



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

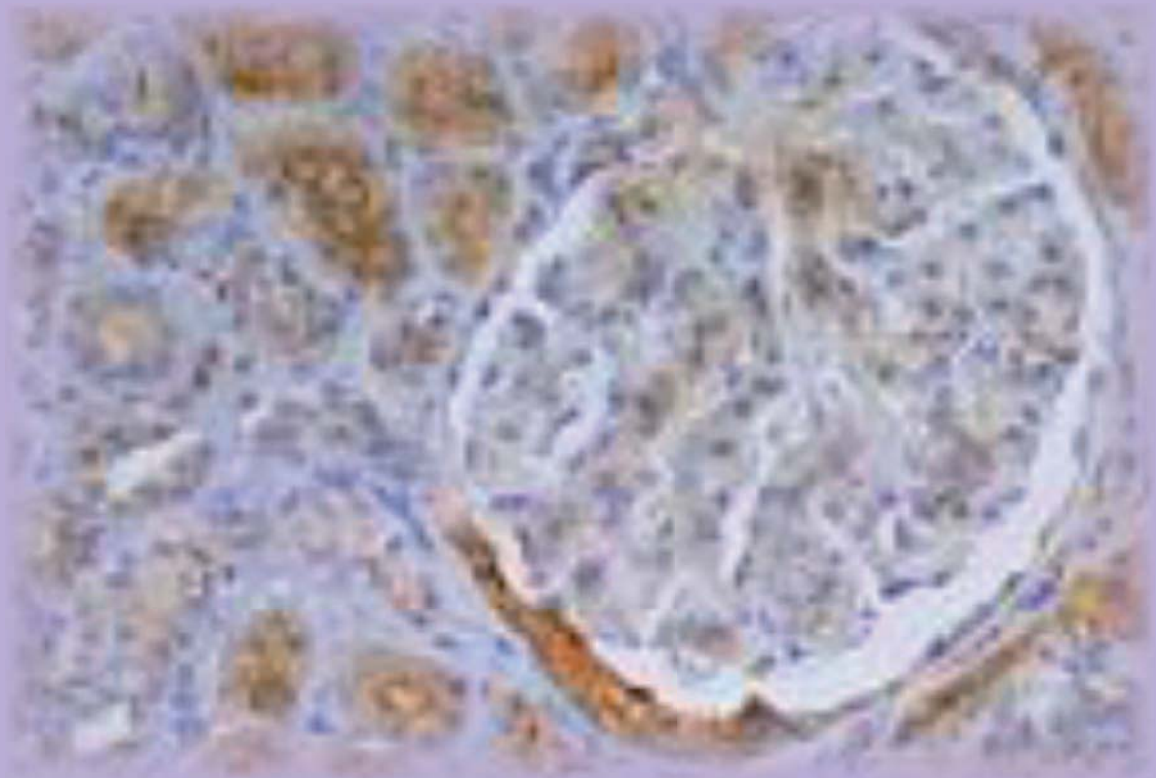


**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

Biomarcadores en la nefritis lúpica



María Teresa Torres Salido

Barcelona, 2016

TESIS DOCTORAL
Biomarcadores en la nefritis lúpica

Autor:

María Teresa Torres Salido

Directores:

Josep Ordi-Ros

Miquel Vilardell-Tarrés

Tutor:

Miquel Vilardell-Tarrés

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado en Medicina



Facultad de Medicina

Barcelona, 2016



UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



**Vall d'Hebron
Hospital**



**Vall d'Hebron
Institut de Recerca**

*Si algú et negués la saviesa,
el vi de qual tens set,
en llibertat no fóra
com un riu que cap a a la mar no pot anar.*

D. Alighieri, La Divina Commedia. Paradiso (Canto X).

1. Prólogo y agradecimientos	13
2. Abreviaturas	17
3. Introducción	23
3.1 <u>Nefritis lúpica</u>	23
3.1.1 Epidemiología.....	23
3.1.2 Patogénesis.....	24
3.1.2.1 <i>Mecanismos de muerte celular y aparición de nuevos autoantígenos en LES</i>	24
3.1.2.2 <i>Proliferación de linfocitos anómalos y activación de la vía del interferón</i>	26
3.1.2.3 <i>Papel de los autoanticuerpos en la NL</i>	26
3.1.2.4 <i>Activación de los receptores toll-like e inhibición de la expresión de la DNAsa</i>	30
3.1.2.5 <i>Sistema del complemento</i>	31
3.1.2.6 <i>Reclutamiento y activación de leucocitos autoreactivos</i>	31
3.1.2.7 <i>Alteraciones en la reparación renal que conducen a la IRC</i>	32
3.2 <u>Biomarcadores</u>	33
3.2.1 Definición.....	33

3.2.2 Desarrollo de biomarcadores en la NL.....	33
3.3 <u>Diagnóstico</u>	34
3.3.1 Presentación clínica.....	34
3.3.2 Biomarcadores analíticos habituales de actividad de la enfermedad.....	34
3.3.2.1 <i>Orina</i>	35
3.3.2.1.1 Proteinuria.....	35
3.3.2.1.2 Sedimento urinario.....	36
3.3.2.2 <i>Sangre</i>	37
3.3.2.2.1 TFGe y creatinina sérica.....	38
3.3.2.2.2 Anticuerpos anti ds-DNA.....	38
3.3.2.2.3 Anticuerpos anti C1q.....	40
3.3.2.2.4 Niveles de complemento sérico....	41
3.3.2.3 <i>Biopsia renal</i>	43
3.3.4 Escalas de valoración del LES.....	46
3.3.4.1 <i>Índice de actividad del Lupus Eritematoso</i> <i>Sistémico (SLEDAI)</i>	46
3.3.4.2 <i>Índice de lesión del Lupus Eritematoso</i> <i>Sistémico</i>	47

3.4 <u>Nuevos biomarcadores utilizados para valorar la nefritis lúpica</u>	47
3.4.1 Biomarcador candidato.....	47
3.4.1.1 <i>Factor de necrosis tumoral inductor débil de la apoptosis (TWEAK)</i>	48
3.4.1.2 <i>Proteína quimiotáctica de los monocitos tipo 1 (MCP-1)</i>	49
3.4.1.3 <i>Proteína 10 inducida por el IFN-γ (IP-10)</i>	50
3.4.1.4 <i>Molécula de adhesión celular vascular tipo 1 (VCAM-1)</i>	51
3.4.1.5 <i>Lipocalina de los neutrófilos asociada a la gelatinasa (NGAL)</i>	51
3.4.1.6 <i>Ligando inductor de la proliferación (APRIL)</i>	52
3.4.1.7 <i>Neuropilina-1 (NRP-1)</i>	53
3.4.2. Biomarcadores genéticos de la nefritis lúpica.....	53
3.4.3. Biomarcadores proteómicos de la nefritis lúpica.....	54
3.5 <u>Pronóstico</u>	56
4. Hipótesis de trabajo	59
5. Objetivos	61
6. Diseño y pacientes	63
7. Resultados	69

7.1 <u>Características demográficas basales de los pacientes</u>	69
7.2 <u>Estudio de los biomarcadores del estudio en relación a los cambios de actividad en el Lupus Eritematoso Sistémico</u>	73
7.2.1 Niveles de los biomarcadores en los diferentes grupos de pacientes con LES y controles en el estudio transversal.....	73
7.2.2 Correlación entre los biomarcadores con los parámetros utilizados de forma habitual en los pacientes con LES.....	84
7.2.2.1 <i>Correlación de los biomarcadores y los parámetros de actividad del LES utilizados en la actualidad</i>	84
7.2.2.2 <i>Correlación de los biomarcadores y los parámetros de actividad de la NL utilizados en la actualidad</i>	86
7.3 <u>Utilidad clínica de los biomarcadores objeto de estudio como marcadores de nefritis lúpica activa</u>	89
7.3.1 Estudio comparativo de la utilidad clínica de los biomarcadores como marcadores de nefritis lúpica activa.....	102
7.4 <u>Estudio de los biomarcadores del estudio durante la evolución de la nefritis lúpica</u>	107
7.4.1. Brote renal.....	108
7.4.1.1 <i>Niveles de los biomarcadores antes y durante el brote renal</i>	108
7.4.1.2 <i>Utilidad de los biomarcadores como predictores de brote renal en el LES</i>	122
7.4.1.2.1 Estudio comparativo del valor predictor de brote renal.....	129

7.4.2 Respuesta completa.....	131
7.4.2.1 <i>Estudio de la capacidad predictiva de RC de los biomarcadores en el momento del diagnóstico.....</i>	132
7.4.2.1.1 Estudio comparativo de la utilidad clínica de los biomarcadores en el momento del diagnóstico como marcadores de RC tras el tratamiento.....	138
7.4.2.2 <i>Niveles de los biomarcadores antes y durante la respuesta completa.....</i>	140
7.4.2.3 <i>Utilidad de los biomarcadores como predictores de respuesta completa en la NL.....</i>	148
7.4.2.3.1 Estudio comparativo del valor predictor de respuesta completa de los biomarcadores.....	152
7.4.3 Progresión a IRC.....	154
7.4.3.1 <i>Estudio del valor predictor a IRC de los biomarcadores.....</i>	154
7.4.3.1.1 Estudio comparativo del valor predictor a IRC de los biomarcadores.....	169
8. Discusión general.....	171
9. Conclusiones.....	185
10. Bibliografía.....	187
11. Anexo1: Criterios diagnósticos de la ACR para la clasificación de LES.....	217
12. Anexo 2: SLE Disease Activity Index 2000.....	219

**13. Anexo 3: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/
American College of Rheumatology Damage Index.....221**

Prólogo y Agradecimientos

Siendo residente de Medicina Interna en el Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona inicie los estudios de Doctorado en la *Universitat Rovira i Virgili*, que posteriormente continuaría en la *Universitat Autònoma* de Barcelona durante mi periodo de formación como investigador para especialistas médicos en la *Unitat de Malalties Sistèmiques de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron* dónde inicie mi tesis doctoral. Ahora la finalizo mientras me recuperó de una intervención quirúrgica y me doy cuenta que es mucho más duro estar enfermo que ser médico.

