

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y**  
**BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE**  
**DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD**  
**LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD E**  
**INMUNOGENÉTICA**



**ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES URINARIOS DEL**  
**INDUCTOR DÉBIL DE LA APOPTOSIS DE LA**  
**FAMILIA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL**  
**(TWEAK), PROTEÍNA QUIMIOATRACTANTE DE**  
**MONOCITOS - 1 (MCP-1) Y LOS MARCADORES**  
**SEROLÓGICOS CON LA REMISIÓN Y**  
**REACTIVIDAD DE LA NEFROPATÍA LÚPICA**

Trabajo de post-grado presentado para la obtención del Grado de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud, Mención Inmunología “Histocompatibilidad e Inmunogenética”

**POR: Lic. ESTHER CASABLANCA ALARCÓN**

**TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA, Esp.**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2018**

## ***DEDICATORIA***

*Dedicado a mis padres, Benancio y Francisca,  
por creer y confiar en mí, además porque ellos  
son mi modelo a seguir.*

*Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido. Ahora es el momento de comprender más, para que  
podamos temer menos.*

*Marie Curie*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Este estudio fue realizado en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética (Instituto SELADIS) dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés. Agradezco al Dr. Fernando Sosa T., tutor de esta tesis, por guiar y supervisar la realización de este trabajo de investigación. También expreso mi gratitud al equipo de trabajo del laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética, muchas gracias por su apoyo y ayuda.*

*Agradezco a los pacientes del grupo ASBOLUP por participar en el estudio, por su colaboración y por ser el objetivo último de los logros de nuestra investigación.*

*También me gustaría agradecer a mis familiares y amigos cercanos por su apoyo y aliento durante este estudio.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>A. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>B. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>C. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
<b>D. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>8</b>
<b>F. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
<b>1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. NEFROPATÍA LÚPICA.....</b>	<b>12</b>
2.1. Etiología intrarenal.....	14
2.2. Fisiopatología y etiogenia.....	17
2.2.1. Factor ambiental.....	17
2.2.2. Factor hormonal.....	17
2.2.3. Factor genético.....	18
2.3. Tratamiento.....	18
2.4. Diagnóstico clínico y laboratorial.....	20
2.4.1. Criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y del grupo de Clínicas Colaboradoras Internacionales del Lupus Eritematoso Sistémico .....	20
2.4.2. Criterios de clasificación de la Sociedad de Nefrología (ISN) / Sociedad de Patología Renal (RPS) .....	24
2.4.2.1. Patrones de lesión glomerular .....	25
2.4.2.2. Clasificación de la nefropatía lúpica .....	26
2.5. Biomarcadores en la nefropatía lúpica.....	28
2.5.1. Biomarcadores serológicos .....	28
2.5.1.1. Anticuerpos anti-ds-DNA.....	28
2.5.1.2. Anticuerpos anti-nucleosoma.....	29
2.5.1.3. Complemento C3 Y C4.....	31
2.5.1.4. Anticuerpos anti-C1q .....	34
2.5.1.5. Beta-2-microglobulina.....	37
2.5.2. Biomarcadores urinarios .....	38
2.5.2.1. Inductor Débil de la Apoptosis de la Familia del Factor de Necrosis Tumoral (TWEAK) .....	39
2.5.2.2. Proteína Quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1).....	44
<b>3. EXPRESIÓN GÉNICA .....</b>	<b>46</b>
3.1. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR).....	46
<b>G. OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
<b>1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>50</b>

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>H. DISEÑO METODOLÓGICO .....</b>	<b>50</b>
1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	50
1.1. Tipo de diseño.....	50
1.2. Población en estudio .....	50
1.2.1. Criterios de inclusión .....	51
1.2.1.1. Grupo control.....	51
1.2.1.2. Grupo caso.....	51
1.2.2. Criterios de exclusión .....	51
1.2.3. Criterios de eliminación .....	52
2. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN .....	52
2.1. Tamaño de la muestra .....	52
2.2. Aspectos bioéticos .....	52
2.3. Sitio o contexto del estudio.....	52
2.4. Financiamiento.....	52
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	53
3.1. Ficha clínica y toma de muestra .....	53
3.2. Extracción de RNA total de muestras de orina.....	53
3.3. Evaluación de la cantidad y calidad de RNA .....	54
3.4. Síntesis de DNA copia (DNAc).....	54
3.5. PCR en tiempo real.....	55
3.6. Curva de citoquinas MCP-1 y TWEAK.....	57
3.7. Validación de las pruebas moleculares MCP-1 y TWEAK.. ..	57
3.8. Cuantificación de la expresión génica.....	58
3.9. Evaluación de auto-anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta y por ensayos inmunoenzimáticos .....	58
4. ANÁLISIS DE DATOS ESTADÍSTICOS.....	59
<b>I. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
1. PARÁMETROS DESCRIPTIVOS DE LA MUESTRA ESTUDIADA.....	60
2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA.....	63
2.1. Validación de pruebas moleculares MCP-1 y TWEAK.....	63
2.2. Correlación de resultados entre marcadores serológicos.....	65
2.3. Sensibilidad y especificidad diagnóstica .....	66
2.4. Correlaciones obtenidas entre los niveles de expresión de las citoquinas en estudio frente a los marcadores serológicos evaluados en pacientes lúpicos....	68
3. CUATIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	70
3.1. Análisis de la expresión génica relativa .....	70

<b>4. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE CITOQUINAS DE LOS GRUPOS CASO Y CONTROL .....</b>	<b>72</b>
<b>J. DISCUSIÓN .....</b>	<b>73</b>
<b>K. CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>L. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>M. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>81</b>
<b>N. ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Histología renal y su correspondiente tratamiento (Directrices del Colegio Americano de Reumatología para el tratamiento y el manejo de la nefritis lúpica) .....	<b>19</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación del LES por criterios SLICC del 2012 .....	<b>22</b>
<b>Tabla 3.</b> Índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico .....	<b>23</b>
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de la nefropatía lúpica por la Sociedad internacional de Nefrología/ Sociedad de Patología Renal (ISN/RPS) 2003 .....	<b>27</b>
<b>Tabla 5.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la qPCR a tiempo real .....	<b>55</b>
<b>Tabla 6.</b> Características demográficas y valores promedio de los marcadores serológicos evaluados en el grupo control. ....	<b>60</b>
<b>Tabla 7.</b> Comparación de las características demográficas, hallazgos clínicos y datos de laboratorio entre el grupo control – caso (4 subgrupos) .....	<b>61</b>
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la concentración de cebadores y concentración de muestras que se establecieron como adecuadas durante el proceso de optimización de las pruebas moleculares que miden los niveles de expresión de RNAm de MCP-1 y TWEAK. ....	<b>63</b>
<b>Tabla 9.</b> Control de repetitividad obtenida para las pruebas optimizadas de MCP-1 y TWEAK .....	<b>65</b>
<b>Tabla 10.</b> Control de reproducibilidad obtenidos para las pruebas optimizadas.....	<b>65</b>
<b>Tabla 11.</b> Correlación de resultados entre los niveles de anticuerpos anti-ds-DNA y marcadores de laboratorios empleados en el seguimiento clínico de pacientes lúpicos. .	<b>66</b>
<b>Tabla 12.</b> Resultados de correlación entre la prueba optimizada TWEAK y los marcadores serológicos de la enfermedad. ....	<b>67</b>
<b>Tabla 13.</b> Resultados de correlación resultados positivos y negativos entre la prueba optimizada MCP-1 y los marcadores serológicos evaluados en el presente estudio .....	<b>67</b>
<b>Tabla 14.</b> Resumen de la correlación de los niveles de expresión urinarios de la citoquina TWEAK con los marcadores serológicos estudiados .....	<b>68</b>

<b>Tabla 15.</b> Resumen del análisis de correlación de los niveles de expresión urinarios de la quimioquina MCP-1 con los marcadores serológicos evaluados.....	<b>69</b>
<b>Tabla 16.</b> Cuantificación relativa normalizada del gen TWEAK evaluada mediante qRT-PCR en muestras de orina. ....	<b>71</b>
<b>Tabla 17.</b> Cuantificación relativa normalizada de la expresión del gen MCP-1 evaluada mediante qRT-PCR en muestras de orina .....	<b>72</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** *La célula apoptótica expone en su superficie las vesículas apoptóticas conteniendo antígenos nucleares; debido a un deficiente aclaramiento de las partículas apoptóticas por el sistema mononuclear fagocítico, aquellas se acumulan y ganan acceso a los linfocitos B autorreactivos, los cuales sintetizan auto-anticuerpos; los IC formados por esos anticuerpos y sus respectivos antígenos nucleicos tienen capacidad para activar el complemento y conducir a lesiones en los tejidos y también para activar a las CDP; las CDP responden con la producción de IFN- $\alpha$  (por vías dependientes de TLR7 y TLR9; IFN- $\alpha$  tiene múltiples efectos sobre el sistema inmunitario que favorecen el desarrollo de autoinmunidad, como la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, la activación de células T y la maduración de las células dendríticas. Todo ello conduce a un círculo reverberante que intensifica y perpetúa el proceso autoinmunitario.....***11**

**Figura 2.** *La predisposición genética nos brinda un impacto de riesgo moderado en LES. Los factores ambientales, hormonales y epigenéticos añaden complejidad a este modelo patogénico y el resultado de la desregulación del sistema inmune. La formación in situ de complejos inmunitarios entre los anticuerpos anti-cromatina circulantes y la cromatina glomerular extracelular parece ser el evento iniciador en NL. Dichas especificaciones autorreactivas se generan por respuestas inmunitarias relacionadas con la captación defectuosa de detritos celulares apoptóticos por neutrófilos, macrófagos y un aumento en la rotación de células inflamatorias. La formación de tejido linfoide tubulointersticial, la producción de anticuerpos intrarrenales y la activación del complemento contribuyen a la inflamación renal. La activación de las células dendríticas (CD) aumenta la producción del CMH II para la presentación antigénica y la liberación de los receptores de IFN $\alpha$ , lo que lleva a la activación de las células T y la diferenciación de las células B en las células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los leucocitos y las células intrínsecas del riñón producen citoquinas proinflamatorias y quimiocinas en respuesta a complejos inmunitarios y fragmentos del complemento, amplificando un círculo vicioso de inflamación renal y promoviendo la nefritis. Existen varios intermediarios de*

*inflamación como ser: factor de necrosis (TNF) como inductor débil de apoptosis (TWEAK) promueve la proliferación celular glomerular, inflamación y apoptosis. Por el contrario, otros como el factor de crecimiento transformante beta (TGFb) promueven cicatrices en los glomérulos lesionados y el túbulo intersticial a través de la deposición de matriz extracelular. ....15*

**Figura 3.** *Resumen del mecanismo que conduce a la formación de auto-anticuerpos anti-nucleosomícos y su papel en la patogénesis de la NL .....30*

**Figura 4.** *Estructura del C1q y anticuerpos anti-C1q. La parte de unión a antígeno a la región Fab de anti-C1q se une a epítomos en la región de C1q de tipo colágeno. Por el contrario, las cabezas globulares de C1q son los sitios de unión para las porciones de Fc de IgG en complejos inmunes.. .....36*

**Figura 5.** *Biología básica del sistema TWEAK / Fn14. (a) TWEAK es una glucoproteína transmembrana de tipo II que puede procesarse proteolíticamente, produciendo TWEAK soluble (sTWEAK). Ambos se unen y activan el receptor TWEAK (TWEAKR), Fn14. Además, el dominio intracelular N-terminal puede ser escindido y contiene secuencias de localización nuclear (NLS). Fn14 es una proteína transmembrana de tipo I que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF que carece de un dominio de muerte (DD) pero que contiene un dominio de unión a TRAF (TRAF BD). (b) La Fn14 se regula de manera rápida y fuerte sobre la lesión tisular. La trimerización del receptor tras la unión de TWEAK transduce la señalización intracelular. TWEAK también puede unirse al receptor eliminador de CD163 en macrófagos .....40*

**Figura 6.** *Papel del TWEAK/Fn14 en la nefritis lúpica. La unión del TWEAK al receptor Fn14 favorece la activación de una de las 3 vías efectoras, y esto depende del tipo de célula estimulada, el microambiente celular y la señalización intracelular generada ...42*

**Figura 7.** *Representación tridimensional de una quimiocina, donde se muestran las hojas  $\alpha$  y  $\beta$ , así como los residuos de cisteína y los bucles 30 y 40.....44*

**Figura 8.** *Curva de fusión DNAC detectada en el termociclador.....48*

**Figura 9.** *Curvas de amplificación de las diluciones seriadas de DNAC.....48*

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> <i>Comparación de los niveles de los marcadores serológicos entre los grupos control y caso A). niveles de anticuerpos anti-ds-DNA, B). niveles de anticuerpos anti-nucleosoma, C) niveles de <math>\beta</math>2-microglobulina. Comparación entre los distintos subgrupos (grupos I al IV) con D). niveles de complemento C3, E) niveles de complemento C4 y F) niveles séricos de Creatinina .</i> .....	<b>62</b>
<b>Gráfico 2.</b> <i>Curva de concentración de las citoquinas: [A] proteína quimioattractante de monocitos -1 [B] Inductor débil de la apoptosis de la familia del factor de necrosis tumoral.</i> .....	<b>64</b>
<b>Gráfico 3.</b> <i>Correlación entre niveles de expresión urinarios de la citoquina TWEAK y quimioquina MCP-1 con los marcadores serológicos evaluados en el presente estudio.</i> .....	<b>70</b>
<b>Gráfico 4.</b> <i>Análisis comparativo entre grupos caso y control (Grupo control, Grupo I= LES activa sin NL, Grupo II = LES y NL activa, Grupo III = LES inactiva sin NL y Grupo IV = LES y NL inactiva) de los niveles de las citoquinas TWEAK (A), quimioquina MCP-1 (B).</i> .....	<b>73</b>

## **A. RESUMEN**

El Inductor débil de la apoptosis de la familia del factor de necrosis tumoral (TWEAK) es una citoquina multifuncional que controla muchas actividades celulares, incluida la proliferación, la migración, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis y la inflamación. Además, tiene un papel importante en la patogénesis de la nefropatía lúpica (NL), su producción estimula a las células renales a producir distintas citoquinas proinflamatorias. Otra de las quimioquinas que tiene participación en la NL es la proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) que se produce en los riñones por células mesangiales, endoteliales y monocíticas en respuesta a la presencia de inmunocomplejos y mediadores inflamatorios, es responsable de la infiltración de leucocitos en el riñón. Investigaciones previas han demostrado que los niveles tanto de TWEAK y MCP-1 en la orina de pacientes con NL, se correlacionan con la actividad de la enfermedad. Su excreción en la orina es un excelente indicador de su producción y secreción local, y por lo tanto puede tener más potencial que un marcador basado en suero para reflejar la actividad inflamatoria en el riñón.

**OBJETIVO:** Asociar los niveles urinarios del TWEAK, MCP-1 y los marcadores serológicos con la remisión y reactividad de la nefropatía lúpica

**METODOLOGÍA:** Se incorporaron 85 pacientes (22 pacientes control y 63 pacientes caso), los cuales firmaron su consentimiento para participar en el estudio. El grupo control correspondía a pacientes sin antecedentes clínicos y familiares de enfermedad autoinmune. El grupo caso cumplía al menos 4 criterios de la Sociedad Americana de Reumatología. Este grupo fue subdividido en 4 subgrupos en función a la actividad de la enfermedad, la actividad de la enfermedad fue evaluada por los niveles de anti-ds-DNA y niveles de complemento C3 y C4; mediante qRT-PCR se midió los niveles de expresión de la citoquina TWEAK y la quimioquina MCP-1 en muestras de orina de pacientes lúpicos, los niveles de estas moléculas fueron asociados con los valores séricos de los marcadores serológicos comúnmente empleados en la clínica.

**RESULTADOS:** La expresión urinaria de mRNA de TWEAK y MCP-1 estaba significativamente aumentada en pacientes con NL activa ( $P < 0,05$ ). La expresión de

TWEAK se correlacionó positivamente con los niveles séricos de anticuerpos anti-ds-DNA, anti-nucleosoma y niveles de  $\beta$ 2-microglobulina ( $r = 0,414 p < 0,001$ ;  $r = 0,405 p < 0,001$ ;  $r = 0,427 p < 0,001$ ). El nivel de expresión de MCP-1 se asoció positivamente con los niveles de expresión de TWEAK ( $r = 0,299 p = 0,031$ ), los niveles séricos de anticuerpos anti-ds-DNA y anti-nucleosoma ( $r = 0,390 p < 0,05$ ;  $r = 0,376 p < 0,05$ ).

**CONCLUSIONES:** El presente estudio demuestra que la MCP-1 y TWEAK pueden ser considerados como biomarcadores de la actividad de la NL.

**PALABRAS CLAVE:** *Proteína quimioattractante de monocitos – 1 (MCP-1), Inductor Débil de la Apoptosis de la Familia del Factor de Necrosis Tumoral (TWEAK), nefropatía lúpica (NL).*

## **SUMMARY**

The Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis (TWEAK), this is a multifunctional cytokine that controls many cellular activities, including proliferation, migration, differentiation, apoptosis, angiogenesis and inflammation. In addition, it has an important role in the pathogenesis of Lupus nephritis (LN), its production stimulates renal cells to produce different proinflammatory cytokines. Another chemokine involved in LN is the Monocyte chemotactic protein – 1 (MCP-1) that is produced by the kidneys, mesangial, endothelial and monocytic cells in response to the presence of immune complexes and inflammatory mediators. It is responsible of the leukocytes infiltration in the kidney. Previous research has shown that the urinary levels of TWEAK and MCP-1 patients with LN correlate with the activity of the disease. Its excretion in the urine is an excellent indicator of its production and local secretion, and therefore may have more potential than serologic markers to reflect the inflammatory activity in the kidney.

**OBJECTIVE:** To associate the urinary levels of TWEAK, MCP-1 and serological markers with the remission and reactivity of lupus nephritis.

**METHODOLOGY:** 85 patients were included (control 22 and case 63), who signed their consent to participate in the study. The control group corresponded to patients without clinical and family history of autoimmune disease. The case group met at least 4 criteria of the American Society of Rheumatology for lupus diagnostic. This group was subdivided into 4 subgroups according to the activity of the disease evaluated by the levels of anti-ds-DNA and complement levels C3 and C4; qRT-PCR was employed to measure the urinary levels of expression of the cytokine TWEAK and the chemokine MCP-1. The levels of these molecules were associated with the serum values of the serological markers commonly used in the clinic.

**RESULTS:** The mRNA urinary expression of TWEAK and MCP-1 was significantly increased in patients with active LN ( $P < 0.05$ ). TWEAK expression correlated positively with serum levels of anti-ds-DNA, anti-nucleosome and  $\beta 2$ -microglobulin ( $r = 0.414$   $p < 0.001$ ,  $r = 0.405$   $p < 0.001$ ,  $r = 0.427$   $p < 0.001$ ). The level of expression of MCP-1 was

positively associated with TWEAK expression levels ( $r = 0.299$   $p = 0.031$ ), serum levels of anti-ds-DNA and anti-nucleosome antibodies ( $r = 0.390$   $p < 0.05$ ). ;  $r = 0.376$   $p < 0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** The present study demonstrates that MCP-1 and TWEAK can be considered as biomarkers useful to measure the LN activity.

**KEYWORDS:** *Monocyte chemotactic protein – 1 (MCP-1), Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis (TWEAK), Lupus nephritis (LN).*

## **B. INTRODUCCIÓN**

Las manifestaciones heterogéneas del lupus eritematoso sistémico (LES) son causadas por la desregulación crónica del sistema inmune y la producción de auto-anticuerpos patógenos que conducen al daño progresivo de órganos. La afectación renal se produce en el 50% de los pacientes con LES, y la Nefropatía lúpica (NL) sigue siendo la causa predominante de morbilidad y mortalidad en esta enfermedad (Chiu, 2010) (Xu *et al.*, 2016) (Abujam *et al.*, 2013). A pesar de los avances en el manejo de esta enfermedad, se ha logrado poco con respecto a los resultados adversos de la NL, incluyendo insuficiencia renal crónica (IRC) o mortalidad. La detección temprana y el tratamiento oportuno son imprescindibles para minimizar el riesgo de inflamación inducida en la NL, y así detener el daño renal preservando la función del mismo.

Las citoquinas son los mediadores inmunológicos clave que se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad (El-shehaby *et al.*, 2011). En otros países han demostrado que las citoquinas y entre ellas la proteína quimioattractante de monocitos – 1 (MCP-1) o ligando de quimioquinas 2 (CCL2), contribuyen a la lesión renal en NL. La infiltración de monocitos y células T en el riñón depende de las citoquinas liberadas por las células renales residentes lesionadas. Durante la inflamación, la liberación sostenida de citoquinas por las células lesionadas produce un gradiente de concentración creciente que es máximo dentro del tejido dañado y es responsable del movimiento unidireccional de las células infiltrantes (Abujam *et al.*, 2013). La MCP-1 es un quimioattractante potente de monocitos, células T y células asesinas naturales, responsable de inducir daño renal tubular y/o glomerular. Se sabe que las células del parénquima renal, más notablemente las células mesangiales y células epiteliales tubulares, producen MCP-1 en respuesta a IL-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y complejos de IgG circulante. La MCP-1 contribuye a la inflamación, pero no está claro si se limita su producción a determinados tejidos y si recluta solo macrófagos específicos (Susianti *et al.*, 2014).



Otra citoquina que también participa en la patogénesis de NL es el Inductor Débil de la Apoptosis de la Familia del Factor de Necrosis Tumoral (TWEAK). El TWEAK puede regular la proliferación celular, la muerte celular, la diferenciación celular y la inflamación. El TWEAK y su receptor afín Fn14 están constitutivamente presentes en el riñón (células renales intrínsecas y leucocitos infiltrantes) (Schwartz *et al.*, 2006); TWEAK contribuye a la inflamación del riñón promoviendo la secreción de citoquinas por las células renales a través de la activación canónica y no canónica NFκB (Figura 6). TWEAK también promueve la proliferación de células tubulares. Sin embargo, TWEAK induce la apoptosis mesangial y tubular en condiciones proinflamatorias. Estos datos indican que TWEAK es una citoquina multifuncional en el riñón, cuyas acciones son moduladas por el microambiente celular, lo cual sugiere que TWEAK puede proporcionar información diagnóstica y ser un objetivo terapéutico en la lesión renal (Xuejing *et al.*, 2012) (Xu *et al.*, 2016). Los avances en lo referente al diagnóstico de la detección del desarrollo precoz de la NL, motivan a los investigadores de diferentes países y en particular el nuestro, a desarrollar estudios para determinar el valor predictivo en nuestra población de los marcadores potenciales de diagnóstico y seguimiento de enfermedades renales que se están describiendo a nivel mundial.

Es importante destacar, que el daño renal que se presenta en los pacientes con NL está relacionado con el tiempo de padecimiento de la enfermedad, por lo tanto, es necesario identificar métodos no invasivos, rápidos que permitan predecir el riesgo de aparición de NL en los pacientes. Por lo mencionado anteriormente, se propone evaluar si los niveles urinarios de las moléculas MCP-1 y TWEAK podrían ser una herramienta de laboratorio útil para predecir riesgo o reactivación de NL en pacientes lúpicos bolivianos en general y paceños en particular. Además es importante establecer el grado de correlación de resultados que existe entre estos dos marcadores con los marcadores serológicos comúnmente empleados por los clínicos (anti-ds-DNA, anti-nucleosoma, β2-microglobulina, anti-C1q, niveles de C3 y C4). El método que se empleo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de Transcripción Inversa en tiempo real (qRT-PCR), el cual permitirá discernir la expresión génica de ambas moléculas en la misma muestra.

### C. ANTECEDENTES

El LES es una enfermedad autoinmunitaria con etapas de remisión y reactivación que afectan a múltiples órganos, entre ellos al riñón. La NL es una de las formas más comunes y graves de LES, la cual se caracteriza clínicamente por la activación de los linfocitos y la inflamación intra-renales. La mayoría de las citoquinas que participan en esta patología funcionan de forma parácrina, por lo que la detección de los niveles de expresión de estas citoquinas en el sitio de la patología es de relevancia biológica (Xu *et al.*, 2016).

El diagnóstico precoz de la actividad del LES, especialmente al nivel de actividad renal, es extremadamente importante para las decisiones del régimen terapéutico y las modificaciones del tratamiento así como el pronóstico. En la actualidad, la actividad de LES se evalúa basándose en síntomas clínicos y parámetros bioquímicos tales como auto-anticuerpos (por ejemplo, anti-ds-DNA) y componentes del complemento del suero. Sin embargo, la correlación entre estos marcadores y NL es imperfecta, y su utilidad para reflejar la actividad de la enfermedad y la predicción de resultado sigue siendo controversial, por ejemplo, existen grupos de pacientes con NL activa que no tienen anticuerpos anti-ds-DNA elevados, mientras otros pacientes con LES sin compromiso renal presentan títulos altos de auto-anticuerpos anti-ds-DNA, algunas características de estos anticuerpos como son la capacidad de fijar complemento, el isotipo y la capacidad de unirse al tejido glomerular podrían explicar esta situación (Ferreira *et al.*, 2012).

La biopsia renal ha sido y es el estándar de oro para la evaluación del daño renal y la actividad de la enfermedad, pero su característica invasiva ha restringido su uso. Actualmente, existe un interés en la búsqueda de nuevos biomarcadores que evalúen la actividad de NL. En los últimos años, estudios en modelos animales que padecían NL evidenciaron que el TWEAK se expresa en niveles altos. Además, otros estudios también detectaron valores altos de TWEAK en muestras de orina de pacientes con NL. Los investigadores propusieron que el nivel de TWEAK urinario puede reflejar la actividad de NL (Xuejing *et al.*, 2012); otro de los biomarcadores ampliamente estudiado es MCP-1, que interviene en la mediación de la inflamación y la lesión en NL. En pacientes con LES

y NL activa los niveles de MCP-1 en orina están elevados; pero estos están reducidos después del tratamiento inmunosupresor (El-shehaby *et al.*, 2011).

#### **D. JUSTIFICACIÓN**

La biopsia renal es el estándar para determinar daño renal en pacientes con LES, el análisis microscópico de la muestra identifica las etapas tempranas y tardías de la enfermedad. Sin embargo, la biopsia renal es un análisis costoso, invasivo, que conlleva riesgo y es inaplicable para el monitoreo consecutivo de la enfermedad. (Xu *et al.*, 2016) (Abujam *et al.*, 2013). Además, puede no ser representativo, ya que solo se muestrea un número limitado de glomérulos, lo que motiva a buscar e identificar nuevos biomarcadores que proporcionen información sobre el estado de actividad de la enfermedad. Es así que, en el presente trabajo se pretende medir el nivel de expresión de la citoquina TWEAK y quimioquina MCP-1 en orina, siendo estos mediadores inmunológicos clave para el desarrollo de la enfermedad. La MCP-1 y TWEAK se medirán en sedimentos urinarios en pacientes con NL y lúpicos sin NL, lo que ayudará a diseñar nuevas estrategias de diagnóstico y terapéutica para los pacientes con LES que desarrollan NL, pretendiendo además establecer valores de corte para cada transcrito y su correcta asociación clínica.

Uno de los problemas que cursa el nefrólogo es el seguimiento del tratamiento de pacientes diagnosticados con NL en las etapas de reactivación o remisión, por lo que, el presente trabajo pretende proponer a la medición de niveles de expresión de ambas citoquinas MCP-1 y TWEAK como biomarcadores urinarios para el seguimiento de la evolución y tratamiento de la enfermedad, para dicho cometido, se pretende cuantificar la expresión de estas citoquinas mediante el método molecular de qRT-PCR.

#### **E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hace 30 años, la supervivencia de pacientes con NL severa clase IV era de uno a dos años, y del restante la mitad moría antes de los 5 años. De la misma manera la evolución hacia la IRC en la NL era mayor al 50% a 5 años; la falta de diagnóstico fino en nefrología y la falta de un tratamiento específico y oportuno para la NL llevan a un continuo e irreversible daño en el riñón (Chiu, 2010). En la mayoría de los pacientes el inicio temprano al

tratamiento para NL tiene una respuesta gratificante, logrando controlar la enfermedad y evitando en gran medida las recaídas de la enfermedad. La frecuencia y severidad de las recaídas, depende de múltiples factores como ser: el oportuno inicio del tratamiento en relación al tiempo de diagnóstico, intensidad del tratamiento inicial y del tratamiento de sostén (Bermejo *et al.*, 2010).

