 000.

Actualmente el ácido ribonucleico puede aislarse fácilmente de células del sedimento urinario y ser utilizado para medir la expresión de diversas moléculas en forma cuantitativa



por medio de PCR en tiempo real, por ejemplo se ha observado que la determinación de la expresión de Granzima B y Perforina permiten establecer el diagnóstico de rechazo agudo en pacientes adultos con una sensibilidad y especificidad de 80% sin necesidad de realizar una biopsia renal<sup>(4)</sup>. La búsqueda de otro tipo de moléculas tales como CD103, IP9 permite predecir el grado de infiltración tubular y provee información sobre la fisiopatología del rechazo<sup>(5,60)</sup>. La PCR en orina también puede ser utilizada para cuantificar la expresión de agentes patógenos capaces de producir nefritis y disfunción del injerto, como es el caso del virus BK(1). La nefritis por virus BK se ha identificado como una causa importante de disfunción y pérdida del injerto renal que se observa cada vez con mayor frecuencia debido a la introducción de nuevos y más potentes agentes inmunosupresores. El estándar de oro para el diagnóstico de nefritis es la biopsia renal, sin embargo este procedimiento está sujeto a errores de muestreo principalmente en lesiones focales y si no se cuenta con inmunohistoquímica puede confundirse con otras causas de disfunción del injerto tales como rechazo y toxicidad por medicamentos. También se han empleado técnicas basadas en la detección del ADN viral sin embargo no son capaces de distinguir entre una infección latente y la reactivación. Recientemente se describió el uso de PCR en tiempo real estudiando la expresión de ARN mensajero en vez de ADN en células del sedimento urinario como un método confiable y no invasivo para establecer el diagnóstico de nefritis por virus BK en pacientes adultos con trasplante renal<sup>(59)</sup>. No se sabe si los valores de corte empleados en adultos pueden extrapolarse a la población pediátrica, en quienes la proporción de pacientes que cursan con primoinfección es mayor. Actualmente se lleva a cabo un estudio en nuestro hospital en donde se determina si hay infección activa por virus BK mediante la cuantificación por PCR en orina en forma trimestral en todos los pacientes con trasplante renal.

Contamos con algunos estudios en la literatura internacional que se enfocan en descubrir el papel de la expresión génica de diferentes moléculas que pueden funcionar como marcadores de rechazo en pacientes trasplantados renales como es el caso de TGF- $\beta_1$  quien tiene una función importante en procesos inmunes e inflamatorios y que actúa como un quimio-atrayente para fibroblastos.<sup>(6-9)</sup>

El factor transformador de crecimiento TGF- $\beta_1$  es una molécula con múltiples acciones en la reparación tisular y con potentes propiedades fibrogénicas<sup>(5)</sup>. Diferentes estudios se han dado a la tarea de mostrar los mecanismos de acción de este factor así como sus propiedades y características de acción. Se ha encontrado que las propiedades inmunosupresoras y pro inflamatorias del TGF- $\beta_1$  requieren de bajas concentraciones séricas a diferencia de las altas concentraciones necesarias para inducir fibrosis mediante la inhibición de colagenasas y metaloproteasas<sup>(10)</sup>. Se ha observado que juega un papel importante en el desarrollo de fibrosis tisular ya que su principal propiedad es la promoción de la matriz celular principalmente de colágena lo que ha generado la demostración en muchos estudios del desarrollo de glomerulonefritis proliferativa mesangial, nefropatía diabética, enfermedades glomerulares crónicas, rechazo alógeno crónico y toxicidad crónica de la ciclosporina<sup>(5)</sup>. Otros estudios por inmunohistoquímica en biopsias renales detectaron una alta expresión del TGF- $\beta_1$  en rechazo crónico, así como en el agudo encontrándose principalmente en áreas de fibrosis completa y zonas de esclerosis global por lo que se ha propuesto a esta molécula de expresión como un marcador de glomerulopatía alógena<sup>(11,12)</sup>. Por todo esto se puede concluir que contamos con datos que documentan la

expresión de TGF- $\beta_1$  séricos y en biopsia que fundamentan el rol de esta molécula en la fibrosis intersticial y nefropatía crónica del injerto. Finalmente ya tenemos reportes de la expresión de TGF- $\beta_1$  en células obtenidas de orina, estudios que no han sido realizados en el ámbito pediátrico en México por lo que representaría un avance para el diagnóstico no invasivo y precoz de rechazo renal crónico.

La Perforina y la granzima B son moléculas que se presentan en la activación de las células T citotóxicas que caracterizan al rechazo agudo, se ha observado que la perforina es una proteína formadora de un poro y la Granzima B una serinpeptidasa componente fundamental de la maquinaria lítica de las células citotóxicas que se presentan en rechazo agudo del injerto<sup>(4)</sup>. Estudios en adultos reportan la presencia de estas moléculas en la mayoría de los episodios de rechazo agudo, aunque se observó que no se correlaciona con los hallazgos histológicos de severidad del rechazo<sup>(15)</sup>. El más significativo es aquel en el que determinan las cantidades de proteínas citotóxicas, codificadas por RNA mensajero, de las células urinarias procedentes de muestras de orina de pacientes que habían sido trasplantados de riñón, y en los que la biopsia había confirmado el rechazo agudo encontrando que las cantidades de perforina y granzima B codificadas por RNAm, eran más elevadas en las muestras de orina de los pacientes con rechazo agudo que en los que no se producía el rechazo. Los análisis demostraron que el rechazo agudo podía ser pronosticado con una sensibilidad y especificidad del 83 por ciento<sup>(4)</sup>. Djamali y cols. demostraron la expresión de la perforina y su relación con los episodios de rechazo agudo en pacientes adultos encontrándose que la expresión de perforina es sensible pero no específica para el rechazo agudo en el trasplante renal.

En el hospital infantil de México no se han realizado estudios en células urinarias sobre expresión molecular de TGF- $\beta_1$  y Perforina en pacientes receptores de trasplante renal y aún menos su correlación con la presencia de rechazo del injerto por lo que consideramos de importancia valorar la presencia de estas moléculas de expresión y su relación en pacientes trasplantados con y sin rechazo.

## MARCO TEORICO:

La enfermedad renal crónica tiene implicaciones diferentes en los niños que en los adultos, ya que afecta directamente el desarrollo normal. También destacan las diferencias en la etiología, la actividad del sistema inmune, la biodisponibilidad y toxicidad de medicamentos, además del tipo de complicaciones postrasplante. La terapia de reemplazo renal (diálisis o trasplante) esta indicada cuando el paciente presenta complicaciones de uremia que incluyen: síntomas de la uremia, falta de crecimiento a pesar de un adecuado aporte calórico, retraso en el desarrollo psicomotor, alteraciones hidroelectrolíticas y osteodistrofia renal.<sup>(1)</sup>

El trasplante renal es hoy un tratamiento bien establecido de la insuficiencia renal terminal. Se estima en unos 250.000 los trasplantes renales efectuados hasta ahora en el mundo, en nuestro país, suman cerca de 1.500. Es el tratamiento óptimo para los niños con insuficiencia renal crónica terminal porque permite un desarrollo psicomotor que no se alcanza con otros métodos de rehabilitación, hace algunas décadas los niños eran considerados de muy alto riesgo para un trasplante renal pero gracias a los avances en la técnica quirúrgica, tratamiento inmunológico y nuevos medicamentos inmunosupresores hoy en día los pacientes pediátricos tienen la mejor sobrevida del injerto que los otros grupos de edad <sup>(1)</sup>.

Existen pocas contraindicaciones para un trasplante renal como: procesos malignos activos, pruebas cruzadas positivas, daño cerebral debilitante e irreversible, infección por VIH, hepatitis B crónica activa y dentro de las contraindicaciones relativas encontramos: enfermedad auto-inmune activa con niveles elevados de anticuerpos antimembrana basal glomerular, incompatibilidad ABO con el donador, retraso en el desarrollo psicomotor o trastorno psiquiátrico que requiera custodia permanente, infección crónica por virus de hepatitis C, falta de adherencia terapéutica, falta de supervisión y apoyo familiar adecuado. Recientemente ha habido un interés por el trasplante predialisis, ya que evita a los niños la incomodidad del método dialítico, y los resultados a largo plazo son mejores.

A los tres años postrasplante casi 70% de nuestros pacientes han presentado un rechazo agudo comparado con 60% de NAPRTCS cabe mencionar que si se analiza por año de trasplante cada vez tenemos menor incidencia de rechazo gracias a los nuevos esquemas de inmunosupresión que incluyen el uso de anti-CD25 (basiliximab), inhibidores de calcineurina, mofetil micofenolato y sirolimus. En realidad esta es una tendencia mundial y actualmente la principal causa de ingreso hospitalario ya no es el rechazo agudo sino las infecciones postrasplante. Incluso han emergido nuevos agentes que pueden comprometer el futuro del injerto como son el poliomavirus. La introducción de nuevos inmunosupresores ha tenido un beneficio importante en la disminución de la incidencia de

rechazos, sin embargo, han surgido otros problemas como la enfermedad linfoproliferativa postrasplante.

A pesar de los avances en terapia inmunosupresora, el rechazo del injerto continúa siendo una de las principales causas de la disfunción y pérdida del mismo <sup>(16,17)</sup>, si bien es verdad que el porcentaje de rechazos, sobre todo de tipo celular agudo, ha variado notablemente en relación con los diferentes protocolos de inmunosupresión que históricamente se vienen utilizando. Cuando hay disfunción del injerto, el primer objetivo de la biopsia es confirmar o descartar la existencia de un rechazo, intensidad del mismo y pronóstico.

Clásicamente el diagnóstico de rechazo agudo (RA). Se basa en las características clínicas de la disfunción del injerto y la comprobación histológica de la existencia de una respuesta inmunológica. El rechazo ha sido dividido en varios subgrupos, teniendo en cuenta no solo la clínica sino también la cronología, el tipo de respuesta inmune (celular o humoral), y las características de las lesiones renales. Clásicamente se describen: rechazo hiperagudo, rechazo agudo túbulo intersticial (RATI), vascular (RV), y rechazo crónico (RC).

### **Rechazo hiperagudo.**

Es la forma más precoz de rechazo, su desarrollo es de forma inmediata una vez puesto en contacto el injerto con la circulación sanguínea del receptor, está mediado por anticuerpos circulantes preformados <sup>(18,19)</sup>. Microscópicamente se encuentra trombosis de pequeñas arterias, arterias terminales y capilares glomerulares, formación de hemorragias intersticiales, microinfartos e incluso una necrosis cortical renal.