Al mirar atrás te das cuenta que en estos años de estudio y aprendizaje, en mi vida ha habido muchos días de sol y solo algunos días nublados, muchas cosas felices y solo algunas muy dolorosas, y creo que eso es en definitiva la vida lo que nos sucede mientras nos empeñamos en hacer alguna cosa que nos gusta. Al pensar en todo lo que vivido en estos años, lo primero que quiero hacer, y sale del fondo de mi corazón, es dar las gracias a todas las personas que han hecho conmigo este camino y me han ayudado a llegar hasta aquí:

Al profesor Miquel Vilardell, director de esta tesis, quiero agradecerle que me enseñara a amar la Medicina interna en sus clases en la facultad de Medicina, soy internista por él y aprovecho estas líneas para decírselo.

A todos los médicos de hospital Universitario del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona dónde hice mi especialidad, de los que guardo un fantástico recuerdo, quiero agradecerles que me ayudaran a ser internista. A la Dra. M^a Ángeles Ruiz quiero agradecerle su apoyo y su cariño, a la Dra. Sheyla Ruiz y al Dr. Rafael Ramírez quiero agradecerles haberme permitido crecer con ellos como personas y como médicos.

Al Dr. Josep Ordi Ros, tutor de esta tesis, quiero agradecerle qué pensara que era posible y todo lo que me ha enseñado. A su equipo de la *Unitat de Malalties Sistèmiques de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron* quiero agradecerles su ayuda, especialmente a la Dra. Fina Cortes Hernández a la que quiero dar las gracias por haberla hecho posible, sin su ayuda y su ánimo no habría podido acabarla, y que me haya enseñado una cosa muy importante el valor del tiempo.

Al Dr. Xavier Vidal, quiero agradecerle su infinita paciencia y su inestimable ayuda en el análisis estadístico.

A mi familia, tengo que agradecerles muchas cosas. A mis abuelos quiero agradecerles su cariño y que me hayan enseñado tantas cosas. A mis padres, a los que dedico esta tesis, su apoyo y amor incondicional y que me hayan dado las lecciones más importantes de la vida. A mis hermanos quiero pedirles perdón porque esta tesis, a veces, nos ha quitado mucho tiempo para estar juntos en estos últimos años. A Pedro, mi marido, quiero agradecerle su amor, que siempre

esté a mi lado cuidándome como lo hace y que haga que mi vida sea sin duda mucho mejor, y a sus padres y a su hermano quiero agradecerles su cariño y su apoyo.

Para acabar, quiero acordarme de mis pacientes y de mis médicos. Quiero agradecer a todos los pacientes que he atendido que me hayan hecho médico, y quiero tener un especial recuerdo para aquellos pacientes con LES que colaboraron de forma desinteresada en la realización de este estudio que me ha permitido hacer mi tesis. Para finalizar, quiero reconocer y agradecer a mis médicos su profesionalidad, la Dra. Olga García Conejero que a lo largo de tantos años me ha cuidado y ha estado a mi lado siempre que la he necesitado y el Dr. Jordi Roura Onaíndia que me ha enseñado que algunas enfermedades son una verdadera lección de humildad para el paciente y también para el médico pero que nunca hay que rendirse.

¡A todos, sinceramente, muchas gracias!

Abreviaturas

ACR:	American College of Rheumatology
Acs:	Anticuerpos
Acs. anti C1q:	Anticuerpos anti C1q
Acs. anti ds-DNA:	Anticuerpos anti-DNA de doble cadena
Acs. anti- DNAasa:	Anticuerpos anti-desoxirribonucleasa
Acs. anti- NET:	Anticuerpos anti- trampas extracelulares de neutrófilos
Acs. anti-RNP:	Anticuerpos anti- ribonucleoproteína
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AID:	Desaminasa Inducida por Activación
APRIL:	Ligando inductor de la proliferación
ARNm:	ARN mensajero
AUC:	Área Bajo la Curva
BILAG:	British Isles Lupus Assessment Group
C1:	Componente 1 del complemento
C2:	Componente 2 del complemento
C3:	Componente 3 del complemento
C4:	Componente 4 del complemento
CD4:	Cúmulo de diferenciación 4

CCL2:	Ligando de quimioquinas tipo 2
CH50:	Actividad total del complemento
CLIF:	Inmunofluorescencia indirecta en <i>Crithidia luciliae</i>
CXCL 10:	Proteína 10 inducida por el IFN- γ
CXCR3:	Receptor de quimioquinas
DNAsa:	Desoxirribonucleasa
ELISA:	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ERT:	Enfermedad renal terminal
eSLEDAs:	SLEDAs extrarenal
Fc γ R:	Receptores Fc γ
FCGR2A:	Receptor II de la fracción Fc de la inmunoglobulina G
Fn14:	Receptor del factor de necrosis tumoral
GWAS:	Estudios de asociación del genoma completo
HMGB1:	Proteína del grupo de alta movilidad box 1
Ics:	Inmunocomplejos
IF:	Inmunofluorescencia
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
IFN-1:	Interferón tipo 1
IFN- α :	Interferón alfa

IFN- γ :	Interferón gamma
IL-8:	Interleucina-8
IP-10:	Proteína 10 inducida por el IFN- γ
IRC:	Insuficiencia renal crónica
IRF5:	Factor regulador del interferón-5
ITGAM:	Integrina- α M
LES:	Lupus eritematoso sistémico
MALDI-TOF-SF:	<i>Solvent Free Modification of Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time Of Flight</i>
MCP-1:	Proteína quimiotáctica de los monocitos tipo 1
ME:	Microscopia electrónica
MMF:	Micofenolato mofetil
MO:	Microscopía óptica
NETs:	Trampas extracelulares de neutrófilos
NGAL:	Lipocalina de los neutrófilos asociada a la gelatinasa
NL:	Nefritis lúpica
NLA:	Nefritis lúpica activa
PD-1:	Proteína de la muerte programada tipo 1
RC:	Respuesta completa

Ratio Upro:Ucre:	Ratio proteínas/ creatinina en orina
RIA:	Radioinmunoanálisis
ROC:	Análisis de la Característica Operativa del Receptor
RP:	Respuesta parcial
rSLEDAs:	SLEDAs renal
SAP 130:	Subunidad 130 del complejo histona desacetilasa
SELDI-TOF-MS:	<i>Surface Enhanced Laser Desorption/ Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
SLEDAI-2K:	<i>SLE Disease Activity Index 2000</i>
SLICC/ACR DI:	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index</i>
STAT 4:	Transductor de señal y activador de la transcripción 4
TGF- β 1:	Factor de crecimiento transformante beta 1
TH1:	Linfocitos T helper 1
Th17:	Linfocitos T helper 17
TLR7:	Receptores toll-like tipo 7
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)
TWEAK:	Factor de necrosis tumoral inductor débil de la apoptosis

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular tipo 1

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

3.1 Nefritis lúpica

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que cursa en brotes y que puede afectar a múltiples órganos y tejidos, siendo una de sus manifestaciones más graves la afectación renal [1, 2]. La nefritis lúpica (NL) es en estos pacientes una causa importante de morbilidad y mortalidad, ya sea por la propia enfermedad o como consecuencia de la toxicidad ocasionada por el tratamiento inmunosupresor [3–10].

3.1.1 Epidemiología

La incidencia y la prevalencia del LES oscilan en las diferentes series entre 1- 5/100.000 y 20-150/100.000 habitantes, respectivamente [11], siendo su incidencia 9 veces superior en las mujeres que en los hombres y más frecuente en población no europea [12].

Los datos disponibles sobre la epidemiología de la NL son limitados, estimándose que su frecuencia oscila según las series, entre el 40 y el 75% de los pacientes con LES [13], siendo más frecuente en aquellas formas de inicio juvenil [14–19]. La NL puede aparecer en cualquier momento de la evolución del LES, aunque es más frecuente durante el año posterior al diagnóstico siendo casi siempre diagnosticada dentro de los 5 primeros años de la enfermedad [20- 21].

3.1.2 Patogénesis

La patogénesis del LES y de la NL es altamente compleja y múltiples mecanismos patogénicos han sido implicados en el inicio y progresión de la misma [22].

La etiopatogenia que induce la lesión renal en el paciente con LES no se conoce con exactitud, aunque algunos genes implicados en el LES y en la NL pueden contribuir a la patogenia de la enfermedad afectando a la inmunidad humoral y celular y a diferentes mecanismos implicados en el mantenimiento de la tolerancia a autoantígenos nucleares. Entre estos mecanismos implicados destaca el de la apoptosis aberrante [22- 24], produciéndose posteriormente una gran afluencia de leucocitos efectores, mediadores inflamatorios y autoanticuerpos hacia el tejido renal que da lugar a la formación y depósito de inmunocomplejos (Ics) y a la activación de la vía del complemento [12, 22].

3.1.2.1 Mecanismos de muerte celular y aparición de nuevos autoantígenos en LES

Se conocen varias vías que pueden conducir a la muerte celular en los pacientes con LES siendo la apoptosis el mecanismo principal.