Actualmente, la biopsia renal es obligatoria en todos los pacientes con LES con clínica de afectación renal como ser: aumento de creatinina, disminución de filtrado glomerular, proteinuria, hematuria y sedimento activo. La biopsia renal aporta información imprescindible para clasificar la NL según las características histológicas, ayuda a establecer un pronóstico y planificar el tratamiento; lamentablemente la biopsia renal, al ser invasiva no es útil para el seguimiento de la enfermedad. También se emplea marcadores serológicos para detectar actividad lúpica del LES o NL como ser: anticuerpos anti-ds-DNA, niveles de complemento, auto-anticuerpos anti-cromatina y anti-C1q; y para evaluar el funcionamiento renal: creatinina, aclaramiento de creatinina y proteinuria; pero ninguna de las pruebas es específica para predecir la reactivación de la enfermedad o la remisión de esta (Braun *et al.*, 2007). Pueden producirse daños significativos en los riñones antes de que se evidencie clínicamente que la función renal esté deteriorada, por ejemplo, la proteinuria persistente puede no necesariamente indicar una inflamación en curso en los riñones y puede ser contribuida por lesiones crónicas preexistentes o daño reciente en los riñones durante el curso de la enfermedad. Las reactivaciones de la NL pueden ocurrir sin ningún aumento observable y reciente en el grado de proteinuria (Chiu, 2010).

Al no existir un marcador de laboratorio fiable para predecir el inicio de eventos de reactivación de la enfermedad, se está en busca de biomarcadores que puedan predecir este hecho y además, predecir el inicio del daño renal.

Toda la problemática hasta aquí planteada, motiva a que el presente trabajo trate de responder la siguiente pregunta de investigación:

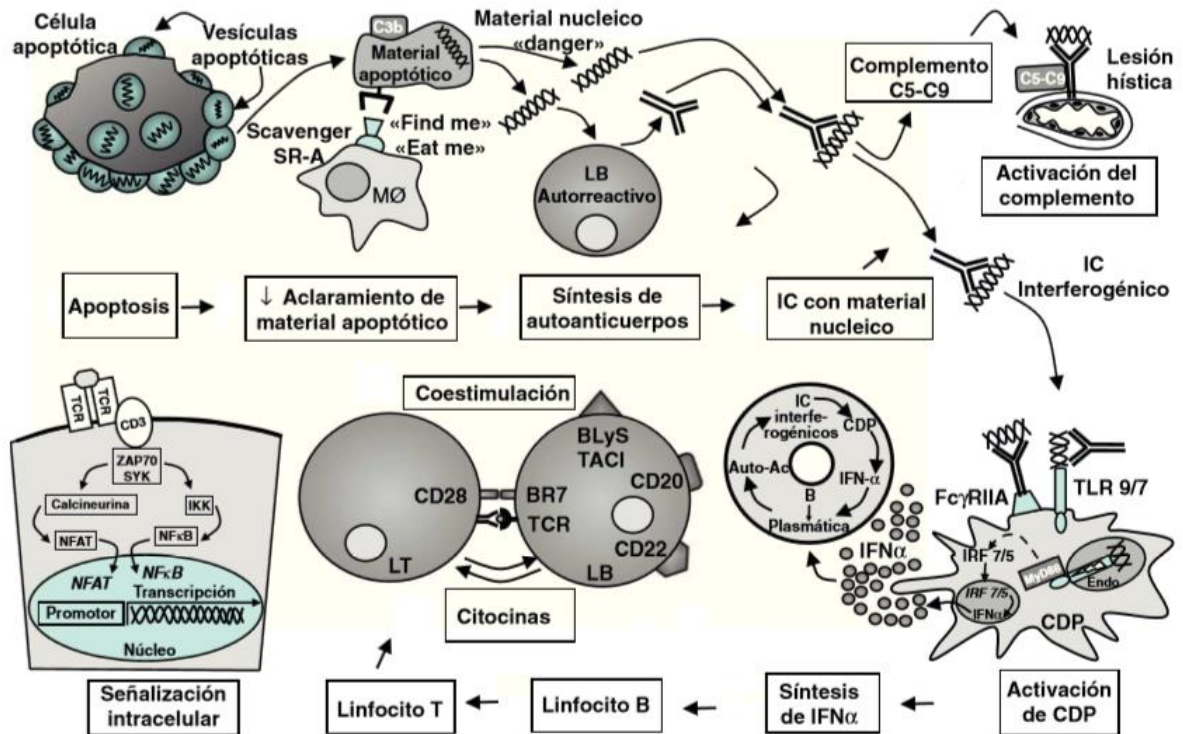
¿Cuál es el grado de asociación entre los niveles urinarios de las citoquinas TWEAK, MCP-1 con los niveles de los marcadores serológicos (anti-ds-DNA, anti-nucleosoma, anti-C1q,  $\beta$ 2-microglobulina, niveles de C3 y C4) de pacientes con NL activa o en remisión?

## **F. MARCO TEORICO**

### **1. LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

En la patología del LES se observan dos situaciones:

- Una de las características de la enfermedad autoinmune es la producción de auto-anticuerpos, que parece ser el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales (exógeno o endógeno), que inciden en el sistema inmunitario para desencadenar la secuencia de eventos que conducen a la exacerbación de fenómenos fisiológicos propios de la autoinmunidad. Se reconoce que en la exacerbación la respuesta inmunitaria a los antígenos nucleares y sus correspondientes auto-anticuerpos desempeñan un papel amplificador tanto a través de los mecanismos de la inmunidad adquirida, como de la inmunidad innata.
  
- Otra situación, es el desarrollo de la inflamación y daño en los órganos diana. Las células apoptóticas parecen ser el origen de los auto-anticuerpos (Figura 1); específicamente son las vesículas apoptóticas que se exponen en la superficie de la célula que entra en apoptosis y que contienen restos celulares, entre ellos ácidos nucleicos y nucleótidos. En circunstancias normales el sistema mononuclear fagocítico, particularmente los macrófagos, se encargan de retirar de la circulación esos restos apoptóticos. En este proceso participa el sistema del complemento, a través de la opsonización de las partículas apoptóticas por su factor C3b.



**Figura 1.** La célula apoptótica expone en su superficie las vesículas apoptóticas conteniendo antígenos nucleares; debido a un deficiente aclaramiento de las partículas apoptóticas por el sistema mononuclear fagocítico, aquellas se acumulan y ganan acceso a los linfocitos B autorreactivos, los cuales sintetizan autoanticuerpos; los IC formados por esos anticuerpos y sus respectivos antígenos nucleicos tienen capacidad para activar el complemento y conducir a lesiones en los tejidos y también para activar a las CDP; las CDP responden con la producción de IFN- $\alpha$  por vías dependientes de TLR7 y TLR9; IFN- $\alpha$  tiene múltiples efectos sobre el sistema inmunitario que favorecen el desarrollo de autoinmunidad, como la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, la activación de células T y la maduración de las células dendríticas. Todo ello conduce a un círculo reverberante que intensifica y perpetúa el proceso autoinmunitario. (CDP: células dendríticas plasmocitoides; IC: inmunocomplejos; IFN: interferón; LB: linfocito B; MØ: macrófago; TCR: receptor de células T; TLR: toll-like receptor)(Sifuentes et al., 2012)

En el LES además de existir un incremento de la apoptosis celular, existe un aclaramiento deficiente de células apoptóticas y ambas alteraciones conducen a la acumulación de material necrótico secundario, capaz de desencadenar inflamación, generación de fragmentos nucleares modificados que son identificados como señales de peligro por el sistema inmunitario, dando como respuesta un estímulo para que los LB autoreactivos inicien la síntesis y secreción de anticuerpos dirigidos contra los fragmentos nucleares de células apoptóticas. Tras la secreción de auto-anticuerpos y su unión a los antígenos nucleares se forman los correspondientes inmunocomplejos (IC), fundamentalmente DNA/anti-DNA, con capacidad para depositarse en los tejidos. Posteriormente, con la

participación del sistema del complemento se provocaría inflamación local y/o lesión como ocurre típicamente en el glomérulo renal (Sifuentes *et al.*, 2012).

Estos IC que contienen productos nucleicos son también captados por las células dendríticas plasmocitoides (CDP) por medio de los receptores Fc $\gamma$ -IIAr e interiorizados en los endosomas. Los receptores Toll-like (TLR) 7 y 9, anclados en la membrana del endosoma, son activados por estos IC e inician la cascada de la transducción que conduce a la activación de los factores de transcripción IRF 7/5 y NF $\kappa$ B, con la producción de grandes cantidades de IFN- $\alpha$ , las CDP son las productoras profesionales de IFN $\alpha$  y, en menor medida, de otras citocinas proinflamatorias, como la IL-6 (Sifuentes *et al.*, 2012). Es de interés que la hidroxiclороquina, uno de los más antiguos fármacos utilizados en el LES, inhibe la unión de las cadenas de ácidos nucleicos a estos TLR a través de la elevación del pH del endosoma y, por tanto, son fármacos inhibidores de los TLR.

El IFN- $\alpha$  secretado por las CDP tiene efectos que favorecen la autoinmunidad: promueve la maduración de las células dendríticas, activa los linfocitos T (LT) (incluidos linfocitos autorreactivos, que pueden haber escapado a la tolerancia central) e interviene en la diferenciación de LB a células plasmáticas productoras de auto-anticuerpos. De esta manera, el IFN- $\alpha$  es un gran activador del sistema inmunitario y con su aparición en escena se completa un circuito en el que al aumentar la presencia de células plasmáticas se incrementa la síntesis de auto-anticuerpos, se forman más IC conteniendo ácidos nucleicos y se activan más CDP, las cuales van a producir más IFN- $\alpha$ , cerrándose así un círculo reverberante que mantiene y multiplica los mecanismos de autoinmunidad (Sifuentes *et al.*, 2012).

## **2. NEFROPATÍA LÚPICA**

La patogénesis de la NL se relaciona en gran medida con el LES por las siguientes características: la desregulación compleja de las respuestas inmunes a los auto-antígenos nucleares, incluyendo la inhibición de mecanismos reguladores, la inflamación crónica, la acumulación de auto-anticuerpos y la formación de IC patógenos. (Munroe *et al.*, 2015).

Numerosos estudios han demostrado que los antígenos nucleares promueven la patogénesis del LES, con fuertes respuestas inmunitarias dirigidas contra los ácidos nucleicos, las histonas y las proteínas ribonucleares. Sin embargo, los mecanismos de muerte celular programada, junto con las alteraciones en la maquinaria de limpieza de residuos apoptóticos, permiten la persistencia de antígenos que pueden ser modificados y percibidos por el sistema inmune como antígenos (auto reactividad contra los auto-antígenos ubicuos). Este proceso es conceptualmente similar a la inmunización en la que las células plasmáticas de larga vida autorreactivas y las células T de memoria aseguran la memoria inmune a largo plazo, lo que puede usarse para explicar por qué no hay cura para esta enfermedad.

Las partículas nucleares endógenas pueden conducir la autoinmunidad de dos maneras: como autoadyuvantes y auto-antígenos. Por ejemplo, las partículas nucleares se asemejan a las partículas virales porque activan los mismos receptores de reconocimiento de ácido nucleico viral, es decir, la señalización de TLR7 en las células presentadoras de antígeno, donde promueven efectos autoadyuvantes; asimismo, el DNA nucleosómico o el DNA dentro de complejos inmunes también pueden activar TLR9 en células B y CDP (Munroe *et al.*, 2015).

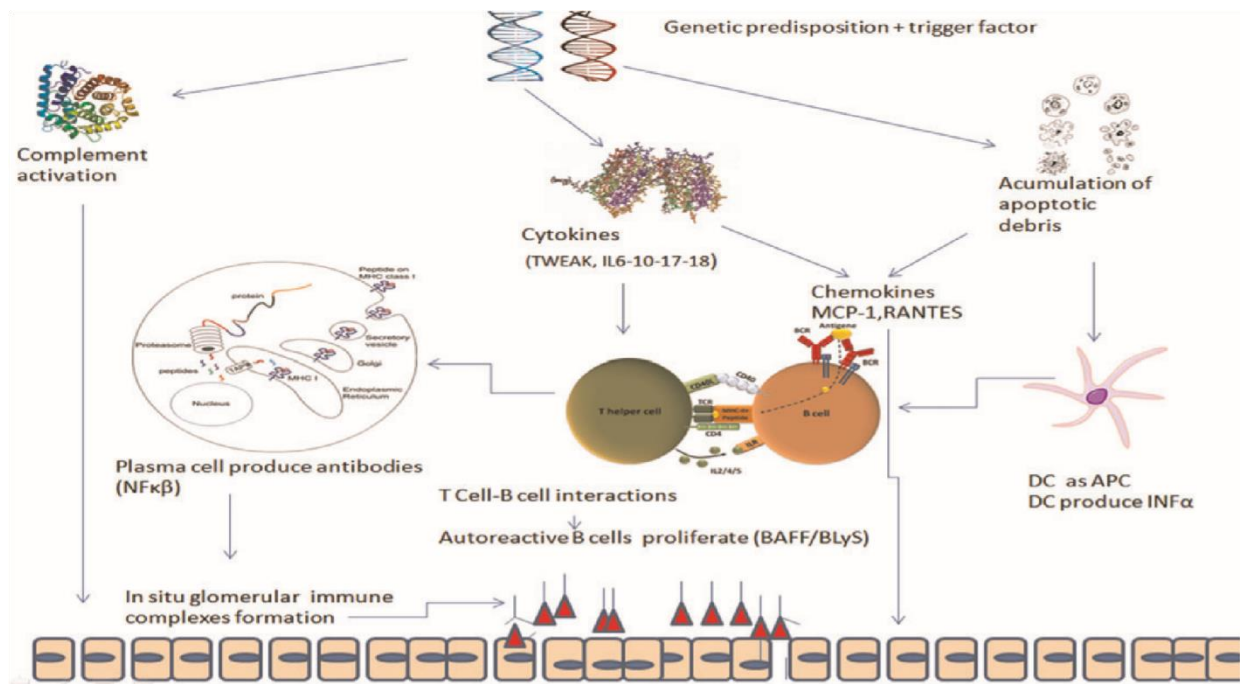
Las células T citotóxicas, las células Th17 así como las células B, se infiltran en el riñón. Sin embargo, el mecanismo patogénico esencial para la aparición de la NL está en la activación de las células B y T fuera del riñón. La activación no específica de las células B autorreactivas explica la respuesta policlonal del auto-anticuerpo, también los depósitos de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG (IgG1 e IgG3) activan el complemento; este doble proceso supera el doble papel de los factores del complemento en la NL. Por un lado, la deficiencia del complemento afecta la opsonización y la eliminación de los auto-antígenos de espacios extracelulares, pero, por otro lado, los factores del complemento también causan directamente daño renal relacionado con los depósitos de IC. Según el tipo, la duración y la gravedad de la NL, los IC se depositan en el mesangio, en el espacio subendotelial o en los capilares peritubulares subepitelial. Dentro del glomérulo, los



depósitos de complejos inmunes subepiteliales conducen a glomerulonefritis membranosa secundaria y síndrome nefrótico (Kulkarni *et al.*, 2012).

### **2.1. Etiología intrarenal**

El desarrollo y la deposición de IC en NL ha sido ampliamente estudiado, ya que los depósitos de IC renales se encuentran en casi todos los pacientes con LES. Estudios recientes indican que los IC que contienen auto-anticuerpos anti-nucleares interactúan con nucleosomas atrapados en una forma antígeno específica, particularmente en pacientes con LES con especificidad de auto-anticuerpos a componentes nucleosómicos, como la cromatina y el ds-DNA. Además, un gran número de pacientes lúpicos llevan anticuerpos anti-C1q, capaces de amplificar la activación del complemento patogénico que resulta en daño renal cuando los auto-anticuerpos interactúan con IC que contienen anti-C1q. A pesar de la presencia de IC, muchos pacientes de LES nunca desarrollan enfermedad renal clínica, aunque tienen evidencia histológica de inflamación intrarrenal (Kulkarni *et al.*, 2012). La nefritis clínicamente silenciosa sugiere que la presencia y/o deposición de IC por sí sola no es suficiente para impulsar el desarrollo de NL y que están involucrados otros factores patológicos como ser: la creciente inflamación, la apoptosis y la acumulación de matriz extracelular, que pueden reducir el flujo sanguíneo glomerular y dañar la barrera de permeabilidad glomerular, además de los factores genéticos (Figura 2).



**FIGURA 2:** La predisposición genética nos brinda un impacto de riesgo moderado en LES. Los factores ambientales, hormonales y epigenéticos añaden complejidad a este modelo patogénico y el resultado de la disregulación del sistema inmune. La formación in situ de complejos inmunitarios entre los anticuerpos anti-cromatina circulantes y la cromatina glomerular extracelular parece ser el evento iniciador en NL. Dichas especificaciones autorreactivas se generan por respuestas inmunitarias relacionadas con la captación defectuosa de detritos celulares apoptóticos por neutrófilos, macrófagos y un aumento en la rotación de células inflamatorias. La formación de tejido linfoide tubulointersticial, la producción de anticuerpos intrarrenales y la activación del complemento contribuyen a la inflamación renal. La activación de las células dendríticas (CD) aumenta la producción del CMH II para la presentación antigénica y la liberación de los receptores de IFN $\alpha$ , lo que lleva a la activación de las células T y la diferenciación de las células B en las células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los leucocitos y las células intrínsecas del riñón producen citoquinas proinflamatorias y quimiocinas en respuesta a complejos inmunitarios y fragmentos del complemento, amplificando un círculo vicioso de inflamación renal y promoviendo la nefritis. Existen varios intermediarios de inflamación como ser: factor de necrosis (TNF) como inductor débil de apoptosis (TWEAK) promueve la proliferación celular glomerular, inflamación y apoptosis. Por el contrario, otros como el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) promueven cicatrices en los glomérulos lesionados y el túbulo intersticial a través de la deposición de matriz extracelular (Quintana et al., 2016).

La inflamación asociada con el daño renal en pacientes lúpicos esta mediada por la producción de TNF- $\alpha$  en el sitio de daño. El receptor 1 de TNF- $\alpha$  (TNFR1) se expresa normalmente a nivel glomerular y en las células endoteliales peritubulares y se regula positivamente en respuesta a la lesión renal en NL, asociándose principalmente con la forma soluble de TNF- $\alpha$ . El segundo receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR2), no se expresa en el riñón hasta que se ha producido inflamación, siendo la presencia de TNFR2 esencial para

el desarrollo de glomerulonefritis. TNFR2 se asocia con la forma de TNF- $\alpha$  ligada a la membrana, promoviendo la secreción de mediadores pro-inflamatorios. La citoquina TWEAK interactúa con el receptor Fn14, y la expresión de los genes que codifican TWEAK y Fn14 son regulados en el glomérulo y túbulo intersticial de pacientes LES con NL.

Los datos histopatológicos de los riñones de pacientes con LES y NL sugieren que la inflamación que tiene lugar en el riñón es un microcosmos de desregulación del sistema inmune, con la interacción entre las células parenquimatosas y los leucocitos, determinando así el grado de daño renal. Las células presentadoras de antígeno profesionales (APC), células Th diferenciadas (Th1, Th2, Th3 y Tfh) y linfocitos B, así como centros germinales ectópicos, están presentes en el riñón en la NL (Nowling *et al.*, 2011). Estos tipos de células deben ser reclutados en el riñón inflamado por quimiocinas, como MCP-1/CCL2 macrófagos, IL-8/CXCL8 y CXCR5, que se unen al BCA-1/CXCL13 del linfocito B, todos ellos asociados con NL. Además de los procesos proinflamatorios que conducen al daño renal, los mecanismos de protección renal que previenen la NL clínica en algunos pacientes con LES con IC pueden ser alterados, lo que aumenta el riesgo de desarrollar NL que puede ser refractario a los regímenes de tratamiento actual y progresar a enfermedad renal crónica.

Las variantes genéticas que contribuyen a comorbilidades sistémicas también pueden contribuir al desarrollo y gravedad de la NL. Por ejemplo, la hipertensión se ha asociado con NL y puede ser un factor de riesgo para un resultado deficiente. Las variantes genéticas dentro de los genes codificadores de la enzima convertidora de angiotensina y codificantes del angiotensinógeno confieren una mayor susceptibilidad al desarrollo y la gravedad de NL. Para los pacientes con LES la desregulación inmune de las respuestas de IFN de tipo I y la presencia de auto-anticuerpos asociados con lupus puede proporcionar el segundo golpe necesario para dañar los podocitos en la NL y la progresión a enfermedad renal crónica (Munroe *et al.*, 2015).

## **2.2. FISIOPATOLOGÍA Y ETIOGENIA**

Se cree que el lupus se desarrolla en respuesta a una combinación de factores internos y externos del cuerpo, incluidas las hormonas, la genética y el medio ambiente.

### **2.2.1. Factor ambiental**

Actualmente, la mayoría de los investigadores hace referencia de un agente ambiental, como un virus o posiblemente un químico, encontrado al azar por un individuo genéticamente susceptible, el cual actúa como desencadenante de la enfermedad (Parks *et al.*, 2017). Los investigadores aún no han identificado un agente medioambiental específico, pero la hipótesis sigue siendo probable.

Si bien, los elementos ambientales que pueden desencadenar lupus y causar su activación no se conocen del todo, los más citados son la luz ultravioleta (UVA y UVB); infecciones (incluidos los efectos del virus Epstein-Barr) y la exposición al polvo de sílice en entornos agrícolas o industriales (Mak *et al.*, 2014).

Otros ejemplos de desencadenantes ambientales potenciales incluyen:

- Los medicamentos de sulfa, que hacen que una persona sea más sensible al sol, como: Sulfatrimetoprim, sulfisoxazol, tolbutamida, sulfasalazina, diuréticos; medicamentos de tetraciclina sensibilizantes al sol como la minociclina, penicilina u otros medicamentos antibióticos como: amoxicilina; ampicilina; cloxacilina.
- Infección, resfriados o enfermedades virales
- Agotamiento
- Estrés emocional, como el divorcio, la enfermedad, la muerte en la familia u otras complicaciones de la vida.
- Cualquier otra cosa que cause estrés al cuerpo, como cirugía, daño físico, lesión, embarazo o dar a luz.

### **2.2.2. Factor hormonal**

Las hormonas son los mensajeros que regulan muchas de las funciones del cuerpo. Debido a que 9 de cada 10 casos de lupus se encuentran en mujeres, los investigadores han analizado la relación entre el estrógeno y el lupus (Vidaver, 2002; McMurray *et al.*, 2003).

Si bien, los varones y las mujeres producen estrógenos, su producción es mucho mayor en las mujeres. Muchas mujeres tienen más síntomas de lupus antes de los períodos menstruales y/o durante el embarazo cuando la producción de estrógenos es alta. Esto puede indicar que los estrógenos regulan de alguna manera la severidad del lupus. Sin embargo, no se ha demostrado ningún efecto causal entre los estrógenos o cualquier otra hormona y el lupus. Además, los estudios de mujeres con lupus que toman estrógenos en pastillas anticonceptivas o como terapia posmenopáusica no han mostrado un aumento en la actividad de la enfermedad. Los investigadores ahora se centran en las diferencias entre hombres y mujeres, más allá de los niveles hormonales, lo que puede explicar por qué las mujeres son más propensas al lupus y otras enfermedades autoinmunes (Grimaldi, 2006).

### **2.2.3. Factor genético**

Los investigadores identificaron más de 50 genes que se asocian con el lupus, y aunque la mayoría de estos genes no han demostrado causar directamente lupus, se cree que contribuyen a ello (susceptibilidad genética) (Li *et al.*, 2013).

El lupus puede desarrollarse en personas sin antecedentes familiares, pero es probable que existan otras enfermedades autoinmunes en algunos miembros de la familia.

## **2.3. TRATAMIENTO**

La NL activa requiere terapia inmunosupresora combinada y glucocorticoide (Tabla 1). La terapia actual es tóxica y las respuestas demoran en conseguir el efecto deseado: menos del 50% logran una respuesta completa, definida como proteinuria < 0,5 g / 24 h en 12 meses, con función excretora normal. Existe incertidumbre en cómo utilizar las terapias biológicas específicas debido a la evidencia no concluyente de los ensayos y la ausencia de biomarcadores de estratificación para explicar las tasas de respuesta (Quintana *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Histología renal y su correspondiente tratamiento (Directrices del Colegio Americano de Reumatología para el tratamiento y el manejo de la nefritis lúpica)

ISN	Histología	Riesgo de enfermedad renal en etapa terminal	Tratamiento propuesto
I	OM: Normal, mesangial ID	Muy poco	ACEi/ARB; HC
II	OM: Mesangial hiper celularidad, mesangial ID	Muy poco	ACEi/ARB; HC
III/IV	OM: GN Focal o difuso. Hiper celularidad Endo/estracapilar, ID sub-endotelial	20%	GC; CYC; MMF; rituximab
V	OM: GN Membranoso, BM ensanchamiento sub-epitelial ID	< 10 %	GC; CYC; MMF; rituximab

*ISN, clase histológica; OM, microscopía óptica; ID, depósitos inmunitarios; GN, glomerulonefritis; BM, membranas de base; ACEi / ARB, inhibidores de la ACE inhibidores de los bloqueadores del receptor de angiotensina; HC, hidroxiclороquina; GC, glucocorticoides; CYC, ciclofosfamida; MMF, micofenolato mofetil. (Quintana et al., 2016)*

La clasificación es importante debido a la terapia inmunosupresora que sólo está indicada en pacientes con daño glomerular activo y trastornos de clase III y Clase IV, así como en la clase V en NL que presentan proteinuria > 1 g por 24 h.

Las recientes declaraciones del consenso (Colegio Americano de Reumatología, asociación contra el reumatismo – asociación Europea renal – asociación Europea de diálisis y trasplante) recomendaron una inmunoterapia de inmunosupresión primaria que consistente en micofenolato mofetil (MMF) o ciclofosfamida. Dada la toxicidad de la ciclofosfamida, se recomendó un régimen de dosis bajas (500 mg/m<sup>2</sup> por vía intravenosa cada 2 semanas durante 3 meses), mientras que el régimen de dosis alta (750-1000 mg/m<sup>2</sup> por vía intravenosa una vez al mes para las dosis) debe ser administrado a pacientes con progresión de la enfermedad (Yong *et al.*, 2008).

La elección entre el MMF y la ciclofosfamida es un tema de controversia, aunque los datos de ensayos revelaron que los afroamericanos y los hispanos parecían tener una peor respuesta a la ciclofosfamida que a MMF. Además de la etnicidad, también debe considerarse los efectos tóxicos colaterales en la elección de fármacos inmunosupresores. El MMF fue asociado sin fracaso ovárico y leucopenia. Sin embargo, aumentó el riesgo de diarrea comparada con la ciclofosfamida. El tacrolimus se ha combinado con el MMF

y los glucocorticoides en un grupo de poblaciones chinas, y se ha demostrado que es superior a un régimen basado en ciclofosfamida. El tacrolimus también se ha comparado con el MMF con similares tasas de eficacia temprana, pero mayores tasas de recaída más tarde (Palmer *et al.*, 2017; Mok *et al.*, 2014).

El tratamiento inmunosupresor de la NL se combina con glucocorticoides, que comienza con un bolo intravenoso de metilprednisolona (500-750 mg / día durante 3 días) es recomendado por el consenso Europeo y Americano como la dosis cumulativa de glucocorticoides. Otra recomendación es que los pacientes que responden al tratamiento inicial deben continuar con la terapia de mantenimiento inmunosupresor, en este momento la principal preocupación debería ser bloquear la respuesta del sistema inmunitario para inhibir la producción de anticuerpos y prevenir la activación de la enfermedad. Se puede utilizar MMF o azatioprina para este propósito, aunque el MMF debe continuar cuando se utiliza con éxito como terapia de inducción (Quintana *et al.*, 2015).