### **Rechazo vascular.**

Clínicamente se manifiesta por un deterioro brusco de la función renal, generalmente resistente a bolos de metilprednisolona y se asocia a una alta tasa de pérdida de injerto que alcanza un 75%, es similar a cualquier vasculitis, las características dependerán del momento evolutivo en el que se realiza la biopsia. Debemos tener la sospecha de un rechazo vascular, ante una clínica de insuficiencia renal aguda, con presencia de un componente inflamatorio intersticial, necrosis tubular aguda y resistencia al tratamiento con metilprednisolona <sup>(20)</sup>.

### **Rechazo túbulo intersticial.**

El rechazo agudo túbulo intersticial (RATI) es más frecuente que el RV y puede ocurrir en cualquier momento de la evolución después del trasplante, se caracteriza por una nefritis intersticial con predominio de linfocitos CD4, localizados perivascularmente y CD8 en el rechazo establecido <sup>(21-23)</sup>, se debe hacer diagnóstico diferencial con otras causas de infiltrados celulares como son infecciones virales, nefritis tóxicas y enfermedad linfoproliferativa <sup>(24)</sup>.

Es muy importante la aplicación de los criterios de Banff no solo para el diagnóstico sino también para graduar la intensidad del rechazo. Basándonos en dichos criterios, es

necesario la presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario, destrucción de membrana basal tubular y tubulitis <sup>(25)</sup>.

## TABLA II. CLASIFICACION DE BANFF

### GRADO I (AGUDO LEVE)

- 1.- Inflamación intersticial mayor del 25% del parénquima.
- 2.- Tubulitis >4 células mononucleadas por sección tubular o grupo de 10 células tubulares.

### GRADO II (AGUDO MODERADO)

- 1.- Inflamación intersticial evidente y tubulitis >10 células mononucleares por sección tubular y/o
- 2.- Leve-moderada arteritis de la intima.

### GRADO III (SEVERA)

- 1.- Arteritis severa transmural con cambios fibrinoides y/o necrosis de la media y/o
- 2.- Infarto focal o hemorragia intersticial.

### Rechazo crónico.

Es el cuadro clínico e histológico más heterogéneo y en el que factores no inmunológicos pueden jugar un papel importante. El cuadro clínico consiste generalmente en deterioro progresivo y lento de la función renal, proteinuria y/o hipertensión arterial. Sin duda alguna el rechazo crónico es un diagnóstico por exclusión<sup>(26)</sup>.

El RC es la forma más frecuente de disfunción tardía del injerto con una incidencia en los primeros 5 años post-trasplante muy variable entre un 4-40% <sup>(26)</sup>. La patogenia no está bien establecida pero se conocen diversos factores de riesgo como son: incompatibilidad HLA, dosis y tipos de inmunosupresión, y crisis subclínicas de RATI <sup>(21)</sup>. Pero también se atribuyen factores no inmunológicos como pérdida de masa renal funcionante, isquemia, hiperlipidemia <sup>(21)</sup>. Un marcador clínico de pronóstico es la proteinuria, ya que una vez detectada tan solo un 6% de los injertos eran funcionantes al 4º año <sup>(26)</sup>. Histológicamente el marcador más importante es la fibrosis, donde el TGF-β1 juega un papel importante. El RC se clasifica en cuatro grados atendiendo a la extensión de fibrosis intersticial, grado de atrofia tubular, e intensidad de vasculopatía <sup>(28,29)</sup>.

Como se ha descrito la biopsia es el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo, recientemente se han disminuido pero no eliminado las complicaciones asociadas tales

como hematuria, anuria, hematoma peri renal, sangrado, choque, fistulas arteriovenosas, y perdida del injerto, por lo que el diseño de un eficaz y no invasivo método de diagnóstico es el reto principal. En los últimos años se han descrito nuevas estrategias para el seguimiento de los pacientes con trasplante renal. Aplicando técnicas de biología molecular, donde el ácido ribonucleico puede aislarse fácilmente y ser utilizado para medir la expresión de diversas moléculas en forma cuantitativa por medio de PCR en tiempo real.

Es importante conocer la función de las moléculas seleccionadas para este estudio de tal manera que podamos entender la importancia de su expresión.

Sabemos que la granzima B y la perforina forman parte de la maquinaria lítica de las células citotóxicas presentes durante el proceso de rechazo agudo. Ya que la perforina actúa en la fase efectora o de ataque y destrucción de la célula diana, los monómeros de perforina contenida en los granulosomas llegan a la membrana de la célula diana, y en presencia de  $Ca^{++}$  se polimerizan para formar cilindros huecos de poliperforina (con unas 20 unidades), que atraviesan la bicapa lipídica. De este modo se forma un canal (con un diámetro de 5-20 nm) que es permeable a iones, y que puede provocar la lisis osmótica de la célula diana (aunque su papel principal es servir como canal para dejar pasar a otros componentes de los gránulos). Pero no siempre el efecto de la poliperforina es la lisis, en otros casos parece que el papel de los canales es el de permitir la entrada de otras sustancias del granulosoma que inducen la apoptosis de la célula diana. De hecho se ha visto que pueden entrar fragmentinas (granzimas) que inducen la fragmentación de los cromosomas en múltiplos de nucleosoma. Ahora bien, este efecto es indirecto: las fragmentinas no son DNAasas, sino proteasas.

En cuanto al papel del TGF- $\beta$  fue descrito en 1978 de un factor de crecimiento del sarcoma, que provenía de un extracto de células transformadas por virus, que causaba que los fibroblastos de riñón de rata normal crecieran en medio con agar<sup>(13)</sup>. Cuando este extracto fue purificado, se encontró que la habilidad para causar el crecimiento era el resultado de dos péptidos nombrados posteriormente TGF- $\beta_1$  y TGF- $\beta_2$ <sup>(40)</sup>

El TGF- $\beta$  es una superfamilia de proteínas integrada por más de 35 citocinas que incluye a las activinas, inhibinas, proteína morfogénica de hueso, hormona anti-mülleriana y al TGF- $\beta$  que regulan una gran cantidad de actividades biológicas como proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares, tanto en el estado adulto como durante el desarrollo embrionario<sup>(40)</sup>. Puede estimular la proliferación de fibroblastos normales en células no epiteliales y cierto tipo de células mesenquimales. Es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; además, induce la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular. Existen cinco isoformas del TGF- $\beta$ , es producido como un precursor dimérico de 25 kDa, secretado en forma latente que posee 390 aminoácidos, en el cual la porción C-terminal de 112-114 aminoácidos posee nueve residuos de cisteína, y es la región activa después de que es cortada proteolíticamente en el aminoácido 278<sup>(42,43,44)</sup>.

Se han descrito tres tipos de receptores para que el TGF-B lleve a cabo su señalización (TGF- $\beta$ RI de 53 a 65 kDa, TGF- $\beta$ RII con 83 a 110 kDa y TGF- $\beta$ RIII que va de 250 a 310

kDa), en mamíferos, sólo cinco receptores tipo II y siete tipo I han sido identificados, y descritos 29 ligandos. En ausencia de ligando, los receptores tipo I y II existen como homodímeros en la superficie celular. El ensamblaje del complejo heteromérico es iniciado por la unión del ligando y estabilizado por las interacciones entre los dominios citoplásmicos de los receptores tipo I y II<sup>(42,48)</sup>. Los efectos de las isoformas del TGF- $\beta$  están asociados a su disponibilidad, a la combinación de los tipos de receptores y a la vía de señalización intracelular que inducen<sup>(49,50)</sup>. Todas las células normales y la mayoría de las células neoplásicas tienen receptores en su superficie para el TGF- $\beta$ 1. Los receptores I y II son los responsables de los efectos biológicos del TGF- $\beta$ 1 en mamíferos<sup>(42)</sup>

Las proteínas Smad han sido identificadas como las principales transductoras de la señalización del TGF- $\beta$ , median la señalización del receptor en la superficie celular a los genes blanco en el núcleo. Existen ocho proteínas Smad en vertebrados (Smad 1-Smad 8)

En el espacio extracelular, el TGF- $\beta$  se une al T $\beta$ RIII, el cual recluta al T $\beta$ RII y se autofosforila, o el TGF- $\beta$  se puede unir directamente al T $\beta$ RII anclado a membrana e inducir la atracción del T $\beta$ RI y su consecuente fosforilación. Esta fosforilación en el receptor tipo I activa a las cinasas en residuos de tirosina que fosforilan a los factores de transcripción Smad 2 y Smad 3; una vez fosforilados, forman un complejo con Smad 4 para trasladarse del citoplasma hacia el núcleo, donde interactúan de una manera específica con otros factores de transcripción como AP-1, regulando la transcripción de genes de respuesta al TGF- $\beta$  para llevar a cabo sus funciones biológicas de diferenciación, control del crecimiento, apoptosis celular y síntesis de matriz extracelular, entre otras (un ejemplo es el gen de colágena)<sup>(45,51)</sup>.

La sobreproducción del TGF- $\beta$  puede inducir la acumulación de una cicatriz fibrosa en diferentes órganos (hígado, riñón, pulmón), culminando con un estado patológico muy grave que en muchos casos lleva a la muerte<sup>(54,56)</sup>.

El papel del TGF- $\beta$  en varias enfermedades humanas puede darse de dos formas: la primera, involucra un incremento en la actividad, como ocurre en pacientes que cursan con fibrosis, y la segunda, en la que la actividad del TGF- $\beta$  decrece; tal es el caso del cáncer y de la aterosclerosis. Numerosos estudios experimentales encaminados a tratar de modular la expresión de esta citocina pleiotrópica en diferentes patologías han dado resultados satisfactorios; entre ellos tenemos a la administración de antioxidantes, drogas específicas, extractos de plantas, citocinas antagónicas, supresores de apoptosis, oligonucleótidos antisentido y herramientas de terapia génica con Smad 7, diseñadas específicamente para truncar la señalización del TGF- $\beta$ <sup>(57)</sup>.

Algunos investigadores han demostrado en diversos trabajos que la fibrosis pulmonar puede ser inducida experimentalmente por la sobreexpresión del TGF- $\beta$ 1 o mediante el envío de adenovirus que portan el cDNA del TGF- $\beta$  instilados en pulmón, con el objetivo de establecer un modelo que ayude a entender algunos aspectos cuantitativos de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 y tratar de manipular este potente factor como un mediador de fibrogénesis intersticial. Por otro lado, la terapia génica con la smad inhibitoria (Smad 7) bloquea la cascada de señalización e inhibe la fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina de manera similar, la administración de vectores adenovirales recombinantes,

que llevan inserto el cDNA del receptor tipo II del TGF- $\beta$  soluble, reduce la disponibilidad del TGF- $\beta$ 1 activo y protege al pulmón del daño inducido por radiación en ratas.