Apoptosis aberrante

En condiciones normales la rápida eliminación de las células apoptóticas previene la aparición de alteraciones en la inmunidad,

existiendo varios estudios que sugieren que la acumulación de restos apoptóticos en la NL tiene un papel importante en la aparición de la autoinmunidad en el LES [22, 24-25]. Estos pacientes presentan diferentes alteraciones de los mecanismos de la apoptosis que afectan a la eliminación de los cuerpos apoptóticos, a la liberación de los nucleosomas, y a la fragmentación de la cromatina dando lugar a la acumulación y exposición de fragmentos de cromatina inmunogénicos [26- 28].

NETosis

Existe otro mecanismo de muerte celular implicado en la NL, la NETosis que ocurre principalmente en los neutrófilos, y es inducido hasta en 2/3 de estos pacientes por los Acs. anti-RNP [29]. Este proceso requiere la participación de los receptores Fcγ (FcγR) y de los toll-like tipo 7 (TLR7) [29] y da lugar a la liberación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), siendo estas más frecuentes en los pacientes con LES que en los controles sanos, y asociándose su presencia en estos pacientes a enfermedad renal [30]. Las NETs están formadas por una red de DNA e histonas, así como por el contenido de los gránulos citoplasmáticos y otros mediadores claves como la proteína del grupo de alta movilidad box1 (HMGB1) [30]. La HMGB1 es una proteína estructural cromosómica que puede actuar como mediador inflamatorio in vitro [31] creyéndose que su presencia en los inmunocomplejos es necesaria para que se activen las células dendríticas y la

producción de IFN- α a través de los receptores toll-like tipo 9 [32]. La presencia de Acs. anti-DNAasa 1 o Acs. anti- NET en estos pacientes [32], se ha asociado a alteraciones en la eliminación de las NETs [33].

3.1.2.2 Proliferación de linfocitos anómalos y activación de la vía del interferón.

Los mecanismos anteriormente expuestos producen en estos pacientes un aumento de la exposición antigénica que originará la activación de la respuesta inmunológica. Las NETs tienen un importante papel en el sistema inmune, conociéndose cada vez mejor, como fuente de antígenos nucleares y como origen de la respuesta inmunológica que producirá: la liberación de interleuquinas (1 β , 6, 10) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la expresión de proteínas coestimuladoras en macrófagos y células dendríticas [31, 34], la liberación de IFN-1 y la presentación de los péptidos derivados de la cromatina a los linfocitos T CD4 que interaccionan con el DNA y los linfocitos B, produciéndose la transformación de estos últimos en células plasmáticas que generaran una gran cantidad de anticuerpos mediante la activación de los receptores toll-like tipo 2 [31, 34].

3.1.2.3 Papel de los autoanticuerpos en la NL

Los pacientes con NL tienen, frecuentemente, niveles altos de diferentes autoanticuerpos que reaccionan de forma específica con diferentes antígenos, entre los que destacan: ácidos nucleicos (antinucleares, anti-dsDNA), proteínas nucleares (anti nucleoproteínas) [31, 35], proteínas citoplasmáticas (anti alfa actinina) [36] y antígenos extracelulares (anti C1q) [34,37]. Estos Acs. tienen un papel muy importante en la patogénesis de la NL, dependiendo del tipo de Ac. implicado su capacidad de formar Ics. y también su lugar de depósito [38]. La manera en la que estos Acs. ejercen su actividad nefritogénica es todavía controvertida, postulándose en la actualidad dos teorías para explicar este mecanismo: la extrarrenal y la renal [23].

1. La teoría extrarrenal defiende que el daño tisular es mediado por inmunocomplejos producidos por la unión y el depósito de los Acs. anticromatina a su ligando a nivel renal. De entre todos los anticuerpos presentes en la NL, unos destacan en especial los llamados Acs. anti-dsDNA, su descubrimiento en 1957 tuvo un gran impacto en la comprensión del origen y la regulación de la autoinmunidad y del proceso inflamatorio inducido por esta [26]. Posteriormente, se descubrió que estos anticuerpos son específicos de LES y que pueden ser detectados hasta 1 año antes del diagnóstico de la enfermedad [39], pudiendo reflejar sus niveles séricos la presencia y la severidad de la afectación renal en estos

pacientes [40- 43].

Los Acs. antiDNA de cadena única o doble forman parte del conjunto de anticuerpos naturales normales presentes en el sujeto sano siendo estos predominantemente del tipo Ig. M y de baja afinidad, reaccionando débilmente con los autoantígenos [43]. Estos anticuerpos en los pacientes con LES presentan un cambio de clase del tipo Ig. M a Ig. G y mutaciones somáticas en la región variable de la Ig., siendo ambos procesos antígeno-dependiente y catalizados por la Desaminasa Inducida por Activación (AID) habiéndose demostrado la importancia de este enzima en la generación de anticuerpos del tipo Ig.G anti-dsDNA de alta afinidad y el posterior desarrollo de nefritis lúpica [43- 47].

Existen evidencias que los anticuerpos anti-dsDNA tienen un papel importante en la patogenia de la enfermedad renal en los pacientes con LES, habiéndose aislado en el glomérulo de pacientes con NL activa y relacionándose su depósito en diferentes localizaciones del glomérulo con los diferentes tipos de afectación histopatológica que presentan estos pacientes [48].

El mecanismo exacto por el cual estos anticuerpos se depositan en el parénquima renal ocasionando su lesión no es del todo conocido, no existiendo evidencias directas que la presencia de reactividad cruzada entre los Acs. anti-dsDNA y los antígenos intrínsecos renales tenga un papel

importante en la NL [27, 49]. La patogenicidad de estos anticuerpos se ha relacionado con la disponibilidad de fragmentos de cromatina en el glomérulo de estos pacientes [27], sugiriendo algunos estudios realizados en modelos murinos que son los responsables del depósito de la cromatina en el riñón puesto que este no se objetiva sin la presencia de estos anticuerpos [50- 51].

2. La teoría renal se basa en la presencia de reactividad cruzada de los anticuerpos de estos pacientes contra estructuras intrínsecas renales presentes en la matriz mesangial, en la membrana glomerular u otros antígenos liberados por las células como por ejemplo los Acs. anti-Cq1 [37, 52]. La opsonina C1Q se ha relacionado con LES y está implicada en la eliminación de las NETs [53, 54], presentando los pacientes con LES de forma frecuente Acs. anti-C1Q que pueden originar una deficiencia funcional de C1Q y un empeoramiento de la eliminación de las células apoptóticas [55] y de la activación de la vía clásica del complemento [37,52].

Asimismo, en varios estudios realizados en modelos murinos se observó reactividad cruzada de algún tipo de anticuerpo anti-DNA con la alfa-actinina, una de cuyas funciones principales es la de ayudar al mantenimiento del filtrado glomerular, habiéndose

objetivado en estos pacientes un aumento de su expresión [35, 52].

3.1.2.4 Activación de los receptores toll-like e inhibición de la expresión de la DNAsa

Todo lo anteriormente enumerado da lugar a la formación de Ics. que en las fases iniciales de la NL se depositan en la matriz mesangial [56], produciéndose durante la progresión de la enfermedad un aumento de la expresión de los receptores toll-like 7 y 9 y una inhibición de la expresión de la DNAsa tipo 1 en las células glomerulares y tubulares [57].

La DNAsa tipo 1 es la principal endonucleasa renal cuya inhibición da lugar a una disminución de la fragmentación de la cromatina durante el proceso de apoptosis y de la degradación y eliminación de las NETs [22] produciéndose un acúmulo de restos apoptóticos que contienen la subunidad 130 del complejo histona desacetilasa (SAP 130) [58- 59]. El SAP 130 es el ligando del receptor inflamatorio Clec 4, su estimulación produce la secreción de citoquinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de las metaloproteinasas implicadas en la destrucción de las estructuras membranosas [58- 60], produciéndose el depósito de los Ics. en la matriz mesangial y en la membrana glomerular y la activación de los receptores Fcγ (FcγR) y del complemento [12], teniendo todo ello un importante papel patogénico en la nefritis lúpica [27, 33, 61].

3.1.2.5 Sistema del complemento

El sistema del complemento es un conjunto de proteínas plasmáticas y de membrana, que forman parte de la inmunidad innata, se activa a modo de cascada enzimática a través de tres vías (la clásica, la alternativa y de la lectina) y está implicado en la opsonización de los inmunocomplejos [62- 63] y en la eliminación de células apoptóticas [22]. La deficiencia en los componentes iniciales del complemento, también se ha asociado con el desarrollo del LES probablemente debido a la disminución de la capacidad del sistema inmune para eliminar los inmunocomplejos [9, 31, 62], habiéndose implicado la vía clásica en las fases iniciales de la patogénesis de la NL [54, 60], y las vías alternativa y de la lectina en la progresión del daño glomerular [63].

3.1.2.6 Reclutamiento y activación de leucocitos autoreactivos

El reconocimiento de la región Fc de los inmunocomplejos por los receptores (FcγR) de las células B produce su endocitosis [64]. El contenido de los endosomas es reconocido por los receptores toll like tipo 7 y 9, produciéndose la estimulación de las células dendríticas, la pérdida de la tolerancia periférica de las células B, la activación de células B autoreactivas y de la respuesta inmunológica mediada por células T [64] y la diferenciación de las células T reguladoras en Th17 [65], relacionándose estas con la

severidad de la enfermedad, dando lugar a una amplificación de los mecanismos patogénicos de la NL [64, 66].