## **2.4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y LABORATORIAL**

### **2.4.1. Criterios del colegio Americano de Reumatología (ACR) y del grupo de Clínicas Colaboradoras Internacionales del Lupus Eritematoso Sistémico (SLICC).**

El diagnóstico inicial del LES depende de la forma de presentación y la exclusión de los diagnósticos alternativos. Dada la heterogeneidad de las presentaciones clínicas, existen algunos pacientes para quienes las características clínicas y los estudios de laboratorio de apoyo hacen que el diagnóstico de LES resulte relativamente sencillo. Por el contrario, hay otros que presentan quejas aisladas o características infrecuentes de la enfermedad, convirtiéndose en un desafío para el diagnóstico. Los datos demográficos también deben tenerse en cuenta cuando se evalúa a un paciente para LES, ya que se produce principalmente en mujeres jóvenes en edad fértil. Además, el LES se presenta con mayor frecuencia en ciertos grupos raciales y étnicos, en particular afroamericanos, asiáticos, africanos caribeños e hispanoamericanos, en comparación con los caucásicos.

Un grupo de expertos de consenso sobre LES, el SLICC, ha propuesto criterios revisados para dicho diagnóstico. La clasificación como LES por los criterios SLICC requiere que un paciente satisfaga al menos 4 de 17 criterios, incluyendo al menos 1 de los 11 criterios clínicos y 1 de los 6 criterios inmunológicos (Tabla 2) (Petri *et al.*, 2012), o que el paciente tenga nefritis demostrada por biopsia compatible con LES en presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) o anticuerpos anti-DNA bicatenario (ds-DNA).

Los criterios SLICC fueron validados mediante el análisis de 690 pacientes con LES u otras enfermedades reumáticas. En esta prueba de validación inicial, los criterios revisados de SLICC tuvieron una mayor sensibilidad pero una menor especificidad que los criterios de clasificación ACR de 1997 (sensibilidad de 97 frente a 83 por ciento y especificidad de 84 frente a 96 por ciento, respectivamente) (Petri *et al.*, 2012).



**Tabla 2.** Clasificación del LES por los criterios SLICC del 2012.

---

**Criterios Clínicos**

- 1. Lupus cutáneo agudo**, incluyen:
  - Rash malar
  - Lupus bulloso
  - Necrosis tóxica epidérmica variante de LES
  - Rash maculopapular lúpico
  - Rash lúpico fotosensible
  - en ausencia de dermatomiositis*
  - O lupus cutáneo subagudo (lesiones policíclicas anulares y/o psoriasiformes no induradas que resuelven sin cicatriz, aunque ocasionalmente dejan despigmentación postinflamatoria o telangiectasias)
- 2. Lupus cutáneo crónico**, incluyen:
  - Lupus discoide clásico: lupus profundus, lupus sabañon o perniois lúpica.
    - Localizado (por encima del cuello)
    - Generalizado (por encima y debajo del cuello)
  - Lupus hipertrófico (verrugoso)
  - Paniculitis lúpica
  - Lupus mucoso
  - Lupus eritematoso tumidus
  - Lupus chillblain
  - Sobreposición lupus discoide/liquen plano
- 3. Úlceras orales**, incluyen:
  - Úlceras en e paladar (bucal, lengua)
  - Úlceras nasales
  - en ausencia de otras causas como vasculitis, enfermedad de Behçet, infección (herpesvirus), enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reactiva*
- 4. Alopecia no cicatricial** (adelgazamiento difuso o fragilidad capilar con cabello visiblemente roto)  
*en ausencia de otras causas como fármacos, deficiencia de hierro o alopecia androgénica*
- 5. Afectación articular de 2 o más articulaciones**, caracterizado por inflamación o edema, o sensibilidad en 2 o más articulaciones y al menos 30 minutos de rigidez matutina.
- 6. Serositis:**
  - Pleuritis típica por más de 1 día (derrame pleural o roce pleural).
  - Dolor pericárdico típico durante más de 1 día (derrame pericárdico, o roce pericárdico)  
*en ausencia de otras causas como infección, uremia y Síndrome de Dressler.*
- 7. Afectación renal:** Relación proteinuria/creatinuria (o proteinuria de 24 horas) que representen 500 mg de proteínas/24 horas o cilindros hemáticos.
- 8. Alteraciones neurológicas**
  - Convulsiones
  - Psicosis
  - Mononeuritis múltiple
  - en ausencia de otras causas conocidas como vasculitis primaria*
  - Mielitis
  - Neuropatía periférica o craneal
  - en ausencia de otras causas como vasculitis primaria, infección y diabetes mellitus*
  - Estado confusional agudo
  - en ausencia de otras causa como uremia, fármacos y toxico-metabólicas*
- 9. Anemia hemolítica.**
- 10. Leucopenia** (< 4000/mm<sup>3</sup> al menor una vez)  
*en ausencia de otra causa conocida como ser el síndrome de Felty, fármacos e hipertensión portal*
  - Linfopenia (< 1,000/mm<sup>3</sup> al menos un vez)
  - en ausencia de otra causa conocida como cordicoides, fármacos e infección*
- 11. Trombocitopenia** (<100.000/mm<sup>3</sup>) al menos una vez  
*en ausencia de otras causas conocidas como farmacos, hipertension portal y purpura trombocitopenica*

---

**Criterios inmunológicos**

- 1. ANA positivo:** en valores por encima del nivel del rango de referencia del laboratorio
- 2. Anti-ds-DNA positivo:** en valores por encima del nivel de referencia del laboratorio (o >2 veces el nivel de referencia si es realizado por ELISA).
- 3. Anti Sm positivo:** presencia de anticuerpos anti-antígeno nuclear Sm
- 4. Anticuerpos antifosfolípidos:**
  - Resultado positivo para anticoagulante lúpico falso reactante de reagina (RPR, VDRL)
  - títulos medios o altos de anticardiolipina (IgA, IgG o IgM)
  - resultado positivo para anti β2-glicoproteína (IgA, IgG o IgM)
- 5. Niveles de Complemento bajo:** C3, C4, CH50.
- 6. Coombs directo positivo** en ausencia de anemia hemolítica.

---

Debido a que el LES se caracteriza por la remisión y reactividad de la enfermedad se han creado numerosos regímenes según las manifestaciones y el grado de daño del paciente; sin embargo, durante muchos años se ha estudiado y se han planteado diversos sistemas para definir el tipo de tratamiento a prescribir durante el curso de los brotes lúpicos. Esto dio origen al índice de actividad, que define el grado de afección lúpica en cualquier momento dado, y que puede oscilar desde la remisión o actividad mínima o nula, hasta la actividad grave que comprometa la vida del paciente (Tabla 3) (Ighe *et al.*, 2015; Ines *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2012).

La determinación del grado o intensidad de la enfermedad, en un momento dado, establece criterios terapéuticos y, a largo plazo, identifica el grado de daño progresivo que ha experimentado el paciente; por ende, es de gran ayuda para el pronóstico a largo plazo y determinante para indicar el tratamiento. El tratamiento es proporcional a la intensidad de la actividad. Es fundamental cuantificar los cambios y las respuestas clínicas de los pacientes (diferentes en cada uno), ya que el tratamiento varía de uno a otro, según la actividad, los órganos afectados y el daño acumulado.

**Tabla 3.** Índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico (SLEDAI)

Valor	Manifestación	Definición
8	Convulsión	Apariencia reciente, exclusión de causas metabólicas, infecciones o medicamentos
8	Psicosis	La alteración de la actividad normal asociada con deterioro grave de la percepción de la realidad. Incluye: alucinaciones, incoherencia, el empobrecimiento del contenido del pensamiento, pensamiento ilógico, comportamiento extraño, desorganizado o catatónico. Exclusión de la insuficiencia renal o el medicamento
8	Parálisis cerebral	Alteración de la función mental con la orientación alterada, memoria u otro inicio repentino y curso fluctuante. Incluye: alteración de la consciencia con una capacidad reducida para concentrarse, incapacidad para permanecer atento y más con al menos 2 de los siguientes: los trastornos de percepción del habla incoherente, insomnio o somnolencia durante el día, el aumento o disminución de la actividad psicomotora
8	Trastornos visuales	Retinopatía retiniana del lupus, incluye: nódulos, hemorragias retinianas, exudados o hemorragias coroideas serosas, neuritis óptica. Exclusión de una causa hipertensiva, infecciosa o medicinal
8	Nervios craneales	Neuropatía sensorial o motor de aparición reciente que afecta a un nervio craneal
8	Dolor de cabeza	Dolor de cabeza intenso y persistente, migraña, pero pueden ser resistentes a los principales analgésicos

8	Accidente cerebrovascular	Accidente cerebrovascular de aparición reciente. Arteriosclerosis excluida.
8	Vasculitis	Ulceraciones, gangrena, nódulos digitales dolorosos, peri-infarto o evidencia histológica de vasculitis o arteriografía.
4	Artritis	Más de 2 articulaciones dolorosas con signos de inflamación (dolor, hinchazón y derrame articular)
4	Myositis	Dolor / debilidad muscular proximal asociado con elevación de creatinofosfoquinasa (CPK) y/o aldolasa o cambios electromiográficos o una biopsia que muestra signos de vasculitis
4	Cilindros urinarios	Cilindros urinarios de glóbulos rojos
4	Hematuria	> 5 g / campo en ausencia de litiasis, infección u otra causa
4	Proteinuria	> 0.5 g / 24h. Inicio reciente o reciente aumento de más de 0,5 g / 24h
4	Piuria	> 5 GB / campo en ausencia de la infección
2	Alopecia	Aparición o recurrencia de la placa de alopecia o difusa reciente
2	Úlceras mucosas	Nueva aparición o reaparición de úlceras orales o nasales
2	Pleuresía	Dolor en el pecho con fricción origen pleural o derrame pleural o engrosamiento
2	Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos una de las siguientes manifestaciones: fricción, derrame o confirmación electrográfica o por ultrasonido.
2	Reducción de complemento	Disminución de CH50, C3 o C4
2	Positividad anti-DNA	> a 25% valor normal de laboratorio
1	Fiebre	> 38 ° en ausencia de causa Infecciosa
1	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas / mm <sup>3</sup>
1	Leucopenia	<3000 GB / mm <sup>3</sup> en ausencia de una causa de droga

#### 2.4.2. Criterios de clasificación de la Sociedad de Nefrología (ISN)/ Sociedad de Patología Renal (RPS)

La clasificación de la NL es crítica, desde la atención al paciente hasta la comparación de resultados y ensayos terapéuticos entre diferentes clínicas. Aunque el conocimiento de la etiología de LES es incompleta, está claro que los diferentes mecanismos efectores de la enfermedad pueden ser efectuados solos o en conjunto para producir los patrones pleomórficos de NL. En el riñón, los antígenos intrínsecos tales como los componentes de la matriz extracelular o las glicoproteínas de células pueden servir como dianas para la unión de auto-anticuerpos. Asimismo, la lesión renal en la NL puede resultar de auto-anticuerpos (anti-ds-DNA, anti-nucleosoma) que se unen a antígenos circulantes, formando IC preformados, que llegan a depositarse en las paredes glomerulares causando inflamación y citotoxicidad por la posterior unión del complemento a la región Fc.

Además, dicha citotoxicidad puede dirigirse a los podocitos en el contexto de la nefropatía membranosa, donde la formación de IC *in situ* ocurre a lo largo de la membrana basal glomerular sub-epitelial o hacia las células endocapilares. Además de la directa lesión celular y tisular por los complejos inmunes, los auto-anticuerpos con actividad antifosfolípido o crioglobulina también pueden promover lesiones vasculares trombóticas e inflamatorias en LES.

#### **2.4.2.1. Patrones de lesión glomerular**

Basado en varios modelos experimentales de enfermedades autoinmunes por depósitos de complejos inmunes en el riñón y observaciones de biopsias renales en humanos; los patrones de daño glomerular están mediados por la acumulación de inmunoglobulinas y su antígeno específico, y la capacidad de activar el complemento y otras proteasas provocando así una respuesta inflamatoria celular. Estos patrones de lesión se dividen en tres grupos:

##### **a) Patrón mesangial**

El patrón mesangial, es el resultado de la acumulación de complejos inmunes y de la hiperplasia en la matriz mesangial, como puede ocurrir en la nefropatía por IgA o NL mesangial proliferativa.

##### **b) Patrón endotelial**

El patrón endotelial tiene un componente exudativo, se caracteriza por la acumulación de leucocitos, lesión de células endoteliales y un patrón de proliferación endocapilar. Este patrón está asociado a menudo con una destrucción de la pared capilar, existe una leve deposición de IC. Esta categoría es amplificada por una glomerulonefritis post infecciosa, por los anticuerpos anti-membrana glomerular basal (GMB), vasculitis sistémica y las formas endocapilares proliferativas de la glomerulonefritis lúpica.

En el patrón endotelial de lesión glomerular puede estar separado del patrón difuso y global por una forma focal segmentario (como se ve en la poliangiitis microscópica), en la que pueden prevalecer diferentes mecanismos patogénicos. El patrón de lesión endotelial puede ser causado por mecanismos no inmunológicos como la hipertensión, toxinas

bacterianas que inducen la microangiopatía trombótica y eventos trombóticos en el síndrome del anticoagulante lúpico asociado a LES.

La acumulación persistente de complejos inmunes en el espacio subendotelial puede provocar lesiones graves y crónicas, incluida la interposición celular y la producción del GMB. Este cambio endocapilar usualmente se asocia con la patología mesangial porque el mesangio tiene una directa continuidad con el espacio sub endotelial y son accesibles a IC circulantes. Este patrón combinado de lesión mesangiocapilar o patrón membrano proliferativo es común en la fase crónica de la NL.

#### c) **Patrón epitelial**

En el patrón epitelial los anticuerpos y el complemento influyen en el daño citotóxico en los podocitos, resultando una lesión de la pared capilar no exudativa, no proliferativa, como puede verse en las formas idiopáticas y asociados a LES de glomerulopatía membranosa.

Las manifestaciones clínicas de estos tres patrones morfológicos pueden predecirse en base a la topografía y el carácter de las lesiones glomerulares. La patología mesangial conduce a un síndrome de hematuria microscópica y proteinuria subnefrótica con una tasa de filtración glomerular (TFG) mínimamente reducido; el patrón endocapilar se caracteriza por una aguda reducción de la TGF, hematuria y proteinuria de leve a moderada; y el patrón membranoso se asocia con proteinuria significativa, en el síndrome nefrótico frecuentemente existe preservación o una gradual reducción del TFG (Mok *et al.*, 2014).

#### **2.4.2.2. Clasificación de la nefropatía lúpica**

Con el fin de dar cabida a los puntos de vista clínico patológico y patogénico que se han acumulado desde 1982 y modificado en 1995 a partir de la clasificación original de la OMS 1974, con el objeto de eliminar las incoherencias y ambigüedades se propuso la nueva clasificación (Tabla 4) (Weening *et al.*, 2004). En general, tiene gran similitud con la clasificación de 1974, pero introduce varias modificaciones importantes con respecto a las diferencias cuantitativas y cualitativas entre las lesiones de clase II y IV

(Bombardier *et al.*, 1992, Markowitz *et al.*, 2007). El objetivo principal fue estandarizar definiciones, enfatizar las lesiones clínicamente relevantes, uniformar y reproducir los reportes entre centros. Al igual que las clasificaciones precedentes, esta nueva clasificación está basado exclusivamente en la patología glomerular.

**Tabla 4.** Clasificación de la nefropatía lúpica por la Sociedad Internacional de Nefrología/ Sociedad de Patología Renal (ISN/RPS) 2003.

---

<b>Clase I</b>	<b>Nefritis lúpica mesangial mínima</b> Glomérulos normales por microscopía óptica, pero con depósitos inmunes mesangiales por inmunofluorescencia
<b>Clase II</b>	<b>Nefritis lúpica mesangial proliferativa</b> Hipercelularidad mesangial de cualquier grado o expansión de la matriz mesangial por microscopia, con depósitos inmunes mesangiales. Algunos aislados de depósitos sub-epiteliales o sub-endoteliales pueden ser visibles por inmunofluorescencia o microscopía electrónica, pero no por microscopía de luz
<b>Clase III</b>	<b>Nefritis lúpica focal</b> Glomerulonefritis focal o extracapilar, segmentaria o global, activa o inactiva que involucra < 50 % de todos los glomérulos, generalmente con depósitos inmunes subendoteliales focales, con o sin alteraciones mesangiales. Clase III (A) Lesiones activas: NL focal proliferativa Clase III (A/C) Lesiones activas y crónicas: NL focal proliferativa y esclerosante Clase III (C) Lesiones crónicas inactivas con cicatrices glomerulares: NL focal esclerosante
<b>Clase IV</b>	<b>Nefritis lúpica difuso</b> Glomerulonefritis focal o extracapilar, segmentaria o global, activa o inactiva que involucra $\geq 50$ % de todos los glomérulos, típicamente con depósitos de complejos inmunes sub-endotelial, con o sin alteración mesangial. Esta clase se divide en NL difuso segmentario (IV-S) cuando la lesión es $\geq 50$ % en los glomérulos, y NL difuso global (IV-G) cuando la lesión es $\geq 50$ % del total de glomérulos. Segmental es definido como lesión glomerular que implica menos de la mitad del penacho glomerular. Clase IV-S (A) Lesión activa: NL proliferativa segmental Clase IV-G (A) Lesión activa: NL proliferativa global Clase IV-S (A/C) Lesión crónica y activa: NL proliferativa difuso, segmental y esclerosante Clase IV-G (A/C) Lesión crónica y activa: NL proliferativa difuso, global y esclerosante Clase IV-S (C) Lesión crónica inactiva con cicatrices: NL difuso, segmental y esclerosante Clase IV-G (C) Lesión crónica inactiva con cicatrices: NL difuso, global y esclerosante
<b>Clase V</b>	<b>Nefritis lúpica membranoso</b> Depósitos inmunes subepiteliales globales o segmentarios o sus secuelas morfológicas mediante microscopía óptica y mediante inmunofluorescencia o microscopía electrónica, con o sin alteraciones mesangiales. La nefritis lúpica de clase V puede ocurrir en combinación con clase III o IV, en cuyo caso ambos serán diagnosticados La nefritis lúpica de clase V puede mostrar esclerosis avanzada Clase VI Nefritis lúpica avanzado esclerosante $\geq 90\%$ de glomérulos globalmente esclerosados sin actividad residual

---

Los tejidos obtenidos para la biopsia y evaluación precisa de las alteraciones glomerulares, celulares y de la pared capilar deben contener un mínimo de 10 glomérulos para el análisis microscópico. Se requiere de la inmunofluorescencia para un análisis completo de la biopsia renal y debería incluir tinciones que detecten IgG, IgA e IgM, cadenas ligeras kappa y lambda, componentes del complemento C3 y C1q.

Si bien el papel de la microscopía electrónica en el diagnóstico y la clasificación de la glomerulonefritis lúpica no puede subestimarse y puede ser esencial en algunos casos, la falta de instalaciones de microscopía electrónica disponibles en muchos centros en todo el mundo no debe evitar que el patólogo de un diagnóstico de NL usando una combinación de estudios completos de microscopía de luz e inmunofluorescencia (Weening *et al.*, 2004).

## **2.5. BIOMARCADORES EN LA NEFROPATÍA LÚPICA**

El concepto de biomarcador está enmarcada en las características o cambios fisiológicos, bioquímicos o morfológico medible y evaluable a nivel molecular, bioquímico o celular que actúa como indicador de un proceso normal o patológico, o como respuesta a una intervención terapéutica. Actualmente para la NL se estudió distintos biomarcadores para el diagnóstico y para el seguimiento de la reactivación de la enfermedad, entre ellos se destaca:

### **2.5.1. Biomarcadores serológicos**

#### **2.5.1.1. Anticuerpos anti-ds-DNA**

El DNA es el portador de la información genética de un individuo, y como tal, está presente en cada célula nucleada. En la célula, el DNA se encapsula en nucleosomas. Estos nucleosomas forman la estructura básica de la cromatina y tienen una función importante en la compactación del DNA en el núcleo de la célula.

Desde hace décadas se sabe que los anticuerpos anti-DNA de doble cadena están muy relacionados con el LES. Este se caracteriza por remisiones y exacerbaciones que suelen estar asociadas a la presencia de anticuerpos antinucleares, en particular anti-DNA de doble cadena. Estos anticuerpos raras veces son encontrados en otras enfermedades autoinmunes, y su presencia casi siempre está relacionada con la actividad de la enfermedad, en particular cuando muestran la capacidad de fijar el complemento. Los anticuerpos anti-DNA de doble cadena solo pueden unirse a la poliribosa-fosfato, a los pares de bases desoxiguanosina-desoxicidina y desoxiadenosina-desoxitimidina y a algunas conformaciones muy especiales de la doble hélice (Hsieh *et al.*, 2016).

La mayoría de las personas normales tienen en su suero inmunoglobulinas IgM anti-DNA de una sola cadena, que pertenecen a los autoanticuerpos naturales presentes en todas las personas. Estos anticuerpos tienen una baja afinidad hacia el DNA y otros auto-antígenos como la tiroglobulina o la miosina. Por el contrario, los anticuerpos IgG anti-DNA de doble cadena no suelen estar presentes en los individuos normales y muestran una alta afinidad hacia el DNA y otros antígenos (Liu *et al.*, 2013). Además, el anti-ds-DNA está presente en 50% a 70% de los pacientes con LES. Los IC circulantes de DNA/anti-DNA se considera que desempeñan un papel en la patogénesis de LES. Esta unión del DNA por anticuerpos puede ocurrir en la circulación, pero también puede ocurrir *in situ*. En el sitio de deposición de IC se da la activación del complemento que conduce a la inflamación y a las características de la enfermedad del LES. En años posteriores, este concepto de la fisiopatología del LES ha sido cuestionado y se ha propuesto una hipótesis modificada. Este concepto se basa en estudios que han demostrado que el anti-ds-DNA puede interactuar a través de nucleosomas con estructuras tisulares como el sulfato de heparina, la principal cadena lateral de glicosaminoglicanos de la membrana basal glomerular (Shoenfeld *et al.*, 2014).

### **2.5.1.2. Anticuerpos anti-nucleosoma**

Los nucleosomas están constituidos por un octámero de histonas (cuatro homodímeros H2A, H2B, H3 y H4) alrededor de cual se enlazan 146 pb de DNA. La conformación de los nucleosomas es indispensable para la compactación del DNA en el núcleo. Su modificación durante la apoptosis de las células, altera su estructura antigénica permitiéndoles romper la tolerancia inmunológica.

La participación de los anticuerpos anti-nucleosoma en la patología del LES se enmarca en la disminución de la fagocitosis de las células apoptóticas (Figura 3). Esta eliminación insuficiente provoca la liberación de nucleosomas apoptóticos, los cuales se convierten en inmunogénicos por modificaciones durante la apoptosis. Hasta ahora, las modificaciones inducidas por la apoptosis que se dirigen al lupus incluyen la hiperacetilación de H4 (en las posiciones 8, 12 y 16) y H2B (en la posición 12), o la trimetilación de H3 (en la



posición 27) (Liu *et al.*, 2013). Las células dendríticas mieloides que detectan estos nucleosomas modificados digieren y presentan estos auto-antígenos de manera inmunogénica para las células T. Estas células T activadas estimularán a las células B a producir anticuerpos anti-nucleosómicos. Posteriormente, estas células T específicas de nucleosoma también pueden inducir auto-anticuerpos para ds-DNA e histonas por propagación de epítopes. Después de la formación compleja de estos auto-anticuerpos con nucleosomas presentes en la circulación, estos complejos están dirigidos a las membranas basales, especialmente a la membrana basal glomerular. Este potencial nefritogénico se debe a la unión de los componentes de la histona cargados positivamente del nucleosoma, a los residuos cargados negativamente en el heparán sulfato (un componente del GBM), lo que da inicio al desarrollo de inflamaciones locales en el glomérulo, lo que resulta en NL (Shoenfeld *et al.*, 2014).

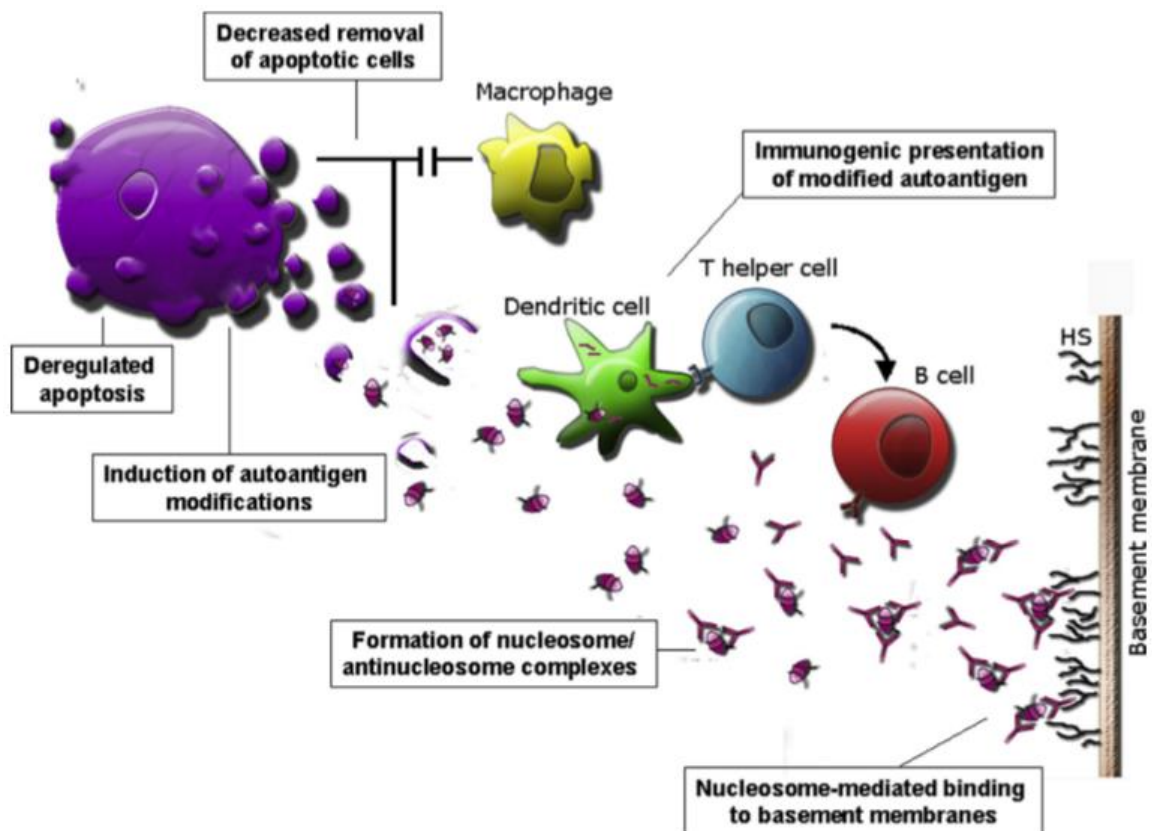


Figura 3. Resumen del mecanismo que conduce a la formación de auto-anticuerpos anti-nucleosómicos y su papel en la patogénesis de la NL (Shoenfeld *et al.*, 2014).

Los anticuerpos anti-nucleosomas se encuentran en aproximadamente 75% de los pacientes con LES y pueden ser detectados en fase más temprana que los anticuerpos anti-ds-DNA, además sus niveles están asociados con la actividad de la enfermedad determinada por el SLEDAI, pero también está presente en el 70 – 100% de pacientes con Lupus inducido por drogas.

### **2.5.1.3. Complemento C3 y C4**

El sistema del complemento es una parte importante de la inmunidad innata que defiende al huésped contra los microorganismos infecciosos, elimina los IC y las células muertas, y sirve de puente entre la inmunidad innata y adaptativa. El complemento puede activarse a través de vías clásicas, alternativas y lectinas de unión a manosa (MBL), cada una con diferentes iniciadores.

La ruta clásica se activa cuando C1q de C1 se une con alta avidéz a la porción Fc de la inmunoglobulina M (dominio CH3) o IgG (dominio CH2) en los IC. Además, las Inmunoglobulinas y el C1q también se unen a las células apoptóticas para facilitar su eliminación, lo que le otorga un papel importante en la tolerancia inmunológica. La unión de C1q a su objetivo desencadena su cambio conformacional y autoactivación de C1r, seguido de la activación de C1s. C1 activado escinde tanto C4 como C2 para generar C4a / C4b y C2a / C2b. C4b2a actúa como una convertasa C3 que escinde y activa C3.