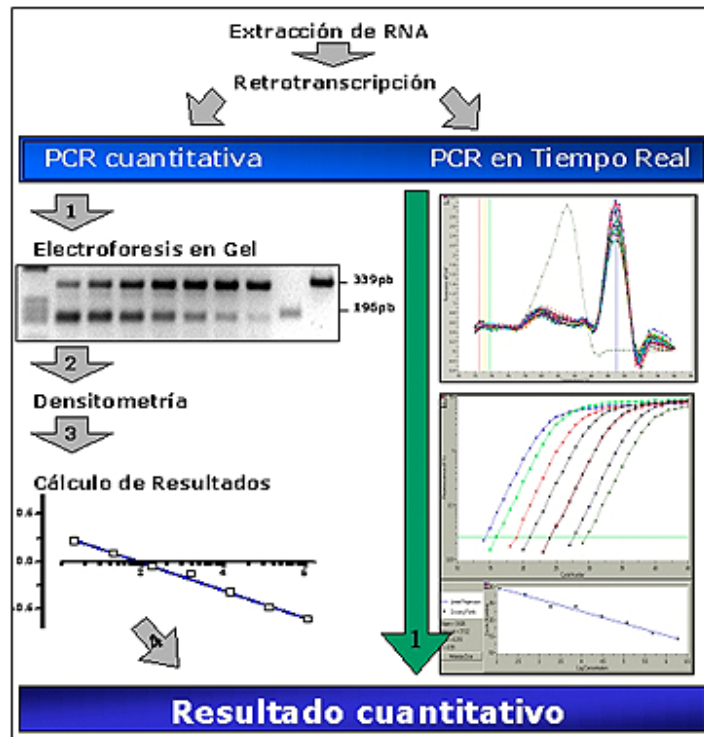
Los trabajos de Sato y colaboradores demuestran que la carencia de Smad 3, una intermediaria clave en la señalización del receptor del TGF- $\beta$ , protege al riñón de la fibrosis tubulointersticial, como se evidencia por el bloqueo de la transición epitelial-mesenquimal y de acumulación de colágena. Estos datos demuestran que la vía de Smad 3 es central en la patogénesis de la fibrosis intersticial y sugiere que los inhibidores de esta vía podrían tener aplicación clínica en el tratamiento de nefropatías obstructivas<sup>(57)</sup>.

Finalmente se ha extendido el uso de marcadores fluorescentes que permiten detectar en tiempo real la cantidad de producto de PCR que se está generando en cada ciclo, denominándose a estas nuevas metodologías qRT-PCR en tiempo real o qRT-PCR cinética.<sup>(38,39)</sup>

La utilidad de la qRT-PCR en el análisis de expresión en células procedentes de la orina abre una opción diagnóstica de apoyo en el rechazo agudo. Los potenciales riesgos asociados a la obtención percutánea de biopsias renales, así como los potenciales errores de muestreo, por lo que la PCR se ha utilizado para cuantificar la expresión de agentes patógenos capaces de producir nefritis y disfunción del injerto, como es el caso del virus BK, así como moléculas relacionadas con la progresión del daño renal como el TGF- $\beta$ 1. La retro-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR) ha permitido determinar los niveles de expresión de numerosos genes relacionados con el rechazo, tanto agudo como crónico todos estos avances han conducido a valorar un método no invasivo de diagnóstico basado en la expresión de Granzima B y Perforina en células procedentes de orina de pacientes trasplantados<sup>(4)</sup>.

Se han realizado estudios de expresión con microensayos tanto en pacientes con rechazo agudo como crónico<sup>(30,31,32)</sup>. También han aparecido recientemente publicaciones enfocadas a la búsqueda de marcadores diagnósticos y pronósticos<sup>(33,34)</sup>. En algunos estudios se respalda la idea de que el TGF- $\beta$  puede jugar un papel importante en las primeras fases post-trasplante<sup>(35)</sup>, ya que los pacientes que no desarrollaron NCIR presentaban niveles más elevados de RNA mensajero para TGF- $\beta$ 1<sup>(36)</sup>. La búsqueda de otro tipo de moléculas tales como CD103, IP9 permite predecir el grado de infiltración tubular y provee información sobre la fisiopatología el rechazo<sup>(16)</sup>. Así también se ha observado que 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<sup>(4)</sup>.





Esquema comparativo de PCR competitiva y PCR en tiempo real cuantitativa.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

- No existen estudios sobre valoración de la expresión de genes en células de sedimento urinario en pacientes pediátricos con trasplante renal.
- Identificar si la expresión de genes de proteínas citotóxicas y pro-fibroticas son predictivos de la evolución del rechazo renal y establecer así la posibilidad de otra perspectiva diagnóstica.
- Valorar si los pacientes con rechazo agudo tienen mayor riesgo de hacer infección activa por virus BK.
- Valorar la expresión de perforina para la identificación precoz de rechazo agudo.
- Valorar la expresión de TGF- $\beta_1$  corregido en pacientes con rechazo crónico.

## JUSTIFICACIÓN:

El rechazo agudo y su detección precoz mediante un método no invasivo es un reto diagnóstico para tratar de evitar las complicaciones ocasionadas por la biopsia renal que actualmente es el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo.

El tratamiento del rechazo agudo, que incluye bolos de metilprednisolona y/o anticuerpos anti-CD3 puede exponer a los pacientes al desarrollo de infecciones incluyendo virus BK.

El estudio de la expresión génica de proteínas citotóxicas (perforina y granzima B) ha demostrado su utilidad para diagnóstico de rechazo agudo en pacientes adultos, aun antes de que exista elevación de creatinina sérica. No se han descrito aun marcadores génicos de rechazo crónico, pero sabemos que el TGF- $\beta_1$  es una proteína que participa en el desarrollo de fibrosis, evento final de esta patología.

El presente estudio pretende valorar la expresión de estas moléculas en células del sedimento urinario de pacientes pediátricos y determinar si pueden predecir la evolución del injerto.

### HIPOTESIS:

- La determinación de TGF- $\beta_1$  permite identificar a los pacientes que desarrollarán rechazo crónico en el primer año post-trasplante renal.
- La expresión de perforina se relaciona con la presencia de rechazo agudo.
- Los pacientes con rechazo agudo tienen mayor frecuencia de infección por virus BK

## CARACTERISTICAS DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL ESTUDIO.

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

El estudio se llevo acabo en el hospital infantil de México “Federico Gómez” institución que cuenta con un número total de 300 camas censables, en el servicio de Nefrología Pediátrica ubicado en el 4to piso de la infraestructura hospitalaria. Donde se realizan alrededor de 30 trasplantes renales pediátricos anualmente.

TIPO DE ESTUDIO:

Se trata de un estudio de tipo cohorte

### LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

Algunos medicamentos pueden modificar la producción de TGF- $\beta_1$  como la administración de antioxidantes, drogas específicas, extractos de plantas, citocinas antagónicas, supresores de apoptosis, oligonucleótidos antisentido y herramientas de terapia génica con Smad 7, diseñadas específicamente para truncar la señalización del TGF- $\beta$  y la expresión de perforina. Otros medicamentos pueden aumentar la expresión de TGF- $\beta_1$  como son los inhibidores de calcineurina.

Las muestras de orina utilizadas en este estudio son tomadas a los pacientes en forma prospectiva, cada mes los primeros tres meses y cada tres meses posteriormente. Algunos pacientes con rechazo agudo recibieron tratamiento con bolos de metilprednisolona antes de la colección de orina para PCR y esto puede modificar la expresión de moléculas citotóxicas.

## CRONOGRAMA

- Enero-Febrero 2006: Realizar Marco teórico y recabar antecedentes.
- Marzo-Julio 2006 captura de datos y determinación de niveles séricos.
- Julio 2006 análisis de datos obtenidos
- Agosto 2006 redacción de conclusiones.
- Agosto 2006 presentación de tesis

	2005		2006						
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
Realizar marco teórico y recabar antecedentes									
Presentación de proyecto de tesis									
Captura de datos y determinación de niveles sérico									
Análisis de datos obtenidos									
Redacción de conclusiones									
Presentación de tesis									



POBLACIÓN:

Pacientes del HIMFG, de cualquier edad y género, con diagnóstico de post-operados de trasplante renal con toma trimestral de muestras de orina en el primer año post-trasplante.

## CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION Y ELIMINACION

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Todos los pacientes pediátricos post-operados de trasplante renal que tengan seguimiento trimestrales con muestras de orina con tiempo mínimo de seguimiento de un año.
- Aceptación por escrito para participar en el estudio.

### CRITERIOS DE EXCLUSION Y ELIMINACION:

- Ausencia de expediente clínico
- Falta de datos en expediente clínico
- Pacientes que abandonaron seguimiento
- Pacientes con RNA en orina de calidad inadecuada para el estudio molecular en todas sus muestras

### PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO:

Se llevara acabo el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante:

- Estadística descriptiva
- Tabla de frecuencias
- Descripción de la población
- Correlación entre niveles séricos de TGF- $\beta_1$ , Perforina, Virus BK y 18S ribosomal con la presencia de rechazo

### DESCRIPCION DE LAS VARIABLES:

1. Edad: Variable cuantitativa continúa expresada en meses.
2. Sexo: Variable cualitativa, dicotómica (masculino y femenino).
3. Tipo de Trasplante renal: variable cualitativa dicotómica (donador vivo relacionado y donador cadavérico).
4. Valores de expresión génica en orina de TGF- $\beta$ 1, perforina, virus BK y 18S ribosomal en muestras prospectivas: Variable cuantitativa expresada en numero de copias por  $\mu$ g de RNA, y por gen objetivo/18S rRNA
5. Tipo de rechazo: Variable cualitativa dicotómica ( rechazo agudo y rechazo crónico)
6. Presencia de infección por virus BK: variable cualitativa que expresa la presencia o ausencia de la infección.

Nota: El diagnóstico de rechazo agudo y crónico se hará en base a los criterios de Banff por biopsia renal.