3.1.2.7 Alteraciones en la reparación renal que conducen a la IRC.

La inflamación persistente en la NL causa una alteración en la regulación de los procesos de reparación que incluye la activación de las células mesangiales y la transformación epitelio-mesenquimal produciéndose una infiltración por mediadores celulares, un aumento de las quimioquinas profibróticas y de citoquinas y factores de crecimiento que originan una sobreexpresión de las proteínas de la matriz y su posterior depósito, causando todo ello glomeruloesclerosis [67] pudiendo predecir mejor el pronóstico renal a largo plazo los cambios a nivel túbulo-intersticial [68]. En la NL activa (NLA) se produce un aumento de la expresión glomerular de fibronectina, que es una glicoproteína esencial para la homeostasis, proliferación, adherencia, migración y diferenciación de las células renales ayudando junto con otras proteínas de la matriz al mantenimiento de la integridad estructural del capilar glomerular [69-71], habiéndose observado que el depósito de fibronectina G en el LES se asocia al de las inmunoglobulinas (Igs) sugiriendo una asociación entre el depósito de Acs. y la acumulación de proteínas en la matriz [69]. Se ha demostrado que los Acs. anti-dsDNA nefritogénicos aumentan la

expresión génica y proteica de los mediadores inflamatorios y fibróticos en las células renales ejerciendo un efecto directo sobre la inflamación y la fibrosis renal en la NL [72], produciendo en las células mesangiales un aumento de la síntesis de fibronectina y su depósito en el medio extracelular [69], y del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) [73] cuyo papel en la fibrosis renal ha sido bien establecido [74- 75].

3.2 Biomarcadores

3.2.1 Definición

Un biomarcador (abreviatura de marcador biológico) es una característica biológica, genética o bioquímica que puede ser medida cualitativa y/o cuantitativamente en el laboratorio [76- 82] y cuyos niveles se correlacionan con un hecho biológico (fisiológico o patológico) [79]. Un biomarcador para ser considerado bueno debe reunir una serie de características como: ser biológicamente activo y relevante desde un punto de vista fisiopatológico, ser de uso sencillo en la práctica clínica y medir de una forma sensible y precisa los cambios en la actividad de la enfermedad [76- 78].

3.2.2 Desarrollo de biomarcadores en la NL

Inicialmente, las investigaciones se centraron en la patogénesis de la NL con el objetivo de encontrar biomarcadores genéticos o bioquímicos de

NL que pudieran tener un significado translacional y reflejar mejor la actividad de la enfermedad recibiendo este método el nombre de biomarcador candidato. Posteriormente, la introducción de las nuevas técnicas, como la genómica y la proteómica, cambiaron el concepto del descubrimiento de biomarcadores, ayudando a la identificación de moléculas bioquímicas y factores genéticos como biomarcadores de LN [79].

3.3 Diagnóstico

3.3.1 Presentación clínica

Las manifestaciones clínicas de la NL pueden oscilar desde formas asintomáticas hasta formas clínicas con hipertensión arterial (HTA), insuficiencia renal y síndrome nefrótico, siendo esta última, la manifestación clínica predominante [80]. Su diagnóstico requiere que el equipo médico que atiende a estos pacientes tenga un alto nivel de sospecha clínica en aquellos pacientes con LES que presenten un empeoramiento de la función renal [81] precisando estos pacientes la realización de controles analíticos periódicos que permitan hacer un diagnóstico precoz de la NL.

3.3.2 Biomarcadores analíticos utilizados de forma habitual para valorar la actividad de la enfermedad

En la práctica clínica diaria se utilizan para el diagnóstico y seguimiento

de los pacientes con LES diferentes determinaciones analíticas, urinarias y séricas, presentando todas ellas una sensibilidad baja para el diagnóstico de la NL y poca utilidad para diferenciar la presencia de actividad y cronicidad [82- 84].

3.3.2.1 Orina

El análisis de la orina sigue siendo la prueba más simple y fiable para realizar el diagnóstico y seguimiento de la NL, siendo los parámetros más utilizados la cuantificación de la proteínas y el sedimento urinario.

3.3.2.1.1 Proteínas

La NL se caracteriza por la presencia de proteinuria (proteínas en orina >0.5 g/24h), siendo en la actualidad el principal biomarcador urinario utilizándose como screening de la enfermedad [85- 86]. La determinación de las proteínas urinarias forma parte de diferentes escalas utilizadas para medir la actividad de la enfermedad renal en estos pacientes, entre las que destaca el SLEDAI-2K y el BILAG [87- 88]. No existe un acuerdo sobre cuál es el método más adecuado para determinar las proteínas en orina en estos pacientes, utilizándose varios, como: la tira reactiva, el ratio proteínas/creatinina (ratio Upro: Ucre), y la proteinuria en orina de 24 horas [89]. El método más utilizado es la tira reactiva, aunque se considera inadecuado para la valoración de la proteinuria, considerándose la determinación de la

proteinuria en orina de 24 horas el “Gold standard” [90- 91]. En los últimos años y puesto que la determinación de las proteínas en orina de 24 horas, frecuentemente, no es una herramienta práctica en la clínica diaria se ha ido sustituyendo por la determinación del ratio Upro: Ucre. El ratio Upro: Ucre ha demostrado en otras enfermedades como la nefropatía diabética una buena correlación con las proteínas en orina de 24 horas [92- 93] siendo en la actualidad recomendado por la Asociación Americana de Diabetes [94- 96] y la Fundación Nacional Americana Renal para el seguimiento de la enfermedad renal [95, 97- 98]. En la actualidad se desconoce todavía si es un método eficaz para ser utilizado como screening para la determinación de proteinuria en los pacientes con LES [95, 97- 98]. Recientemente, se ha publicado un estudio que cuestiona el uso del ratio Upro: Ucre al demostrar que el estado de concentración de orina influye en la precisión de este ratio, debiéndose interpretar los resultados obtenidos en estas muestras con precaución ya pueden conducir a un diagnóstico erróneo o a un estadiaje incorrecto de la enfermedad renal [99].

3.3.2.1.2 Sedimento urinario

El Colegio Americano de Reumatología (ACR) recomienda el uso del sedimento urinario para valorar la respuesta al tratamiento en la NL. De esta manera, la mejoría ha sido definida como el cambio de sedimento activo (presencia de hematíes o leucocitos en número >5/ campo y/o la presencia de cilindros celulares que no existían previamente y que no puedan ser atribuidos a otra etiología) a inactivo (número de leucocitos o hematíes \leq 5/ campo y ausencia de cilindros) [100].

Uno de los principales problemas de utilizar el sedimento urinario es que el número de células o de cilindros del sedimento puede estar influenciado por el tiempo y la intensidad del centrifugado de la muestra durante su procesado, por lo cual es de vital importancia que las muestras sean procesadas siempre siguiendo un mismo método, debiéndose descartar también la presencia de falsos positivos secundarios a infecciones urinarias o vaginales [101].

3.3.2.2 Sangre

Para el diagnóstico y seguimiento de la NL se utilizan diferentes determinaciones analíticas entre las que destacamos aquellas que nos ayudan a estimar el filtrado glomerular como la tasa de

Filtración Glomerular estimada (TFGe), la creatinina, y los niveles de Acs.(anti ds-DNA y anti C1q) y de complemento.

3.3.2.2.1 TFGe y creatinina sérica.

La TFGe es en la actualidad el índice más utilizado para la valoración de la función renal y es un indicador de la capacidad de filtración renal [102- 103]. La fórmula más utilizada para su estimación es la de Cockcroft-Gault la cual incluye los valores de creatinina sérica, la edad, el sexo, la raza y peso.

La creatinina es producida por los músculos a partir del fosfato de creatina, siendo eliminada por el riñón mediante la filtración glomerular y la secreción proximal tubular. Su determinación sérica es utilizada como indicador de la función renal y como marcador endógeno de la estimación de la tasa de filtrado glomerular [104].

Aunque los niveles de creatinina y el valor de la TFGe representan la piedra angular de la evaluación de la función renal y de su deterioro, varios factores pueden influir en los valores de creatinina como la edad, la dieta, el sexo, y la masa corporal, limitando también a su vez las medidas que derivan de ella [105].

3.3.2.2.2 Anticuerpos anti ds-DNA

Los Acs. Anti ds-DNA son uno de los Acs. mejor estudiados, existiendo diferentes técnicas para su determinación como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en Crithidia luciliae (CLIF), radioinmunoanálisis (RIA) mediante el método Farr y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) [40]. Estos Acs. han demostrado tener un gran significado en la patogénesis, el diagnóstico y la monitorización de la actividad clínica en el LES, siendo uno de sus criterios clasificatorios [106].

Dependiendo del método utilizado para su determinación, del 40 al 85% de los pacientes con LES presentarán Acs. anti ds-DNA durante algún momento de la evolución de la enfermedad [40,107- 111]. Estos Acs. han mostrado en el LES una elevada especificidad [112- 113] asociada a una baja sensibilidad [40] pudiendo detectarse hasta más de un año antes del inicio de la enfermedad [39, 114].

Existen discrepancias en la literatura sobre el valor predictivo de las variaciones en los valores de los Acs. anti ds-DNA en relación a la aparición de brotes en los enfermos con LES, no habiéndose demostrado ninguna relación entre los cambios en los valores de Acs. anti ds-DNA y la actividad de la enfermedad en algunos estudios [108, 115] que si ha sido podido ser demostrado en otros [109- 110, 116- 118], considerándose la prueba más sensible para la predicción

de brotes la determinación de estos Acs. mediante el método Farr [109].

Algunos estudios han demostrado que la afectación renal en estos pacientes se asocia con niveles altos de Acs. anti ds-DNA [119- 123], habiéndose objetivado también una disminución de sus niveles tras el inicio del tratamiento [124]. Diferentes estudios han mostrado la correlación de estos Acs. con la presencia de nefritis [122- 131], el índice de actividad en la biopsia [108], y la progresión a enfermedad renal terminal [132- 133], considerándose predictores independientes para diferenciar entre NL proliferativa y no proliferativa [134].

