



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>

TESIS DOCTORAL

**Exosomas urinarios: Identificación de biomarcadores de
respuesta clínica en la nefritis lúpica**

Doctorando:

Eloi Garcia Vives

Directora:

Josefina Cortés Hernández

Tutor:

Albert Selva O'Callaghan



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina:

Departamento de Medicina

Barcelona, 2019

<<Eppur si muove >>

PRÓLOGO Y AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de doctorado, enmarcado bajo el título "*Exosomas urinarios: Identificación de biomarcadores de respuesta clínica en la nefritis lúpica*", estudia y analiza el perfil de expresión de los microRNAs exosomales de la orina de pacientes con nefritis lúpica y compara los resultados obtenidos en función de la respuesta al tratamiento estándar, con el objetivo de identificar potenciales biomarcadores de actividad y pronóstico en esta afectación orgánica. De este modo, los resultados se estudiaron en función de si los pacientes habían presentado remisión completa o ausencia de la misma. El trabajo se divide en diez capítulos: una primera parte de compilación y síntesis de los conocimientos actuales de la nefritis lúpica, los métodos diagnósticos y los biomarcadores existentes, una segunda parte, en la que se incluye el trabajo de investigación propiamente dicho, y finalmente una parte en la que se discuten los resultados destacándose un apartado de conclusiones así como de implicaciones clínicas y posible líneas de investigación futuras que de él se derivan. En el apartado de metodología se definen y explican todos los métodos y técnicas de laboratorio utilizadas durante su elaboración.

El presente trabajo simboliza un cambio de etapa, pues con él se concluye un período de formación reglada iniciado durante los estudio de secundaria, cuando la idea de la medicina penetró profundamente en mi mente manteniéndose vital durante los sucesivos años. Esta idea se mantuvo hasta completar la secundaria y el bachillerato. Esta idea se reforzó durante la realización de la carrera universitaria en la *Universitat Autònoma de Barcelona*. Esta idea reconoció parte de su significado real en el *Hospital de Sant Pau i la Santa Creu* durante las prácticas universitarias. Esta idea resistió posteriormente el MIR, y se plasmó durante la realización de la residencia de Medicina Interna en el *Hospital de la Vall d'Hebrón* donde conoció las mejores y peores expresión del hacer médico. Finalmente, esta etapa de formación concluye con la elaboración del presente trabajo de investigación básica en la *Unitat de Malalties Sistèmiques i Autoimmunitaries de Medicina Interna*.

Al recordar todo el camino recorrido me gustaría dar las gracias a todos aquellos que en su medida han contribuido, en las distintas etapas, en hacerme llegar donde me hallo. Agradezco a la Dra. Fina Cortés Hernández, directora de tesis, su paciencia y esfuerzo para hacer de este un verdadero trabajo de doctorado. Agradezco a la Dra Cristina Solé, que me guiara en el mundo del laboratorio, donde su docencia ha hecho posible conocer. Agradezco al Dr. Josep Ordi Ros, la Dra. Roser Solans Laque, el Dr. Fernando Martínez Valle, el Dr. Segundo Bujan Rivas, al Dr. Albert Selva O'Callaghan y la Dra. Carmen Pilar Pérez Simeón que me enseñaran la medicina interna y el mundo de la autoinmunidad.

Recuerdo y agradezco a todos los compañeros de la residencia y en especial a los compañeros de la guardia *Nefasta* con los que he compartido horas y horas de trabajo, con momentos y situaciones difíciles pero siempre con gran arropo convirtiéndolos en fantásticos recuerdos. También un especial abrazo a todos los médicos de las Urgencias de Vall d'Hebrón por ser unos increíbles mentores primero y unos mejores compañeros después, con especial énfasis al Dr. Alfredo Guillen, la Dra. Maria Urquizu, el Dr. Isi Sanz y la Dra. Maritxell Ventura.

Finalmente agradezco a mi familia el haber hecho posible toda esta realidad, con todas sus enseñanzas y su destacado espíritu crítico y transgresor y muy especialmente a Adaia Albasanz Puig por estar siempre aquí.

Eloi Garcia Vives

Barcelona, julio 2019.

Abreviaturas:

- Ac: Anticuerpo
- ACR: *American College of Rheumatology*
- Ag: Antígeno
- Akt: Proteína kinasa B
- ANA: Anticuerpo antinuclear
- AutoAc: Auto-anticuerpo
- AutoAg: Auto-antígeno
- BAFF: Factor activador de las células B
- CASR: Receptor sensor de calcio
- CCL/CXCL: Ligando de quimioquina
- CDK: Quinasa dependiente de ciclina
- cDNA: DNA complementario
- CEGRH: Células endoteliales glomerulares renales humanas
- CETRH: Células endoteliales tubulares renales humanas
- CMRH: Células mesangiales renales humanas
- Col3A1: Colágeno 3A1
- CPA: Células presentadoras de antígenos
- Ct: Ciclo umbral
- CYC: Ciclofosfamida
- EEM: Error estándar de la media
- ELISA: Inmunoabsorbancia ligada a enzima
- ERT: Enfermedad renal terminal
- EULAR/ERA-EDTA: *European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association*
- FcγRs: Receptores Fc-gamma
- FE: Fracción de excreción
- FoxO1: *Forkhead box protein 1*
- FIH: Factor inhibidor del HIF
- FN-1: Fibronectina-1
- GSK: Glucógeno sintetasa quinasa
- HIF-1: Factor-1 inducible por hipoxia