La ruta alternativa se activa espontáneamente por un cambio de conformación de C3, que ocurre lenta pero continuamente para generar C3 hidrolizado [C3 (H<sub>2</sub>O)]. C3 (H<sub>2</sub>O) se une al factor B en la fase fluida. Tras la escisión del factor B por el factor D (adipsina), se forma una C3 convertasa C3(H<sub>2</sub>O)Bb, que puede ser estabilizada por properdín y amplificarse para formar C3bBb. La ausencia de properdín conduce a la desactivación irreversible del sitio catalítico en la convertasa. Las proteínas reguladoras que inhiben el ensamble de la convertasa y promueven su disociación protegen las células del hospedero contra el daño mediado por el complemento.

La vía de las lectinas se inicia por la unión de MBL a grupos terminales de carbohidratos en ciertos microorganismos que conduce a la activación de las serina proteasas asociadas

a MBL (MASP). MASP activado escinde C4 a C4a y C4b. El C4b inmovilizado induce la unión de C2, que también se escinde por MASP y genera la C4b2a C3 convertasa (Bao *et al.*, 2015).

Independientemente de la vía de activación, finalmente se produce la escisión de C3 y C5, con la generación de las anafilatoxinas C3a y C5a, opsoninas C3b y C5b para iniciar el ensamblaje no enzimático del complejo de ataque de membrana C5b-9, que puede provocar la muerte celular.

Para evitar lesiones en los tejidos del huésped, la activación del complemento está estrictamente regulada por una serie de proteínas asociadas a la membrana celular y al plasma. Factor acelerado de desintegración (DAF) es una proteína de membrana anclada en glicosilfosfatidilinositol (GPI), que se une a C3b y C4b y acelera la descomposición de C3 (C4b2a en la ruta clásica y C3bBb en la ruta alternativa) y C5 (C4b2a3b en la ruta clásica y C3bBb3b en la vía alternativa). CR1 es una glicoproteína transmembrana de cadena única que tiene las funciones combinadas de DAF y proteína cofactor de membrana, acelera la descomposición de las convertasas C3 y C5 como DAF, y también sirve como un cofactor para la inactivación mediada por factor I de C3b y C4b en iC3b y iC4b (Pickering *et al.*, 2000).

Las proteínas plasmáticas C4bp y el factor de complemento H (CFH) también tienen actividad de cofactor para la inactivación mediada por el factor I del plasma C4b y C3b en las vías clásica y alternativa, respectivamente. Por último, en cualquiera de los "extremos" de las cascadas del complemento se encuentran el inhibidor de C1 (C1-INH) y CD59, que inhiben la activación de C1 y la formación de C5b-9, respectivamente (Bao *et al.*, 2015).

### **El papel del sistema de complemento en el LES.**

Las funciones patógenas de la activación del complemento en el LES se indicaron a partir de años de observaciones clínicas: se ha observado una baja actividad hemolítica del complemento total y una disminución de los niveles de C3 y C4 en aproximadamente el 75% de los pacientes con LES con nefritis focal y el 90% en pacientes con nefritis difusa.

Además, la interacción de los isotipos de IgG, IgA e IgM con C1q, C4 y C3 (y C5b-9; el llamado patrón de "casa completa") en los glomérulos está casi exclusivamente presente en los glomérulos de pacientes con NL.

Se encontró que los pacientes con LES con linfopenia y neutropenia tenían niveles más bajos de DAF y CD59 en los neutrófilos, y los pacientes con LES con anemia tenían una menor expresión de CD59 y CR1 en los eritrocitos, y la expresión se correlaciona con la actividad de la enfermedad. En los neutrófilos de pacientes con LES, los IC regulan los niveles de transcripción de CR1, tanto directa como indirectamente mediante la inhibición de la expresión de CR1 inducida por IFN- $\gamma$ , un ejemplo de cómo la actividad del lupus afecta la expresión de CR1 (Birmingham *et al.*, 2010).

El manejo deficiente de los IC juega un papel importante en la patogénesis de la nefritis lúpica. Dado que el sistema del complemento se requiere en todos los pasos del metabolismo normal de la IC, cualquier número de alteraciones puede conducir a una acumulación patológica glomerular de la IC, particularmente en condiciones de exceso de IC, como en el LES. Los estudios han demostrado la asociación de SLE con niveles bajos de CR1 en los eritrocitos, un sitio clave de unión y transferencia de IC al sistema de fagocitos mononucleares, lo que sugiere que un sistema de limpieza de eritrocitos/IC defectuoso puede estar relacionado con la patogénesis del LES.

Recientemente, se informó que las deficiencias de C1q, C4, C2 o C3, la fagocitosis de las células apoptóticas se redujo en comparación con los estudios que utilizaron de sueros normales, lo que indica roles importantes de todos estos componentes de la vía clásica del complemento en el aclaramiento de células apoptóticas y necróticas.

El complemento también juega un papel importante en las complicaciones trombóticas asociadas con LES. El riesgo de trombosis es particularmente alto en pacientes con LES con auto-anticuerpos anti-fosfolípidos (aPL). Una explicación es que los IC que contienen fosfolípidos se unen a las plaquetas, lo que posteriormente puede activar la vía clásica del complemento, como lo demuestra el hecho de que los pacientes con LES tienen niveles elevados de C1q, C3d y C4d en sus plaquetas, especialmente en pacientes con

antecedentes de trombosis venosa. Los sueros de pacientes con LES con anticuerpos aPL tienen una mayor capacidad para activar la vía clásica en plaquetas heteróloga. Aunque la deposición de C1q y C4d sobre las plaquetas no es específica para el LES, se asocia con trombosis venosa. Un estudio también sugiere que las partículas pequeñas y densas de HDL pueden activar el sistema del complemento y están relacionadas con la aterosclerosis subclínica en pacientes con LES (Pickering *et al.*, 2000).

#### **2.5.1.4. Anticuerpos anti-C1q**

La activación del sistema del complemento es el primer paso en la prevención de daños por IC. El inicio de la activación del complemento se produce a través de tres vías: la clásica, la alternativa y la vía de la lectina. La vía clásica del sistema del complemento se considera la vía más importante en el aclaramiento de IC. Esta vía puede ser activada por complejos inmunes que contienen IgM e IgG después de la unión de C1q. El C1q es un subcomponente del primer componente (C1) de la vía clásica. Es una glicoproteína altamente catiónica con un peso molecular de 410 kD. C1q consta de seis copias, cada una de tres cadenas polipeptídicas, A, B y C. Las cadenas A, B y C son ricas en aminoácidos hidroxilados y están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro en dímeros, unidos estos dímeros forman un triple de estructura helicoidal que se asemeja al colágeno. Hacia el extremo N-terminal de C1q, las hélices triples están paralelas entre sí y divergen hacia el extremo C-terminal. El extremo N-terminal se llama la región de tipo colágeno que está unida por las cadenas de conexión al extremo C-terminal, que se llama la región de las cabezas globulares. Se dice que la estructura macromolecular de C1q se parece a un ramo de seis tulipanes con "tallos" que consisten en gran parte la región similar al colágeno (CLR) (Hegazy *et al.*, 2012).

La función de C1q está directamente relacionada con su estructura. La unión de las regiones Fc de las inmunoglobulinas a las porciones de la cabeza globular de C1q induce la distorsión de la cadena de conexión, lo que cambia la conformación de la región similar al colágeno. El equilibrio dinámico entre C1q y los otros subcomponentes de C1, C1r y C1s, posteriormente cambia e induce una activación adicional de la cascada de proteínas

que componen la ruta clásica. Esto resulta en la prevención de la formación de IC en la red y asegura su eliminación de la circulación por el sistema de fagocitos mononucleares. Aunque, la proteína de reconocimiento de la vía de la lectina se une a la manosa, y esto se relaciona estructuralmente con el C1q, no se sabe que está involucrada en los mecanismos de eliminación del complejo inmune. Es decir, la activación de C1 mediante la unión de complejos inmunes a C1q es un requisito previo para la eliminación del complejo inmune (Chen *et al.*, 2018).

Los IC o las inmunoglobulinas agregadas no son las únicas sustancias que se unen al C1q, ya que el DNA, la proteína C reactiva, las proteínas priónicas, amiloides y otras sustancias también se unen a C1q. Además, el C1q del mismo modo se une directamente a una serie de receptores celulares que están presentes en linfocitos, fibroblastos, membranas intracelulares y otras superficies celulares, como las membranas mitocondriales. La unión de C1q a los receptores celulares puede inducir fagocitosis, quimiotaxis y actividad procoagulante, aunque el papel fisiológico de C1q en estos procesos no está claro.

La asociación del anti-C1q con la NL activa, se basa en los depósitos inmunes subendoteliales. El anti-C1q contribuye a la formación y/o persistencia de depósitos inmunes subendoteliales promoviendo la agregación de diferentes IC que contienen C1q en la membrana basal glomerular renal. La agregación de los complejos unidos a C1q se ve reforzada por anti-C1q, lo que conduce a depósitos inmunitarios más grandes, de mayor duración y más patógenos. Los anticuerpos anti-C1q de pacientes con LES probablemente no influyen directamente en la activación del complemento, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Se ha informado que IgG anti-C1q en los sueros de pacientes con síndrome de vasculitis urticarial hipocomplementémica y LES es predominantemente el isotipo IgG2, aunque todos los pacientes también tienen anticuerpos IgG1, IgG3 y/o IgG4. Siendo la IgG3 anti-C1q de pacientes con MPGN la que predomina. En otros estudios, el anti-C1q aislado de pacientes con LES muestra la misma distribución de subclase que la IgG normal (IgG1> IgG2> IgG3> IgG4) (Figura 4). La clase predominante de anti-C1q en pacientes con

vasculitis reumatoide es la IgA. No se sabe si los diferentes isotipos de anti-C1q podrían afectar la activación del complemento de diferente forma (Mora *et al.*, 2014).

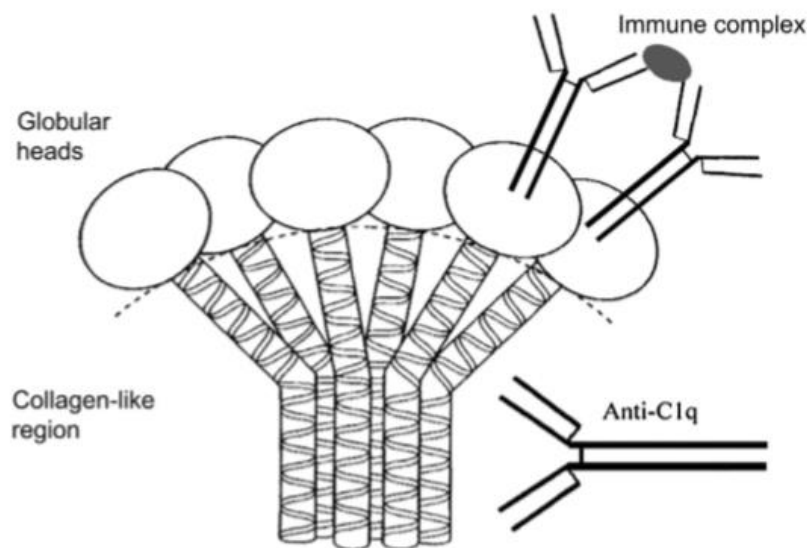


Figura 4. Estructura del C1q y anticuerpos anti C1q. La parte de unión a antígeno a la región Fab de anti-C1q se une a epítomos en la región de C1q de tipo colágeno. Por el contrario, las cabezas globulares de C1q son los sitios de unión para las porciones de Fc de IgG en complejos inmunes.

Aunque el anti-C1q se dirige a la CLR de C1q, no se observa reactividad cruzada ni correlación entre los anticuerpos contra el colágeno de tipo II humano y anti-C1q en pacientes con LES o artritis reumatoide. El anti-C1q demuestra características de una respuesta dirigida por antígeno, con múltiples mutaciones en la región de unión a antígeno. Se ha sugerido que anti-C1q/anti-CLR podría surgir después de la inmunización por el neoantígeno expresado en C1q cuando C1q se une a complejos inmunes. Algunos anti-C1q se unen específicamente a C1q en células apoptóticas tempranas (pero no en complejos inmunes o células apoptóticas tardías), lo que sugiere que las células apoptóticas podrían servir como un inmunógeno.

Los anticuerpos contra C1q son más frecuentes entre los pacientes con lupus que presentan un polimorfismo en el receptor FcγRIIa, en los que el aminoácido en la posición 131 de la molécula FcγRIIa contiene una arginina, lo que conduce a una disminución de la unión a las moléculas de la subclase IgG2. Este polimorfismo también se asocia con un mayor riesgo de NL y con una disminución del aclaramiento de los anticuerpos subclase IgG2 (Shoenfeld *et al.*, 2014).

### 2.5.1.5. Beta-2-microglobulina

La Beta-2-microglobulina ( $\beta$ 2M) se descubrió por primera vez en 1964 en la orina de sujetos con enfermedad de Wilson o envenenamiento por cadmio. Es una proteína de 100 aminoácidos de peso molecular relativamente pequeño (11,800 Da, tamaño 11 Å) y está codificada por un gen en el cromosoma 15 en humanos. La estructura secundaria de la molécula consiste en dos hojas  $\beta$  unidas por un solo enlace disulfuro. La estructura terciaria de la molécula es similar al dominio constante de las inmunoglobulinas (Larocca *et al.*, 2014).

A diferencia de las inmunoglobulinas, la  $\beta$ 2M no forma dímeros sino que se asocia con el complejo principal de histocompatibilidad I (MHC-I)/antígeno leucocitario humano I (HLA-I) en la superficie de todas las células nucleadas. La interacción entre  $\beta$ 2M con la cadena alfa del HLA-I es esencial para la presentación del antígeno. La molécula  $\beta$ 2M también forma complejos con muchas moléculas similares a MHC-I no clásicas (MHC-Ib) como ser: grupo de diferenciación 1 (CD1), MR1, HLA-E, -F, -G, receptor neonatal de Fc (FcRn), y proteína de la hemocromatosis humana (HFE)/HLA-H que participan en la inmunidad de la mucosa, la vigilancia de tumores, la tolerancia inmune materno-fetal, la inmunoglobulina y la homeostasis de albúmina, así como el metabolismo del hierro. No solo  $\beta$ 2M es para interactuar y estabilizar la estructura terciaria del MHC I o moléculas similares, sino que también está involucrado ampliamente en la regulación funcional de la supervivencia, proliferación, apoptosis e incluso metástasis en células cancerosas (Li *et al.*, 2016)

Los valores de  $\beta$ 2M en suero y plasma reflejan la activación del sistema inmunitario celular, así como un marcador tumoral en ciertas neoplasias malignas hematológicas (Zychowska *et al.*, 2018). Para la enfermedad inflamatoria del intestino, se sugirió la utilización de  $\beta$ 2M como parámetro de actividad. Los niveles de  $\beta$ 2M también aumentan durante la infección con algunos virus, incluidos el citomegalovirus y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Por otro lado, la anomalía de los valores de  $\beta$ 2M en la orina indica trastornos de filtración renal o de reabsorción. Dado su pequeño tamaño, esta



proteína puede difundirse libremente entre los espacios intravascular y extravascular y pasa por la membrana basal glomerular, y luego se reabsorbe, se degrada hasta el 99.9% y se descompone por las células del túbulo proximal. El riñón que es el sitio principal del catabolismo  $\beta$ 2M puede aislar y metabolizar esta proteína, incluso en caso de ausencia de filtración glomerular. En condiciones normales, el metabolismo de esta proteína cambia ligeramente en un individuo.

La causa más importante del aumento de  $\beta$ 2M en suero es la insuficiencia renal, aunque en la función renal normal, factores como la inflamación grave, el cáncer y las anomalías inmunológicas pueden aumentar los niveles séricos de  $\beta$ 2M. El trastorno de los glomérulos del riñón causaría un aumento de  $\beta$ 2M en la sangre y una disminución de  $\beta$ 2M en la urea; en contraste, el trastorno de los túbulos del riñón causaría un aumento de  $\beta$ 2M en la urea y una disminución de  $\beta$ 2M en la sangre. Además, los niveles séricos altos de  $\beta$ 2M en el momento predecirían la mortalidad a largo plazo y la pérdida de injerto en los receptores de trasplante de riñón (Argyropoulos *et al.*, 2017).

### **2.5.2. BIOMARCADORES URINARIOS**

Los biomarcadores tradicionales que evalúan el progreso de la NL tienen una respuesta limitada para verificar la eficacia del tratamiento, y son inadecuadas para detectar la activación o remisión en la NL de una manera oportuna, lo que lleva a una dificultad en la atención clínica del paciente. Además, las medidas de laboratorio tradicionales de la función renal, como la depuración de creatinina o la proporción de proteína a creatinina, reflejan una pérdida significativa de la función renal, de tal manera que puede producirse daño renal importante antes de ser detectado por estos métodos. Por lo tanto, son necesarios nuevos biomarcadores que pueden detectar rápidamente la afectación, gravedad, predecir la activación, controlar la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad, estos fueron el objeto de intensas investigaciones (Bennett *et al.*, 2013).

### **2.5.2.1. Inductor Débil de la Apoptosis de la Familia del Factor de Necrosis Tumoral (TWEAK)**

La citoquina, Inductor débil de la apoptosis de la familia del factor de necrosis tumoral (TWEAK), es una glicoproteína de membrana tipo II de 249 aminoácidos (30 kDa) expresada por células del sistema inmune (monocitos-macrófagos) y células no inmunes, cuya producción endógena y fisiológica es baja. El gen TWEAK humano se localiza en el cromosoma 17. Su dominio extracelular C-terminal es susceptible de proteólisis por proteasas que permiten que la forma soluble de la molécula (sTWEAK) circule libremente. El dominio intracelular N-terminal también posee regiones susceptibles de clivaje por proteasas que facilitan la exposición de secuencias de localización nuclear cuya función hasta el momento es incierta. Debido a su homología estructural con el TNF, su actividad biológica es dependiente de la formación de trímeros para su unión específica al receptor Fn14 (CD 266). El Fn14 es una proteína de membrana tipo I de 129 aa expresada en bajas concentraciones en las células y que pertenece a la superfamilia de receptores del TNF (Bennett *et al.*, 2013). Su dominio extracelular N-terminal posee regiones ricas en serina que participan en la unión con su ligando específico TWEAK. El dominio intracelular C-terminal permite el reclutamiento de proteínas del tipo TRAF (factores asociados al receptor del TNF) que inician la cascada de señalización intracelular. A diferencia de otros receptores de la superfamilia del TNF que reclutan complejos del tipo FADD, TRADD y TRAF, el Fn14 solo recluta complejos del tipo TRAF (Figura 5). Esta diferencia es muy importante, pues explica la capacidad apoptótica débil del TWEAK, que solo puede ser mediada por la vía mitocondrial y no por receptores de muerte, propia de la vía extracelular (Michaelson *et al.*, 2012).

De igual forma se ha podido establecer cómo el único ligando del TWEAK al Fn14. El receptor tipo *scavenger* CD 163 expresado por macrófagos tiene la capacidad de ligar TWEAK y facilitar la interiorización y posterior depuración de la forma soluble de la molécula (sTWEAK), por lo que se cree que este mecanismo constituye una vía de regulación negativa del TWEAK/Fn14 (González *et al.*, 2016).

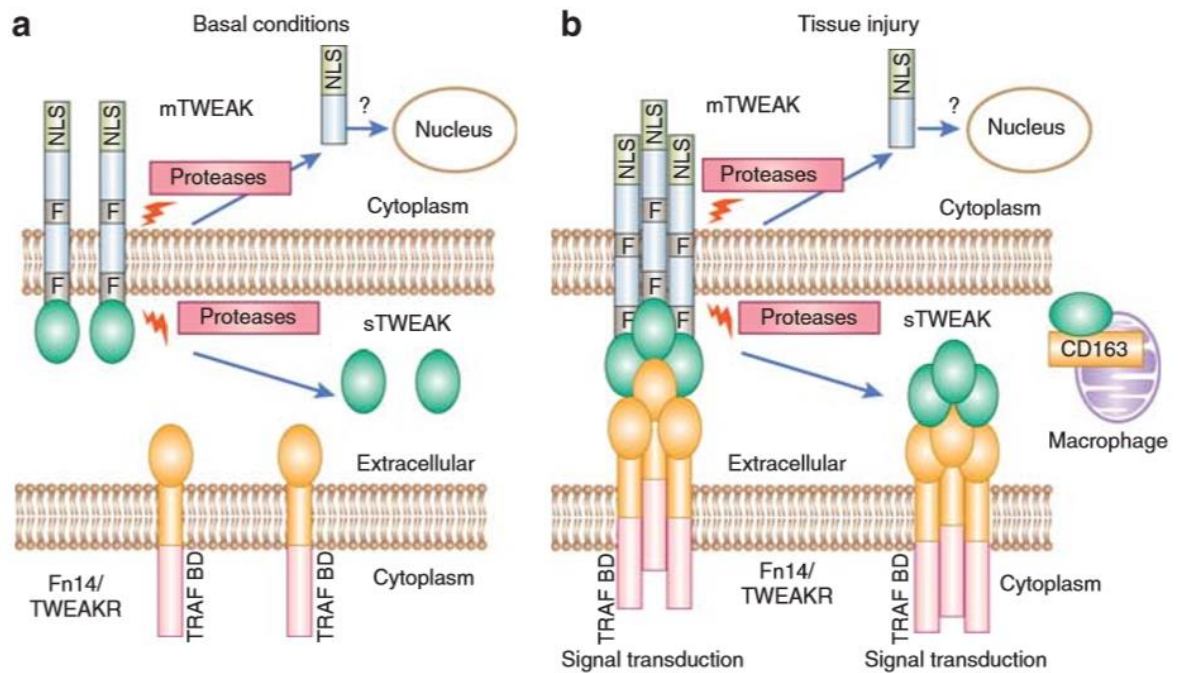


Figura 5. Biología básica del sistema TWEAK / Fn14. (a) TWEAK es una glucoproteína transmembrana de tipo II que puede procesarse proteolíticamente, produciendo TWEAK soluble (sTWEAK). Ambos se unen y activan el receptor TWEAK (TWEAKR), Fn14. Además, el dominio intracelular N-terminal puede ser escindido y contiene secuencias de localización nuclear (NLS). Fn14 es una proteína transmembrana de tipo I que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF que carece de un dominio de muerte (DD) pero que contiene un dominio de unión a TRAF (TRAF BD). (b) La Fn14 se regula de manera rápida y fuerte sobre la lesión tisular. La trimerización del receptor tras la unión de TWEAK transduce la señalización intracelular. TWEAK también puede unirse al receptor eliminador de CD163 en macrófagos. F, sitio de escisión de furina; mTWEAK, TWEAK anclado a la membrana; TNF, factor de necrosis tumoral; TRAF, factor asociado al receptor de TNF (Sanz et al., 2014).

Una vez que se ha dado la unión del mTWEAK o sTWEAK con su receptor Fn14, la vía de señalización intracelular puede derivar en una de las 3 vías efectoras: la inflamatoria, la proliferativa o la apoptótica (Figura 6). Quizás, la vía mejor caracterizada es la inflamatoria, pues se conocen vías de señalización citoplasmática similares en otras poblaciones celulares. Esta vía efectora depende de la activación canónica o no canónica del factor de transcripción del NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). La interacción mTWEAK/Fn14 favorece que predominen señales de activación canónica del NF- $\kappa$ B con la formación del heterodímero RelA/p50 en el citoplasma de la célula efectora.

Por otro lado, la interacción sTWEAK/Fn14 favorece las señales de activación no canónica del NF- $\kappa$ B a través del heterodímero RelB/p52. Desde un punto de vista clínico, esta diferencia en la forma de activación del NF- $\kappa$ B no tendría un significado mayor, sin embargo, desde el punto de vista inmunológico, las diferencias en el tipo de genes transcritos y el tipo de células del sistema inmune reclutadas en el tejido diana son fundamentales. La activación canónica temprana del NF- $\kappa$ B (RelA/p50) favorece la síntesis y secreción de la proteína quimioatractante de monocitos tipo 1 (MCP-1), la quimiocina CCL5 (RANTES) y la quimiocina CXCL10 (IP-10). Este gradiente de quimiocinas permite la infiltración de macrófagos en los tejidos. De otro lado, la activación no canónica tardía del NF- $\kappa$ B (RelB/p52) favorece la síntesis de quimiocinas CCL19 y CCL21, cuyo gradiente facilita la infiltración de linfocitos T en los órganos diana (Sanz *et al.*, 2014).

La activación de las 2 vías efectoras restantes como consecuencia de la interacción TWEAK/Fn14 va a depender específicamente del microambiente celular existente. En un ambiente celular en ausencia de inflamación y rico en factores de crecimiento, la vía efectora dominante será la proliferativa. Por el contrario, en presencia de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IFN  $\gamma$ ) predominará la vía efectora apoptótica. Esta diferencia totalmente opuesta en estas 2 vías efectoras radica principalmente en las diferentes concentraciones citoplasmáticas de complejos proteicos antiapoptóticos (Bcl2) y proapoptóticos (Bax) respectivamente. Además, en la vía efectora proliferativa hay un incremento en la actividad de proteincinasas activadas por mitógenos (MAPK) mientras que en la vía efectora apoptótica existe un aumento funcional del complejo apoptosoma (APAF-1, citocromo C, procaspasa 9) que media la muerte celular programada por vía mitocondrial. Estos hallazgos en la vía efectora proliferativa han sido mostrados por Sanz *et al.*, en el escenario de hiperplasia renal compensatoria posnefrectomía unilateral, en donde se evidencia proliferación del epitelio tubular renal inducida por TWEAK/Fn14 (González *et al.*, 2016).

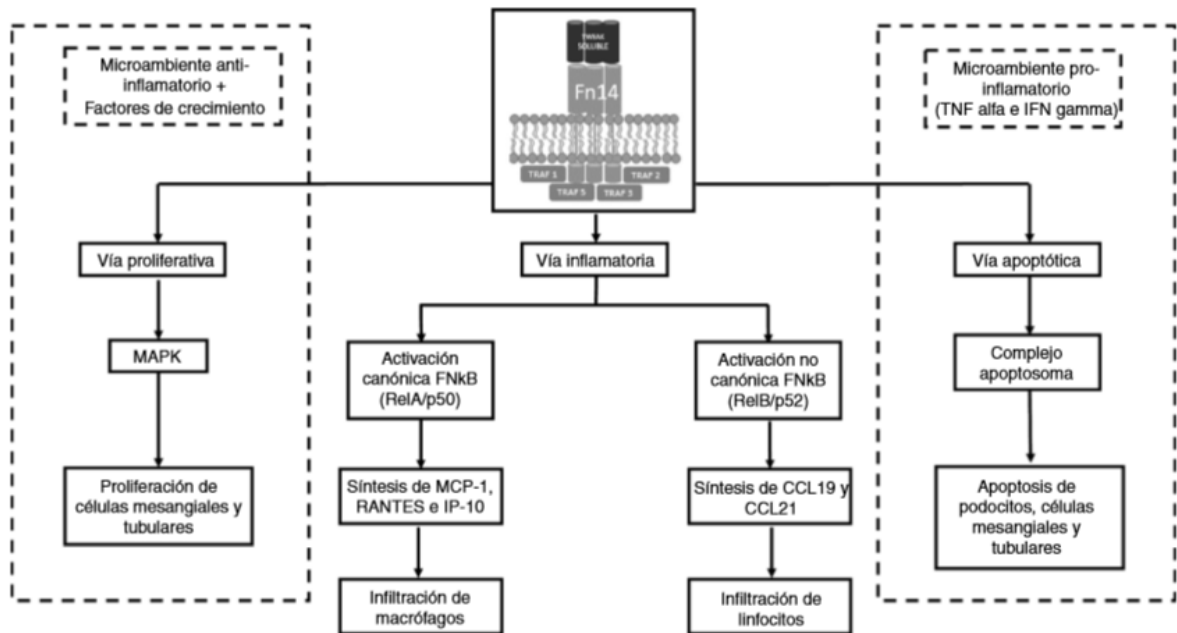


Figura 6. Papel del TWEAK/Fn14 en la nefritis lúpica. La unión del TWEAK al receptor Fn14 favorece la activación de una de las 3 vías efectoras, y esto depende del tipo de célula estimulada, el microambiente celular y la señalización intracelular generada. IP-10: proteína 10 interferón gamma inducible; MAPK: proteincinasas activadas por mitógenos; MCP-1: proteína quimioattractante de monocitos tipo 1; NF-kB: factor nuclear kappa B (González et al., 2016).