3.3.2.2.3 Anticuerpos anti C1q

Los niveles bajos de C1q en los pacientes con LES se han asociado tradicionalmente con la presencia de autoanticuerpos contra C1q [135- 137] detectándose estos hasta en el 20-50 % de pacientes con LES y hasta en el 100 % de pacientes con NL proliferativa activa [138- 139] presentando por este motivo un alto valor predictivo negativo para la el diagnóstico de NL severa, habiéndose encontrado una asociación significativa con la actividad de enfermedad en los pacientes con LES y en particular con aquellos

pacientes que presentan afectación renal [140- 144] pudiendo ser utilizado como marcador de NL activa.

Existen pocos estudios que valoren el papel de los Acs. anti-C1q durante la evolución de la NL, siendo sus resultados contradictorios [145- 147]. Un estudio realizado recientemente mostró que estos pacientes presentan una correlación negativa entre los niveles de Acs. anti-C1q y los niveles de los componentes 3 (C3) y 4 (C4) del complemento y la actividad total de este (CH50), siendo positiva con el ratio Upro: Ucre, los Acs. anti-dsDNA y los índices de actividad de enfermedad durante el seguimiento de la enfermedad. Esta correlación fue mayor en aquellos pacientes con afectación renal y NL activa lo cual parece indicar que es un biomarcador de actividad en los pacientes con LES no siendo exclusivo de aquellos que presentan afectación renal [145]. Varios estudios han demostrado que la aparición de un brote renal en los pacientes con LES pueden asociarse con títulos crecientes de Acs. anti-C1q durante los seis meses previos a este sugiriendo que podría ser utilizado como marcador predictor de brote renal [146- 148].

3.3.2.2.4 Niveles de complemento sérico

El déficit hereditario de componentes 1 (C1), 2 (C2) y 4 (C4) del complemento se ha asociado con el desarrollo de LES

[62]. Algunos estudios ha mostrado una correlación inversa entre los niveles séricos de C3 y C4 y la actividad clínica del LES [79, 148], utilizándose en la actualidad la determinación de estos niveles para valorar la actividad de la enfermedad en los pacientes con LES [148], aunque han demostrado una baja utilidad clínica para predecir o identificar un brote renal [149].

En abril de 2009, la Liga Europea Contra El Reumatismo (EULAR) definió el brote renal en el LES, en un documento de consenso, en relación a los resultados obtenidos en las analíticas de sangre y orina en estos pacientes, como: un aumento de la proteinuria o de la creatinina acompañado de un sedimento urinario anormal o una reducción del clearance de creatinina secundario a la actividad de la enfermedad. A su vez, se clasificaron los brotes en: proteinúricos y nefríticos. El brote proteinúrico es definido como un aumento persistente de la proteinuria ($>0,5-1.0$ g/día) después de la respuesta completa (RC) (sedimento urinario inactivo, proteinuria ≤ 0.2 g/día y TFGe normal o estable definiéndose como un deterioro de la TFGe basal $<10\%$ si este era previamente anormal) o como una duplicación de los valores de proteinuria (>1 g/día) después de la respuesta parcial (RP) (sedimento urinario inactivo, proteinuria ≤ 0.5 g/día y TFGe normal o estable definiéndose este como un deterioro de la TFGe basal $<10\%$ si era previamente anormal). El

brote nefrítico se define como un aumento o empeoramiento del sedimento urinario con o sin proteinuria que normalmente se asocia con un empeoramiento de la función renal [150].

3.2.2.3 Biopsia renal.

Los pacientes con nefritis lúpica pueden presentar en la biopsia renal un amplio espectro de lesiones glomerulares, vasculares y túbulo-intersticiales. La actual clasificación histológica de la nefritis lúpica fue realizada en 2003 por la Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad de Patología Renal, siendo una modificación de las anteriores, dividiéndose la nefritis lúpica en 6 clases [151]:

- **Clase I o nefritis lúpica mesangial a cambios mínimos:** se observan depósitos mesangiales, únicamente, por inmunofluorescencia (IF).
- **Clase II o nefritis lúpica mesangial proliferativa:** muestra una hipercelularidad o expansión mesangial en la microscopia óptica (MO) con depósitos inmunomesangiales, pudiendo existir depósitos subepiteliales o subendoteliales visibles por IF o por microscopia electrónica (ME) no por MO.
- **Clase III o nefritis focal:** muestra una lesión focal que puede ser activa o inactiva, segmentaria o global (afecta a <50% o >50% de glomérulo, respectivamente), endo o extracapilar, que afecta a <50% de los glomérulos, con depósitos inmunes

subendoteliales y depósitos y alteraciones mesangiales. Se debe indicar la proporción de glomérulos con lesiones activas y con lesiones esclerosantes, y se subdivide en tres tipos:

- **Tipo III (A):** Lesiones activas: **nefropatía lúpica proliferativa focal.**
 - **Tipo III (A/C):** Lesiones activas y crónicas: **nefropatía lúpica proliferativa y esclerosante focal.**
 - **Tipo III (C):** Lesiones crónicas inactivas con cicatrices glomerulares: **nefropatía lúpica esclerosante focal.**
- **Clase IV o nefritis lúpica difusa:** muestra una glomerulonefritis difusa, activa o inactiva, segmentaria o global, endo o extracapilar, que afecta a >50% de los glomérulos, con depósitos inmunes subendoteliales y alteraciones mesangiales. Se subdivide en **NL segmentaria difusa (IV-S)** cuando $\geq 50\%$ de los glomérulos presentan lesiones segmentarias y **NL global difusa (IV-G)** cuando $\geq 50\%$ de los glomérulos presentan lesiones globales, además de la proporción de glomérulos con lesiones activas y con lesiones esclerosantes, se debe indicar el grado de atrofia tubular (ligero, moderado, severo), el de fibrosis o inflamación intersticial, y la severidad de la arterioesclerosis o de otras lesiones vasculares distinguiéndose los siguientes tipos:
- **Tipo IV-S (A):** Lesiones activas: **nefropatía lúpica proliferativa segmentaria difusa**

- **Tipo IV-G (A):** Lesiones activas: **nefropatía lúpica proliferativa global difusa**
 - **Tipo IV-S (A/C):** Lesiones activas y crónicas: **nefropatía lúpica proliferativa y esclerosante segmentaria difusa.**
 - **Tipo IV-G (A/C):** Lesiones activas y crónicas: **nefropatía lúpica proliferativa y esclerosante global difusa.**
 - **Tipo IV-S (C):** Lesiones crónicas inactivas con cicatrices: **NL esclerosante segmentaria difusa.**
 - **Tipo IV-G (C):** Lesiones crónicas inactivas con cicatrices: **NL esclerosante global difusa.**
- **Clase V o nefritis lúpica membranosa:** muestra depósitos inmunes subepiteliales que pueden ser globales o segmentarios o sus secuelas morfológicas por MO, IF o ME con o sin alteraciones mesangiales relevantes. Este tipo puede coexistir en combinación con los tipos III o IV.
 - **Clase VI o nefropatía lúpica esclerosante,** >90% de los glomérulos están esclerosados y sin actividad residual.

El índice de actividad, oscila entre 0 y 24 puntos, y valora a nivel glomerular: la proliferación celular, la necrosis fibrinoide-cariorexis, los trombos hialinos, las semilunas celulares, la infiltración por leucocitos y a nivel túbulo-intersticial: la infiltración por mononucleares. El índice de cronicidad, oscila entre 0 y 12 puntos,

valorando la presencia de glomérulos esclerosados, semilunas fibrosas, atrofia tubular y fibrosis intersticial. Las lesiones individuales se puntúan de 0 a 3 según estén ausentes, o sean leves, moderadas o graves, la presencia necrosis-cariorexis y de semilunas celulares se puntúa con 2 puntos cada una de ellas.

3.3.4 Escalas de valoración del LES

En la actualidad existen varias escalas para medir la actividad y la cronicidad en el LES que son utilizadas en la práctica clínica, para evaluar los resultados de los ensayos clínicos y para la realización de estudios de pronóstico, entre las que destacamos:

3.3.4.1 SLEDAI.

El SLEDAI se desarrolló en 1985 en una conferencia de estudio de pronóstico del LES, realizándose posteriormente varias modificaciones del mismo. En el año 2000 se realizó una modificación siendo conocida como SLEDAI-2K (SLE Disease Activity Index 2000 update), comprende 24 ítems que recogen manifestaciones específicas en 9 órganos o sistemas, oscilando el rango de resultados entre 0 y 105 (anexo 1) [87]. La utilización de este índice ha permitido definir la actividad renal en estos pacientes en relación a la puntuación de este índice que valora la afectación

renal, siendo conocido como el SLEDAI renal (rSLEDAIs) cuyo rango oscila entre 0 y 16.

3.3.4.2 Índice de lesión del Lupus Eritematoso Sistémico.

El índice de lesión del LES elaborado por el grupo SLICC/ACR (*Sistémica Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology*) conocido como SLICC/ACR DI pretende establecer el grado de lesión orgánica irreversible derivado de la actividad, las complicaciones y el tratamiento de la enfermedad (anexo 2). Este índice valora 42 ítems que miden la afectación de 12 dominios con una puntuación que oscila entre 0 y 46, cada ítem es evaluado como presente o ausente con la posibilidad de puntuar 2 o 3 puntos adicionales en caso de eventos recurrentes.

El daño acumulado a nivel renal puede ser estimado mediante los valores SLICC/ACR DI relacionados con el riñón, es conocido como rSDI y sus valores oscilan entre 0 y 47) [152].