## MATERIAL Y METODOS

### **RECURSOS HUMANOS:**

3 Licenciados en química, uno de ellos con maestría en ciencias.

1 Médico pediatra especialista en nefrología, con doctorado en ciencias biomédicas

1 residente de 3<sup>er</sup> año de pediatría

### **RECURSOS MATERIALES:**

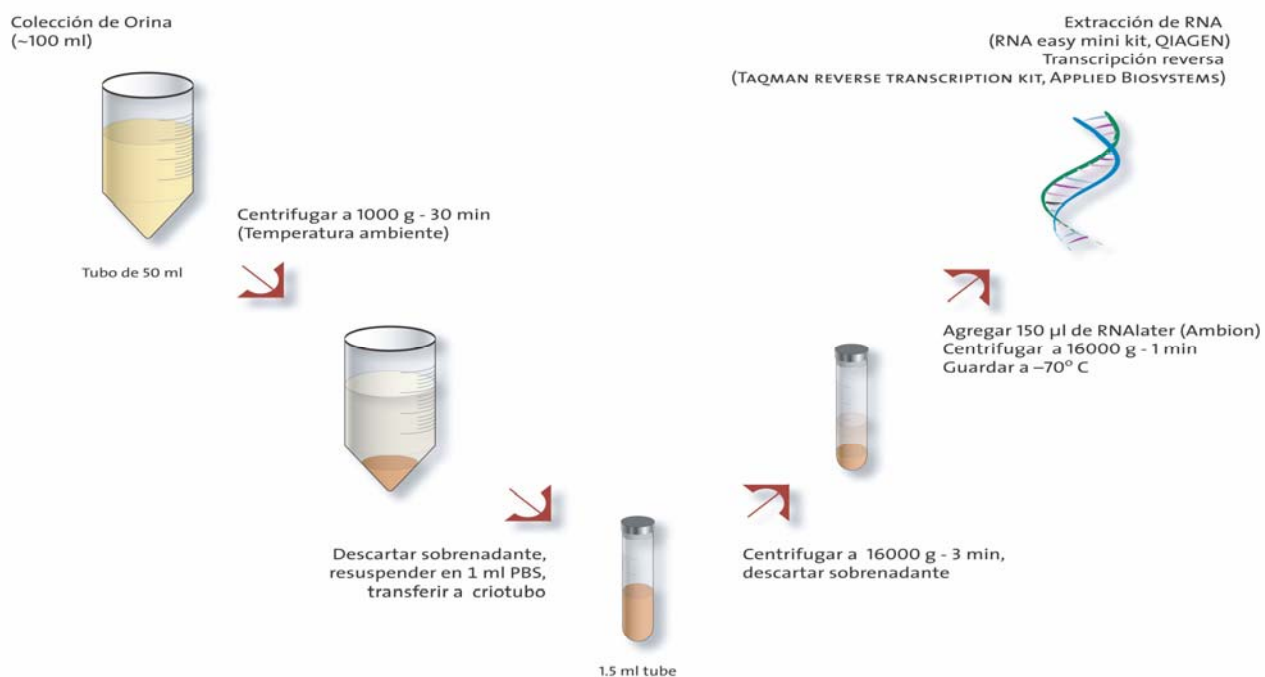
- Tubos cónicos de 50ml esterilizados.
- Solución de PBS 1x.
- 1 frasco de RNA Later.
- Microtubos de 1.7ml esterilizados.
- Puntas para micropipeta de 100-1000 $\mu$ l
- Puntas para micropipeta de 2-200  $\mu$ l
- Puntas para micropipeta de 1-10  $\mu$ l
- Jeringas de 1ml
- Agua libre de RNasa
- Kit QIA shredder.
- Mini-Kit (250) RNeasy.
- Kit Taq Man (reverse transcription reagents).
- Primers y Probes para perforina, virus BK, 18S y TGF- $\beta$ <sub>1</sub>.
- Campana de flujo laminar.
- 1 Microcentrifuga.
- 1 Vortex.
- 1 Nanodrop.
- 1 termociclador.
- 1 Equipo de tiempo real.
- 1 computadora personal hp pavilion zv5000.
- 1 impresora Lexmark X1100 series.

## METODOLOGIA

Se trata de un estudio de tipo cohorte en el cual se solicitó la autorización por escrito a cada paciente previo consentimiento informado para participar en el proyecto en el cual se recolectaría de manera trimestral una muestra de orina, con previa aceptación del paciente se realizó una revisión exhaustiva de los expedientes clínicos para obtener variables como edad, género, fecha de trasplante y de las visitas mensuales con la creatinina y resultados de EGO de cada una de estas, en aquellos pacientes con alteraciones en los laboratorios de control o deterioro clínico que hiciera pensar en rechazo del injerto se realizó toma de biopsia y se revisó exhaustivamente los reportes individuales de los hallazgos histopatológicos

La recolección de muestras de orina se realizó en forma trimestral en todos los pacientes con trasplante renal que han recibido el injerto en los últimos dos años. Se seleccionaron tomas semestrales y las muestras más cercanas a la fecha de diagnóstico de rechazo agudo o crónico y se determinó la expresión génica de TGF- $\beta_1$ , Perforina, virus BK y 18S rRNA mediante PCR en tiempo real.

### Colección y Extracción de ARN mensajero de orina



1. Se colecta orina de chorro medio en un recipiente estéril.
2. Se centrifugan uno o dos tubos de 50ml a 2000 RPM, temperatura ambiente por 30 min.
3. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento con 1mL de PBS, se vuelve a centrifugar por 3 minutos a 14000 RPM.
4. Se descarta el PBS y se agregan 150µl de RNA Later (Ambion).
5. Se guardan inmediatamente en un congelador a -70°C hasta que se extraiga el ARN mensajero. Para lo cual las células son homogenizadas utilizando una jeringa de 1ml con 350ul de buffer RLT (QIAGEN), el homogenizado se pasa por la columna QIA shredder para filtrar detritus insolubles y posteriormente por la columna de RNA easy mini kit (QIAGEN)
6. La cantidad y calidad del RNA se mide por espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop, con lectura a  $\lambda$ 260 y 280. Se considera un ARN de calidad adecuada para PCR cuando la relación 260/280 es entre 1.6 y 2.0.
7. Se hace transcripción reversa para obtener el cDNA complementario utilizando el kit de Transcripción reversa de Applied biosystems obteniendo un cDNA en concentración de 1µg en 100µl.
8. Cuantificación de expresión génica

La cuantificación de los niveles de ARN mensajero se hizo por PCR en tiempo real. Una técnica que permite la cuantificación rápida de la secuencia objetivo durante la fase exponencial de la PCR, con el aparato 7500 de Applied biosystems.

Las secuencias de oligonucleotidos para los genes estudiados se diseñaron con el programa Primer Express (Applied Biosystems). Las secuencias de TGF- $\beta_1$ , virus BK y Perforina fueron diseñadas para saltar intrones con el fin de evitar la amplificación de DNA. Las secuencias de 18S rRNA no pueden hacerse de esta manera porque no tiene intron.

Las reacciones de PCR en tiempo real se hicieron en un volumen de 25 µl utilizando 12.5µl de Taqman Universal master mix, 2.5 µl de cDNA de estudio y sondas sentido, antisentido y marcada. Las concentraciones de las sondas se individualizaron para cada gen para incrementar la eficiencia de la reacción de PCR. La amplificación de PCR consistió en un incubación inicial de 50 °C por 2 minutos, desnaturalización a 95 °C por 10 minutos y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por un minuto.

El amplicon del 18S rRNA fue preparado y cuantificado para preparar una curva estándar en tiempo real. El numero de copias del gen objetivo de la muestra se calculo al extrapolar el ciclo umbral (Ct) de fluorescencia en la muestra a la curva estándar. Los niveles de ARNm se expresaron como número de copias por microgramo de RNA total.

## FINANCIAMIENTO:

Los gastos del proyecto fueron absorbidos por el Hospital Infantil de México que es una institución comprometida con la sociedad y la niñez mexicana en la formación de recursos humanos de excelencia clínica y en investigación este compromiso lo adopto desde su fundación por el Dr. Federico Gómez y a lo largo de los años se ha esmerado en la evaluación de guías de manejo, diagnóstico y terapéutica de las diferentes enfermedades que aquejan a nuestra niñez. Además se ha caracterizado siempre por ir a la vanguardia en investigación innovando siempre técnicas diagnósticas o terapéuticas utilizando y perfeccionando los últimos avances internacionales.

Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) organismo creado por decreto presidencial en 1935 con la finalidad de Promover el desarrollo de la investigación científica y tecnológica, la innovación, el desarrollo y modernización tecnológica del país, con el apoyo del Fondo Sectorial al estudio CONAYT 2004-C01-193 “Estudio multicéntrico de infección por virus BK en pacientes con trasplante renal mediante seguimiento de la expresión de ARN mensajero de la región VP1 en orina”



## FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio se fundamenta en la experimentación previa realizada en otros países. Fundamentado y respetando los lineamientos éticos de Helsinki, apegándose a lo establecido en el reglamento de La Ley General de Salud en materia de investigación para la salud.

Una vez aprobada la investigación por el comité de enseñanza, investigación y ética del Hospital Infantil de México se recabo el consentimiento informado de los pacientes. El estudio fue realizado por profesionales de salud con conocimientos y experiencia para el manejo 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.

Además la probabilidad de los beneficios esperados supera los riesgos predecibles tomando en cuenta que es un método no invasivo y no compromete la vida de los pacientes.

MEDIDAS DE SEGURIDAD:

Si se encontraba calidad de RNA deficiente se tomo la muestra más cercana a la fecha establecida.

## ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó una hoja de captura de datos en el programa excell donde se recolectaron los datos de cada paciente en los que se incluía nombre, numero de expediente, fecha de transplante, fecha de cada visita de seguimiento, con los valores de creatinina, reporte de EGO y cifras de tensión arterial por visita, fecha de biopsia, resultado de la biopsia, numero de copias de perforina, TGF- $\beta_1$ , virus BK y 18S rRNA. Esta hoja de cálculo se extrapolo para poder ser utilizada en el programa de análisis estadístico SPSS para realizar el análisis y realizar medidas de tendencia central en las variables cualitativas, frecuencias, medias y correlaciones estadísticas. Para poder convertir los valores a logaritmo, se asigna la mitad del menor valor del grupo en vez de cero. Como sabemos que la expresión de genes depende de la calidad de la orina, y uno de los elementos que se consideran para decidir si es o no de buena calidad es el control interno (18S rRNA) que debe de ser por lo menos en el orden de  $10 \times 10^7$ , se eliminaron todas las muestras que tenían  $10 \times 10^6$ , que de hecho no tenían ninguna expresión de genes con lo que logramos evaluar la calidad de la muestra, quedando solo con 66 muestras para el análisis estadístico.

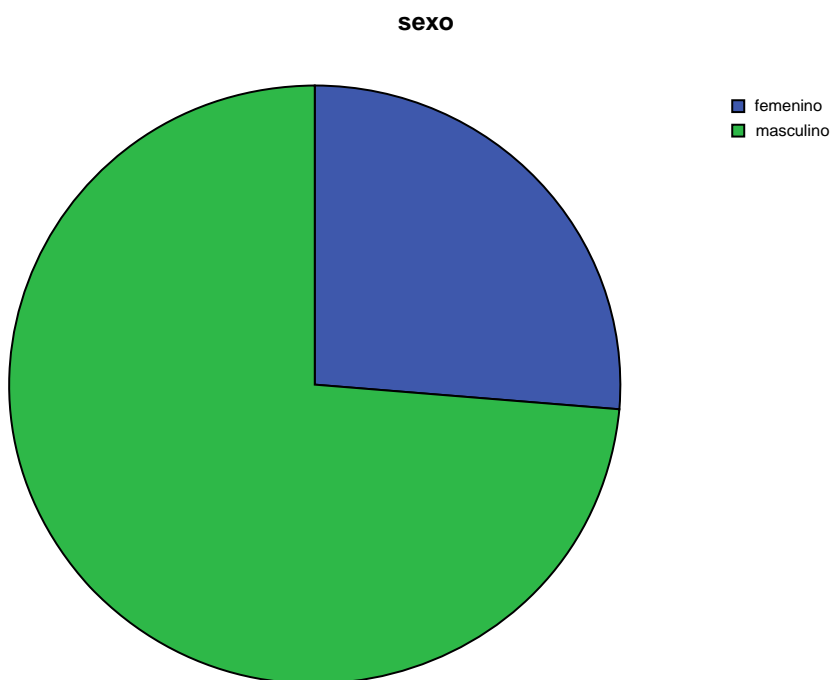
Se realizaron varias hojas en excell una con las copias por  $\mu\text{g}$  de RNA total, y otra con los valores corregidos con el control interno (gen/18S) que como no todas las columnas tienen una distribución normal no se puede aplicar prueba t de student sino la prueba de Mann whitney, y finalmente otra con los valores normalizados por 18S y transformados a logaritmo y con lo cual se logra tener una distribución normal y se puede aplicar la t de student, realizándose posteriormente la representación grafica.