- HUVH: Hospital Universitario de la Vall d'Hebrón
- IA: Índice de Actividad
- IC: Inmunocomplejo
- IC 95%: Intervalo confianza del 95%
- ICAM: Molécula de adhesión intercelular
- ICr: Índice cronicidad
- IECA: Inhibidor del enzima conversor de angiotensina
- IF: Inmunofluorescencia
- Ig: Inmunoglobulina
- IL: Interleuquina
- INF: Interferón
- IP-10: *IFN- γ -inducible protein 10*
- IQR: Rango intercuartil
- IS: Inmunosupresor
- ISH: Hibridación in situ
- ISN/RPS: *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society*
- IRC: Insuficiencia renal crónica
- Kim-1: *Kidney injury molecule-1*
- KLF-4: Factor 4 Kruppel-like
- L-FABP: *Liver-type fatty acid binding protein*
- LATS2: Supresor de tumores grandes quinasa-2
- LES: Lupus eritematoso sistémico
- LNA: *Locked Nucleic Acid*
- MAPK: Proteína-quinasa activada por mitógeno
- MBG: Membrana basal glomerular
- MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*
- mEPCR: *Membrane endothelial protein C receptor*
- MIF: Factor inhibidor de la migración macrofágica
- miRNA: microRNA
- MMF: Micofenolato Mofetilo
- mTOR: Diana de Rapamicina en célula de mamífero
- ncRNA: RNA no codificante
- NET: Trampas extracelulares de neutrófilos
- Nf- $\kappa\beta$: Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas

- NFAT: Factor nuclear de las células T activadas
- NGAL: *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*
- NL: Nefritis lúpica
- NR: No respondedores
- NS: No estimulado
- OR: Odds Ratio
- PAS: Ácido periódico de Schiff
- PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
- PBS: Tampón fosfato salino
- PCR: Reacción de la cadena polimerasa
- pDC: Células dendríticas plasmocitoides
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PI3k: Fosfoinositol-3 quinasa
- PPP2R5C: Proteína fosfatasa-2 reguladora de la subunidad B' γ
- PRKCE: Proteína quinasa C ϵ
- PTX3: Pentraxina 3
- P/C: Ratio proteínas/creatinina
- R: Respondedores
- RhoA: Gen homólogo al Ras A
- RC: Remisión completa
- RNAm: RNA mensajero
- RQ: Cuantificación relativa
- RR: Riesgo relativo
- RT: Retro-Transcriptasa
- snRNA: Acido Ribonucleico pequeño nuclear ("small nuclear").
- SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*
- SLICC-DI: *Systemic Lupus International Collaboration Clinics-Damage Index*
- SSC: Salino-citrato de sodio
- STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*
- TFGe: Tasa filtrado glomerular estimado
- Th: Linfocito T helper
- TLR: Toll-like Receptor
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- Treg: Linfocitos T reguladores
- TSA: Amplificación de señal de Tyramide

Abreviaturas

- TWEAK: *TNF-like weak inducer of apoptosis*
- UV: Ultravioleta
- VCA: Antígeno de la cápsida viral
- VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*
- VEB: Virus Epstein-Barr
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- VPN: Valor predictivo negativo
- VPP: Valor predictivo positivo
- VSG: Velocidad de sedimentación glomerular
- WHO: *World Health Organisation*

ÍNDICE

Prólogo y agradecimientos	3
Abreviaturas.....	9
Resumen/Abstract.....	17/19
1. Introducción	21
1.1 Nefritis lúpica	23
1.1.1 Epidemiología	23
1.1.2 Patogénesis	24
1.1.2.1 Mecanismos extra-renales de la NL	24
1.1.2.2 Mecanismos intra-renales de la NL	29
1.2 Diagnóstico	35
1.2.1 Presentación clínica	36
1.2.2 Marcadores analíticos habituales de actividad de la enfermedad.....	37
1.2.2.1 Marcadores séricos.....	37
1.2.2.2 Marcadores urinarios	40
1.2.3 Biopsia renal	42
1.2.3.1 Clasificación histológica nefritis lúpica	43
1.3 Tratamiento	45
1.4 Pronóstico	47
1.5 Nuevos Biomarcadores	48
1.5.1 Biomarcadores predictores de brote	48
1.5.2 Biomarcadores predictores de evolución	50
1.5.3 Biomarcadores predictores de histología	52
1.5.4 Exosomas como fuente de nuevos biomarcadores	57

2. Hipótesis de trabajo	61
3. Objetivos	65
4. Diseño y pacientes	69
5. Metodología	75
6. Resultados	91
6.1 Caracterización de exosomas	93
6.2 Características demográficas	94
6.3 Cribado de perfil de expresión de microRNA mediante técnica de microarrays en función de respuesta al tratamiento	98
6.3.1 Control de calidad del estudio de microarrays.....	99
6.3.2 Análisis de resultados del estudio de microarrays.....	106
6.4 Validación de los resultados mediante análisis de RT-qPCR individual	111
6.5 Análisis de los niveles séricos de los microRNAs elegidos	117
6.6 Curvas ROC	119
6.6.1. Curvas ROC Respondedores vs No Respondedores	119
6.7 Cohorte control_1 (Sana).....	123
6.8 Cohorte control_2 (Nefropatía médica)	125
6.9 Relación microRNAs con parámetros clínicos y histológicos.....	127
6.10 Hibridación <i>in situ</i> sobre muestras de tejido renal.....	130
6.11 Internalización de los exosomas	134
6.12 Producción de exosomas urinarios	138
6.13 Cuantificación de exosomas urinarios	140
6.14 <i>Pathway analysis</i> o análisis de vía.....	141
6.15 Estudios <i>in vitro</i> para descubrir el rol de los miRNAs a nivel renal	143
6.15.1 Transfección del mimic-miR, inhibidor-miR y scr-miR	143
6.15.2 Efecto de los microRNAs en la proliferación celular	146