3.4 Nuevos biomarcadores utilizados para valorar la NL

Como ya hemos comentado anteriormente en los últimos años la mejora del conocimiento de la patogénesis de la NL y la utilización de nuevas técnicas en la búsqueda de biomarcadores urinarios han dado lugar al descubrimiento de nuevos marcadores. Según el método utilizado para su descubrimiento distinguimos los siguientes:

3.4.1 Biomarcador candidato

Diferentes mediadores moleculares son responsables de la inflamación renal y han sido implicados en la patogénesis de la NL [153], por ejemplo: citoquinas, quimiocinas, complemento, diferentes autoanticuerpos y moléculas de adherencia. El avance en conocimiento de las citoquinas ha originado el descubrimiento de varios potenciales biomarcadores, correlacionándose varios de ellos de forma positiva con la actividad de la NL. A continuación enumeramos aquellos que han sido más estudiados:

3.4.1.1 El factor de necrosis tumoral inductor débil de la apoptosis (TWEAK)

El TWEAK es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), secretado principalmente por los monocitos activados y los macrófagos que actúa a través de su receptor (Fn14) [79]. Este receptor está presente en diferentes tipos de células renales como: los podocitos, las células tubulares y las células mesangiales. La interacción TWEAK-Fn 14 estimula la producción de varias citoquinas proinflamatorias como son: la MCP-1 y la IP-10 [79]. Estas citoquinas estimulan la proliferación y supervivencia de los leucocitos manteniendo un medio proinflamatorio [154], e induciendo la apoptosis de monocitos y macrófagos y liberación de cuerpos apoptóticos que es uno de los mecanismos implicados en la patogénesis de la NL [155]. Se ha demostrado en modelos murinos que la interacción TWEAK- Fn14 es importante para el desarrollo de LN, presentando una nefritis mucho menos severa aquellos modelos deficientes en Fn14 [156,157]. En varios estudios realizados en pacientes

con NL se observó una elevación de los niveles urinarios de TWEAK en aquellos pacientes afectados por una NL activa en comparación con aquellos que presentaban una enfermedad renal estable, no existiendo correlación entre los niveles urinarios y séricos de TWEAK lo cual indica el origen renal del TWEAK urinario en estos pacientes [158–160]. Los niveles de TWEAK aumentan entre 4 y 5 meses antes del brote renal, manteniéndose sus niveles elevados durante un período similar tras el brote [160]. Los niveles urinarios de TWEAK demostraron ser mejores para el diagnóstico de afectación renal en pacientes con LES que los marcadores convencionales de actividad de la enfermedad (C3, C4 y Acs. anti-ds DNA), mediante el análisis de la Característica Operativa del Receptor (ROC) se determinaron las respectivas áreas bajo la curva (AUC) 0,72, 0,58, 0,63 y 0,6, con una sensibilidad del 50% y una especificidad del 90% para establecer el diagnóstico de NL [158–160].

3.4.1.2. Proteína quimiotáctica de los monocitos tipo 1 (MCP-1).

La proteína quimiotáctica de los monocitos tipo 1 (MCP-1) también conocida como ligando de quimioquinas tipo 2 (CCL2) es una proteína quimiotáctica responsable de la infiltración leucocitaria a nivel renal aunque no es específica de la NL ya que se ha encontrado elevada en otras glomerulonefritis [161]. Se ha demostrado su implicación en la patogenia de la NL en varios estudios realizados en animales mediante la utilización de sus antagonistas ya que estos mejoran la iniciación y progresión de la LN [162].

La determinación de la MCP-1 urinaria en diferentes estudios realizados en pacientes con LN así como el estudio de su RNA mensajero (RNAm) en el sedimento urinario mostró una buena correlación con la actividad de la enfermedad [163], objetivándose que sus niveles aumentan entre los 2 y 4 meses previos al brote de NL y permanecen altos durante el mismo [164] pudiendo diferenciar aquellos pacientes con nefritis proliferativa (clases III y IV) [165], y que disminuyen con el tratamiento [166- 167], no habiéndose podido demostrar en otros estudios que sea un biomarcador de actividad de NL [168].

3.4.1.3 Proteína 10 inducida por el IFN- γ (IP-10).

La IP-10 también conocida como CXCL 10 es secretada por monocitos y células endoteliales en respuesta a la estimulación por el interferón gamma (IFN- γ), actuando mediante su interacción con el receptor de quimioquinas (CXCR3) que se encuentra principalmente en los linfocitos T *helper* 1 (TH1) y es responsable de la infiltración del órgano inflamado por células T [79].

Un estudio realizado en pacientes con LN mostró un aumento de los niveles urinarios y séricos de IP-10 en aquellos pacientes afectados por una enfermedad activa respecto a aquellos con una enfermedad inactiva, permitiendo los niveles urinarios distinguir entre enfermedad renal y extrarenal activa, objetivándose una disminución de sus niveles tras el tratamiento de la NL [169]. Otro estudio realizado en una cohorte de pacientes con NL durante 6 meses analizó la expresión urinaria de su

RNAm encontrando una correlación con la actividad de la enfermedad, permitiendo diferenciar los pacientes con NL del tipo IV del resto [170]. Así mismo, se estudiaron los linfocitos T CD4 (*cluster of quadruple differentiation*) CXCR3 positivo en la orina de pacientes con LN, identificándose como biomarcador de NL proliferativa, considerándose que cifras mayores de 800 linfocitos T CD4 en 100 mL de orina eran específicas para nefritis [171, 172].

3.4.1.4 Molécula de adhesión celular vascular tipo 1 (VCAM-1).

La molécula de adhesión celular vascular tipo 1 (VCAM-1) tiene un papel importante en el mantenimiento de los linfocitos en el tejido renal inflamado. La determinación de sus niveles, séricos y urinarios, en los pacientes con NL mostró una buena correlación con la presencia de NL activa, correlacionando sus niveles urinarios con la presencia de NL proliferativa [168, 173] y el índice de actividad de la enfermedad [174]. Otro estudio realizado en pacientes con NL encontró niveles urinarios más elevados en aquellos que se encontraban afectados por NL tipo III, IV o V [175, 176].

3.4.1.5 Lipocalina de los neutrófilos asociada a la gelatinasa (NGAL).

La NGAL es una proteína de 25 KDa que se expresa en muchos tipos de células como los neutrófilos y células epiteliales tubulares renales. Se ha identificado como marcador de lesión renal aguda asociado al

tratamiento de quimioterapia, a la realización de trasplantes y a la cirugía cardíaca [177, 178]. El tratamiento con anticuerpos nefritogénicos en un modelo animal de NL mostró un aumento in vitro de la de NGAL a nivel renal [72].

En pacientes con LES, adultos y niños, es un predictor significativo de actividad y de brote renal [179-184], mientras que en pacientes con nefritis lúpica también es predictor de progresión de la enfermedad [185-187].

Los niveles urinarios de NGAL en los pacientes con NL son específicos de actividad renal [183] habiéndose observado un aumento de los mismos en los 3 a 6 meses previos al brote, siendo su capacidad predictiva superior a la de los Acs. anti-dsDNA [182]. Los pacientes afectados por una LN proliferativa presentan niveles más elevados de NGAL que aquellos afectados por una LN membranosa, correlacionando sus niveles con la presencia de signos de cronicidad [188- 189].

Además, la NGAL parece estar implicada también en la renoprotección puesto que está implicada en el desarrollo y desdiferenciación del epitelio tubular tras la isquemia-reperfusión pudiendo predecir la recuperación del injerto, habiéndose demostrado que su administración en animales atenúa el daño renal [190-191].

3.4.1.6 Ligando inductor de la proliferación (APRIL).

El APRIL se encuentra en el plasma y en las membranas de monocitos, macrófagos y células dendríticas [192-194] y está implicado en la

inducción y el mantenimiento de la respuesta de la células T y B [195]. Algunos estudios realizados en pacientes con LES objetivaron un aumento de sus niveles séricos [196- 198] mientras que en otros estudios no se encontraron diferencias [199]. Los niveles séricos de APRIL en los pacientes con LES fueron específicos de afectación renal, objetivándose una disminución de sus valores tras el tratamiento pudiendo ser utilizado como marcador pronóstico de NL severa [200].

3.4.1.7 *Neuropilina-1 (NRP-1).*

La NRP-1 es un receptor de transmembrana que se une al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que participa en la regulación del sistema inmune y es un potente mediador de la angiogénesis, la proliferación celular y la remodelación renal [201- 202]. Su papel en la nefropatía lúpica no está aclarado, aunque estudios preliminares apuntan a un posible efecto protector y/o reparador de la NRP-1 a nivel renal relacionado con su interacción con el VEGF [203].

3.4.2 Biomarcadores genéticos en la LN

Varios loci de susceptibilidad genética de NL han sido identificados en humanos mediante estudios de asociación del genoma completo (GWAS) [204]. Existen dos grupos de genes asociados con la LN: aquellos genes llamados de susceptibilidad para la LN que predisponen al desarrollo de LN en cualquier paciente con LES, y aquellos genes que amplifican la respuesta

inmune en la NL. Ninguno de ellos puede utilizarse como biomarcador de actividad de la enfermedad ya que su presencia es constante y no se ve afectada por el tratamiento, siendo útiles para identificar la probabilidad y el pronóstico de la LN [79].

Recientes avances en la tecnología de genotipado de campo han hecho posible el estudio de diferentes polimorfismos genéticos objetivándose una fuerte evidencia de asociación entre varios polimorfismos y el aumento de la susceptibilidad y de la gravedad en la LN, como por ejemplo: en el complejo mayor histocompatibilidad (CMH) del tipo II (HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1), el TNF, el C2 y C4, el factor regulador del interferón-5 (IRF5), la integrina- α M (ITGAM), el transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT4), el receptor II de la fracción Fc de la inmunoglobulina G (FCGR2A) [79, 205], la MCP-1, la interleucina-8 (IL-8), la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y el angiotensinógeno. Además de estos polimorfismos genéticos, se han descubierto otros genes responsables de autoinmunidad como por ejemplo: la C-C quimiocina receptora de tipo 5, receptor de muerte programada tipo 1 (PD-1) y el IFN- γ , aunque para establecer una relación clara con la NL la mayoría de estos genes requerirían la realización de grandes estudios [206].