## **RESULTADOS:**

Nuestra población total consto de 19 pacientes con la siguiente descripción poblacional:

**Tabla 1. Género de la población**

	Frecuencia	Porcentaje %
Femenino	5	26.3%
Masculino	14	73.7%
Total	19	100.0%

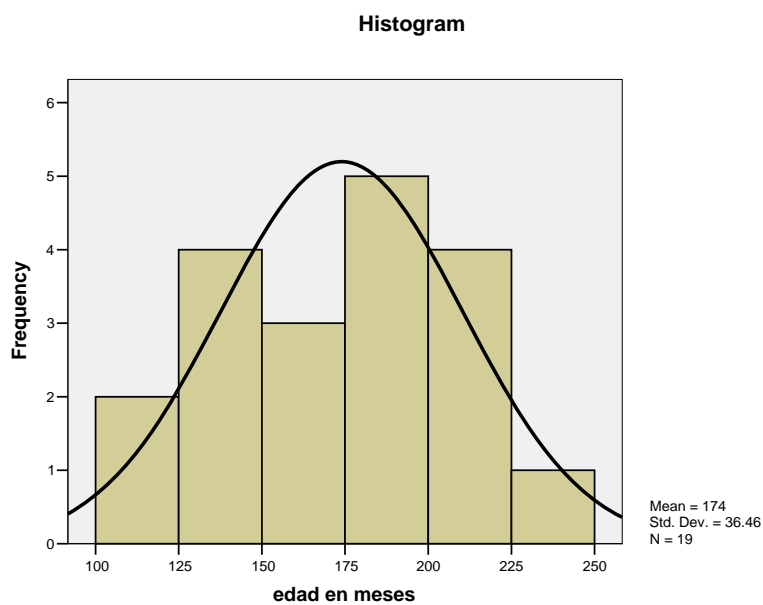


Se contó con 66 muestras de orina de buena calidad en 19 pacientes. 39 de ellas de 10 pacientes que presentaron rechazo agudo en algún momento de su evolución y 27 de 9 pacientes sin rechazo agudo.

Observándose una prevalencia de sexo mayor en el genero masculino y con la siguiente descripción de edad.

**Tabla 2. Edad**

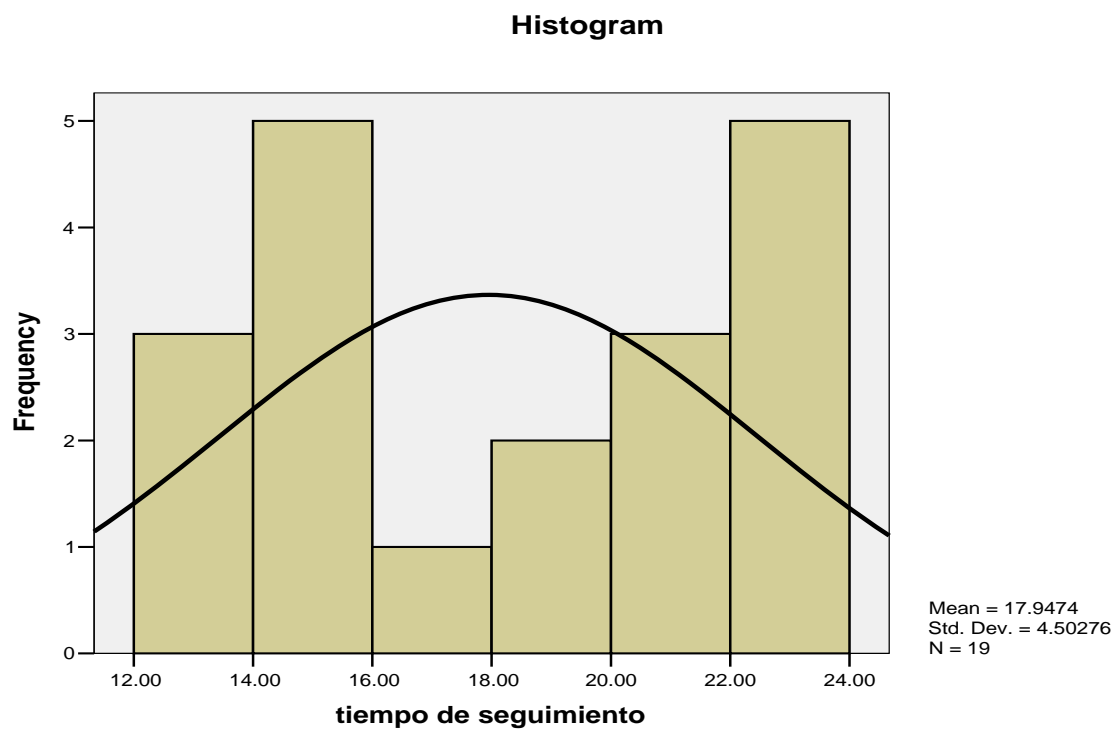
	Población total	Edad mínima en meses	Edad máxima en meses	Promedio	Desviación estándar
Edad en meses	19	103	243	174.00	36.460



El tiempo mínimo de seguimiento de los pacientes debía ser de un año especificado dentro de los criterios de inclusión como se muestra a continuación:

**Tabla 3. Tiempo de seguimiento en meses**

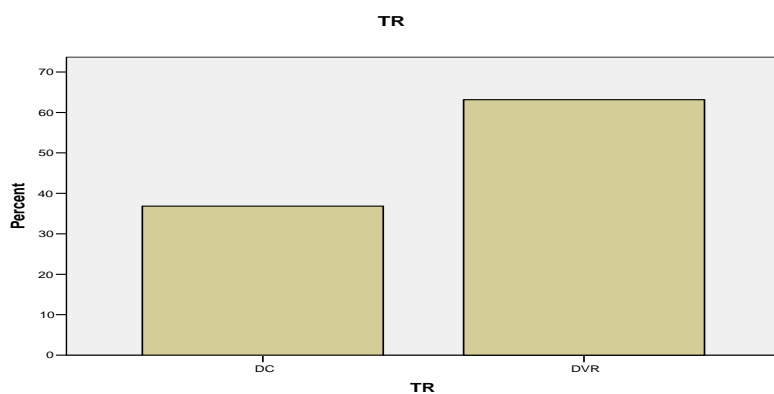
Promedio de seguimiento en meses	17.9474
Mediana	18.0000
Moda	14.00
Desviación estándar	4.50276
Tiempo Mínimo de seguimiento	12.00
Tiempo Máximo de seguimiento	24.00



Evaluamos el tipo de donador del trasplante renal, en el que observamos que nuestra población mayor fue de donado vivo relacionado como lo podemos observar en la tabla ilustrada abajo

Tabla 4. Frecuencia del tipo de Trasplante

	Frecuencia	Porcentaje
Donador cadavérico	7	36.8%
Donador vivo relacionado	12	63.2%
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100.0%</b>



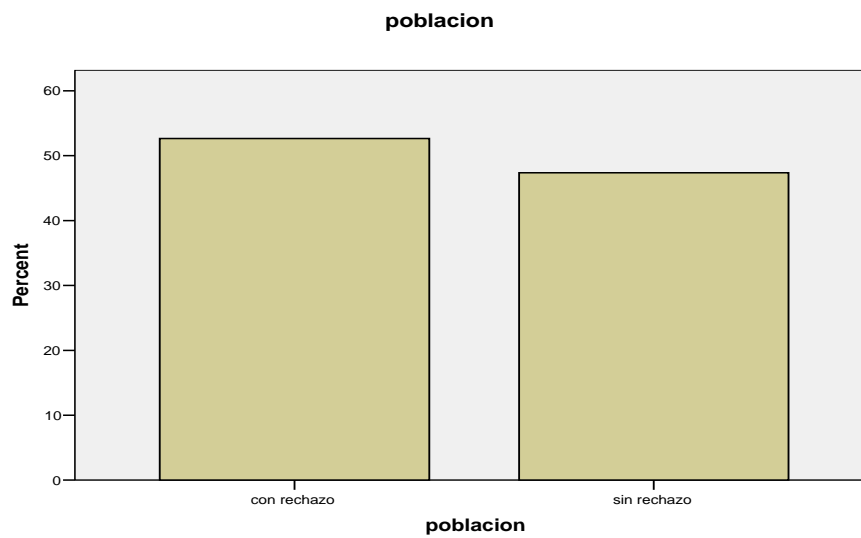
Posteriormente los pacientes se dividieron en dos grupos:

1. Pacientes con rechazo: considerando a este grupo como todos los pacientes con diagnóstico de rechazo agudo que cuentan con biopsia renal, por lo que fue necesario hacer una revisión exhaustiva de los reportes de biopsias renales en los que se reportara rechazo del injerto de cualquier tipo.
2. Pacientes sin rechazo: agrupando a todos los pacientes con creatinina estable (variación <math><0.3\text{mg/dL}</math>) durante el seguimiento.

Contando con una población final de 19 pacientes con y sin rechazo estableciendo nuestro grupo control como aquellos pacientes sin rechazo con cifras estables de creatinina con variación menor de 0.3mg/dl.