6.15.3 Efecto de los microRNAs en la apoptosis celular	148
6.15.4 Vías de acción de los miRNAs a nivel de las células mesangiales renales humanas.....	150
6.15.4.1 Efecto de los miRNAs a estudio en la fibrosis	151
6.15.4.2 Efecto de los miRNAs a estudio a nivel de los procesos inflamatorios	154
6.15.4.3 Otros efectos de los miRNAs a estudio: HIF-1	160
6.15.5 Vías de acción de los miRNAs a nivel de las células endoteliales glomerulares renales humanas	161
6.15.5.1 Efecto de los miRNAs a estudio en la fibrosis	161
6.15.5.2 Efecto de los miRNAs a estudio a nivel de los procesos inflamatorios	164
6.15.5.3 Efecto de los miRNAs a estudio a nivel de migración celular y angiogénesis	167
6.15.5.4 Otros efectos de los miRNAs a estudio: HIF-1	171
7. Discusión	173
8. Conclusiones	197
9. Implicaciones Clínicas	201
10. Posibles líneas de investigación futuras	205
11. Bibliografía	209
12. Anexos	237
12.1 Anexo_1: Criterios clasificatorios de la ACR para la clasificación de LES	239
12.2 Anexo_2: Criterios clasificatorios del grupo SLICC para la clasificación de LES	241
12.3 Anexo_3: <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i> (<i>SLEDAI</i>)	243
12.4 Anexo_4: Listado de genes por cada placa de 96 pocillos <i>MiRCURY</i> <i>LNA miRNA focus PCR Urine Exosome Panel</i>	245

RESUMEN

Antecedentes

Los biomarcadores actuales en la nefritis lúpica (NL) no son lo suficientemente sensibles o específicos para predecir la evolución renal. Datos recientes abalan el uso de los exosomas urinarios como fuente de biomarcadores de origen renal, con especial relevancia en su contenido de miRNAs. Algunos estudios han identificado varios miRNAs asociados con la actividad de la enfermedad y la formación de fibrosis, pero no se han realizado estudios sobre biomarcadores de pronóstico.

Métodos

Para identificar biomarcadores pronóstico, realizamos una micromatriz de miRNA en exosomas urinarios de pacientes con NL activa, analizando los resultados en función de la respuesta al tratamiento presentada por los pacientes (7 respondedores y 7 no respondedores). Los estudios de validación se realizaron mediante técnica de RT-qPCR en una nueva cohorte de LN (respondedores = 21 y no respondedores = 22). Entre los miRNAs de interés se realizó un estudio comparativo con los niveles séricos así como con una cohorte de pacientes sanos y otra de nefropatías no lúpicas. Posteriormente se realizó hibridación *in situ* de tejido renal y estudios *in vitro* para identificar el origen, diana celular y el mecanismo de acción de estos exosomas a nivel renal. Para cada miRNA expresado diferencialmente, los genes diana potenciales fueron predichos a través del estudio de conjuntos de datos de miRNA.

Resultados

Los pacientes que respondieron a la pauta de tratamiento estándar expresaron niveles significativamente mayores de *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* en la orina y en tejido renal en comparación con los no respondedores. El *miR-135b-5p* mostró el mejor valor predictivo para discriminar a los pacientes que respondieron (AUC = 0.783 [intervalo de confianza del

95%, 0.640 - 0.926], al valor de corte > 0.0884 con una sensibilidad del 77.8% y especificidad del 71.4%). La expresión de los miRNAs se localizó principalmente en la estructura tubular, demostrándose, además, una mayor formación de exosomas enriquecidos con *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* a nivel de esta estirpe en comparación con la de células endoteliales glomerulares o mesangiales ($p < 0,0001$). En cuanto a la diana de estos exosomas, se observó una velocidad de internalización de los derivados de orina de pacientes respondedores superior a los de no respondedores tanto a nivel de las células endoteliales glomerulares como mesangiales ($p = 0,001$ y $0,0002$), siendo además superior la capacidad de internalización a nivel de las células mesangiales englobadas (90% frente a 50%, $p < 0,0001$). El *miR-135b-5p* demostró capacidad en la inhibición de la proliferación de las células mesangiales ($p < 0.01$). Además, el análisis de las distintas dianas biológicas pudo demostrar de forma global un papel de estos miRNAs en la modulación de la respuesta inflamatoria, con reducción de los niveles de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, un cierto efecto en la modulación sobre la angiogénesis, así como una marcada capacidad antifibrosante. El análisis de la vía identificó nueve dianas comunes relevantes para la recuperación renal, una de ellas, HIF-1 α , común para los 3 miRNA de interés. Los 3 miRNAs demostraron un efecto modulador sobre la vía del HIF-1 α a través de su inhibición.

Conclusiones

Los niveles de *miR-135b-5p*, *miR-31-5p* y *miR-107* son capaces de predecir la respuesta al tratamiento en el momento del brote y evolutivamente en los pacientes afectados de NL, de forma específica. El origen de estos parecería situarse a nivel de las células tubulares mientras que las mesangiales y endoteliales glomerulares se presentarían como las principales efectoras de sus acciones biológicas. HIF-1 α fue identificado como diana común de estos 3 miRNAs, ocasionando la presencia de estos miRNAs una supresión a nivel de la expresión de esta vía, considerando clave en la patogénesis de la NL.