### Papel del TWEAK/Fn14 en la nefritis lúpica

En estado de reposo celular, en ausencia de estímulos lesivos e inflamatorios, la expresión de TWEAK y Fn14 por parte de los tejidos es baja. Sin embargo, en fenómenos inflamatorios como en el LES, existe un incremento en la expresión del receptor Fn14 por parte de las células renales, elevación que no es proporcional a la disponibilidad del mTWEAK/sTWEAK, cuyo incremento es menor a pesar de estas condiciones proinflamatorias. Además, se ha podido establecer como en pacientes con NL existe un incremento en la expresión del Fn14 en 3 tipos de células renales: los podocitos, las células mesangiales glomerulares y el epitelio tubular proximal. Este fenómeno pudiera explicar, en parte, la proliferación mesangial, la podocitopatía y el daño tubular observado en las biopsias de pacientes con afectación renal por LES. La activación de la vía inflamatoria previamente mencionada contribuye a la infiltración de macrófagos y linfocitos a nivel glomerular y tubular, a la citotoxicidad directa mediada por estas células y a la apoptosis mesangial y tubular, eventos que progresivamente favorecen el deterioro de la función

renal. Todos estos cambios sumados a la activación del sistema del complemento y al depósito de IC aceleran el daño renal (Michaelson *et al.*, 2012).

Se han empleado múltiples modelos experimentales para evaluar la contribución potencial de la vía TWEAK / Fn14 a NL. Estos incluyen varios modelos en los que la lesión renal se inicia por deposición de auto-anticuerpos en el glomérulo, así como otros modelos inducidos por lesión tubular renal, los cuales pueden conducir a disfunción renal y fibrosis. Para apoyar el papel de TWEAK en la patogénesis de la NL, los investigadores encontraron que la deficiencia del receptor TWEAK Fn14 o anticuerpos anti-TWEAK disminuyó el daño renal, lo cual fue corroborado con la disminución significativa de los siguientes parámetros: proteinuria, inmunocomplejos, niveles de IL-6, niveles de MCP-1 y la IP-10. Además, los investigadores también encontraron en orina niveles altos de TWEAK los cuales fueron significativos en comparación con los pacientes con LES sin enfermedad renal y otros grupos control.

La citoquina TWEAK puede promover la inflamación en el glomérulo, el sitio de lesión primaria en NL, así como inducir la inflamación tubulointersticial, una característica de la cronicidad en NL. Las células renales sensibles a TWEAK comprenden los tipos de células glomerulares que expresan Fn14, incluidas las células endoteliales vasculares, y las células mesangiales y podocíticas que producen mediadores inflamatorios en respuesta a la estimulación TWEAK. Además, las células tubulares renales que expresan Fn14 y fibroblastos secretan mediadores inflamatorios en respuesta a TWEAK.

La matriz de mediadores proinflamatorios inducida por TWEAK en tipos de células renales es muy amplia. Específicamente, se demostró que TWEAK inducía la expresión de MCP-1, IP-10, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , ICAM-1 y VCAM-1 en múltiples tipos de células renales *in vitro*. TWEAK indujo la expresión de quimioquinas en el riñón, incluyendo MCP-1 y RANTES. En evaluaciones adicionales demostraron la inducción en quimioattractante de células T CCL-21, así como CXCL-16, y la infiltración de los macrófagos y las células T en el riñón. Así, TWEAK tiene el potencial de promover la infiltración de ambos tipos de células inmunes innatas y adaptativas en NL (Chi, 2010).

### 2.5.2.2. Proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1)

Las quimiocinas juegan un papel importante en el reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos, así como en la inducción de quimiotaxis a través de la activación de receptores acoplados a proteína G. La proteína-1 quimioattractante de monocitos (MCP-1/CCL2) es un miembro de la familia de las quimiocinas C-C, ubicado en el cromosoma 17 (chr.17, q11.2), compuesto de 76 aminoácidos y tiene un tamaño de 13 kDa, pertenece a una familia compuesta por al menos cuatro miembros (MCP-1, -2, -3 y -4). La estructura del dominio de las MCP humanas se muestra en la figura 7. El MCP-1 es un potente factor quimiotáctico para los monocitos/macrófagos. Tanto CCL2 como su receptor CCR2 han sido inducidos e involucrados en diversas enfermedades. La migración de los monocitos del torrente sanguíneo a través del endotelio vascular es requerida para la vigilancia inmunológica rutinaria de los tejidos, así como en respuesta a la inflamación (Satish *et al.*, 2009; Deshmane *et al.*, 2009).

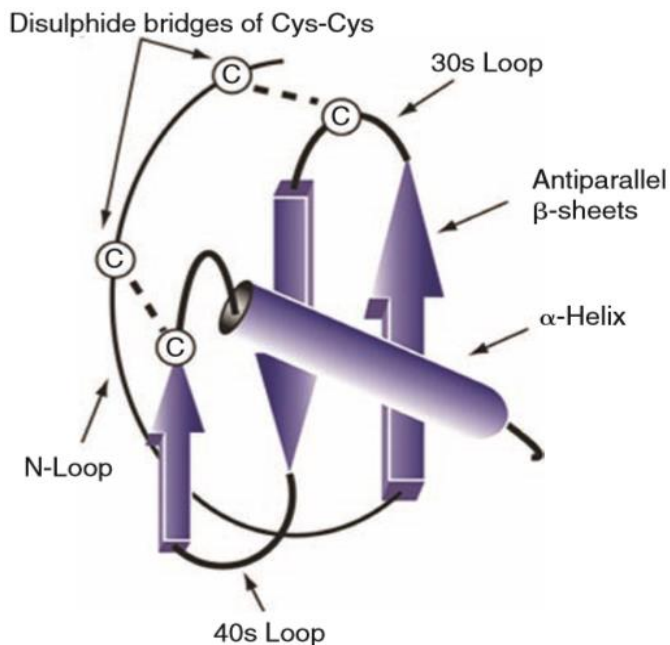


Figura 7. Representación tridimensional de una quimiocina, donde se muestran las hojas  $\alpha$  y  $\beta$ , así como los residuos de cisteína y los bucles 30 y 40 (Deshmane *et al.*, 2009).

La CCL2 es producida por muchos tipos de células, incluidas células endoteliales, fibroblastos, epiteliales, de músculo liso, mesangiales, astrocíticas, monocíticas y microgliales. La CCL2 regula la migración y la infiltración de monocitos, linfocitos T de memoria y células asesinas naturales (NK) (Szeto *et al.*, 2013).

La infiltración de monocitos y células T en el riñón media la lesión tisular. Durante la lesión renal, las células infiltrantes se acumulan en los glomérulos y en el intersticio, donde su interacción con las células renales residentes, incluidas las células epiteliales tubulares, estimula las células infiltrantes y residentes para generar moléculas que promueven la lesión renal. En consecuencia, la acumulación de monocitos y células T, y la consiguiente inflamación, da lugar a glomerulosclerosis, atrofia tubular, fibrosis intersticial e insuficiencia renal progresiva (Bardado *et al.*, 2010). La infiltración de monocitos y células T en el riñón depende de las quimiocinas liberadas por las células renales residentes lesionadas. Estas quimiocinas pertenecen a una "superfamilia" de pequeñas proteínas quimioatrayentes que promueven el reclutamiento y la activación de células infiltrantes. Durante la inflamación, la liberación sostenida de quimiocinas por las células lesionadas da como resultado un gradiente de concentración creciente dentro del tejido dañado y es responsable del movimiento unidireccional de las células infiltrantes (Chen *et al.*, 2018).

En consecuencia, el bloqueo de MCP-1 ofrece posibilidades terapéuticas en enfermedades renales dependientes de lesión mediada por células T y/o monocitos, incluyendo nefropatía IgA, NL, glomerulonefritis membranoproliferativa, glomerulonefritis progresiva rápida y nefritis tubulointersticial. El MCP-1 puede ser responsable de inducir daño renal tubular y/o glomerular. Se sabe que las células del parénquima renal, especialmente las células epiteliales tubulares y mesangiales, producen MCP-1 en respuesta a la IL-1, el TNF- $\alpha$ , el INF- $\gamma$  y los complejos IgG circulantes.

Los estudios experimentales han vinculado la expresión de MCP-1 en glomérulos con una afluencia de macrófagos utilizando suero anti-timocitos. De forma similar, se observa que la expresión de MCP-1 por células epiteliales tubulares aumenta el número de macrófagos en isquemia renal, obstrucción ureteral y sobrecarga de proteínas. Debido a que MCP-1 se encuentra entre una amplia gama de moléculas inducidas en glomérulos y células epiteliales tubulares durante la inflamación, no está claro si esta quimiocina contribuye a la inflamación glomerular y/o tubulointersticial (Bennett *et al.*, 2013).



### 3. EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica es el proceso por el que la información de un gen es usada en la síntesis de un producto génico funcional. Estrictamente el término abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se localiza en el lugar adecuado y realiza su función (Hernandez *et al.*, 1994), aunque en algunos casos como en los genes no codificantes de proteínas el producto génico es un RNA funcional (RNAm, RNAr o RNAt).

Todas las células del organismo vivo regulan sus actividades mediante la activación o desactivación de la expresión de sus genes y esta expresión es generalmente proporcional al número de copias de RNA mensajero de un gen determinado. Este hecho es crucial si tratamos de identificar la presencia de productos celulares específicos ya que el RNAm es traducido en los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson *et al.*, 2008).

Los métodos de estudio de la expresión génica se basan en su capacidad para detectar RNAm específicos, y durante mucho tiempo el Northern blot ha sido la técnica más empleada para detectar moléculas de RNA. Actualmente, han aparecido técnicas mucho más precisas para el estudio de la expresión génica como la reacción en cadena de la Polimerasa a partir de Transcripción Inversa en tiempo real (qRT-PCR), y técnicas de alta productividad como los chips de DNA (microarray) (Wu *et al.*, 2016). Las estrategias basadas en la secuenciación masiva proporcionan enormes cantidades de datos y son muy útiles para estudios de transcriptómica comparada, mientras que la qRT-PCR es más específica y adecuada para el estudio de genes concretos.

#### **3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de Transcripción Inversa en tiempo real (qRT-PCR)**

En conjunto, el método qRT-PCR consiste en una extracción de RNA seguida de la síntesis de una cadena del DNA copia (DNAc) a partir del RNAm, empleando una transcriptasa inversa y un PCR; el producto amplificado puede detectarse a tiempo real

dado que la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNAc producida en cada ciclo. Para ello los componentes imprescindibles son: los elementos de excitación (láser, diodos o lámparas halógenas), elementos ópticos de detección integrados al termociclador y marcadores fluorescentes.

Los marcadores fluorescentes pueden ser de dos tipos:

- d) Marcadores específicos: Utilizan sondas de ácidos nucleicos marcadas con moléculas fluorescentes, estos se unen a productos amplificados específicos y emiten señales luminosas que se miden en el termociclador a medida que se obtiene el producto de la PCR. Estos métodos son muy precisos, aunque requieren de un diseño de secuencias específicas para su uso como sondas y por consiguiente es más laborioso y costoso.
- e) Marcadores genéricos: Son moléculas fluorescentes que se unen inespecíficamente al DNA de doble cadena emitiendo una señal fluorescente que se procesa a tiempo real, de modo que un aumento en el producto de PCR supone un aumento de fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR. Estos marcadores son muy utilizados por su bajo costo y porque no requieren de un diseño experimental previo (Ririe *et al.*, 1997). A este tipo de marcadores pertenece el fluoróforo SYBR Green, empleado en el presente trabajo.

Los valores detectados de fluorescencia forman una curva similar al crecimiento bacteriano. En ésta curva el investigador fija un punto por encima de la línea base que se denomina umbral del ciclo. Los valores umbral del ciclo (Ct) se determinan identificando el ciclo en el cual la intensidad de emisión del marcador fluorescente atraviesa el punto umbral, por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción.

Por otra parte, al representar gráficamente la fluorescencia en función de la temperatura se obtienen curvas de fusión; las curvas de fusión dependen del contenido de GC/AT y la longitud de la secuencia, eliminando la necesidad de realizar geles de electroforesis ya que en ellas se pueden diferenciar los productos específicos de la PCR, dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas (Figura 8).

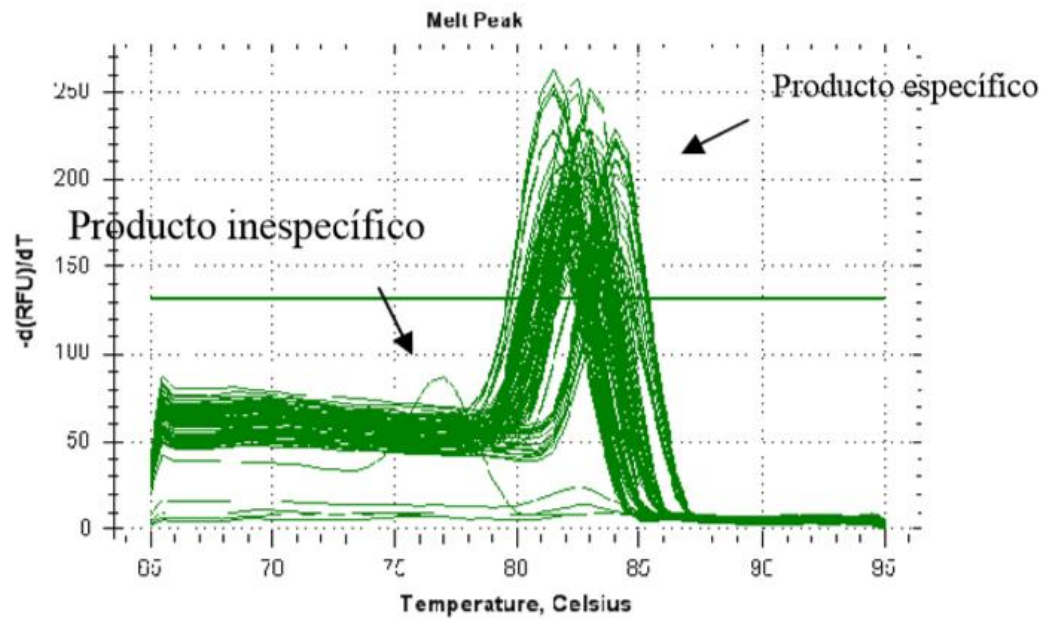


Figura 8. Curva de fusión DNAC detectada en el termociclador (D'haene et al., 2010)

Los criterios más importantes para la optimización son: especificidad, eficiencia y reproducibilidad de la PCR en tiempo real. La especificidad depende exclusivamente de los cebadores empleados, y la eficiencia de cada reacción se calcula a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas de DNAC (Figura 9) (Pfaffl, 2004).

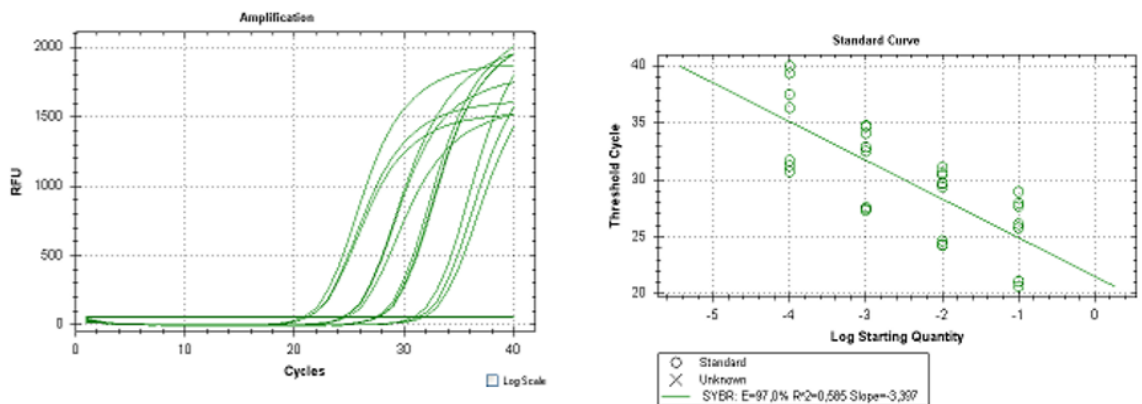


Figura 9. Curvas de amplificación de las diluciones seriadas de DNAC (D'haene et al., 2010).

La eficiencia de la reacción se calcula en base a la pendiente de la recta de regresión ajustada según la fórmula  $E=10^{[-1/\text{pendiente}]}$ .

En función de los objetivos del estudio se pueden llevar a cabo diferentes estrategias de cuantificación. Una de ellas es la cuantificación absoluta, mediante la cual es posible conocer el número de copias de RNAm de un gen, relacionando la señal de fluorescencia obtenida con un número de copias fijo de una secuencia estándar (curva de calibración). Estas curvas son muy reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles, pero deben ser rigurosamente validadas ya que la cuantificación de la expresión genética dependerá exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2004).

Otra de las cuantificaciones es la relativa que consiste en la detección de diferencias cuantitativas en la expresión de varios genes en distintas situaciones. Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004).

Tanto la cuantificación absoluta como relativa se emplean controles endógenos. Un control endógeno es un gen cuya expresión se mantiene relativamente constante en las condiciones del experimento (entre diferentes tejidos, durante el tratamiento o estimulación, etc.) y que está presente en todos los tipos celulares. Algunos de los controles internos más utilizados son la  $\beta$ -actina, cicloflina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina, fosforibosil-transferasa y 18S del RNA ribosomal (D'haene *et al.*, 2010). Este control interno elimina las variaciones debidas a posibles interferencias producidas por la degradación parcial del RNA en alguna muestra, distintas eficiencias en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc.. Al proceso de eliminación de estas variaciones debidas a las condiciones experimentales mediante el uso de genes endógenos se le llama normalización. Una vez normalizada una muestra diana y una muestra control (calibrador), estas son comparables entre sí, siendo posible determinar el fold-change asociado. En los pacientes control el fold-change en la expresión génica relativa es igual a uno por definición. Para la muestra target, la evaluación indicará el fold-change en la expresión génica relativa a la muestra control (Rao *et al.*, 2013).

Existen varios modelos matemáticos disponibles para el cálculo de la expresión relativa, y todos ellos se basan en la comparación de los valores Ct obtenidos en cada condición del estudio, normalizados con los controles internos. Uno de los métodos más utilizados es el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, CA), que asume una eficiencia del 100% en todas las reacciones.

## **G. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

- Asociar los niveles urinarios de las citoquinas TWEAK, MCP-1 con los marcadores serológicos de pacientes con nefropatía lúpica activa o en remisión.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar las características demográficas de la población en estudio (grupo control y grupo caso).
- Determinar el valor diagnóstico de las pruebas de qRT-PCR optimizadas MCP-1 y TWEAK.
- Cuantificar la expresión génica de la citoquina TWEAK y quimioquina MCP-1
- Correlacionar los niveles de expresión de TWEAK y MCP-1 con los niveles séricos de anticuerpos anti-ds-DNA, anti-nucleosoma,  $\beta$ 2-microglobulina, anti-C1q, creatinina, niveles de complemento C3 y C4.
- Comparar los niveles de citoquina y los niveles serológicos empleados para el seguimiento entre los grupos caso – control.

## **H. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

#### **1.1. Tipo de Diseño**

El presente trabajo corresponde a un estudio de tipo caso-control.

#### **1.2. Población en estudio**

Se tomó un total de 85 pacientes mayores de 18 años que asistieron al Instituto SELADIS entre los meses de febrero a mayo del 2017. Se dividieron a los pacientes en dos grupos: grupo control 22 y grupo caso 63. El muestreo fue realizado por conveniencia, y fue

determinado principalmente por los criterios de inclusión y exclusión, accesibilidad a los pacientes y en función a la capacidad de financiamiento del presente estudio.

### **1.2.1. Criterios de inclusión**

En el grupo caso se tomó en cuenta a pacientes mayores de edad y de cualquier sexo atendidos en centros de salud de la ciudad de La Paz, diagnosticados mediante clínica y confirmado por laboratorio (anticuerpos anti-ds-DNA positivos), los cuales tienen determinada la actividad de la enfermedad mediante criterios establecidos en el formulario que evalúa el Índice de actividad de la enfermedad lupus eritematoso sistémico (en inglés SLEDAI), el formulario SLEDAI validado por los especialistas reumatólogos (ver anexo 1).

#### **1.2.1.1. Grupo control**

Se reclutó 22 pacientes como grupo control (aparentemente sanos), se les realizó pruebas confirmatorias para descartar cualquier enfermedad autoinmune. Las determinaciones analíticas que se realizaron fueron: Anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta, Anticuerpos anti-ds-DNA y perfil ANA/ENA (Inmunoensayo lineal).

#### **1.2.1.2. Grupo caso**

Se dividió en cuatro sub grupos: pacientes con LES activa sin NL (grupo I), pacientes con LES y NL activa (grupo II), pacientes con LES inactiva sin NL (grupo III) y aquellos pacientes con LES y NL inactiva (grupo IV), la clasificación se realizó en función a sus pruebas serológicas (Ac anti-ds-DNA, Niveles de C3 y C4). La presencia o ausencia de NL y la actividad o no de la misma fue establecida por el médico tratante de los pacientes.

### **1.2.2. Criterios de exclusión**

Se excluyó aquellos pacientes que tienen un diagnóstico de enfermedad autoinmune diferente LES y nefropatía por otra causa que no sea lúpica.

### **1.2.3. Criterios de eliminación**

Se eliminó del estudio aquellos pacientes que no tenían todos los análisis complementarios para el estudio de correlación. O que desestimaron su autorización para participar en el estudio.

## **2. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN**

### **2.1. Tamaño de la muestra**

El cálculo del tamaño muestral se realizó por conveniencia (muestreo no probabilístico), debido a la ausencia de estudios de incidencia y prevalencia de LES en nuestra población (el LES es una de las muchas enfermedades crónicas desatendidas por el Ministerio de Salud), siendo que este varía en función a la raza o grupo étnico.

### **2.2. Aspectos bioéticos**

A todos los pacientes se les informó en forma verbal y escrita el objetivo y el alcance del presente estudio; además, se les explicó los posibles beneficios de los resultados que se obtendrán y de las posibles complicaciones que pudieran existir por la toma de muestra. Todos los pacientes que aceptaron formar parte del estudio firmaron el consentimiento informado para participar del estudio (ver anexo 2).

### **2.3. Sitio o contexto del estudio**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud - SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA.

### **2.4. Financiamiento**

El presente trabajo de grado fue financiado con fondos concursables provenientes del Impuesto Directo a los Hidrocarburos mediante el proyecto "Evaluación del valor diagnóstico de los marcadores serológicos y urinarios destinados a predecir la exacerbación de lupus eritematoso sistémico y nefropatía lúpica" y con recursos propios generados por el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ficha clínica y toma de muestra**

##### **Ficha clínica**

Se realizó el llenado de una ficha clínica de cada paciente que participó en el estudio, la ficha recabó información referente a: datos personales (edad, sexo, años que padece de la enfermedad), datos de laboratorio (C3, C4, hemograma, plaquetas, creatinina) y la medicación que recibía al momento de la toma de muestra (ver anexo 1).

##### **Muestra de sangre**

A los participantes del estudio se les tomó 5 mL de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante, la muestra se centrifugó a 2.000 rpm/5 min para separar el suero, el cual fue empleado para evaluar los niveles de auto-anticuerpos (ANA, anti-ds-DNA, Anti-Nucleosoma y anti-C1q) y el metabolito ( $\beta$ 2-microglobulina).

##### **Muestra de Orina**

Se indicó al paciente el procedimiento para la recolección de la primera orina de la mañana (chorro medio, con previo aseo de la región genital en un frasco nuevo y estéril). Se concentró el sedimento urinario de la muestra recolectada mediante centrifugación a 3.000 rpm/10 min. El sedimento obtenido fue trasvasado a un tubo Eppendorf y se resuspendió en 600  $\mu$ L Trizol. Las muestras resuspendidas se guardaron en congelación (-20 °C) hasta el momento de la realización del aislamiento de RNA.

#### **3.2. Extracción de RNA total de muestras de orina**

Después de descongelar los sedimentos urinarios, se realizó el aislamiento del RNA total de la siguiente manera:

Se mezcló de manera enérgica las muestras descongeladas que contenían trizol, después se incubó 15 min en hielo, se añadió 200  $\mu$ L de Cloroformo y nuevamente se homogenizó de manera enérgica posteriormente se incubó en hielo 15 min y se centrifugó a 12.000 rpm/15 min, se obtuvo el sobrenadante y se transfirió a otro tubo Eppendorf, al sobrenadante se añadió 500  $\mu$ L Isopropanol p.a. para precipitar RNA incubándolo nuevamente en hielo por 48 horas, concluido el tiempo se centrifugó a 12.000 rpm/15 min



y se desechó el sobrenadante; se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 12.000 rpm/15 min (repetiendo el proceso de lavado 3 veces), se descartó el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta y se dejó secar durante 1 hora a temperatura ambiente para asegurar que no tenga remanente de etanol, concluido el tiempo se resuspendió el RNA en 50 uL de agua libre de nucleasas. El RNA extraído se mantuvo a -20°C hasta el momento de su uso.

### 3.3. Evaluación de la cantidad y calidad de RNA

Para cada muestra se determinó la concentración de RNA, en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón) se midió las absorbancias a una longitud de onda de 260nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica A<sub>260</sub> equivale a 50µg/ml de RNA. Los cálculos se realizaron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Long onda 260nm} = \mu\text{g/mL}$$
$$[\text{RNA}] = (A_{260}/0,025) * \text{factor de dilución}$$

Para la estimación de su pureza se hicieron lecturas a 260 (Ac. nucleicos) y 280 nm (proteínas) obteniendo los cocientes de pureza.

$$\text{Pureza} = x = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Se evaluó la calidad de la muestra bajo los siguientes rangos:

- $A_{260}/A_{280} = < 1,7$  (contaminación con proteínas)
- $A_{260}/A_{280} = > 1,7 < 2,0$  (buena calidad)
- $A_{260}/A_{280} = > 2,1$  (contaminación con fenol, cloroformo, etc.).

### 3.4. Síntesis de DNA copia (DNAc)

La síntesis de DNAc se realizó a partir de 30 µg de RNA total utilizando el kit comercial Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA), que además incluye la enzima retrotranscriptasa reversa juntamente con cebadores hexámeros aleatorios, para la síntesis de DNAc a partir del RNA.

Previo a la síntesis de DNAc, para garantizar que el RNA no forme estructuras secundarias se realizó el siguiente pre tratamiento a la muestra de RNA.

- 12 uL de RNA (30 ug/mL) se incubó 10 min a 70 °C, concluido el tiempo se realizó un spin para luego llevarlo a hielo por 5 min.

Finalizado el pre-tratamiento, se preparó el mix para un volumen final de 20 µl, por reacción se añadieron 4µl Buffer (First Strand 5X), 1µl cebadores hexámeros (50 uM), 1µl DTT (0,1 mM), 1µl mezcla de oligo(dT) (10 mM), 1µl de retrotranscriptasa reversa (200 U/uL) y 12 µl de RNA total (30µg/ ml). Posteriormente se incubó 10 minutos a 20°C, 45 minutos 42°C y 3 minutos a 99°C.

### 3.5. PCR a tiempo real

Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador Step One plus (Applied Biosystems) con capacidad para placas de 96 pocillos. En cada pocillo se cargaron 20 µl de la siguiente mezcla de reacción: 4 µl de DNAc (30 µg/ ml), 10 µl de SYBR Green Supermix (mezcla optimizada de iTaq™ DNA polimerasa, SYBR Green, dNTPs, buffer y estabilizadores), 0,4 µl de cebador específico directo (2 µM), 0,4 µl de cebador específico reverso (2 µM) y agua libre de nucleasas. El programa de PCR utilizado, denominado en 2 pasos, consistió en una desnaturalización inicial de 10 min a 95°, seguida de 40 ciclos 15 seg a 95°C, 60 seg a 60°C. Se incluyó un control negativo (CN) por cada mezcla de reacción para descartar posibles contaminaciones cruzadas entre muestras, también se empleó un control endógeno (β-Actina). En la tabla 5 se muestran todos los cebadores empleados en la reacción.