**Tabla 5. Población con y sin rechazo.**

	Frecuencia	Porcentaje
con rechazo	10	52.6
sin rechazo	9	47.4
Total	19	100.0

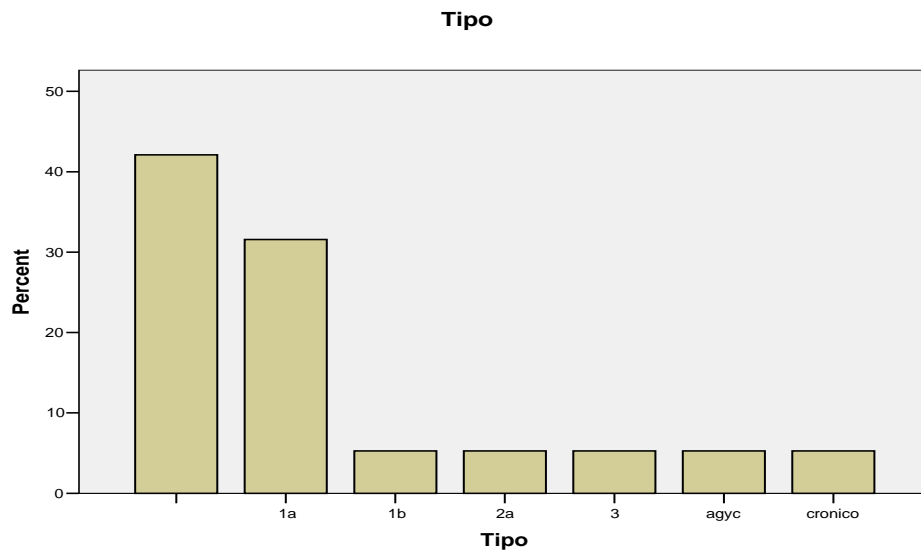




Realizamos una revisión de los hallazgos histopatológicos encontrados en los pacientes a quien se realizó trasplante renal y que ameritaron biopsia para valorar la presencia de rechazo renal observándose los siguientes datos:

**Tabla 6. Tipo de rechazo (Clasificación de Banff)**

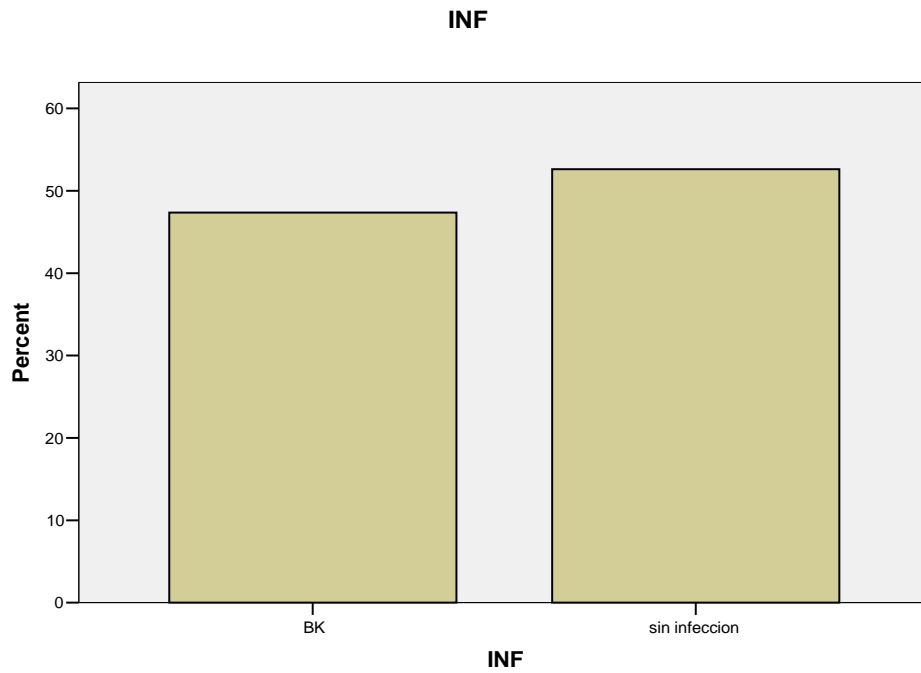
	Frecuencia	Porcentaje
Sin rechazo	8	42.1
1a	6	31.6
1b	1	5.3
2a	1	5.3
3	1	5.3
Agudo y crónico	1	5.3
crónico	1	5.3
Total	19	100.0



Además en la muestra de orina se realizó un análisis para valorar la infección de virus BK en la población seleccionada para el estudio obteniéndose el siguiente reporte.

Tabla 7. Frecuencia de infección por virus BK

	Frecuencia	Porcentaje
BK	9	47.4
sin infección	10	52.6
Total	19	100.0



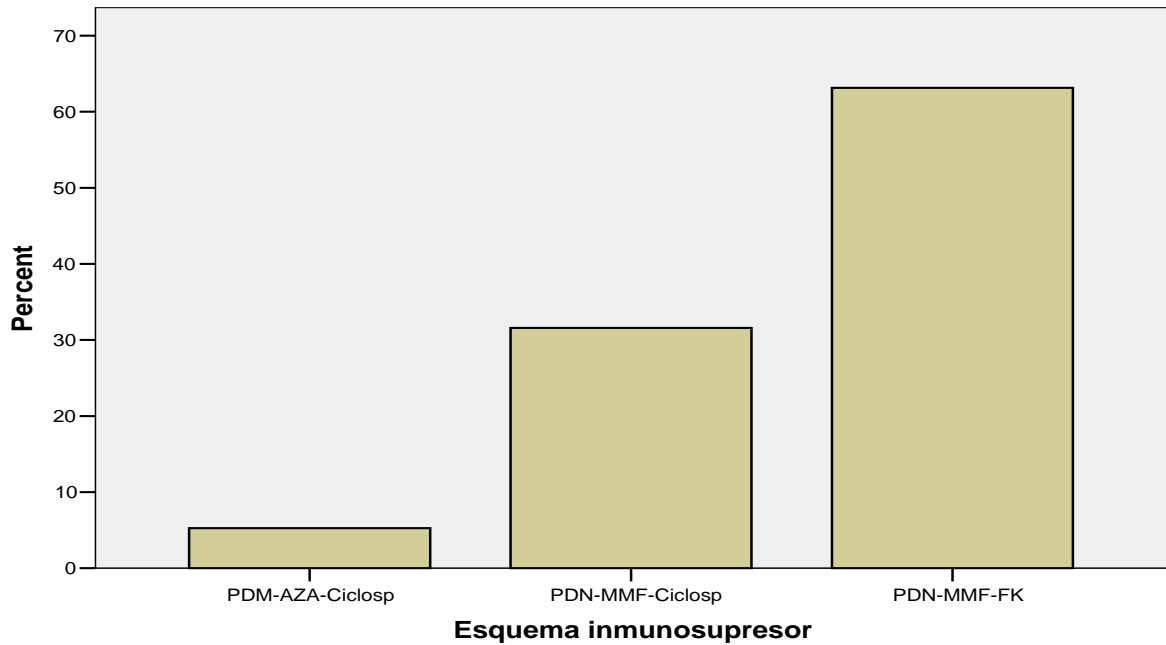
Se valoró el esquema inmunosupresor en los pacientes post-operados de trasplante renal obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 8. Esquema de Inmunosupresión**

	Frecuencia	Porcentaje %
PDN-AZA-Ciclosporina	1	5.3
PDN-MMF-Ciclosporina	6	31.6
PDN-MMF-FK	12	63.2
Total	19	100.0

PDN: prednisona, AZA: Azatioprina, MMF: Mofetil micofenolato, FK: Tacrolimus.  
Todos los pacientes recibieron inducción con Anti-CD25 en el día 1 y 4 post-trasplante renal.

**Esquema inmunosupresor**

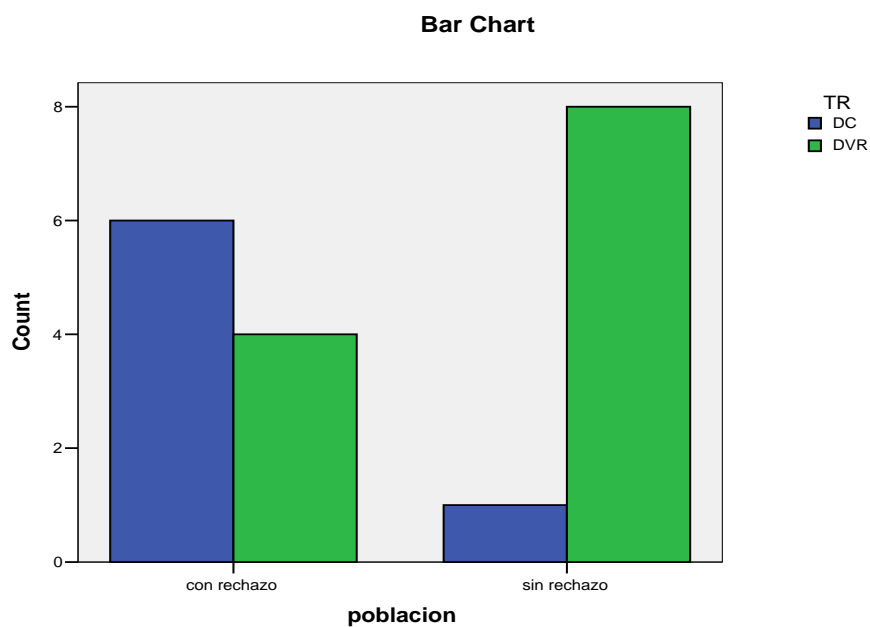


Y se realizo la correlación entre la presencia de rechazo y el tipo de donador para el trasplante renal observándose una mayor prevalencia de rechazo en pacientes receptores con donador cadavérico.

**Tabla 9. Relación entre la presencia de rechazo y tipo de transplante**

	Tipo de trasplante		Total
	Donador cadavérico	Donador vivo relacionado	
Con rechazo	6	4	10
Sin rechazo	1	8	9
Total	7	12	19

$p = 0.057$  (prueba exacta de Fisher de dos colas)



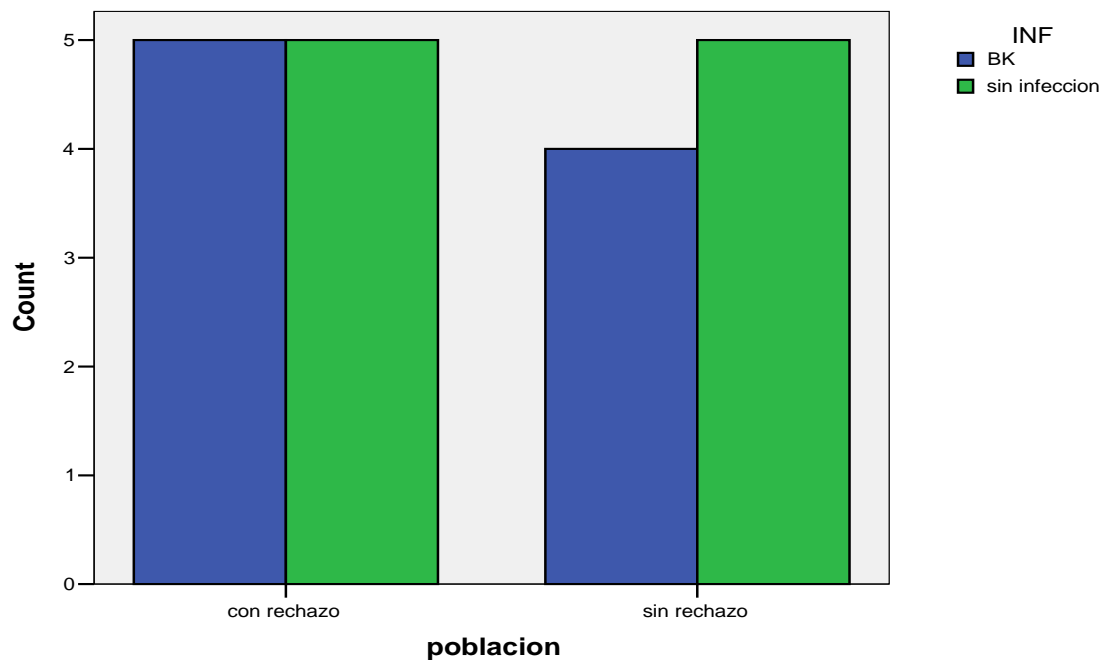
No se encontró una correlación significativa entre la infección por virus BK y el rechazo agudo.