3.4.3 Biomarcadores proteómicos en la NL.

La proteómica es el estudio de las proteínas en diferentes muestras biológicas como: serum, plasma, orina o cualquier otro fluido. La orina es la muestra más adecuada para la búsqueda de biomarcadores en la NL puesto que se obtiene

de forma sencilla, su proteoma es más sencillo, y puede reflejar mejor la actividad de la enfermedad renal [79].

La identificación de biomarcadores mediante proteómica requiere inicialmente la identificación en dos grupos de enfermos de las proteínas que los diferencian y su posterior validación en otra cohorte de enfermos [79].

Existen diferentes métodos para separar y analizar las proteínas en muestras biológicas como: la electroforesis bidimensional, la cromatografía líquida-espectrometría masa tándem, y la espectrometría de masas, el SELDI-TOF-MS (*Surface Enhanced Laser Desorption/ Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) y el MALDI-TOF-SF (*Solvent Free Modification of Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time Of Flight*) siendo las dos últimas técnicas enumeradas las más sensibles pudiendo detectar diferentes proteínas a la vez, en muestras pequeñas (5-10 uL), pudiendo ser de bajo peso molecular [165, 207, 208].

Se han realizado diferentes estudios proteómicos en modelos murinos de nefritis lúpica y en pacientes afectados por esta enfermedad habiéndose identificado diferentes proteínas relacionadas con la NL [209- 211].

Un estudio realizado mediante SELDI-TOF en pacientes con NL identificó varias proteínas en el momento del brote renal como son: la isoformas de la hepcidina 20 y 25, fragmentos de albúmina, y α 1-antitripsina. En este mismo grupo de pacientes se observó una variación de las isoformas de hepcidina durante la evolución de la enfermedad, aumentando la 20 en los 4 meses previos al brote, disminuyendo la 25 en el momento del brote, recuperando sus valores basales en los 4 meses posteriores a este [165].

Otros dos estudios realizados en pacientes pediátricos con NL permitieron identificar 4 biomarcadores: la transferrina, la ceruloplasmina, la α 1-glicoproteína ácida y la lipocalina tipo prostaglandina D sintetasa. Se objetivó que los pacientes con NL activa presentaban niveles más altos de todos ellos, excepto de ceruloplasmina, que los pacientes con NL no activa permitiendo todos ellos predecir el brote renal con tres meses de antelación [212- 213].

La lipocalina tipo prostanglandina D sintetasa ha sido estudiada en modelos murinos y en pacientes con NL mostrando ser un buen biomarcador de actividad renal, habiendo demostrado su utilidad para diferenciar pacientes con NL activa y no activa, LES activo e inactivo. Sus niveles disminuían de forma significativa durante el año posterior al tratamiento, objetivándose que la persistencia de niveles altos se asociaba a progresión a enfermedad crónica renal [79, 188].

Este método de búsqueda de biomarcadores comporta diferentes ventajas e inconvenientes. Entre las ventajas destaca que no precisa de la realización de una hipótesis, identifica gran número de proteínas candidatas, pudiendo identificar moléculas desconocidas y que no tengan relación con la patogénesis siendo los inconvenientes principales que no todas las proteínas identificadas pueden ser utilizadas como biomarcadores, que es una técnica tiempo y costo-dependiente y que hasta ahora no ha sido capaz de identificar ningún biomarcador que pueda ser utilizado en la práctica clínica [79].

3.5 Pronóstico

La nefritis lúpica comporta una significativa morbilidad y mortalidad. El pronóstico de la NL depende de una serie de factores demográficos, raciales, genéticos, histopatológicos e inmunológicos, entre otros [16, 21, 81, 214- 218]. En el transcurso de las últimas décadas se han producido avances significativos en la mejora de las tasas de supervivencia de estos pacientes, debido en parte a la introducción de glucocorticoides y citotóxicos en el tratamiento de la NL [84, 219-220]. Sin embargo, en la actualidad muchos de estos pacientes presentan aún mal pronóstico, ya que hasta un 35 % de ellos presentaran un nuevo brote renal durante la evolución de la enfermedad, y del 5 al 25% los pacientes con NL progresaran a una insuficiencia renal terminal requiriendo la realización de diálisis [221].

Hipótesis de trabajo

El daño renal en el LES es una complicación importante, aparece aproximadamente en el 40 al 75% de los pacientes, y se asocia a un curso impredecible y a una morbilidad significativa a corto y a largo plazo [13]. A pesar del tratamiento inicial agresivo, hasta un 25% de los pacientes con NL progresarán a enfermedad renal crónica [222], en parte debido a la dificultad para realizar un diagnóstico de forma precoz e identificar las recaídas de la enfermedad que permita establecer un tratamiento inmediato capaz de modificar el curso de la enfermedad.

La biopsia renal es en la actualidad el “Gold standard” para el diagnóstico permitiendo la evaluación directa del grado y tipo de lesión renal aunque debido a su naturaleza invasiva no pueda realizarse de forma seriada. Los biomarcadores serológicos tradicionales como los anticuerpos anti-dsDNA, los niveles de complemento, así como pruebas de laboratorio para la valoración de la función renal han demostrado una baja fiabilidad [181, 223]. Ambas razones han motivado en los últimos años un interés creciente en la búsqueda de biomarcadores no-invasivos en la NL que puedan utilizarse para predecir la aparición de la enfermedad, monitorizar su evolución y la respuesta al tratamiento, siendo los biomarcadores urinarios unos candidatos muy atractivos [78, 83] puesto que su obtención es relativamente fácil y reflejan de forma específica los cambios fisiopatológicos locales. La hipótesis de nuestro estudio es identificar la utilidad de diferentes moléculas relevantes en la patogénesis de

la NL (NGAL, TWEAK, APRIL, MCP-1 y NRP-1) como biomarcadores en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico en los pacientes con LES y afectación renal.

Objetivos

El objetivo principal de nuestro estudio es determinar, en los pacientes con LES, el valor predictor de los diferentes biomarcadores estudiados en diferentes situaciones clínicas (brote renal, RC tras el tratamiento de la NL, y progresión a insuficiencia renal crónica así como el valor pronóstico de respuesta al tratamiento en el momento del diagnóstico), y la realización de un estudio comparativo en las diferentes situaciones clínicas que permita la creación de un panel de biomarcadores según su utilidad clínica.

Los objetivos secundarios del estudio son:

- Describir las características clínicas, demográficas, las determinaciones analíticas y los tratamientos realizados en el momento de la inclusión de los pacientes en el estudio.
- Determinar los niveles de los biomarcadores en los diferentes grupos de pacientes con LES y controles.
- Realizar la correlación entre los biomarcadores objeto del estudio y aquellos utilizados de forma habitual en los pacientes con LES y también en aquellos afectos de nefritis lúpica.
- Establecer la utilidad clínica de los biomarcadores estudiados como marcadores de nefritis lúpica activa y realizar su estudio comparativo.
- Determinar los niveles de los biomarcadores en el brote renal y en los meses previos.
- Determinar los niveles de los biomarcadores en el momento de la remisión completa y en los meses previos.

Diseño y pacientes

Para la realización del estudio se reclutaron pacientes con LES de la unidad de Lupus del Hospital Vall d' Hebron que cumplieran al menos 4 de los criterios revisados de la clasificación de la ACR para LES (anexo 3) [224]. Se excluyeron los pacientes con infección del tracto urinario, diabetes mellitus, embarazo, malignidad, insuficiencia renal no relacionada con el LES y aquellos sometidos a hemodiálisis o historia del trasplante renal. El estudio fue aprobado por el Comité de ética local y todos los pacientes dieron el consentimiento informado por escrito.

La actividad de la enfermedad se evaluó mediante el índice de actividad de la enfermedad del LES 2000 (SLEDAI-2Ks; rango 0-105) [87]. La actividad renal fue definida como la suma de los ítems del SLEDAI-2Ks relacionados con el dominio renal de la escala (rSLEDAIs; rango 0-16). La actividad de la enfermedad extrarenal se calculó restando el rSLEDAIs de la puntuación total del SLEDAI (puntuación extrarenal SLEDAI - 2Ks (eSLEDAIs); rango 0-89). El daño renal acumulado fue evaluado con los datos renales del índice de daño SLICC/ACR (rSDI; rango 0-47) [152].

Se realizó una biopsia renal dentro de la primera semana de inicio del tratamiento, a menos que estuviera contraindicada. Las muestras de la biopsia fueron examinadas mediante microscopio óptico y de inmunofluorescencia, y sus resultados fueron clasificados mediante la clasificación de la sociedad

internacional de Nefrología y de Patología Renal (2003) [151] y el índice de actividad y cronicidad [225].

Se establecieron dos cohortes diferentes, una transversal y otra prospectiva, de pacientes para evaluar la asociación de los niveles de NGAL, TWEAK, APRIL, MCP-1 y NRP-1 con la actividad de la enfermedad, y su valor predictivo en relación a los resultados clínicos y su capacidad pronóstica.

Los pacientes del estudio transversal se categorizaron en diferentes grupos: A) *pacientes con LES y afectación renal* quienes a su vez fueron subclasificados en tres grupos según el estado de la actividad renal en el momento de la inclusión en el estudio: pacientes con NL activa (NLA), definidos por un nuevo rSLEDAI ≥ 8 o rSLEDAI = 4 cuando la proteinuria era el único criterio renal relacionado, o por enfermedad renal activa diagnosticada mediante biopsia (n = 38), pacientes con una NL previamente tratada que en el momento de inclusión habían alcanzado una respuesta parcial (n = 56) o una respuesta completa (n = 29), definida por un cociente de proteínas/ creatinina urinaria (mg/mg) entre 0.2-2.0 y < 0.2, respectivamente, acompañado de un sedimento normal en los casos de RC [100]. B) *Pacientes de LES sin historia de afectación renal con una enfermedad activa* (SLEDAIs ≥ 6) (n = 23) o *con LES inactivo* (SLEDAIs < 4) (n = 39). Se incluyó también un grupo control de voluntarios sanos (n = 35).