**Tabla 5.** Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la qPCR a tiempo real.

Cebadores	Secuencia	Tm
<b>TWEAK *</b>	Directo 5'-CCC TGC GCT GCC TGG AGG AA	72
	Reverso 5'-AGA CCA GGG CCC CTC AGT GA	67
<b>MCP-1 *</b>	Directo 5'-AACACTCACTCCACAACCCAAG	60
	Reverso 5'-TGTGGTTCAAGAGGAAAAGCAAT	59
<b>β-Actina</b>	Directo 5'-GCT CCT CCT GAG CGC AAG	62
	Reverso 5'- CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA	62
* Int J Clin Exp Med 2016;9(6):1123-11243		

Las secuencias de cebadores fueron blasteados en NCBI BLAST para corroborar la especificidad de las secuencias a amplificar.

Después de cada qPCR se analizaron las curvas de fusión con el software Applied Biosystems para identificar los productos específicos de la PCR, teniendo en cuenta que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como dímeros de primer.

Previamente a todos estos pasos se realizó la optimización del qRT-PCR. Las variables que se evaluó para la optimización fueron:

- **Remoción del RNA complementario del DNAc**

Dentro de la optimización se tomó en cuenta la remoción del RNA una vez obtenido el DNAc. 20 uL de DNAc fue tratado con 1 uL RNAasa (4 mg/ml), dicha mezcla se incubó a 37°C por 15 min, concluido en tiempo se realizó qRT-PCR.

La evaluación se realizó comparando los CT de la muestra tratada con RNAasa (remoción del RNA) y aquellos que no fueron tratados (DNAc-RNA), para ambas muestras se empleó cebadores dirigidos para el control de amplificación  $\beta$ -actina. Todas las pruebas se las realizó por triplicado.

- **Temperatura de alineación de los cebadores**

Para obtener la temperatura ideal de alineación para cada citoquina se realizó un gradiente de temperaturas de un rango de 55 a 60 °C, tomando 12 puntos de temperatura.

Temperatura de alineación °C											
55,0	55,3	55,9	56,8	58,1	59,4	60,6	61,9	63,2	64,1	64,7	65,0

- **Concentración de cebadores y muestra de RNA**

Las concentraciones óptimas de cebadores y muestra de RNA se establecieron realizando gradientes de concentración para cebadores de 10, 5, 2 y 1  $\mu$ M, y 50, 30, 15, 10 y 5  $\mu$ g/ml para muestra de RNA tanto para MCP-1 y TWEAK (anexo 3).

### 3.6. Curva de citoquinas MCP-1 y TWEAK

Para la cuantificación de ambas citoquinas se realizó una curva realizando diluciones seriadas 1/5 a partir de una concentración de 50 µg/ml del amplicon MCP-1 y TWEAK. También dichas curvas nos ayudaron a evaluar la sensibilidad analítica del método, la especificidad del método se evaluó mediante la temperatura melting.

El límite de detección, definido como la menor cantidad de analito que puede detectarse confiablemente por encima de los niveles de ruido de fondo y los límites de cuantificación que definen los extremos en los que la respuesta de medición a los cambios en el analito permanece lineal. En el estudio se empleó un referente pasivo, el fluoróforo ROX (6-carboxy-X-rhodamine) para normalizar la fluorescencia.

**Repetitividad.** Se evaluaron 5 muestras al azar. La evaluación se realizó por el mismo analista, en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones de trabajo, cada muestra fue procesada por triplicado.

**Reproducibilidad.** Se seleccionaron dos muestras al azar, mismas que fueron procesadas cuantificando ambas citoquinas en 2 tiempos diferentes. La evaluación tanto en el tiempo 1 como en el tiempo 2 fue procesada por dos analistas de manera seguida, en el mismo equipo y en las mismas condiciones de trabajo.

### 3.7. Validación de las pruebas moleculares MCP-1 y TWEAK

El proceso de validación de pruebas moleculares para uso diagnóstico es un proceso complejo, que determina la idoneidad de una prueba que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un fin concreto que incluye varios niveles de evaluación y validación (Mattocks *et al.*, 2010). La validación incluye estimaciones de las características de rendimiento analítico y diagnóstico de una prueba. En el presente trabajo solo se abarcó el diagnóstico de la prueba (características analíticas y diagnósticas). Tanto la validación como la verificación analítica se refieren solo a los procesos de laboratorio y no evalúa la forma en que se toma la decisión de establecer una prueba, la validación clínica, la utilidad clínica o las implicaciones éticas, legales y sociales de la prueba.

El proceso de validación de la cuantificación de las citoquinas (MCP-1, TWEAK) por qRT-PCR se realizó mediante una metodología diseñada y un flujo de trabajo para identificar parámetros que puedan afectar el rendimiento y las medidas de control que se deben considerar.

Dentro de la validación también se requiere un "estándar de oro" o prueba de referencia que sea capaz de asignar el estado de la muestra sin error, pero con la ausencia casi completa de pruebas de referencia o materiales de referencia certificados para pruebas moleculares, se optó por emplear un conjunto de marcadores serológicos comúnmente utilizado por los clínicos (anti-DNA-ds, C3, C4, anti-Nucleosoma,  $\beta$ 2-Microglobulina y anti-C1q) para el diagnóstico, el curso y la gravedad de la enfermedad.

### **3.8. Cuantificación de la expresión génica**

Las cuantificaciones se llevaron a cabo en base al valor del ciclo umbral (Ct) registrado en el software Applied Biosystems en base al siguiente modelo:

**Cuantificación relativa normalizada:** Este método se basa en el modelo Delta Delta Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA), uno de los más utilizados a nivel mundial para obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes ya que no tiene en cuenta la eficiencia de la reacción. Los valores obtenidos para cada gen (gen diana) son normalizados con los niveles de Ct obtenidos para un gen calibrador, que en todos los casos consistió en el mismo gen diana en las condiciones de tratamiento control. Para ello se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta$ Ct.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (gen diana)} - \text{Ct (Control endógeno)}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} - \Delta\text{Ct}(\text{calibrador})$$

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{Incremento de expresión del gen diana sobre el calibrador}$$

### **3.9. Evaluación de auto-anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta y por ensayo inmunoenzimáticos.**

Para la elección de los pacientes control y la clasificación de los diferentes grupos de los pacientes caso se realizó las siguientes pruebas: anticuerpos antinucleares (ANA) que fue determinado mediante Inmunofluorescencia indirecta (Kit ORGENTEC, Alemania),

Panel ANA/ENA por Inmunoensayo lineal (MIKROGEN, Alemania), anticuerpos anti-ds-DNA determinado por test de ELISA (Kit Trinity, USA),  $\beta$ 2-microglobulina, anticuerpos anti-nucleosoma y anticuerpos anti-C1q determinados por test de ELISA (Kit ORGENTEC, Alemania). Todos los ensayos de las pruebas de inmunoserología se realizaron empleando las instrucciones de los fabricantes de los kits comerciales

#### **4. Análisis de datos estadísticos.**

Los datos se analizaron utilizando SPSS, las variables cuantitativas se describieron usando media, desviación estándar y datos categóricos usando frecuencia y porcentaje, la asociación entre las variables categóricas se midieron mediante la prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ), para las pruebas no paramétricas el análisis se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Para muestras independientes (niveles biomarcadores urinarios) entre los grupos de pacientes con NL y sujetos control, para comparar 3 o más grupos la prueba de Kruskal – Wallis (pacientes control, pacientes NL y pacientes lúpicos).

La prueba de correlación de Rho de Spearman se utilizó para correlacionar los biomarcadores urinarios con otras variables (marcadores serológicos). En todas las pruebas, el valor  $p < 0,05$  se inferirá como estadísticamente significativo.

La expresión génica se evaluó por el  $\Delta\Delta C_t$ , que proporciona información sobre la cantidad de expresión de un gen en valores relativos. Los valores obtenidos representan el número de veces que se expresa más el gen diana que el calibrador. Es decir, valores iguales a uno representan una expresión idéntica entre el gen diana y el calibrador. Valores menores que uno, expresión menor del gen diana frente al calibrador y valores mayores que uno, expresión mayor del gen diana frente al calibrador. La correlación entre la expresión génica y los parámetros clínicos (marcadores serológicos) se calcularon utilizando la correlación de Rho de Spearman.

## I. RESULTADOS

### 1. Parámetros descriptivos de la muestra estudiada

El **grupo control** (n=22) presentó una media de edad de 24.32 años con rangos de 22 a 32 años, se incluyeron un total de 19 mujeres y 3 varones; en la tabla 6 se muestran las características demográficas y los resultados promedio de los marcadores serológicos evaluados en el estudio. Se observa que todos los controles dieron resultados no reactivos a las pruebas de anticuerpos anti-ds-DNA, anticuerpos anti-nucleosoma, anticuerpos anti-C1q,  $\beta$ 2-microglobulina, perfil ANA/ENA por inmunoensayo lineal (ANA/ENA LIA) y anticuerpos antinucleares por IFI (ANA IFI).

**Tabla 6.** Características demográficas y valores promedio de los marcadores serológicos evaluados en el grupo control.

<b>Variable</b>	<b>Grupo control Promedio <math>\pm</math> Desv.</b>
Edad (años)	24.32 $\pm$ 2.82
Sexo	19 (F) : 3 (M)
anti-ds-DNA (UI/mL)	30.89 $\pm$ 4.88
anti-Nucleosoma (U/mL)	10.52 $\pm$ 2.27
anti-C1q (U/mL)	4.17 $\pm$ 2.47
$\beta$ 2 microglobulina (ug/ml)	2.05 $\pm$ 0.77
ANA/ENA LIA	Negativo (-)
ANA IFI	65 % Negativo (-)
	35 % Positivo Patrón granular título 1/40

*Desv.: Desviación estándar, F: femenino, M: masculino*

El **grupo caso** (n = 63) se clasificó en 4 subgrupos en función al diagnóstico clínico e inmunoserología: 27 pacientes con LES activo sin NL (grupo I), 15 pacientes con LES y NL activa (grupo II), 13 pacientes con LES en remisión sin NL (grupo III) y 7 pacientes con LES y NL en remisión (grupo IV).

Las características demográficas y clínicas de los pacientes del grupo caso se muestran en la Tabla 7. El análisis estadístico de los grupos caso - control muestra que no existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre grupos para las variables edad en años cumplidos, edad del paciente al momento de diagnóstico, sexo, porcentaje de hematocrito y anti C1q.

**Tabla 7.** Comparación de las características demográficas, hallazgos clínicos y datos de laboratorio entre el grupo control – caso (4 subgrupos).

Variables	Grupo Control Promedio ± Desv.	Grupo I Promedio ± Desv.	Grupo II Promedio ± Desv.	Grupo III Promedio ± Desv.	Grupo IV Promedio ± Desv.	Test Kruskal-Wallis	
						Chi-cuadrado	valor-P
Edad (años)	24.32 ± 2.82	37 ± 13.30	32.90 ± 9.35	39.07 ± 12.20	41.85 ± 12.50	3.34	0.342
Edad de diagnóstico (años)	-----	29.80 ± 13.50	26.90 ± 10.40	35.20 ± 12.60	32.40 ± 7.90	3.10	0.376
Sexo	19 (F) : 3 (M)	24 (F) : 3 (M)	14 (F) : 1 (M)	12 (F) : 1 (M)	6 (F) : 1 (M)	0.66	0.955
Creatinina (mg/dL)	-----	0.82 ± 0.16	0.93 ± 0.33	0.76 ± 0.11	1.10 ± 0.30	10.52	0.015*
Hematocrito (g%)	-----	41.90 ± 7.20	42.50 ± 5.73	44 ± 5.10	43 ± 13.30	2.45	0.484
C3 (mg/dL)	-----	85.50 ± 27.20	78.70 ± 35.70	117.40 ± 17.90	95.24 ± 24.90	12.41	0.006*
C4 (mg/dL)	-----	10.30 ± 3.50	15.40 ± 7.02	24.20 ± 6.84	29 ± 8.86	17.33	0.001*
anti-ds-DNA (UI/ml)	30.89 ± 4.88	233.40 ± 172.70	296.83 ± 224.84	40.65 ± 15.92	32 ± 11.60	58.39	< 0.01**
anti-Nucleosoma (U/mL)	10.52 ± 2.27	267.50 ± 180.50	239.75 ± 162.92	27.26 ± 20.13	43.89 ± 71.15	58.41	< 0.01**
anti-C1q (U/mL)	4.17 ± 2.47	9.90 ± 14.69	14.33 ± 19.03	3.79 ± 3.61	5.86 ± 10.23	8.92	0.063
β2 microglobulina (ug/ml)	2.05 ± 0.77	5.30 ± 1.78	5.32 ± 2.97	3.11 ± 0.57	3.63 ± 1.42	40.51	< 0.01**
TWEAK (ug/mL)	0.80 ± 0.20	1.00 ± 0.50	1.44 ± 0.41	0.82 ± 0.41	1.02 ± 0.43	15.84	0.003*
MCP-1 (ug/mL)	1.27 ± 0.45	1.71 ± 0.64	1.86 ± 0.61	1.69 ± 0.99	0.79 ± 0.92	9.71	0.046*

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$

*Valores de referencia de los marcadores serológicos anexo 6*

En el gráfico 1 se observa que existe diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre el grupo caso y grupo control para las siguientes pruebas serológicas: niveles séricos de anticuerpos anti-ds-DNA [A], anti-nucleosoma [B] y niveles de β2-microglobulina [C]. También existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes subgrupos del grupo caso en los niveles séricos de creatinina [F], niveles de C3 [D] y C4 [E]; en los niveles de complemento existe diferencia significativa entre los pacientes con la enfermedad activa y los pacientes en remisión.



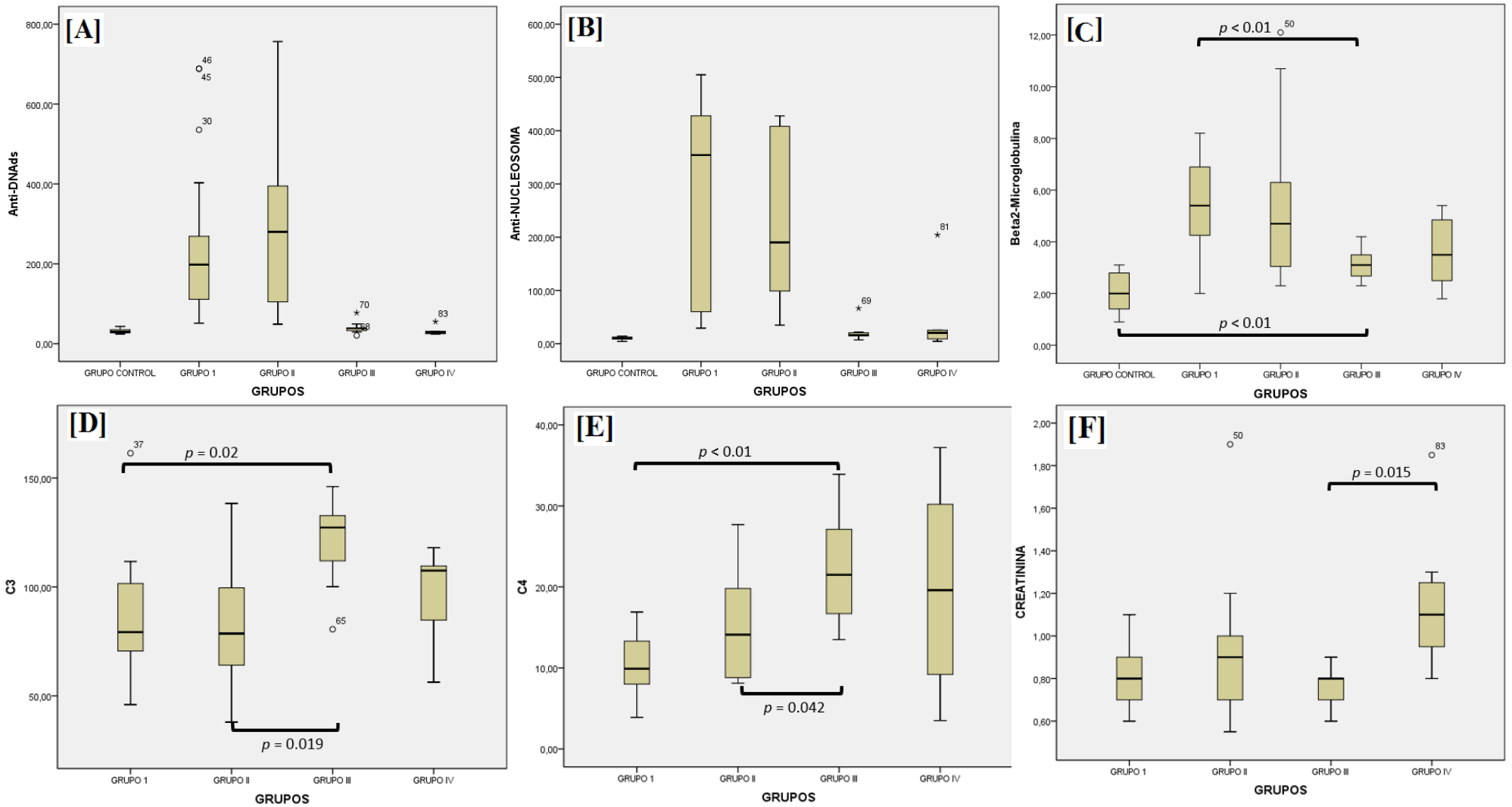


Gráfico 1. Comparación de los niveles de marcadores serológicos entre los grupos control y caso. A). niveles de anticuerpos anti-ds-DNA, B). niveles de anticuerpos anti-nucleosoma y C). niveles de  $\beta 2$ -microglobulina. Comparación entre los distintos subgrupos (grupos I al IV) con D). niveles de complemento C3, E). niveles de complemento C4 y F). niveles séricos de Creatinina.

## 2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

### 2.1. Validación de pruebas moleculares MCP-1 y TWEAK

#### Optimización de la qRT-PCR.

En el proceso de optimización de la qPCR se evaluaron tres parámetros: concentración de los cebadores, concentración de la muestra (material genético RNA) y la temperatura de alineación de los cebadores; encontrándose que las condiciones óptimas de trabajo son: concentración de cebadores de 2 uM para ambas citoquinas, 30 ug/mL de la muestra de material genético y temperaturas de alineación de 63,6 °C y 59,4 °C para la quimioquina MCP-1 y citoquina TWEAK respectivamente (ver anexo 3) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados de la concentración de cebadores y concentración de muestras que se establecieron como adecuadas durante el proceso de optimización de las pruebas moleculares que miden los niveles de expresión de RNAm de MCP-1 y TWEAK.

Variables	Citoquinas	Concentración	CT	CV
			Promedio ± Desv.	
Concentración de cebadores	MCP-1	2 uM	25.67 ± 0.18	0.70
	TWEAK	2 uM	22.16 ± 0.04	0.16
Concentración de muestra	MCP-1	30 ug/mL	30.04 ± 0.30	1.01
	TWEAK	30 ug/mL	30.99 ± 0.91	2.95

También se evaluó la **especificidad** del producto amplificado con la temperatura melting de cada citoquina, estableciéndose que las temperaturas de 75 °C y 78 °C son las ideales para MCP-1 y TWEAK respectivamente (ver anexo 4).

#### Sensibilidad de la prueba optimizada

La sensibilidad fue evaluada mediante una curva de concentración para cada citoquina, determinándose que en el caso de la quimioquina MCP-1 se puede detectar hasta  $8,19 \cdot 10^{-9}$  ug/mL del amplicon que corresponde a un CT de 33 (Gráfico 2A) y para la citoquina TWEAK detecta  $3,27 \cdot 10^{-10}$  ug/mL del amplicon que corresponde a un CT de 32 (Gráfico 2B), valores de CT superiores a los mencionados se consideraron no detectables (ver anexo 5).

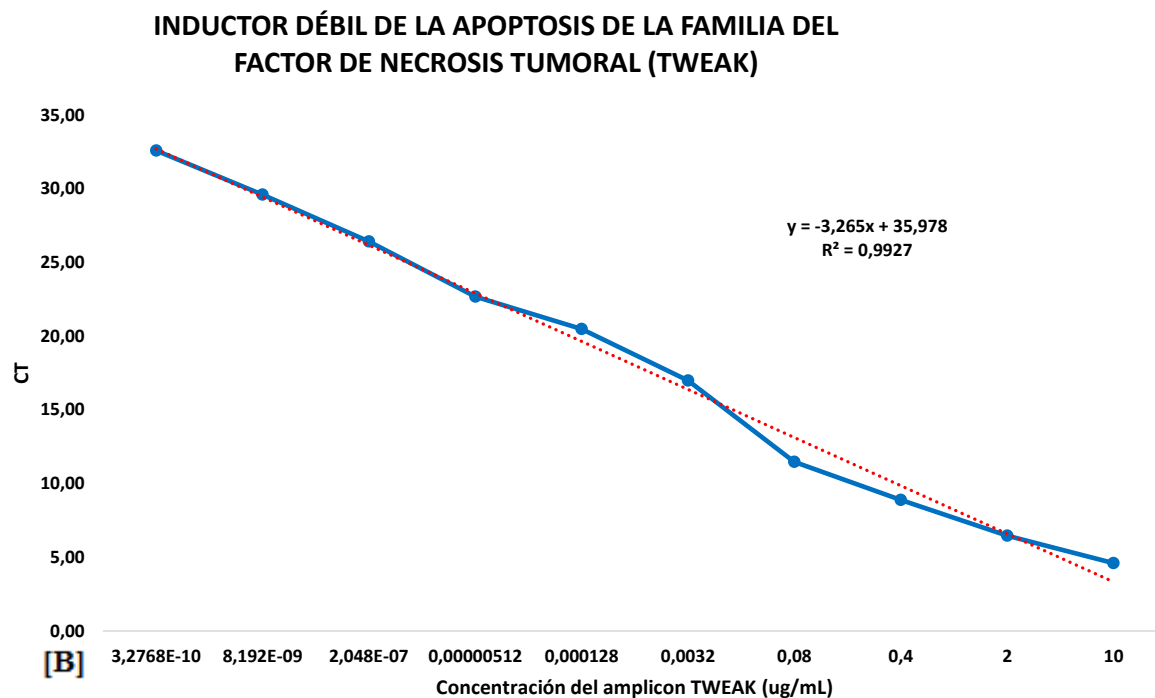
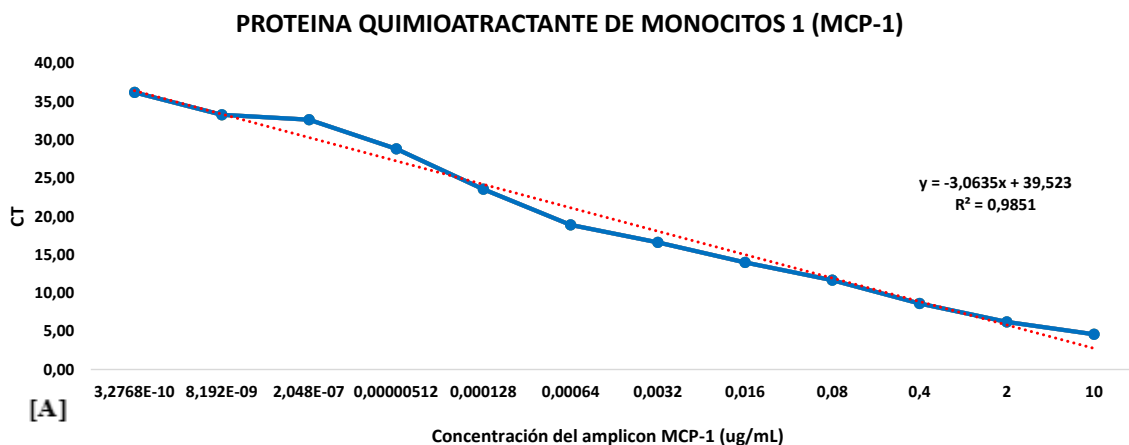


Gráfico 2. Curva de concentración de las citoquinas: [A] proteína quimioattractante de monocitos -1 [B] Inductor débil de la apoptosis de la familia del factor de necrosis tumoral

### Repetitividad

La repetitividad se muestra en la tabla 9, los resultados permiten evidenciar que las pruebas tienen un alto nivel de repetitividad, en particular se muestra los resultados de cinco muestras diferentes analizadas por triplicado. En el caso de MCP-1 la desviación estándar de los valores obtenidos en los diferentes ensayos está en el rango de 0.15 a 0.66

unidades de CT y el coeficiente de variación no supera el 2%. En el caso de los niveles de TWEAK la desviación estándar esta entre los rangos de 0.55 a 1.45 unidades de CT y un coeficiente de variación que no supera el 5%.

**Tabla 9.** Control de repetitividad obtenida para las pruebas optimizadas de MCP-1 y TWEAK.

Blanco de reacción	Código de muestra	CT	CV
		Promedio ± Desv.	
MCP-1	C-13	33.04 ± 0.66	1.99
	PL-55	30.04 ± 0.30	1.01
	PL-8	21.82 ± 0.15	0.70
	C-27	30.30 ± 0.54	1.79
	PL-30	25.60 ± 0.17	0.65
TWEAK	C-13	31.66 ± 1.45	4.43
	PL-55	30.99 ± 0.77	2.33
	PL-8	29.10 ± 0.58	1.74
	C-27	30.31 ± 1.31	3.93
	PL-30	26.41 ± 0.55	1.50

### Reproducibilidad

En la tabla 10, se detalla la evaluación de la reproducibilidad de los resultados para ambas citoquinas, los resultados del ensayo mostraron coeficientes de variación elevados de 10.53% para la quimioquina MCP-1 y 7.20% para la citoquina TWEAK.

**Tabla 10.** Control de reproducibilidad obtenida para las pruebas optimizadas.

Citoquina	Código de muestra	Tiempo		Promedio ± Desv.	CV
		1	2		
MCP-1	PL-40	28.76	32.58	30.37 ± 3.20	10.53
	PL-4	26.68	33.47		
TWEAK	PL-40	29.49	33.97	31.97 ± 2.30	7.20
	PL-4	30.53	33.89		

### 2.2. Correlación de resultados entre marcadores serológicos

Antes de realizar la correlación de los resultados entre los niveles de marcadores serológicos y los niveles de expresión de RNAm en las pruebas moleculares, se estableció el índice de asociación entre los niveles de marcadores serológicos evaluados (C3, C4,

anti-Nucleosoma,  $\beta$ 2-microglobulina y anti-C1q) con los niveles de anticuerpos anti-ds-DNA; por ser este último, el marcador de laboratorio de mayor especificidad para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

En la tabla 11 se muestra que, todos los marcadores serológicos evaluados tienen correlación con los niveles séricos de anti-ds-DNA; pero la forma en la que se correlacionan es diferente entre uno y otro biomarcador, es decir: los niveles séricos de complemento C3 y C4 tienen una correlación negativa con el anti-ds-DNA (C3  $r = -0.435$ ) (C4  $r = -0.554$ ) con un  $p < 0.001$ . Por otra parte, se pudo establecer que los niveles séricos de anti-nucleosoma y  $\beta$ 2-microglobulina tienen una buena correlación positiva con los niveles de anti-ds-DNA ( $r = 0.801$ ,  $r = 0.649$ ); pero los niveles séricos de anti-C1q tiene un grado de correlación bajo ( $r = 0.289$   $p < 0.05$ ) con los niveles de anti-ds-DNA.

**Tabla 11.** Correlación de resultados entre los niveles de anticuerpos anti-ds-DNA y marcadores de laboratorio empleados en el seguimiento clínico de pacientes lúpicos.