ABSTRACT

Background

Current biomarkers in Lupus nephritis (LN) are not sensitive or specific enough to predict renal outcome. Recent data support the use of urinary exosomes as a source of biomarkers of renal origin, with special relevance in their miRNA content. Some studies have identified several miRNAs associated with disease activity and fibrosis formation, but no studies on prognostic biomarkers have been conducted.

Methods

To identify prognostic biomarkers, we performed a miRNA microarray on urinary exosomes from patients with active LN, analyzing their results according to the response to standard therapy (7 responders and 7 non-responders). Validation studies were performed by RT-qPCR technique in a new LN cohort (responders=21 and non-responders=22). Among the miRNA of interest, a comparative study was conducted with serum levels in the same cohort as well as with a healthy control group and non-lupus nephropathy cohort. Subsequently, *in situ* renal tissue hybridization and *in vitro* studies were performed to identify the origin and cell target of these exosomes at renal level and to understand their mechanism of action. For each differentially expressed miRNA, potential target genes were predicted through miRNA-target datasets.

Results

Responder patients expressed significantly increased levels of *miR-31-5p*, *miR-107* and *miR-135b-5p* in urine and renal tissue compared to non-responders. *MiR-135b-5p* exhibited the best predictive value to discriminate responder patients (AUC= 0.783 [95% confidence interval, 0.640 - 0.926], cut-off > 0.0884 with 77.8% sensitivity and 71.4% specificity). MiRNAs expression was mainly located in the tubular structure, demonstrating, in addition, greater

formation on exosomes enriched with *miR-31-5p*, *miR-107* and *miR-135b-5p* present in this lineage compared to endothelial glomerular and mesangial cells ($p < 0.0001$). Regarding the target of these exosomes, a faster rate of internalization of responders' urinary-derived exosomes was observed in both endothelial glomerular and mesangial cells ($p = 0,001$ y $0,0002$), and there was greater capacity of internalization on mesangial cells (90% vs. 50%, $p < 0.0001$). The *miR-135b-5p* demonstrated ability to inhibit the proliferation of mesangial cells ($p < 0.01$). In addition, the analysis of the different biological targets demonstrate globally a role of these miRNAs in the modulation of the inflammatory response, with reduction of cytokines, chemokines and adhesion molecules levels, a modulatory effect on angiogenesis, as well as a marked antifibrosing capacity. The pathway analysis identified nine common targets relevant to renal recovery, one of them, HIF-1 α , common for the 3 miRNA of interest. The 3 miRNAs demonstrated a modulating effect on the HIF-1 α pathway through its inhibition.

Conclusions

Levels of *miR-135b-5p*, *miR-31-5p* and *miR-107* are able to predict the response to treatment at the time of the renal flare and during follow-up in patients with NL, specifically. The origin of the exosomes enriched with these miRNAs appears to be at the level of tubular cells while the mesangial and glomerular endothelial cells appear as the main effectors of their biological actions. HIF-1 α was identified as the common target of these 3 miRNAs, causing the presence of these miRNAs suppression of the expression levels of this pathway, considered key in the pathogenesis of NL.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nefritis lúpica

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria crónica que se caracteriza por una gran variedad de manifestaciones clínicas. La afectación renal en los pacientes con LES ocurre hasta en un 50% de los casos y, a pesar de las mejoras en el pronóstico, actualmente continúa siendo una de las mayores causas de morbi-mortalidad (1). Esta afectación renal en el LES puede deberse a múltiples etiologías (2), siendo la enfermedad glomerular inmunomediada, conocida como nefritis lúpica (NL), la más común.

1.1.1 Epidemiología

La incidencia y prevalencia de la NL varía en función de las poblaciones a estudio. De este modo, se han descrito distintas incidencias según diferencias étnicas, con rangos que oscilan entre 3.5 y 65.5 casos por 100.000 habitantes, correspondiendo las mayores a poblaciones de linaje asiático, seguidas de las afro-americanas y las hispanas (3,4). Son numerosos los estudios que coinciden en señalar la raza caucásica como la de menor incidencia (5,6), estimándose alrededor de 3.8 casos por cada 100.000 habitantes (7). El riesgo de aparición de la afectación renal se describe como mayor durante los primeros años tras el diagnóstico de la enfermedad (6), si bien dicha afectación puede estar presente hasta en el 29-58% de los casos durante el curso de la misma (6). La raza también parece conllevar implicaciones pronósticas pues parece que en la hispana y afro-americana la NL aparece de forma más precoz en comparación con la caucásica (8) y presenta peor evolución en cuanto a eventos renales y muerte global (9).

El género también muestra preferencias en cuanto a la presentación de la NL. Son varios los estudios que indican que el género masculino tiende a desarrollar dicha afectación de forma más precoz en la cronología de la enfermedad, describiéndose su aparición en el 48% de los pacientes hombres durante el primer año de enfermedad comparado con el 20% en el caso de las mujeres (6).

En cuanto a la prevalencia de dicha afección, ésta varía de igual modo en función de la población a estudio, estimándose alrededor de 24-27.7 casos por cada 100.000 persona en el caso de los caucásicos, con ratios 2-3 veces superiores en indio-asiáticos y hasta 5-10 veces en afro-caribeños (3).