Para el estudio prospectivo, se estableció una nueva cohorte de 45 pacientes consecutivos con NL cuya enfermedad fue confirmada mediante la biopsia renal. Los pacientes fueron seguidos mensualmente durante los primeros 6 meses y

posteriormente de forma trimestral. Los brotes renales fueron clasificados como nefríticos o proteinúricos. El brote nefrítico se definió por un aumento $\geq 30\%$ de la creatinina sérica (o una disminución de TFGe $> 10\%$) y un sedimento urinario activo con aumento de hematuria (> 10 hematíes por campo, independientemente de los cambios en la proteinuria; y el proteinúrico por un aumento reproducible del ratio Upro: Ucre $> 0,9$ mg / mg después de la respuesta completa o $> 1,8$ mg / mg después de la respuesta parcial [226].

En cada visita se registró el SLEDAI-2Ks y se realizaron pruebas de laboratorio, que incluían: bioquímica, hemograma completo, niveles de complemento, títulos de Acs. anti-dsDNA, sedimento urinario, proteinuria de 24 horas, ratio Upro: Ucre y la tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) mediante la utilización de la ecuación de Cockcroft-Gault [227]. Todas las muestras fueron obtenidas, durante las horas de la mañana, el día de la visita.

El curso de la LN fue categorizado basándose en el cambio de actividad de la enfermedad respecto a un punto de referencia en el tiempo, ya sea por la presencia de brote (tiempo A), de RC después del tratamiento (tiempo B). La actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento se determinó comparando 2 puntos en el tiempo: el tiempo del evento (tiempo A o B) y el tiempo de las anteriores visitas ($-A1$, $-A2$ y $-B1$, $-B2$). Se valoró también si las determinaciones realizadas en el momento de inclusión en el estudio podían tener utilidad para predecir la respuesta al tratamiento o la progresión a IRC. Asimismo, se calcularon los predictores independientes de progresión a IRC entre los biomarcadores estudiados y el tiempo de progresión a insuficiencia renal crónica.

Para cada paciente, se recolectaron muestras de sangre y orina frescas. Las muestras de orina se centrifugaron a 4 ° C y 3.900 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos para eliminar los restos celulares antes de su almacenaje. Muestras de suero y orina fueron congeladas en las 2 horas posteriores a su recolección y a almacenadas a - 80 ° C hasta su análisis posterior. Se determinaron los niveles de NGAL, TWEAK, APRIL, MCP-1 y NRP-1 en orina (uNGAL, uTWEAK, uAPRIL, uMCP-1 y uNRP-1) y en suero (sNGAL, sTWEAK, sAPRIL, sMCP-1 y sNRP-1) mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Determinación de NGAL, TWEAK, APRIL, MCP-1 y NRP-1 mediante ELISA

Siguiendo las instrucciones del fabricante se midieron los niveles mediante el uso de kits comerciales de ELISA para NGAL (Bioporto, Dinamarca), TWEAK y APRIL (eBioscience, Austria), MCP-1 (Diacclone SAS, Francia) y NRP-1 (Cloud-Clone Corp, USA), respectivamente. Las placas se leyeron a 450 nm. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los límites inferiores de detección fueron 0,5- 4 ng/mL, 9.7 pg/mL, 0.4 ng/mL, 5.8 pg/mL y 0.053 ng/mL, respectivamente. A los valores indetectables se les asignó un valor de 0. Las concentraciones de NGAL, TWEAK, APRIL, MCP-1 y NRP-1 se normalizaron con la creatinina en orina para corregir las diferencias debido a la dilución de la orina en una misma muestra, con los resultados de uNGAL, uAPRIL, y uNRP-1 expresados en nanogramos (ng/mg Cr), y los uTWEAK y uMCP-1 en picogramos por miligramos de creatinina en orina (pg/mg Cr). La excreción fraccional (FE) de NGAL (FE NGAL), TWEAK (FE TWEAK), APRIL (FE APRIL), MCP-1 (FE MCP-1) y NRP-1 (FE NRP-1), se calculó mediante la fórmula:

(concentración de cada biomarcador en orina/suero) ÷ (concentración de creatinina orina/suero) x 100. También se calculó la FE NGAL, FE TWEAK, FE APRIL, FE MCP-1 y FE NRP-1 en relación con la fracción de excreción de proteínas totales (FE NGAL/FE proteína, FE TWEAK/FE proteína, FE APRIL/FE proteína, FE MCP-1/FE proteína y FE NRP-1 /FE proteína, respectivamente).

En el estudio transversal para la realización de la estadística descriptiva para las variables categóricas y continuas, se utilizaron los cuartiles y los porcentajes, respectivamente. Para las inferencias sobre la población los valores se expresaron con intervalos de confianza del 95%. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Chi cuadrado o test exacto de Fisher para los categóricos y la prueba U de Mann-Whitney para los continuos. El coeficiente de correlación de Spearman se utilizó para estimar la asociación entre variables continuas. Para realizar comparaciones múltiples de los diversos biomarcadores con el grupo de nefritis lúpica activa, se ajustó un modelo lineal generalizado con un enlace de registro, y luego se aplicó la prueba de Dunnett para ajustar los valores de p. Se calcularon las áreas bajo las curvas ROC y los puntos de corte fueron determinados según el índice de Youden, considerándose para valorar su poder discriminante que los valores bajo la curva ROC entre 0,9-1,0 eran excelentes, de 0,8-0,9 buenos, de 0,7-0,8 moderados, de 0,6- 0,7 pobres y de 0,6- 0,5 malos. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo y sus intervalos de confianza del 95% mediante modelos lineales generalizados usando como función de enlace la función logit. En el estudio longitudinal para la realización de la estadística descriptiva, inferencial y la realización de correlaciones se utilizaron los mismos métodos que

en el estudio transversal. Para la realización de comparaciones de datos de un mismo paciente en diferentes tiempos se utilizaron modelos de ecuaciones de estimación generalizada para explicar el diseño de medidas repetidas. Kaplan-Meier y métodos de riesgos proporcionales de Cox fueron utilizados para analizar la relación entre los marcadores y el tiempo de progresión de la enfermedad renal. Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas estadísticos SPSS 17.0 (SPSS Inc., de 2009, Chicago, IL, USA) y SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Cr), Ligando inductor de la proliferación normalizado con los niveles de creatinina urinaria; Ratio MCP-1/ FE Proteína (%), Fracción de excreción (FE) de la proteína quimiotáctica de los monocitos tipo 1 en relación a la fracción de excreción de proteínas; uNRP-1 (ng/mg Cr), neuropilina-1 normalizada con los niveles de creatinina urinaria.

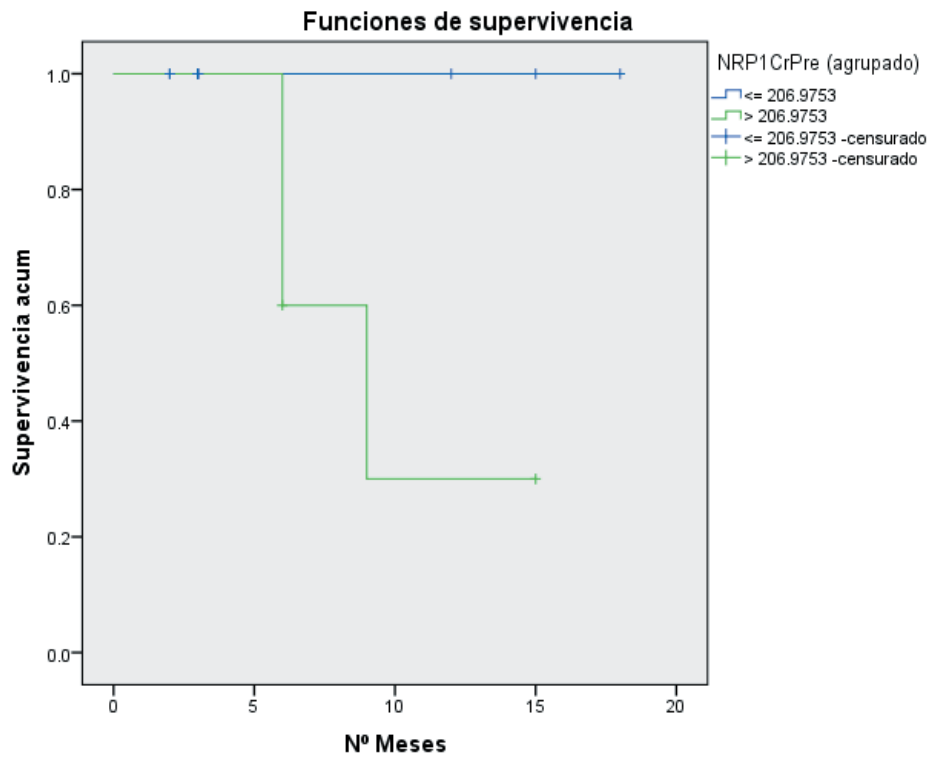


FIGURA 34: Curvas de supervivencia renal Kaplan–Meier en pacientes con niveles de uNRP-1 (ng/mg Cr) superiores e inferiores al nivel del cut-off de 206,97. Pacientes con niveles de uNRP-1 (ng/mg Cr) > 206,97 mostraron una progresión significativamente más rápida a pérdida de la función renal (P = 0,092, test long-rank)