		Anti-ds-DNA		Rho de Spearman	p - valor
		Positivo	Negativo		
C3	Bajo	11 (22 %)	1 (2 %)	- 0.435	< 0.01**
	Normal	30 (60 %)	8 (16 %)		
C4	Bajo	34 (69.39 %)	3 (6.12 %)	- 0.554	< 0.01**
	Normal	6 (12.24 %)	6 (12.24 %)		
Anti-Nucleosoma	Positivo	49 (79.03 %)	2 (3.23 %)	0.801	< 0.01**
	Negativo	2 (3.23 %)	9 (14.52 %)		
$\beta$ 2-Microglobulina	Positivo	40 (64.52 %)	6 (9.68 %)	0.649	< 0.01**
	Negativo	10 (16.13 %)	6 (9.68 %)		
Anti-C1q	Positivo	16 (25.81 %)	0 (0 %)	0.289	0.01*
	Negativo	34 (54.84 %)	12 (19.35 %)		
* $p < 0.05$ , ** $p < 0.001$					

### 2.3. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

La determinación y cuantificación de los niveles urinarios de la citoquina TWEAK presenta una especificidad diagnóstica que supera el 80%, cuando es comparada con los niveles de los marcadores serológicos anti-nucleosoma, anti-ds-DNA y  $\beta$ 2-microglobulina, este valor obtenido permite considerarla como una buena herramienta

para el diagnóstico y seguimiento de la patología, a la vez que la prueba tiene capacidad para discriminar entre la reactivación o brote de la enfermedad y remisión (*Odds ratio* > 2), como está ilustrado en la tabla 12.

**Tabla 12.** Resultados de correlación entre la prueba optimizada TWEAK y los marcadores serológicos de la enfermedad.

Prueba diagnóstica	Marcadores serológicos de la enfermedad					
	TWEAK	Anti-Nucleosoma	Anti-ds-DNA	$\beta$ 2-Microglobulina	C3	C4
Sensibilidad	34.88 %	37.21 %	32.61 %	53.85 %	34.29 %	41.18 %
Especificidad	<b>84.38 %</b>	<b>86.67 %</b>	<b>86.21 %</b>	72.73 %	55.56 %	77.97 %
Valor predictivo positivo	<b>75.00 %</b>	<b>80.00 %</b>	<b>78.95 %</b>	43.75 %	75.00 %	35.00 %
Valor predictivo negativo	49.09 %	49.06 %	44.64 %	80.00 %	17.86 %	82.14 %
Proporción de falsos positivos	15.63 %	13.33 %	13.79 %	27.27 %	44.44 %	22.03 %
Proporción de falsos negativos	65.12 %	62.79 %	67.39 %	46.15 %	65.71 %	58.82 %
Exactitud	56.00 %	57.53 %	53.33 %	67.39 %	38.64 %	69.74 %
<i>Odds ratio</i> diagnóstica	<b>2.89</b>	<b>3.85</b>	<b>3.02</b>	<b>3.11</b>	0.65	<b>2.48</b>
Índice J de Youden	0.19	0.24	0.19	0.27	- 0.10	0.19
CPP o LR(+)	<b>2.23</b>	<b>2.79</b>	<b>2.36</b>	1.97	0.77	1.87
CPN o LR(-)	0.77	0.72	0.78	0.63	1.18	0.75

Intervalo de confianza del 95 %

Sin embargo, la determinación y cuantificación de los niveles urinarios de expresión de la quimioquina MCP-1 presenta una sensibilidad y especificidad diagnóstica que no supera el 52% y 67% respectivamente con respecto a los marcadores serológicos evaluados. (Tabla 13).

**Tabla 13.** Resultados de correlación resultados positivos y negativos entre la prueba optimizada MCP-1 y los marcadores serológicos evaluados en el presente estudio.

Prueba diagnóstica	Marcadores serológicos de la enfermedad					
	MCP-1	Anti-Nucleosoma	Anti-ds-DNA	$\beta$ 2-Microglobulina	C3	C4
Sensibilidad	41.86 %	46.51 %	43.48 %	46.15 %	41.67 %	52.94 %
Especificidad	63.64 %	66.67 %	66.67 %	60.61 %	55.56 %	64.41 %
Valor predictivo positivo	60.00 %	66.67 %	66.67 %	31.58 %	78.95 %	30.00 %
Valor predictivo negativo	45.65 %	46.51 %	43.48 %	74.07 %	19.23 %	82.61 %
Proporción de falsos positivos	36.36 %	33.33 %	33.33 %	39.39 %	44.44 %	35.59 %
Proporción de falsos negativos	58.14 %	53.49 %	56.52 %	53.85 %	58.33 %	47.06 %
Exactitud	51.32 %	54.79 %	52.63 %	56.52 %	44.44 %	61.84 %
<i>Odds ratio</i> diagnóstica	1.26	1.74	1.54	1.32	0.89	2.04
Índice J de Youden	0.05	0.13	0.10	0.07	- 0.03	0.17
CPP o LR(+)	1.15	1.40	1.30	1.17	0.94	1.49
CPN o LR(-)	0.91	0.80	0.85	0.89	1.05	0.73

Intervalo de confianza del 95 %

**2.4. Correlaciones obtenidas entre los niveles de expresión de la citoquinas en estudio frente a los marcadores serológicos evaluados en paciente lúpicos.**

En general se observó que los niveles de expresión urinaria de RNAm de la citoquina TWEAK tienen correlación directamente proporcional con los niveles de anti-ds-DNA (gráfico 3A), anti-nucleosoma y  $\beta$ 2-microglobulina ( $p < 0.01$ ); además, se observó que también tiene una correlación positiva con los niveles de la quimioquina MCP-1 ( $p < 0.05$ ) gráfico 3C; por otra parte, se observó que no existe correlación de resultados entre esta citoquina y los niveles de complemento (gráfico 3D), creatinina y anti-C1q (Tabla 14).

**Tabla 14.** Resumen de la correlación de los niveles de expresión urinarios de la citoquina TWEAK con los marcadores serológicos estudiados.

<b>Variables</b>	<b>Rho de Spearman</b>	<b><i>p</i> - valor</b>
Creatinina (mg/dL)	- 0.119	0.426
C3 (mg/dL)	- 0.112	0.466
C4 (mg/dL)	- 0.280	0.073
anti-ds-DNA (UI/ml)	0.414	< 0.01**
anti-Nucleosoma (U/mL)	0.405	< 0.01**
anti-C1q (U/mL)	0.139	0.233
$\beta$ 2 microglobulina (ug/ml)	0.427	< 0.01**
MCP-1 (ug/mL)	0.299	0.031*
* $p < 0.05$ , ** $p < 0.001$		

Según la prueba Rho de Spearman, los niveles de expresión urinarios de la quimioquina MCP-1 se correlacionan con los niveles de anti-ds-DNA (gráfico 3B) y anti-nucleosomas (Tabla 15), pero no así con los demás marcadores serológicos evaluados.

**Tabla 15.** Resumen del análisis de correlación de los niveles de expresión urinarios de la quimioquina MCP-1 con los marcadores serológicos evaluados.

<b>Variables</b>	<b>Rho de Spearman</b>	<b><i>p</i> - valor</b>
Creatinina (mg/dL)	- 0.231	0.237
C3 (mg/dL)	- 0.770	0.698
C4 (mg/dL)	- 0.120	0.551
anti-ds-DNA (UI/ml)	0.390	0.003**
anti-Nucleosoma (U/mL)	0.376	0.005**
anti-C1q (U/mL)	0.200	0.147
β2 microglobulina (ug/ml)	0.250	0.069
TWEAK (ug/mL)	0.299	0.031*
* <i>p</i> < 0.05, ** <i>p</i> < 0.001		



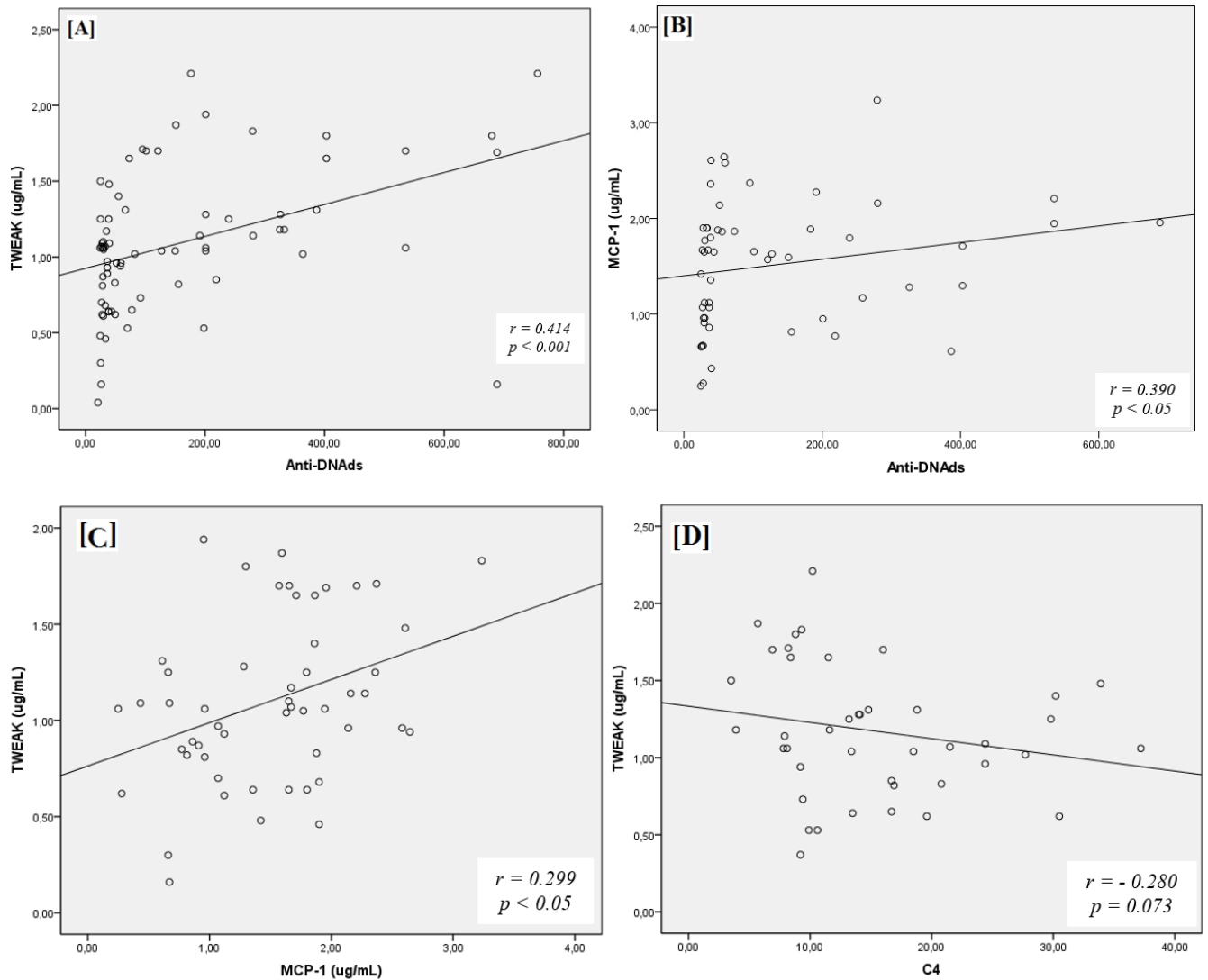


Gráfico 3. Correlación entre niveles de expresión urinarios de la citoquina TWEAK y quimioquina MCP-1 con los marcadores serológicos evaluados en el presente estudio.

### 3. Cuantificación de la expresión génica

#### 3.1 Análisis de la expresión génica relativa

Se comparó la expresión relativa del RNAm de los genes TWEAK y MCP-1 en los diferentes grupos de estudio. Se observó que existe una clara diferencia en los niveles de expresión del TWEAK en los pacientes lúpicos con la enfermedad activa frente aquellos que se encuentran en remisión con porcentajes de 58.3% (grupo I) y 100% (grupo II); siendo el promedio de expresión para ambos grupos 6 veces mayor que en los pacientes

con LES en remisión. Es decir, que en estos dos grupos existe la posibilidad de que haya daño renal (enfermedad activa) siendo que los niveles de expresión son mayores a 1; en los pacientes con la enfermedad en remisión (grupo III, IV) solo el 15.4% y 33.3 % respectivamente de los pacientes expresan niveles altos de la citoquina, como se muestra en la tabla 16 y en el gráfico 4.

**Tabla 16.** Cuantificación relativa normalizada de la expresión del gen TWEAK evaluada mediante RT-qPCR en muestras de orina.

Grupo	Nivel de expresión del gen	Nº pacientes	Promedio ± Desv. 2 (- $\Delta\Delta$ Ct)
<b>I</b> (LES activa sin NL)	Alto	14 (58.3 %)	9.99 ± 8.01
	Bajo	10 (41.7 %)	0.39 ± 0.33
<b>II</b> (LES y NL activa)	Alto	14 (100 %)	6.03 ± 4.10
<b>III</b> (LES inactiva sin NL)	Alto	2 (15.4 %)	2.31 a 14.22
	Bajo	11 (84.6 %)	0.56 ± 0.28
<b>IV</b> (LES y NL inactiva)	Alto	2 (33.3 %)	1.85 a 3.52
	Bajo	4 (66.7 %)	0.25 ± 0.18

Nivel de expresión = 1 (expresión idéntica entre el gen diana y el calibrador)

Nivel de expresión = < 1 (expresión menor del gen diana frente al calibrador)

Nivel de expresión = > 1 (expresión mayor del gen diana frente al calibrador)

Al comparar los niveles urinarios de expresión de la quimioquina MCP-1 entre los grupos en estudio se observó que el nivel de expresión es 12 veces mayor en los pacientes con la enfermedad activa (grupo I y II) en comparación con los pacientes con la enfermedad en remisión (grupo III y IV); sin embargo, no todos los pacientes del grupo con la enfermedad activa muestran niveles altos de la quimioquina solo el 48% (grupo I) y 35.7% (grupo II) como se observa en la tabla 17. Al mismo tiempo, se observó que existe diferencia significativa cuando se hizo análisis de niveles de expresión de MCP-1 a nivel de los subgrupos de pacientes casos, gráfico 4B.

**Tabla 17.** Cuantificación relativa normalizada de la expresión del gen MCP-1 evaluada mediante RT-qPCR en muestras de orina.

Grupo	Nivel de expresión del gen	Nº pacientes	Promedio ± Desv 2 (-ΔΔ Ct)
<b>I</b> (LES activa sin NL)	Alto	12 (48 %)	9.17 ± 12.43
	Bajo	13 (52 %)	0.15 ± 0.12
<b>II</b> (LES y NL activa)	Alto	5 (35.7 %)	12.47 ± 11.33
	Bajo	9 (64.3 %)	0.67 ± 0.19
<b>III</b> (LES inactiva sin NL)	Alto	2 (15.4 %)	2.87 a 12.38
	Bajo	11 (84.6 %)	0.78 ± 0.23
<b>IV</b> (LES y NL inactiva)	Bajo	6 (100 %)	0.74 ± 0.16

Nivel de expresión = 1 (expresión idéntica entre el gen diana y el calibrador)

Nivel de expresión = < 1 (expresión menor del gen diana frente al calibrador)

Nivel de expresión = > 1 (expresión mayor del gen diana frente al calibrador)

#### 4. Correlación entre los niveles de citoquinas de los grupos caso y control

El análisis de correlación entre los niveles de expresión de la citoquina TWEAK y la quimioquina MCP-1 entre los grupos control y los subgrupos de casos (gráfico 4), reveló que entre los niveles de expresión urinaria de la quimioquina MCP-1 y la citoquina TWEAK existe diferencias significativas entre el grupo control y caso-subgrupo II ( $p < 0,05$ ), estas diferencias de niveles de expresión no se observaron en los demás grupos de pacientes lúpicos estudiados.

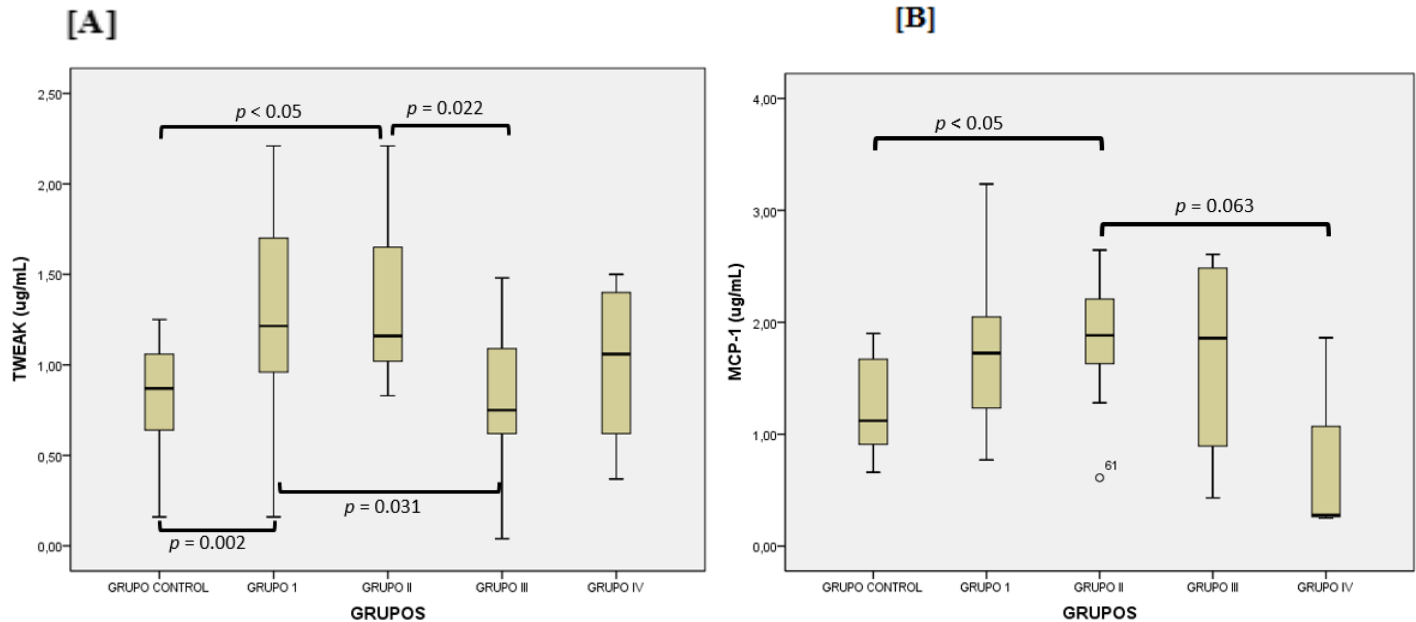


Gráfico 4. Análisis comparativo entre grupos caso y control (Grupo control, Grupo I= LES activa sin NL, Grupo II = LES y NL activa, Grupo III = LES inactiva sin NL y Grupo IV = LES y NL inactiva) de los niveles de las citoquinas TWEAK (A), quimioquina MCP-1 (B).

## J. DISCUSIÓN

La NL es una de las complicaciones más comunes del LES, es así que entre el 40 y 60 % de los pacientes en algún momento de la enfermedad cursan con NL (Chiu, 2010). El control de la actividad de la patología es esencial debido a que puede conducir a una pérdida irreversible de la función renal, además de requerirse de un tratamiento rápido y oportuno. En la práctica clínica, ninguna prueba de laboratorio utilizada hasta la fecha tiene una correlación adecuada con la actividad renal en el LES. Por lo tanto, la disponibilidad de un biomarcador no invasivo, de fácil medición y buena precisión, sería útil en el seguimiento de la enfermedad.

En la patogenia de la NL participan varias citoquinas y quimioquinas, como ser la citoquina proinflamatoria TWEAK y la quimioquina MCP-1, su secreción renal puede ser un excelente biomarcador de laboratorio para evaluar la actividad de la enfermedad. Recientemente, se realizaron varios estudios relacionados a evaluar la actividad clínica de ambas biomoléculas, entre ellos los metanálisis de Lee *et al.* realizados el 2016 y 2017, dichos estudios fueron realizados en poblaciones con distinta distribución demográfica;

en ambos metanálisis se sugiere que tanto la MCP-1 y TWEAK pueden ser biomarcadores útiles para evaluar la actividad de NL y un posible biomarcador para diferenciar entre NL activa e inactiva.

Los resultados del presente estudio demostraron la eficacia de la cuantificación de los niveles urinarios de TWEAK y MCP-1 en la población Boliviana. En el presente estudio se incorporó un total de 85 pacientes (22 pacientes “control” y 63 pacientes “caso”) no se incorporó un mayor número de pacientes al grupo control por el limitado acceso a reactivos y presupuesto del proyecto concursable IDH “Evaluación del valor diagnóstico de los marcadores serológicos y urinarios destinados a predecir la exacerbación de lupus eritematoso sistémico y nefropatía lúpica”.

En el análisis estadístico se reportó diferencia significativa entre los grupos control y los subgrupos del grupo caso (grupo I = pacientes con LES activa sin NL, grupo II = pacientes con LES y NL activa, grupo III = pacientes con LES inactiva sin NL, grupo IV = pacientes con LES y NL inactiva) para los siguientes marcadores serológicos: niveles de creatinina, niveles de complemento, anticuerpos anti-ds-DNA, anticuerpos anti-nucleosoma, niveles de  $\beta$ 2-microglobulina sérica y también se encontró diferencia significativa entre los niveles de expresión de RNA del gen TWEAK y MCP-1 (test kruskal-Wallis  $p < 0.001$ ), resultados similares fueron obtenidos por Taha *et al.*, 2017 quienes en población Egipcia reportaron diferencias significativas para los niveles séricos de C3, C4, anti-ds-DNA y niveles urinarios MCP-1; pero no así para los niveles de creatinina de pacientes con NL. Wing-Yan *et al.*, 2006 en el estudio que realizó con 106 pacientes clasificados en 4 grupos (grupo control, enfermedad activa, enfermedad inactiva y LES sin daño renal), reporta que los niveles de expresión del MCP-1 en pacientes con NL activa es mayor en comparación con los demás grupos (test de kruskal wallis  $p < 0.001$ ). En un trabajo más reciente, Reyes *et al.*, 2018 observó que los niveles urinarios de TWEAK, creatinina sérica, C3 y C4 fueron más elevados en pacientes con LES y NL activa en comparación con los pacientes lúpicos sin ninguna afección renal ( $p < 0.05$ ). Los resultados de ese estudio revelan que

tanto los marcadores comúnmente empleados para el seguimiento de la patología como los biomarcadores urinarios están presentes en pacientes con LES y NL activa.

Los resultados del análisis de la comparación de la expresión relativa de los niveles de la quimioquina MCP-1 y citoquina TWEAK fueron estadísticamente significativos en el grupo II (pacientes con LES y NL activa) en comparación con el grupo control, lo cual se asemeja a los resultados publicados el 2011 por El-Shehaby *et al.* Además, los niveles de expresión urinaria de la citoquina TWEAK se correlacionan positivamente con los niveles de anti-ds-DNA ( $r = 0.414$ ,  $p < 0.01$ ), anti-nucleosoma ( $r = 0.405$ ,  $p < 0.01$ ) y  $\beta$ 2-microglobulina ( $r = 0.427$ ,  $p < 0.01$ ); otros estudios como los realizados por Liu *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2012 y Sun *et al.*, 2018, también mostraron resultados similares referente a la correlación de TWEAK con los niveles de anti-ds-DNA, a la vez, obtuvieron una correlación negativa entre los niveles de complemento (C3, C4) y los niveles de TWEAK, resultados que no se obtuvieron en el presente estudio. En un estudio realizado por Dong *et al.*, 2018 se evaluó la correlación de niveles de complemento C3, C4, anti-C1q, anti-ds-DNA y niveles de  $\beta$ 2-microglobulina con los niveles de TWEAK, en el estudio reportó correlación únicamente con los niveles de anti-ds-DNA ( $r = 0.367$ ,  $p = 0.021$ ) y ninguna correlación con los demás marcadores serológicos. Todos los estudios mencionados fueron realizados por el método ELISA, en el presente estudio se empleó el método de qRT-PCR para evaluar niveles de expresión del RNAm que codifica la proteína incrementando la sensibilidad y especificidad de la prueba.

Con respecto a los niveles de expresión de MCP-1, en este estudio se obtuvo una correlación positiva con los niveles de expresión TWEAK ( $r = 0.299$ ,  $p = 0.031$ ), estos resultados se asemejan a los obtenidos por los estudios de Sun *et al.*, 2018 y Dong *et al.*, 2018. que afirmaron que la correlación se debía posiblemente a que los linfocitos T activados expresaron TWEAK, dando como resultado el aumento de la apoptosis de las células mononucleares, así mismo afirmaron que el incremento de la expresión de MCP-1 dio como respuesta la liberación de autoantígenos nucleares, y la eliminación de

todos los cuerpos apoptóticos se redujo relativamente, lo que podría ser uno de los mecanismos de la participación de ambas citoquinas (Xuejing *et al.*, 2012).

La quimioquina MCP-1 también demostró ser un biomarcador de la actividad de la NL, se detectó niveles más altos del MCP-1 en los pacientes con NL activa (grupo II) en comparación al grupo control ( $p < 0.05$ ). Singh *et al.*, 2012 en el estudio también observó que los niveles de MCP-1 en pacientes con afectación renal son significativamente mayores que de los pacientes del grupo control. Resultados similares fueron reportados en otros estudios (Dong *et al.*, 2018; Taha *et al.*, 2017; Sharaf *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2012; Alzawawy *et al.*, 2009). *In vivo*, la MCP-1 tiene una correlación positiva con los niveles de anti-ds-DNA ( $r = 0.390$ ,  $p = 0.003$ ) y niveles de anticuerpos anti-nucleosoma ( $r = 0.376$ ,  $p = 0.005$ ) (Taha *et al.*, 2017). Schwartz *et al.*, 2009 en un estudio similar evaluó la correlación entre los niveles de anti-ds-DNA y TWEAK mostrando resultados de correlación de Rho de 0.459 ( $p = 0.008$ ); además, al correlacionar los niveles de TWEAK con los niveles de creatinina sérica encontró que no existe correlación ( $r = -0.203$ ,  $p = 0,07$ ), finalmente en el estudio también evaluó la correlación de TWEAK con los niveles de complemento donde encontró que existe una correlación inversamente proporcional con los niveles de complemento ( $r = -0.269$ ,  $p = 0.016$ ). Contrariamente en el presente estudio determinamos que no existe correlación con los niveles de complemento (C4  $r = -0.280$ ,  $p = 0.073$ ; C3  $r = -0.112$ ,  $p = 0.466$ ), posiblemente porque los niveles de complemento no son específicos de la patología.

Referente a la evaluación de la sensibilidad y especificidad para ambas citoquinas, primero se estableció un punto de corte empleando los resultados del grupo control para luego evaluarlos frente a los marcadores serológicos clínicos comúnmente empleados en el seguimiento de la patología, se encontró que la citoquina TWEAK tiene baja sensibilidad diagnóstica 53% y una especificidad diagnóstica superior al 80%, demostrando que esta citoquina es específica para la patología; la quimioquina MCP-1 presentó porcentajes de 66% de especificidad y 46% de sensibilidad, Ferreira *et al.*, 2012 reportó resultados de especificidad de 90% y sensibilidad de la prueba de 50% para el

MCP-1. Dong *et al.*, 2018 en el estudio de ambas citoquinas por el método ELISA reportó resultados de sensibilidad de 70 % y 36.7 % y especificidad de 61.7 y 73.6 % tanto para la quimioquina MCP-1 y citoquina TWEAK respectivamente, datos similares a los obtenidos en el presente estudio, dichos resultados posiblemente se deban a que la activación temprana del NF-kB por la unión de TWEAK a su receptor Fn14, esta unión favorece la síntesis y secreción de varias quimiocinas dentro de ellas el MCP-1, este gradiente de quimiocinas permite la infiltración de macrófagos en los tejidos, por otro lado la activación tardía favorece la síntesis de quimioquinas CCL19 y CCL21 cuyo gradiente facilita la infiltración de LT en los órganos diana (Gonzales *et al.*, 2016). Concluyendo que la alta especificidad del TWEAK hace que la prueba sea un predictor útil de la actividad renal, especialmente cuando se asocia con otras medidas utilizadas en la práctica clínica; sin embargo, para la quimioquina MCP-1 como analito individual su especificidad y sensibilidad no son satisfactorias, pero esta puede ser considerada combinándola con otro metabolito que pueda mejorar la capacidad de evaluación de la patología.