1.1.2 Patogénesis

La patogénesis del LES y la NL es altamente compleja y son múltiples los mecanismos implicados en el inicio y progresión de la misma. En esta parece existir una estrecha interrelación de múltiples factores, tanto genéticos y epigenéticos como ambientales. El punto clave se halla en la pérdida de la auto-tolerancia antigénica siendo su pilar central la producción policlonal de auto-anticuerpos (AutoAc) contra antígenos (Ag) nucleares, demostrado a través de la positividad en la determinación de Ac anti-nucleares (ANAs) a nivel serológico. Dentro de los mecanismos descritos en esta cascada patogénica de la NL se hallan los extra-renales y los intra-renales:

1.1.2.1 Mecanismos extra-renales de la NL

A. Muerte celular y residuos celulares

El proceso de inmunización hacia Ag propios deviene el eje central en el desarrollo de inflamación orgánica en el LES. Para poder tener lugar esta "mala inmunización", los Ag nucleares deben ser accesibles a las células presentadoras de antígenos (CPAs). Uno de los procesos más conocidos de destrucción celular en los organismos multicelulares es la apoptosis (10). En el proceso normal de apoptosis la integridad de la membrana celular persiste hasta las últimas etapas evitando el volcado del material intracelular al espacio extracelular donde podría actuar como estímulo antigénico. Además, dicho proceso

asocia mecanismos de condensación de la cromatina que garantizan mínimos niveles de ésta a nivel del compartimento extracelular (10). Por otro lado, el sistema del complemento actúa, especialmente a través de la vía clásica, opsonizando el material residual para su correcta eliminación (11) a la vez que fagocitos profesionales median de una forma inmunológicamente estéril (12), sin inflamación, el proceso de desaparición de los restos celulares, incluso siendo descrita la secreción concomitante de citoquinas anti-inflamatorias e inmunoreguladoras, como la IL-10, que favorecerían dicha ausencia de inflamación, así como de inmunidad mediada por residuos celulares (13). Cualquier defecto, tanto heredado como adquirido, que altere la correcta hemostasis de este proceso podría conllevar a la aparición de autoinmunidad. Así, por ejemplo, la alteración en el lavado de material apoptótico conllevaría la consiguiente pérdida de integridad de la membrana celular condicionando la liberación de múltiple material antigénico intracelular y por lo tanto favoreciendo la pérdida de la tolerancia inmunológica.

En los pacientes con LES se ha demostrado una reducción de la actividad fagocitaria contribuyendo a un defecto en la eliminación de los residuos celulares, tanto por la reducción en la capacidad de absorción de partículas residuales por parte de unos monocitos/macrófagos funcional y morfológicamente anormales (14), como por la disminución en la secreción de señales de atracción fagocitarias, por parte de las células apoptóticas (15). Por otro lado, se ha descrito la persistencia de remanentes de células apoptóticas a nivel de los centros germinales de los nódulos linfáticos, donde actuarían como señal de supervivencia para cualquier célula B auto-reactiva favoreciendo la formación de células plasmáticas productoras de autoAc, resultando pues en la pérdida de tolerancia para Ag nucleares (15). En algunos pacientes también se ha sugerido la existencia de un defecto en la eliminación de material celular residual como consecuencia de la propia enfermedad, pues parecería que los autoAc de los pacientes con LES podrían actuar opsonizando las células apoptóticas y bloqueando su lavado por parte de los macrófagos (16).

B. Mimetismo viral

Durante el desarrollo inmunológico de las células T, se lleva a cabo una correcta diferenciación, mediante procesos de selección positiva y negativa, de los linfocitos normofuncionantes, sobre los que se favorece una rápida expansión, respecto aquellos que detectan Ag propios, en los que se condiciona su consiguiente destrucción. Si bien la diferenciación homo/hetero es sencilla en términos de epítomos proteicos, sacarídicos y lipídicos, a nivel de los ácidos nucleicos resulta mucha más complicada debido al elevado grado de conservación entre especies. El reconocimiento inmunológico viral se centra en sus componentes nucleicos, siendo estos los agentes más potentes de inmuoestimulación, obligando evolutivamente al secuestro de estas partículas a compartimentos fuera del alcance de los sensores de detección de ácidos nucleicos virales, y por lo tanto, relegando su presencia a los núcleos celulares. La afectación de los mecanismos previamente descritos llevaría al reconocimiento en compartimentos extracelulares de epítomos nucleicos conservados por parte de los sensores de detección de material viral en las CPAs (17). Los Toll-like receptores (TLR), con su papel en la detección de ácidos nucleicos, constituyen uno de los receptores de inmunidad innata más ampliamente expresados, reconociéndose su creciente papel en los procesos de autoinmunidad (18). En los pacientes con LES, las partículas nucleares son pues reconocidas como componentes virales desencadenando inmunidad antiviral. Así, los inmunocomplejos (IC) formados por DNA-Ac anti-DNA han demostrado por un lado estimular la producción de autoAc a través de los TLR-7 y 9 (19,20) y por otro, estimular en células dendríticas plasmocitoides (pDC) humanas, la producción de grandes cantidades de interferón- α (INF- α) (20,21). La firma génica del INF- α estimula múltiples genes con efecto antiviral, al igual que ciertas citoquinas pro-inflamatorias, como la CXCL10 o CXCL5, que justifica la sintomatología general común compartida entre el LES y los procesos infecciosos virales como las fiebre, artralgias, mialgias y fatiga (21). Por otro lado, la firma INF- α ha estado ampliamente descrita como distintiva en los

pacientes con LES (22), demostrando su correlación con el grado de actividad de la enfermedad, así como con los niveles de Ac anti-DNA (23). De este modo, eventos que supongan una inducción de la vía del INF- α , como las infecciones virales o los rayos ultravioletas (UV), son reconocidos estímulos para la activación de la enfermedad.