**Tabla 10. Relación entre el rechazo y la infección por virus BK**

	Presencia de infección		Total
	Virus BK	Sin infección	
Con rechazo	5	5	10
Sin rechazo	4	5	9
Total	9	10	19

*Asociación no significativa*

**Bar Chart**



En cuanto a las muestra procesadas se realizo una correlación entre la expresión génica de factor transformador de crecimiento  $\beta_1$  y la presencia de pacientes con o sin rechazo observándose la presencia de este en el 94.7% de la población total.

**Tabla 11. Relación entre rechazo y presencia de TGF- $\beta_1$**

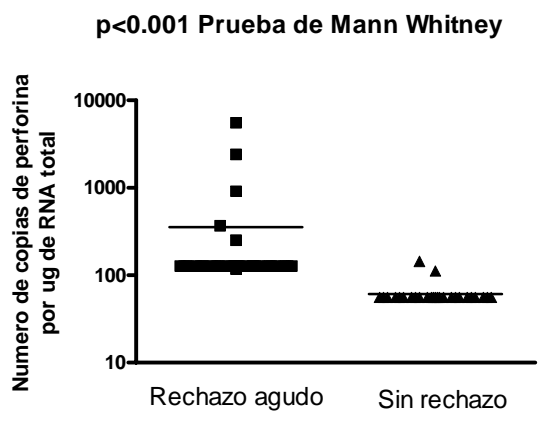
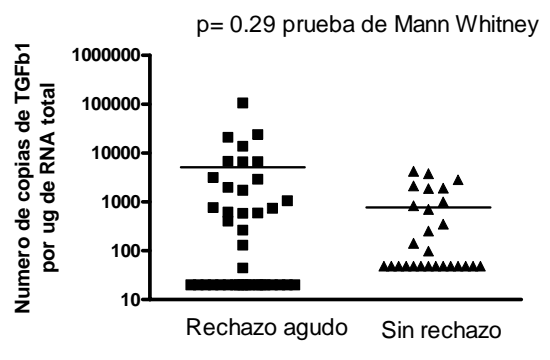
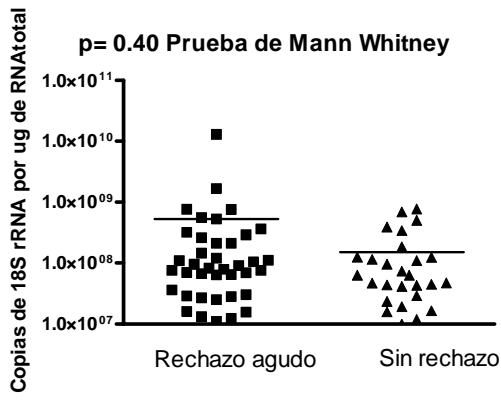
	TGF- $\beta_1$		Total
	ausente	presente	
Con rechazo	0	10	10
Sin rechazo	1	8	9
Total	1	18	19

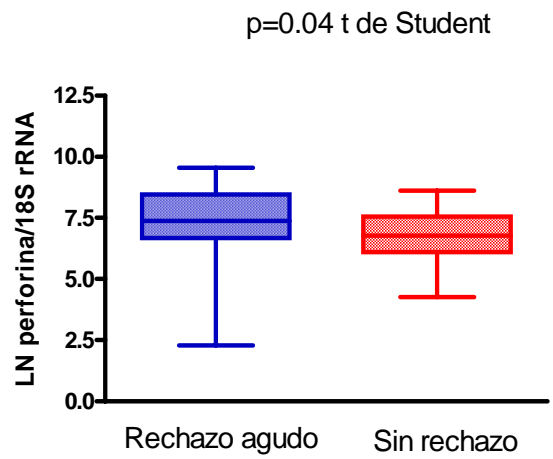
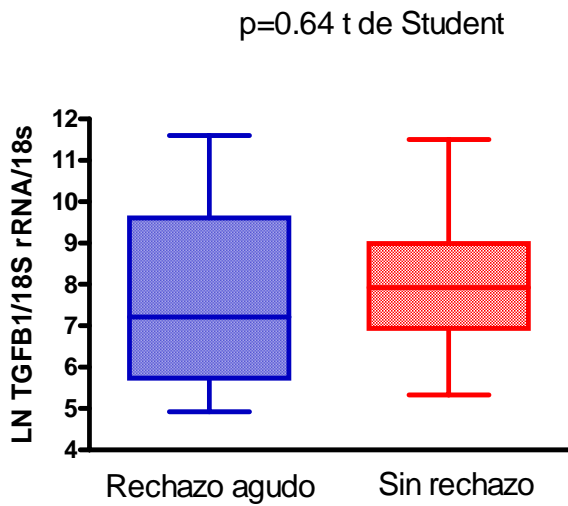
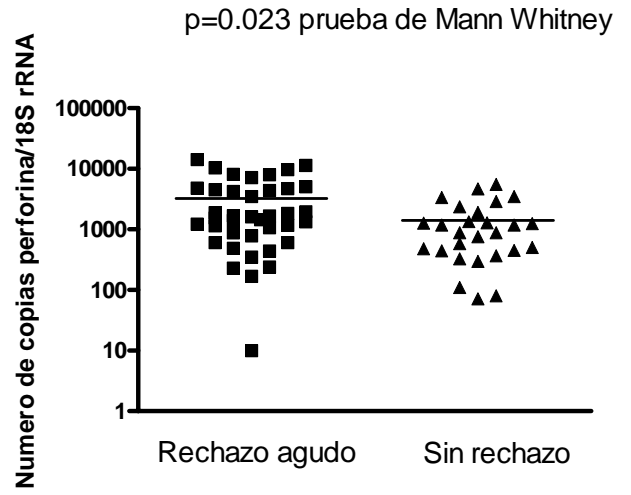
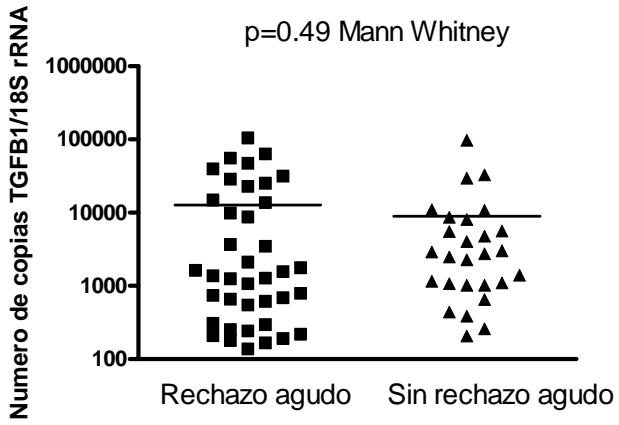
$p = 0.474$  (prueba exacta de fisher de 2 colas)

*Asociación No Significativa*

El perfil molecular de las muestras se expreso por número de copias por microgramo de RNA total así como los niveles en relación con el control interno. Ya que el control interno 18S ribosomal esta ampliamente expresado en todas las muestras , para tener un valor positivo de la relación el numero de copias del gen objetivo en microgramos de RNA total se dividió entre el 18S rRNA en fentogramos de RNA total. La calidad de las muestras fue similar en los dos grupos como puede evidenciarse porque tuvieron el mismo nivel de expresión del control interno 18S ribosomal. No se encontró diferencia significativa en la expresión de TGF- $\beta_1$  entre los pacientes con y sin rechazo, sin embargo los pacientes con rechazo agudo tuvieron mayores niveles generales de perforina.

Los hallazgos anteriores se repiten cuando se analizan los genes estudiados divididos por el control interno y cuando se normalizan al convertirlos a logaritmo.







## CONCLUSIONES:

Con este estudio se puede concluir que nuestra población mostró una prevalencia mayor del género masculino, con 14 pacientes que representaron el 73.7% contra 5 pacientes del sexo femenino (26.3%).

La media de edad fue de 174 meses. Hubo mayor proporción de riñones de donador vivo relacionado (63.2% ) y el esquema de inmunosupresor que se utilizó con mayor frecuencia fue a base de triple terapia con prednisona, mofetil micofenolato y tacrolimus en un 63.2% de los pacientes.

Al agrupar a nuestra población en pacientes con rechazo y sin rechazo encontramos 10 pacientes con rechazo agudo del trasplante renal y nueve sin rechazo.

No se encontró correlación entre TGF- $\beta_1$  y el desarrollo de rechazo agudo y/o crónico. Probablemente porque es una proteína de alta expresión y sabemos que los inhibidores de calcineurina que reciben estos pacientes incrementan los niveles de esta proteína.

Se encontró infección activa por virus BK en 47.4% de pacientes. No observamos una asociación significativa entre la infección por virus BK y la presencia de rechazo al injerto, sin embargo el tamaño de la muestra es pequeño.

No hubo diferencia en la expresión de TGF- $\beta_1$  y 18S rRNA entre los pacientes con rechazo agudo y los pacientes sin rechazo, difiriendo con algunos de los reportes que mencionan a la expresión de TGF- $\beta_1$  como un marcador de rechazo crónico.

Los pacientes con rechazo agudo tuvieron una mayor expresión de perforina en forma estadísticamente significativa tanto si analiza el número de copias de esta molécula solo o corregido por el gen control interno.

Este estudio corrobora la importancia de la expresión de perforina como un marcador para el diagnóstico precoz y no invasivo en pacientes que cursan con rechazo agudo celular, que puede permitir a los médicos tratantes instaurar esquemas de tratamiento con inmunosupresores de manera rápida.

Dado que la determinación de perforina no permite identificar a los pacientes que cursan con rechazo agudo humoral, en el futuro sera conveniente incluir a otras moléculas en el estudio de estos pacientes además de perforina.