En cuanto a la actividad de la enfermedad, para el grupo I (pacientes con LES activo) presentaban niveles de anticuerpos IgG e IgM de anti-ds-DNA de  $233.4 \pm 172.7$  UI/mL. Del total del grupo I solo el 58,3 % tenía niveles altos de expresión de la citoquina TWEAK y 48 % de MCP-1; para el grupo II que son pacientes lúpicos con NL activa mostraban niveles altos de ds-DNA de  $296.83 \pm 224.84$  y a la vez el 100 % presentaba niveles altos de expresión de la citoquina TWEAK, de este grupo de pacientes solo el 35.7% expresaba niveles altos de MCP-1. En el caso de los pacientes con LES inactivo (grupo III), presentaron niveles de anti-ds-DNA de  $40.65 \pm 15.92$ , de este grupo, únicamente el 15.4 % expresaban además niveles elevados de las dos citoquinas estudiadas; por último el grupo IV que son los pacientes con NL en remisión presentaron niveles de anti-ds-DNA de  $32 \pm 11.6$ , solo el 33.3 % expresaron niveles elevados de TWEAK y se evidencio además que este grupo de pacientes se caracterizó por la ausencia de expresión de MCP-1, los resultados antes mencionados corroboran la relación directa que existe entre los niveles de anti-ds-DNA con ambas citoquinas.



Entre los objetivos del presente estudio, también se consideró establecer si existe correlación de TWEAK y MCP-1 con otros marcadores serológicos empleados para el seguimiento de pacientes con NL como ser: anti-C1q, anti-nucleosoma y  $\beta$ 2-microglobulina, encontrando que para los niveles de C1q no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos caso y control ( $p = 0.063$ ); para los biomarcadores anti-nucleosoma y  $\beta$ 2-microglobulina sus niveles fueron significativamente más altos en pacientes con NL activa en comparación con los pacientes con la enfermedad inactiva ( $p < 0.01$ ), a la vez se correlaciona con todos los marcadores tradicionales de seguimiento de la patología (anti-ds-DNA  $r = 0.289$ ,  $p = 0.01$ ; anti-nucleosoma  $r = 0.666$ ,  $p < 0.001$ ; C3  $r = -0.434$ ,  $p = 0.002$ ; C4  $r = -0.426$ ,  $p = 0.003$ ) y también se correlaciona con los niveles de TWEAK ( $r = 0.427$ ,  $p < 0.001$ ); pero no así con los niveles de MCP-1 ( $r = 0.250$ ,  $p = 0.069$ ). Este resultado fue similar a los hallazgos de Badr *et al.*, 2015 que reveló una correlación de los niveles de anti-ds-DNA con los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina ( $p < 0.05$ ).

Actualmente, la molécula de  $\beta$ 2-microglobulina reviste mayor interés como marcador de actividad de la enfermedad renal; la causa de la concentración elevada de  $\beta$ 2-microglobulina en pacientes con LES no se comprende por completo. Algunos investigadores sugieren que el aumento de  $\beta$ 2-microglobulina puede ser el resultado de una mayor síntesis de moléculas MHC que se produce como producto de la proliferación celular de linfocitos que sucede en una enfermedad autoinmune o la presencia de complejos inmunes formados por  $\beta$ 2-microglobulina y anticuerpos anti-  $\beta$ 2-microglobulina eliminados por los riñones (Zychowska *et al.*, 2018).

## **K. CONCLUSIONES**

- En el presente trabajo se demostró que tanto la expresión de TWEAK y MCP-1 en pacientes con NL activa esta incrementada en comparación con los pacientes control, con respecto a los pacientes con NL inactiva existe diferencia pero esta no es estadísticamente significativa; por tanto, concluimos que la expresión de TWEAK y MCP-1 en sedimento urinario de pacientes con NL aumenta la probabilidad de que exista daño renal, por lo cual la medición de la expresión de RNAm urinario puede ser una herramienta potencial no invasiva para el control de la actividad de la enfermedad siempre que se asocie con otros marcadores.
- En relación al valor diagnóstico, la citoquina TWEAK presentó una especificidad diagnóstica superior al 80% por lo que puede ser considerada como un biomarcador específico para el monitoreo de la activación de daño renal y que el aumento de su expresión urinaria implica el doble riesgo de que la NL este activa; con respecto al valor diagnóstico de la quimioquina MCP-1 no presenta una buena sensibilidad y especificidad diagnóstica; pero eso no significa que no pueda llegar a ser un biomarcador de la reactivación de NL debido a que los niveles de MCP-1 fueron mayores en pacientes NL activa, además que se correlaciona significativamente con marcadores clínicos (anti-ds-DNA, anti-nucleosoma). También existe una asociación positiva de forma significativa entre ambas citoquinas, lo que indica que pueden ser considerados biomarcadores de seguimiento de la enfermedad, pero eso no significa que puede reemplazar completamente la biopsia renal en el proceso de diagnóstico.
- Los resultados de la medición de la expresión de la quimioquina MCP-1 y la citoquina TWEAK en muestras de orina permiten concluir que pueden ser una alternativa como biomarcadores que identifican NL activa, ya que ambas moléculas de estudio se expresan en respuesta a estímulos proinflamatorios a nivel renal.

- Como conclusión general del estudio, se puede afirmar que existe diferencia significativa entre niveles de expresión de TWEAK y MCP-1 en pacientes con LES y NL activa con respecto a aquellos que se encuentran en remisión o que pertenecen al grupo control. Por tanto, la citoquina TWEAK y la quimioquina MCP-1 se correlaciona positivamente con aquellos pacientes que tienen la enfermedad activa confirmada con niveles altos de anticuerpos anti-ds-DNA, hecho que sugiere agravación de la enfermedad. La medición de los niveles de expresión del RNAm del MCP-1 y TWEAK pueden ser métodos no invasivos para la evaluación de la actividad de la NL y la severidad del daño renal.

#### **L. RECOMENDACIONES**

- Si bien no se encontró porcentajes altos de sensibilidad y especificidad de la quimioquina MCP-1 se recomienda continuar con estudios más específicos que incluyan la clasificación patológica de la glomerulonefritis debido a que en los estudios de comparación de los grupos caso y control se demostró que existe diferencia significativa entre el grupo II (Pacientes con NL activa) y el grupo control.
- También se recomienda continuar con estudios más específicos de la citoquina TWEAK en población de pacientes con NL en distintos grados de clasificación histológica de la biopsia renal, a la vez que, las direcciones futuras en la investigación de biomarcadores de LES deberían centrarse en una combinación de marcadores novedosos con parámetros clínicos convencionales a fin de mejorar la sensibilidad y especificidad para la predicción de brotes renales y el pronóstico en NL.
- Aunque la fuerza de la asociación es débil con los demás marcadores serológicos (niveles de complemento, niveles de creatinina) se recomienda evaluar otras asociaciones que predigan exclusivamente la función renal (proteinuria, depuración de creatinina) en pacientes con LES con diferente gravedad de la enfermedad para validar la importancia clínica de estos marcadores biológicos urinarios.

## M. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abud, C. (2013). Nefritis lúpica: ¿avances en el conocimiento de su inmunopatogénesis sin los esperables logros terapéuticos?. *Reumatol Clin*, 9(2), 77-79. DOI: 10.1016/j.reuma.2013.02.001.
- Abujam, B., Cheekatla, SS., & Aggarwal, A. (2013). Urinary CXCL-10/IP-10 and MCP-1 as markers to assess activity of lupus nephritis. *Lupus*, 22, 614–623.
- Alzawawy, A., Zohary, M., Ablordiny, M., & Eldalie, M. (2009). Estimation of monocyte-chemoattractantprotein-1 (Mcp-1) level in patients with lupus nephritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 12, 311–318.
- Argyropoulos, C., Chen, S., Ng, Y., Roumelioti, M., Shaffi, K., Singh, P., & Tzamaloukas, A. (2017). Rediscovering Beta-2 Microglobulin as a Biomarker across the Spectrum of Kidney Diseases. *Frontiers in Medicine*, 4(73), 1-25. DOI: 10.3389/fmed.2017.00073.
- Bao, L., Cunningham, P., & Quigg, R. (2015). Complement in Lupus Nephritis: New Perspectives. *Kidney Diseases*, 1, 91-99. DOI: 10.1159/000431278.
- Badr, A., El-Melligy, D., Mostafa, H., & El Deeb, S. (2015). Evaluation of Beta2-Microglobulin as a Possible Biomarker for Assessment of Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus and Chronic Kidney Disease. *World Journal of Medical Sciences*, 12(1), 26-35. DOI: 10.5829/idosi.wjms.2015.12.1.91185.
- Barbado, J., Vega, L., Gonzalez, R., Jimeno, A., Ortiz, R., & Bermejo, J. (2010). MCP-1 en orina como biomarcador de lupus renal en ausencia de citoquinas, interferón- $\gamma$  y factores de crecimiento. *Reumatología Clínica*, 6(6), 296–298. DOI: 10.1016/j.reuma.2009.09.015.
- Bennett, M., & Brunner, H. (2013). Biomarkers and Updates on Pediatrics Lupus Nephritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 39(4), 833–853. DOI: 10.1016/j.rdc.2013.05.001.

- Birmingham, D., Irshaid, F., Nagaraja, H., Zou, X., Tsao, B., Wu, H., Yu, C., Hebert, L., & Rovin, B. (2010). The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare. *Lupus*, 19(11), 1272–1280. DOI: 10.1177/0961203310371154.
- Bombardier, C., Gladman, D., Urowitz, M., Caron, D., & Chang, C. (1992). Derivation of the Sledai. A Disease Activity Index for Lupus Patients. *Arthritis and Rheumatism*, 35(6), 630-640.
- Braun, A., Sis, J., Max, R., Mueller, K., Fiehn, C., Zeier, M., & Andrassy, K. (2007). Anti-chromatin and anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus compared to other systemic autoimmune diseases. *Scand Journal Rheumatology*, 36, 291–298.
- Chen, Y., Qian, H., & Shi, G. (2018). Advances in Study of Biomarkers for Lupus Nephritis. *Austin J Clin Immunol*, 5(1), 1033, 1-6.
- Chiu, C. (2010). Biomarkers for Lupus Nephritis: A Critical Appraisal. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, Article ID 638413, 1-11. DOI: 10.1155/2010/638413.
- Deshmane, S., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29 (6), 313-326. DOI: 10.1089/jir.2008.0027.
- Dong, X., Zheng, Z., Luo, X., Ding, J., Li, Y., Li, Z., Li, S., Rong, M., Fu, Y., Wu, Z., & Zhu, P. (2018). Combined utilization of untimed single urine of MCP-1 and TWEAK as a potential indicator for proteinuria in lupus nephritis. *Medicine*, 97(16), 1-7. DOI: 10.1097/MD.00000000000010343.
- D'haene, B., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods*, 50, 262–270. DOI: 10.1016/j.ymeth.2009.12.007.

- El-shehaby, A., Darweesh, H., El-Khatib, M., Momtaz, M., Marzouk, S., El-Shaarawy, N., & Emad, Y. (2011). Correlations of Urinary Biomarkers, TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK), Osteoprotegerin (OPG), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), and IL-8 with Lupus Nephritis. *J Clin Immunol*, 31, 848–856. DOI: 10.1007/s10875-011-9555-1.
- Ferreira, R., Takei, K., Araújo, N., Loduca, S., Szajubok, J., & Chahade, W. (2012). Monocyte Chemoattractant-1 as a Urinary Biomarker for the Diagnosis of Activity of Lupus Nephritis in Brazilian Patients. *The Journal of Rheumatology*, 39(10), 1948-1954. DOI: 10.3899/jrheum.110201.
- Gao, H., Campbell, S., Burkly, L., Jakubowski, A., Jarchum, I., Banas, B., Saleem, M., Mathieson, P., Berman, J., Michaelson, J., & Putterman, C. (2009). TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells. *Cytokine*, 46, 24–35. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.12.001.
- Ghobrial, E., El Hamshary, A., Mohamed, A., El Raheim, Y., & Talaat, A. (2015). Urinary Monocyte Chemoattractant Protein-1 as a Biomarker of Lupus Nephritis Activity in Children. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 26(3), 507-515.
- Goilav, B., Putterman, C., & Rubinstein, T. (2015). Biomarkers for kidney involvement in pediatric lupus. *Biomark Med*, 9(6), 529–543. DOI: 10.2217/bmm.15.25.
- González, D., Álvarez, C., Vásquez, G., & Gómez, J. (2016). Papel de la vía de señalización del TWEAK/Fn14 en la nefritis lúpica y otros escenarios clínicos. *Nefrología*, 233, 1-8. DOI: 10.1016/j.nefro.2016.05.020.
- Grimaldi, C. (2006). Sex and systemic erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatology*, 18, 456-461.

- Hsieh, S., Tsai, C., & Yu, C. (2016). Potential serum and urine biomarkers in patients with lupus nephritis and the unsolved problems. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews*, 8, 81–91.
- Ighe, A., Dahlstrom, O., Skogh, T., & Sjowall, C. (2015). Application of the 2012 Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria to patients in a regional Swedish systemic lupus erythematosus register. *Arthritis Research & Therapy*, 17(3), 1-8. DOI: 10.1186/s13075-015-0521-9.
- Ines, L., Silva, C., Galindo, M., López, F., Terroso, G., Romão, V., Rúa, I., Santos, M., Pego, J., Nero, P., Cerqueira, M., Duarte, C., Miranda, L., Bernardes, M., Gonçalves, M., Mouriño, C., Araújo, F., Raposo, A., Barcelos, A., Couto, M., Abreu, P., Otón, T., Macieira, C., Ramos, F., Branco, J., Silva, J., Canhão, H., & Jaime Calvo, J. (2014). Classification of Systemic lupus erythematosus: Systemic Lupus International. Collaborating Clinics versus American College of Rheumatology criteria. *Arthritis Care & Research*, 1-19. DOI: 10.1002/acr.22539.
- Kulkarni, O., & Anders, H. (2012). Lupus nephritis. How latest insights into its pathogenesis promote novel therapies. *Curr Opin Rheumatol*, 24(5), 457–465. DOI:10.1097/BOR.0b013e328354c877.
- Larocca, T., FerriII, K., & Aimone, M. (2014). Systemic lupus erythematosus activity and beta two microglobulin levels. *Sao Paulo Med J.*, 132(4), 239-242. DOI: 10.1590/1516-3180.2014.1324703.
- Lee, Y., & Song, G. (2016). UrinaryMCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta-analysis. *Zeitschriftfür Rheumatologie*. DOI: 10.1007/s00393-016-0109-z.
- Lee, Y., & Song, G. (2017). Urinary Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis as a Biomarker for Lupus Nephritis: A Meta-analysis. *Journal of Rheumatic Diseases*, 24(2), 85-92.

- Leng, R., Pan, H., Qin, W., Wang, C., Chen, L., Tao, J., & Ye, D. (2011). TWEAK as a target for therapy in systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*, 38, 587–592. DOI: 10.1007/s11033-010-0144-9.
- Li, L., Dong, M., & Wang, XG. (2016). The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator. *Chinese Medical Journal*, 129(4), 448-455. DOI: 10.4103/0366-6999.176084
- Li, Y., Fang, X., & Li, Q. (2013). Biomarker Profiling for Lupus Nephritis. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 11, 158-165. DOI: 10.1016/j.gpb.2013.05.003.
- Li, Z., Zhou, Q., Li, X., Yang, J., Ao, X., Veeraragoo, P., & Zuo, X. (2011). Elevation of human tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells is correlated with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Cytokine*, 53, 295-300. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.11.012.
- Liu, Z., & Zhou, Q. (2012). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its potential roles in lupus nephritis. *Inflammation Research*, 61, 277–284. DOI: 10.1007/s00011-011-0420-8.
- Liu, C., Kao, A., Manzi, S., & Ahear, J. (2013). Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskel Dis*, 5(4), 210 –233. DOI: 10.1177/ 1759720X13485503.
- Lu, J., Szeto, C., Tam, L., Moune, F., Ming, E., Chow, K., Tao, P., & Kwan, B. (2012). Relationship of Intrarenal Gene Expression and the Histological Class of Lupus Nephritis — A Study on Repeat Renal Biopsy. *The Journal of Rheumatology*, 39, 1942-1947.
- Mak, A., & Hee, S. (2014). Environmental Factors, Toxicants and Systemic Lupus Erythematosus. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 16043-16056. DOI: 10.3390/ijms150916043.



- Markowitz, GS., & D'Agati, VD. (2007). The ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis: An assessment at 3 years. *Kidney International*, 71, 491–495. DOI: 10.1038/sj.ki.5002118.
- Mattocks, C., Morris, M., Matthijs, G., Swinnen, E., Corveleyn, A., Dequeker, E., Muller, C., Pratt, V., & Wallace, A. (2010). A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European Journal of Human Genetics*, 18, 1276–1288. DOI: 10.1038/ejhg.2010.101.
- McMurray, R., & May, W. (2003). Sex Hormones and Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 48(8), 2100–2110. DOI 10.1002/art.11105.
- Michaelson, J., Wisniacki, N., Burkly, L., & Putterman, C. (2012). Role of TWEAK in Lupus Nephritis: A bench-to-bedside review. *Journal Autoimmune*, 39(3), 130–142. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.05.003.
- Mok, C., Yap, D., Navarra, S., Liu, Z., Zhao, M., Lu, L., Takeuchi, T., Avihingsanon, Y., Yu, X., Lapid, E., Llizardo, L., Sumethkul, V., Shen, N., Chen, S., & Chan, T. (2014). Overview of lupus nephritis management guidelines and perspective from Asia. *Nephrology*, 19, 11–20. DOI: 10.1111/nep.12136.
- Molano, A., Lakhani, P., Aran, A., Burkly, L., Michaelson, J., & Putterman, C. (2009). TWEAK stimulation of kidney resident cells in the pathogenesis of graft versus host induced lupus nephritis. *Immunology Letters*, 125, 119-128. DOI: 10.1016/j.imlet.2009.06.010.
- Mora, C., Arbeláez, A., Medina, J., Ospina, A., Sánchez, C., Valencia, P., Jaimes, D., Valle, R., Santos, A., & Londoño, J. (2014). El papel de los anticuerpos anti-cromatina, antiC1q y las fracciones del complemento unidas a células en el diagnóstico precoz de actividad lúpica. *Rev colombiana reumatología*, 21(2), 76-83.

- Munroe, M., & James, J. (2015). Genetics of Lupus Nephritis: Clinical Implications. *Semin Nephrol*, 35(5), 396–409. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2015.08.002.
- Nowling, T., & Gilkeson, G. (2011). Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy*, 13(250), 1-9.
- Ortiz, A., Sanz, A., Muñoz, B., Moreno, J., Sanchez, M., Ventura, J., Egido, J., & Colio, L. (2009). Considering TWEAK as target for therapy in renal and vascular injury. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20, 251–258. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.05.002.
- Palmer, S., Tunnicliffe, D., Singh, D., Mavridis, D., Tonelli, M., Johnson, D., Craig, J., Tong, A., & Strippoli, G. (2017). Induction and Maintenance Immunosuppression Treatment of Lupus Nephritis: A Network Meta-analysis of Randomized Trials. *Am J Kidney Dis*, 70(3), 324-336. DOI: 10.1053/j.ajkd.2016.12.008.
- Parks, C., Souza, A., Barbhuiya, M., & Costenbader, K. (2017). Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 31(3), 306 – 320. DOI: 10.1016/j.berh.2017.09.005
- Petri, M., Orbai, A., Alarcón, G., Gordon, C., Merrill, J., Fortin, F., Bruce, I., Isenberg, D., Wallace, D., Nived, O., Sturfelt, G., Ramsey, R., Cheol, S., Hanly, J., Sanchez, J., Clarke, A., Aranow, C., Manzi, S., Urowitz, M., Gladman, D., Kalunian, K., Costner, M., Werth, V., Zoma, A., Bernatsky, S., RuizIrastorza, G., Khamashta, M., Jacobsen, S., Buyon, J., Maddison, P., Dooley, M., Vollenhoven, R., Ginzler, E., Stoll, T., Peschken, C., Jorizzo, J., Callen, J., Lim, S., Fessler, B., Inanc, M., Kamen, D., Rahman, A., Steinsson, K., Franks, A., Sigler, L., Hameed, S., Fang, H., Pham, N., Brey, R., Weisman, M., McGwin, G., & Magder, L. (2012). Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics

Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*, 64(8), 2677–2686. DOI: 10.1002/art.34473.

- Pickering, M., & Walport, M. (2000). Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 39, 133-141.
- Quintana, L., & Jayne, D. (2016). Sustained remission in lupus nephritis: still a hard road ahead. *Nephrol Dial Transplant*, 31, 2011–2018. DOI: 10.1093/ndt/gfv381.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinform Biomath*, 3(3), 71–85.
- Reyes, F., Pérez, M., Rodríguez, A., Soto, V., Gutierrez, G., Medina, Z., & Valdez, R. (2018). Assessment of urinary TWEAK levels in Mexican patients with untreated lupus nephritis: An exploratory study. *Nefrología*, 38(2), 152–160.
- Roos, C., Wicovsky, A., Muller, N., Salzmann, S., Rosenthal, T., Kalthoff, H., Trauzold, A., Seher, A., Henkler, F., Kneitz, C., & Wajant, H. (2010). Soluble and Transmembrane TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis Differentially activate the classical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *Journal Immunol*, 185, 593-1605.
- Ruiz G., Espinosa, G., Frutos, M., Jiménez, J., Praga, M., Pallarés, L., Rivera, F., Robles, A., Segarra, A., & Quereda, C. (2012). Diagnóstico y tratamiento de la nefritis lúpica. *Revista Nefrología*, 32(1), 1-35. DOI: 10.3265/Nefrologia.pre2011.Dec.11298.
- Sanz, A., Izquierdo, C., Sanchez, D., Uceró, A., Egido, J., Ruiz, M., Ramos, A., Putterman, C., & Alberto Ortiz, A. (2014). TWEAK and the progression of renal disease: clinical translation. *Nephrol Dial Transplant*, 29, 54–62. DOI: 10.1093/ndt/gft342.

- Sanz, A., Sánchez, M., & Ortiz, A. (2011). TWEAK a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney International*, 80, 708–718. DOI: 10.1038/ki.2011.180.
- Schwartz, N., Rubinstein T., Burkly, L., Collins, C., Blanco, I., Su, L., Hojaili, B., Mackay, M., Aranow, C., Stohl, W., Rovin, B., Michaelson, J., & Putterman, C. (2009). Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Research & Therapy*, 11(5), 1-10. DOI: 10.1186/ar2816.
- Schwartz, N., Su, L., Burkly, L., Mackay, M., Aranow, C., Kollaros, M., Michaelson, J., Rovin, B., & Putterman, C. (2006). Urinary TWEAK and the activity of lupus nephritis. *Journal of Autoimmunity*, 27, 242-250. DOI: 10.1016/j.jaut.2006.12.003.
- Selim, Z., Khader, T., Mohammed, H., Al-Hammady, D., Seif, H., & All-Johi, A. (2018). Urinary Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (uTWEAK) as a biomarker for lupus nephritis activity and its correlation with histopathological findings of renal biopsy. *The Egyptian Rheumatologist*, 1-5. DOI: 10.1016/j.ejr.2018.01.008.
- Sifuentes, W., García, M., Boteanu, A., Iglesias, L., & Zea, A. (2012). Nuevas dianas terapéuticas en el lupus sistémico (parte 1/2). *Reumatol Clin.*, 8(4), 201-207. DOI: 10.1016/j.reuma.2012.01.012.
- Singh, R., Usha, Rathore, S., Behura, S., & Singh, N. (2012). Urinary MCP-1 as diagnostic and prognostic marker in patients with lupus nephritis flare. *Lupus*, 21, 1214–1218.
- Sharaf, H., & Helal, M. (2013). Urinary MCP-1 as a Biomarker for Lupus Nephritis. *Med. I Cairo Univ.*, 81(2), 223-228.
- Sun, F., Teng, J., Yu, P., Li, W., Chang, J., & Xu, H. (2018). Involvement of TWEAK and the NF-κB signaling pathway in lupus nephritis. *Experimental and therapeutic medicine*, 15, 2611-2619. DOI: 10.3892/etm.2018.5711.

- Szeto, C., Kwan, B., & Tam, L. (2013). Urinary mRNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Advances in Clinical Chemistry*, 62, 197-219. DOI: 10.1016/B978-0-12-800096-0.00005-6.
- Taha, H., Abdallah, N., Salem, M., Hamouda, A., Elazeem, M., & Eesa, N. (2017). Urinary and tissue monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) in lupus nephritis patients. *The Egyptian Rheumatologist*, 39, 145–150.
- Vidaver, R. (2002). Molecular and clinical evidence of the role of estrogen in lupus. *Trends in Immunology*, 23(5), 229-230.
- Wang, C., Chen, L., Pan, H., Leng, R., Qin, W., & Ye, D. (2012). Expression of human tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* , 31, 335–339. DOI: 10.1007/s10067-011-1865-4.
- Weening, J., D’agati, V., Schwartz, M., Surya, V., Seshan, S., Alpers, C., Appel, G., Balow, J., Bruijn, J., Cook, T., Ferrario, F., Fogo, A., Ginzler, E., Hebert, L., Hill, G., Hill, P., Jennette, C., Kong, N., Lesavre, P., Lockshin, M., Looi, L., Makino, H., Moura, L., & Nagata, M. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney International*, 65, 521–530.
- Wing-Yan, R., Mac-Moune, F., Kwok-Ming, E., Tam, L., Chow, K., Kam-Tao, P., & Szeto, C. (2006). The effect of immunosuppressive therapy on the messenger RNA expression of target genes in the urinary sediment of patients with active lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 1534–1540. DOI: 10.1093/ndt/gfk102.
- Wing-Yan, R., Mac-Moune, F., Kwok-Ming, E., Tam, L., Yuk-Hwa, T., Szeto, C., Kam-Tao, P., & Szeto, C. (2004). Expression of Chemokine and Fibrosing Factor Messenger RNA in the Urinary Sediment of Patients with Lupus Nephritis. *Arthritis & Rheumatism*, 50(9), 2882–2890. DOI: 10.1002/art.20471.

- Winkles, J., Tran, N., & Berens, M. (2006). TWEAK and Fn14: New molecular targets for cancer therapy?. *Cancer Letters*, 235, 11–17. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.03.048.
- Wu, T., Ding, H., Han, J., Arriens, C., Wei, C., Han, W., Pedroza, C., Jiang, S., Anolik, J., & Petri, M. (2016). Johns Hopkins University. Antibody-Array-Based Proteomic Screening of Serum Markers in Systemic Lupus Erythematosus: A Discovery Study. *Journal of Proteome Research*, 15(7), 2102-2114. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00905.
- Xu, X., Zheng, M., & Liu, B. (2016). Urinary TWEAK/Fn14 mRNA as a biomarker of lupus nephritis activity. *Int J Clin Exp Med*, 9(6), 11236-11243.
- Yong, P., & Cruz, D. (2008). Mycophenolate mofetil in the treatment of lupus nephritis. *Biologics: Targets & Therapy*, 2(2), 297–310.
- Yung, S., & Chan, T. (2015). Mechanisms of kidney injury in lupus nephritis – the role of anti-dsDNA antibodies. *Frontiers in Immunology*, 6(475), 1-11. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00475.
- Xuejing, Z., Jiazhen, T., Xiangqing, X., Shuguang, Y., & Fuyou. L. (2012). Urinary TWEAK Level as a Marker of Lupus Nephritis Activity in 46 Cases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-7. DOI: 10.1155/2012/359647.
- Zhao, Z., Burkly, L., Campbell, S., Schwartz, N., Molano, A., Choudhury, A., Eisenberg, R., Michaelson, J., & Putterman, C. (2007). TWEAK/Fn14 Interactions Are Instrumental in the Pathogenesis of Nephritis in the Chronic Graft-versus-Host Model of Systemic Lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 179, 7949– 7958.

- Zychowska, I., Suszek, D., Dryglewska, M., & Majdan, M. (2018).  $\beta$ 2-microglobulin as a marker of systemic lupus erythematosus activity. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(3), 379–382.