C. Proliferación linfocítica aberrante

Las pDCs y los linfocitos B tienen la capacidad de procesar antígenos y presentarlos a las células T. Una vez activadas, estas células migran a la sangre y tejidos para mantener la actividad inflamatoria. Si bien las pDCs tienen una vida útil limitada, la activación persistente por RNA y DNA endógenos, a través de los TLR 7 y 9, favorece su supervivencia, a la vez que termina condicionando un viraje en la respuesta inmunológica de la inmuno-tolerancia y anergia linfocitaria a la autoreactividad (24). Por otro lado, los mismos IC con Ac antiDNA y los residuos celulares apoptóticos actuarían como grandes inductores en la producción de INF- α por parte de estas pDCs (25–27). Se considera la vía del INF- α un importante promotor de la diferenciación de las células B en pDCs secretoras de autoAc (28) pudiendo también inducir la producción de factores de supervivencia de células B como el BAFF (29). Todo ello conduciría a la existencia de circuitos de retro-estimulación positiva donde la producción de AutoAc por parte de células B auto-reactivas podrían estimular una mayor producción de INF- α por parte de las pDCs, que a su vez conduciría a la promoción de la supervivencia de las células B, su activación y su diferenciación (20) perpetuando el proceso autoinmunitario. Ya se ha descrito previamente la relevancia de esta vía del INF en los pacientes con LES, señalándose como un marcador de severidad de la enfermedad, especialmente relacionándose con la afectación renal (30). Además, hay que sumar el hecho que los autoAc lúpicos confieren cierta resistencia a la actividad anti-inflamatoria de los glucocorticoides (GC) sobre las pDCs, no reduciendo pues de forma significativa la

producción de INF- α (31) además de inducir cierta resistencia al estímulo apoptótico (32). Finalmente, todo ello conduciría a una activación persistente de las pDCs activadas que actuarían como amplificador inflamatorio en los pacientes con LES. La hiperproducción de autoAc así como la infiltración por células inflamatorias será causa secundaria de daño renal a través de múltiples vías.

D. Estímulos ambientales

La naturaleza multifactorial de los factores de riesgo genéticos y la baja prevalencia de la enfermedad ponen de manifiesto la importancia que los factores ambientales o la interacción genético-ambiental puede presentar en el desarrollo del LES (33). Pese a la inexistencia de unos factores ambientales claramente definidos para el desarrollo de esta enfermedad, muchos desencadenantes ambientales han sido estudiados, no obstante los estudios epidemiológicos sólo han aportado evidencia suficiente en el caso del polvo de sílice, el tabaco, el virus Epstein-Barr (VEB) y los rayos UV. Hasta el momento no se han descrito factores ambientales de riesgo específicos para el desarrollo de la NL.

Un trabajo realizado por el *National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop* etiqueta la contribución del polvo de sílice en el desarrollo de la enfermedad como "segura" con un riesgo relativo (RR) variable entre 1.6 - 4.9 en población general en función del grado de exposición y > 10 en poblaciones elevadamente expuestas (p.ejem silicosis) (34). El mismo informe etiqueta como "probable" el grado de causalidad debida al tabaco (34). Un meta-análisis encontró en RR en los fumadores respecto a los no fumadores de 1.5 (IC 95%: 1.09 - 2.08), pero ausente para los ex-fumadores (0.98; IC 95%: 0.75 - 1.27) (35). Un análisis posterior, no obstante, describió un OR entre ex-fumadores y no fumadores de 1.8 (IC 95%: 1.15 - 2.83) (36).

Por otro lado, la relación entre los agentes infecciosos como factores desencadenantes de la enfermedad también se halla ampliamente descrita (37), siendo el VEB el que reúne mayor evidencia al respecto. La estructura molecular del VEB presenta reacción cruzada, por mimetismo, generando una respuesta humoral autoinmunitaria lupus-like favoreciendo la producción de autoAc, especialmente anti-Sm y anti-Ro (38). Además, los estudios de seroprevalencia demuestran una mayor tasa de IgG anti-antígeno de la cápsida viral (VCA) (OR 2.08; 95% IC 1.15 – 3.76, $p = 0.007$) entre los pacientes con LES respecto a los controles (39). Los anti-antígenos precoces (EA)/D IgG y los anti-VCA también presentaban mayor prevalencia en los pacientes con LES en comparación con los controles (OR 4.5; 95% CI 3.00–11.06 y OR 5.05 (95% CI 1.95–13.13) respectivamente) (39).

La luz UV es otro factor ampliamente descrito como desencadenante del LES pudiendo inducir brotes de la enfermedad o actuando como factor de debut de la misma (40), con un potencial inductor dosis dependiente (41). La exposición a elevadas dosis de UVB promueve la apoptosis proinflamatoria y necrosis de los queratinocitos, con la producción de citoquinas inflamatorias que se acompaña de la exposición y liberación de autoAg (41).

Los fármacos son otro gran grupo de agentes inductores. Así se ha descrito la aparición de manifestaciones lupus-like en individuos predispuestos con la administración de procainamida (42), hidralazina (43) o anti-TNF (44).