## DISCUSION:

La aceptación o el rechazo del riñón alogénico dependen principalmente de la respuesta inmune y de su compleja regulación en la cual la red de citoquinas, proteínas y otros mediadores juegan un importante papel. Actualmente, la biopsia renal es el único método diagnóstico de rechazo en pacientes receptores de trasplante renal a pesar de ser un procedimiento invasivo. Por ello, es de gran interés encontrar métodos alternativos para el diagnóstico en los que se disminuyan los riesgos asociados a la toma de la biopsia.

La evaluación de proteínas asociadas a la regulación de la respuesta inmune mediante expresión génica en muestras de orina es un procedimiento no invasivo que podría ser de utilidad para incrementar la detección de rechazo al trasplante así como para su diagnóstico precoz.

El rechazo agudo es una complicación seria y frecuente del trasplante renal representando el 81.8% de los pacientes con rechazo, lo cual es de gran interés ya que se ha asociado a una reducción del 20% en la supervivencia a un año de los riñones de cadáver. La prueba diagnóstica más adecuada es la biopsia renal, pero sería muy valioso tener una prueba no invasiva segura y confiable dadas las múltiples complicaciones causadas por métodos invasivos, además de que un método no invasivo puede permitir identificar a los pacientes en riesgo de rechazo aun antes de que se presente disfunción del injerto. La perforina y la granzima B son componentes integrales de la maquinaria lítica de las células citotóxicas, y que frecuentemente se han asociado con injertos que cursan con rechazo agudo, esto según lo reportado en la literatura internacional y con lo cual coincidimos ya que en nuestro estudio se observó que aunque no tenemos muestras en el momento de la biopsia renal en varios pacientes y de hecho en varios la recolección de orina se hizo después del inicio de tratamiento con bolos de metilprednisolona, la expresión de perforina en forma global es mayor en pacientes con rechazo agudo, como lo han demostrado otros estudios.

Es importante mencionar que no encontramos asociación significativa entre la expresión de TGF- $\beta_1$  y la presencia de rechazo agudo o crónico del injerto y de hecho se trata de una molécula que se expresa en forma abundante en las células urinarias de pacientes con y sin rechazo, lo cual probablemente se deba a su papel multifuncional, que se encuentra en todas las células del organismo y la expresión génica se ve aumentada por los inhibidores de calcineurina, mismos que todos nuestros pacientes reciben como parte de la terapia inmunosupresora.

El uso de técnicas de biología molecular para el desarrollo de marcadores moleculares asociados a patologías específicas en el campo del trasplante renal, proporcionan una gama de probabilidades diagnósticas diferentes a los métodos invasores. De manera que los médicos podamos ofrecer una valoración y terapia inmunosupresora precoz mediante la determinación de moléculas de expresión en células urinarias de manera oportuna y sin riesgos quirúrgicos.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Medeiros M, Romero B, Valverde R. Trasplante renal en pediatria. Revista de Investigacion Clinica 2005; 57(2):230-236.
2. Lander ES, Linton LM, Birren B. Initial sequencing and análisis of the human genome. Nature 2001; 409:860-921.
3. Venter JC, Adams MD, Myers EW. The sequence of the human genome. Science 2001;291:1304-1351.
4. Baogui L, Hartono. Noninvasive Diagnosis of Renal-Allograft Rejection by Measurement of Messenger RNA for Perforin and Granzyme B in Urine. New England Journal of Medicine 2001;344:947-54.
5. Tatapudi RR, Muthukumar T, Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. Kidney Int 2004;665:2390-2397
6. Border, wayne A, Noble NA. Mechanisms of Disease: transforming Growth Factor (beta) In Tissue Fibrosis. The New England Journal of medicine 1994;331(19):1286-1292.
7. Sporn m. TGF-b1:20 years and counting. Microbes infect 1999;1:1251-1253
8. Chin D, Glen M, Parson. What is transforming growth factor B1?. Ann International Journal Surgical reconstruccion 2004;57:207-221.
9. Moustakas A, Pardali K. mechanism of TGF-b signaling in regulation of cell growth and differentiation. Immunol Lett 2002;82:85-91.
10. Tinckam, Kathrin, Rush, Hutchinson. The relative importance of cytokine gene polymorphisms in the development of early and late acute rejection and six month renal allograft atology. Transplantation 2005; 79(7):836-841.
11. Iñigo P, Palacín A, Campistol JM, Differences between acute and chronic renal graft rejection on immunohistochemical staining of transforming growth factor beta 1. Transplantation proceedings 1999;31:2309-2310
12. Park K, Han S, Jegal H. Patterns and Sites of Tumor Necrosis Factor-alfa and Transforming Growth factor-B1 Expression in Human Renal Allograft Biopsies. Transplantation Proceedings 2003;35:249-250.
13. Jain S, furness O, Nicholson M. Response to: strategies for meaningful measurement of circulating level of transforming growth factor b1 in clinical samples. Transplantation 2001; 71(9):1356.
14. Helanterä I, Teppo AM, Koskinen P. Increased urinary excretion of transforming growth factor-B1 in renal transplant recipients during cytomegalovirus infection. Transplant immunology 2005; xx.
15. Morris-Stiff, Khanna, Bukilica. Quantification of intragraft expression of Granzyme B and perforin in acute renal allograft rejection British Journal of surgery 2001;88(5):739.

16. Cosio F, Pelletier R, Falkenhain M. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplant* 1997;63:1611-1615
17. Tesi R, Henry M, Elkhammas E. Predictors of long-term primary cadaveric renal transplant survival. *Clin. Transplant* 1993; 7:345.
18. Mildford E, Hancock W, Carpenter C. Immunopathogenetic mechanisms of allograft rejection in renal pathology vol II.
19. Goeken N. Outcome of renal transplantation following a positive Crossmatch with historical sera. *Transplant Proceedings* 1985;17:2443-2445.
20. Alonso A, Tresancos C, Riera C. Micofenolato Mofetil prevention of acute rejection in the renal transplantation. Abstract. I Congress International of Immunodepression. Orlando, Florida D.C.1997.
21. Croker B, Ramos E. Pathology of the renal allograft en Tisher C, Brenner B. *Renal Pathology with clinical and functional correlation*. Ed 2 vol. II Philadelphia 1994. Lippicott: 1591-1640.
22. Cosimi A, Colvin R, Burton R. Use of monoclonal antibodies to T cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *New England Journal Medicine* 1981;305:308-314.
23. Kooijmans-Coutinho M, Herman S, Interstitial rejection, vascular rejection, and diffuse thrombosis of renal allograft. *Transplantation* 1999;61:1338-1344.
24. Cameron J, Rigby R, Van Deth A. Severe tubulo-interstitial disease in a renal allograft due to cytomegalovirus infection. *Clinical Nephrol* 1982;18:321-325.
25. Solez K, Axelsen R, Benediksson H. International standardization of criteria for histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology kidney *Intrn* 1993;44:411-422.
26. Castela A, Griño J, Pathological differential diagnostics of proteinuria and late failure after renal transplantation. *Transplantation proceedings* 1992;24:110-112
27. Myers B, Cyclosporine nephrotoxicidad. *Kidney Int* 1988:964-974
28. Isoniemi H, Taskinen E, Hayry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994;58:1195-1198.
29. Solez K, Benediktsson H, Report of the thir Banff conference on allograft pathology on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proceedings* 1996; 28:441-444.
30. Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RC. Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation* 2001;72:948-953.
31. Sarwal M, Chua MS, Kambham N. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by AND microarray profiling. *New England Journal Medicine* 2003;349:125-38.
32. Mansfield E, Sarwal M, Arraying the orchestration of allograft pathology. *Am J Transplant* 2004;4:853-862.
33. Campistol J, Iñigo P, Role of transforming growth factor-B1 in the progression of chronic allograft nephropaty. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl 1):114-116.
34. Scherer A, Krause A, Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 2003;75:1323-1330.

35. Lario S, Mendes D. Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in an experimental model of kidney transplantation. *Transplantation* 2003;75:1647-1654.
36. Donauer J, Rumberger B, Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation* 2003;76:536-547.
37. Raeymaekers L, General principles of quantitative PCR. In *Quantitative PCR protocols* 1999:31-41. Eds Kochanowski B and Reischl U. Totowa, NJ: Humana Press.
38. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J mol Endocrinol* 2000;25:169-193.
39. Giulietti A, Overbergh I, Valckx D, An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386-401.
40. Sporn M. TGF- $\beta$ :20 years and counting. *Microbes Infect* 1999;1:1251-1253.
41. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF $\beta$  signaling. *J Cell Sci* 2000;113:1101-1109.
42. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. Transforming growth factor beta-1: Structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud Publica Mex* 2001;43:340-351.
43. Border W, Noble N. TGF- $\beta$ . *Sci Am Sci Med* 1995;2:68-77.
44. Hernández-Cañaveral I, González J, López-Casillas F, Armendáriz-Borunda J. Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor-beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:380-387.
45. Caestecker M. The transforming growth factor-B superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:1-11.
46. Kondou H, Mushiaki S, Etani Y, Moyoshi Y, Michigami T, Ozono K. A blocking peptide for transforming growth factor-B1 activation prevents hepatic fibrosis *in vivo*. *J Hepatol* 2003;39:742-748.
47. Susumu I, Fumiko I, Goumans M, Dijke T. Signaling of transforming growth factor-B family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000;267:6954-6967.
48. Heldin CH, Miyazono J, Dijke P. TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-471.
49. Roberts A. TGF- $\beta$  signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect* 1999;1:1265-1273.
50. Derynck R, Zhang Y. Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. *Nature* 2003;425:577-584.
51. Zhu H, Burgess A, Regulation of transforming growth factor B signaling. *Mol Cell Biol Res Community* 2001;4:321-330
52. Whitman M. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature* 1997;389:549-551.
53. Gressner A, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF- $\beta$  in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807.
54. Blobe G, Schiemman W, Lodish H. Role of transforming growth factor B in human disease. *N Engl J Med* 2000;4:1350-1358.
55. Dijke Pt, Miyazono K, CH H. Signalling inputs converge on nuclear effectors in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem Sci* 2000;25:64-70.

56. Lijnen P, Petrov V, Fagard R. Association between transforming growth factor-B and hypertension. *Am J Hypertens* 2003;16:604-611.
57. Galvez F, Sandoval A, Armendariz B, Transforming growth factor-b as a therapeutic target. *Salud Publica Mex* 2004;46(4):
58. Huang X, Lee C. From TGF-*b* to cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2003;4:243-250.
59. Ruchuang D, Medeiros M, Dadhania D, Thangamani M. Noninvasive diagnosis of BK virus VP1 in urine. *Transplantation* 2002;7:987-994.
60. Ruchuang D. Baogui Li. CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003;75:1307-1312.
61. Medeiros M, Sharma V, Ding R. Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNA later. *Journal of immunological Methods* 2003;279:135-142.