1.1.2.2. Mecanismos intra-renales de la NL

A. Inflamación mediada por IC

La activación inespecífica que tiene lugar a nivel de los linfocitos B conlleva la expansión policlonal de los mismos con la secreción concomitante de autoAc que darán lugar a la

formación de IC. El mecanismo a través del cual los IC darán lugar a la lesión renal no está completamente dilucidado, existiendo varios postulados, siendo probablemente el proceso final una combinación de estos. Entre los mecanismos descritos se halla: (1) el depósito de IC preformados a nivel renal, (2) la unión de los Ac a Ag depositados previamente a nivel renal y (3) la unión directa y cruzada a Ag presentes en la superficie de la células renales.

La teoría de sembrado pasivo de IC en el riñón tiene hoy en día poca aceptación dada la incapacidad para detectar grandes cantidades de IC circulantes a nivel del plasma de pacientes con LES, no favoreciéndose por lo tanto su depósito en las membranas de filtración (45). Por otro lado, varios estudios sugieren la significativa interacción de carga existente entre los componentes del nucleosoma/DNA circulante y los de la membrana basal glomerular, hecho que condicionaría su sembrado y permitiría su exposición a los Ac anti-DNA circulantes con la posterior formación *in situ* de los IC (46,47). La evidencia también parece señalar el amplio grado de reactividad cruzada existente entre los Ac anti-DNA y ciertos Ag renales, debido a similitudes estructurales o conformacionales con el material genético, permitiendo ensanchar el abanico de interacciones. Así, en modelos murinos se ha demostrado la inducción de proteinuria y descenso del filtrado glomerular debido a dicha reacción cruzada Ac anti-DNA/Ag renal (48). Entre los antígenos señalados como posibles dianas de reconocimientos de los Ac anti-DNA destaca la α -actinina, los proteoglicanos de Heparán sulfato, la laminina, la fibronectina y el colágeno (49–52).

Por otro lado, se ha descrito la disminución en la actividad de las DNAsa-I a nivel renal, lo cual condicionaría una reducción en la fragmentación de la cromatina y restos de material nuclear y por lo tanto se favorecería una mayor exposición de este a los Ac anti-DNA, incrementándose pues la cascada derivada de la formación de IC (53).

Los IC intrarenales depositados mediarían inflamación a través de la activación del complemento, principalmente la vía clásica (54), a la vez que mediante el reclutamiento y activación de los macrófagos (55).

B. Complemento

El sistema del complemento consta de una gran número de proteínas plasmáticas, constitutivas de la inmunidad innata, que interactúan entre sí, ejerciendo a través de distintas vías (clásica, alternativa y de las lectinas) un papel en la eliminación de los IC y la opsonización de los desechos celulares. El sistema del complemento presentaría un doble papel en la NL (Figura 1). Por un lado, los componentes iniciales del sistema del complemento (C1, C2 y C4) a través de su vía clásica de activación, parecerían ejercer un papel protector mediante la optimización del sistema de lavado de IC y desechos celulares (56), evitando el aporte constante de autoAg que nutran la maquinaria patogénica. Los pacientes con defectos homocigotos en estos componentes iniciales presentan una mayor prevalencia de AutoAc (>80%) así como una mayor predisposición a presentar enfermedades lupus-like (93% de los individuos con deficiencia de C1q, 60-65% en deficiencia de C1s-C1r, 75% en déficit de C4 y 10% en el caso del C2) (57,58). Contrario al efecto protector de la vía clásica, existe evidencia que la vía alternativa jugaría un rol clave en el desarrollo del LES. La activación a través de esta vía estimularía una cascada amplificadora que aceleraría la escisión de C3 en C3b, con liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a y la formación del complejo de ataque a membrana (C5b-9), con el consiguiente estado pro-inflamatorio y daño celular a nivel tisular (59,60). Así, se ha observado, en modelos murinos, que los defectos en las proteínas de la vía alternativa fB y fD, son protectores contra la enfermedad renal (61,62). Además, también ha podido observarse, en modelos murinos, que el bloqueo de los componentes finales del complemento, resulta en una reducción de la severidad de la

enfermedad, una demora en la aparición de la proteinuria, una mejoría de los cambios histopatológicos y un incremento de la supervivencia (60,63).

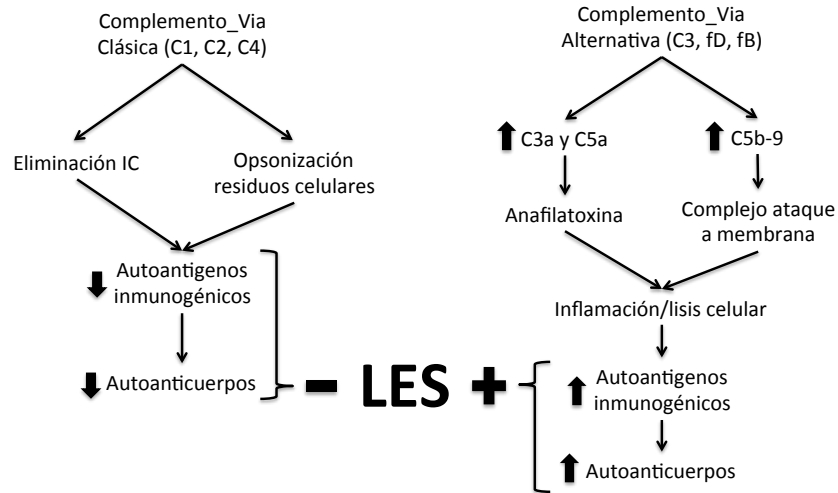


Figura 1: Vías de actuación de la fracción clásica y alternativa del sistema de complemento sobre la patogenia del LES. Mientras que la vía clásica de activación del sistema del complemento parecería ejercer un efecto protector sobre el desarrollo del LES, la vía alternativa ejercería un papel favorecedor.

C. Receptores FC y TLR:

Otro mecanismo patogénico de los IC es a través de la activación de los receptores Fc-gamma ($Fc\gamma R$ s) mediante la unión a la región Fc de la IgG. Dicha interacción a nivel de las células del sistema inmune resulta en un rápido lavado de los antígenos extraños, pero también contribuye al daño tisular autoinmunitario en las enfermedades mediadas por IC (64). Los $Fc\gamma R$ s actúan como vínculo entre la inmunidad Ag-específica mediada por Ac y la respuesta celular inespecífica del sistema inmunitario innato.

Por un lado se ha mostrado que el lavado hepático de IC ligado a $Fc\gamma R$ s resulta menos eficiente en los pacientes con LES activo (65). Por otro lado, ciertos polimorfismos alélicos afectarían al grado de afinidad de los $Fc\gamma R$ s a la IgG y por lo tanto, contribuirían en su capacidad de lavado de IC, aportando cierto grado de susceptibilidad innata hacia

las enfermedades mediadas por IC en los casos de escasa afinidad. Así la variante de "baja afinidad" FcRIIa-R131 se ha asociado con LES, especialmente en los afro-americanos, y la FcRIIIa-F176 en caucásicos y otros grupos étnicos (66).

También los Fc γ Rs muestran una asociación importante con los TLRs, pues estos últimos se hallarían relegados en vesículas endosomales a nivel de los linfocitos B y pDCs y no sería sin la acción de los Fc γ Rs que los IC serían capaces de acceder a dichos endosomas donde estimularían TLR relevantes, principalmente TLR 7 y 9, con la posterior activación de factores de transcripción y la producción de INF- α , perpetuando así el proceso autoinmunitario (67,68).

D. Células inmunitarias:

Una vez formados los IC y depositados a nivel renal se inicia todo un seguido de interacciones entre las células residentes en el riñón y las células inflamatorias que promueven el daño tisular.

Las células T juegan un papel central en la patogénesis del LES y la NL, a través de la amplificación de la inflamación mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias (69,70), ayudando a las células B en la producción de autoAc y modulando la expansión y función de los linfocitos T helper. Además, las células T infiltran el tejido renal lesionando las células renales ya sea a través de su acción directa citotóxica o indirectamente a través del reclutamiento y activación de macrófagos, células dendríticas y células Natural killer (71).

Las células B conducen la patogenia de la enfermedad a través principalmente de la continua producción de AutoAc. En individuos normales, las células secretoras de Ac se encuentran predominantemente en la médula ósea y órganos linfoides, debido a la presencia de factores de supervivencia (72). En el tejido renal inflamado la persistencia

de las células productoras de Ac parece equipararse a la presente a nivel de la médula ósea, favoreciendo la producción local de AutoAc e IC con la consiguiente promoción del daño renal (73).

Los neutrófilos se encargan de la lucha contra patógenos a través de la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), formadas por la externalización de cromatina y fibras forradas de péptidos antimicrobianos (74). Dada la génesis de Ac contra la cromatina y las proteínas de los neutrófilos, componentes principales de las NETs, la NETosis puede considerarse un mecanismo de propagación a la inflamación en los pacientes con LES a través de la exposición de Ag intracelulares. Simultáneamente, los NETs contribuyen al daño renal al tratarse de potentes activadores del complemento y estimuladores de la producción de INF- α por parte de pCDs (75). Defectos en la degradación de los NETs, dada la presencia de inhibidores de la DNAsa-I, principal metabolizador de los NETs, conducen a una mayor activación del complemento, mayor exposición a Ag y mayor formación de autoAc anti-NET creando un círculo vicioso de inflamación (76). Así la correlación entre la NL y el grado de defectos a nivel de la NETosis ya ha estado ampliamente descrita (77).

Los monocito/macrófagos tienen un papel importante en el daño renal dada la correlación entre el grado de proliferación macrofágica y la severidad del daño (78). Estudios de microarrays para monitorizar el perfil de expresión génica a nivel de tejido glomerular de pacientes con NL han demostrado la presencia de un clúster de activación presente en las células de estirpe mieloide activadas con especial énfasis en el subtipo macrofágico mostrando correlación con el IA (79). Por otro lado, la expresión de las proteínas macrofágicas MRP-8 y 14 parecen correlacionarse con el grado de severidad del proceso inflamatorio a nivel glomerular asociándose a formas altamente proliferativas (80). Hasta tal punto se ha considerado el papel de los monocitos/macrófagos en la promoción de la inflamación a nivel renal que incluso se ha considerado destacar su presencia en el desarrollo de nuevos índices histológicos dado su valor pronóstico (81,82).

E. Alteración de los sistemas de reparación renal

Los distintos compartimentos funcionales a nivel renal se hallan estabilizados por el mesénquima. El daño tisular a nivel renal activa la respuesta de reparación por parte de las células mesenquimales que termina conduciendo al daño renal, siendo la sustitución del tejido sano por tejido fibroso la última etapa de dicho daño conocida como glomeruloesclerosis (83). Factores como el Factor de necrosis tumoral- β (TGF- β) (84) o el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (85) están ampliamente relacionados con la promoción de la fibrosis, encontrándose su producción incrementada en los procesos inflamatorios como es el caso de la NL (86,87). El uso de suero anti-TGF- β en modelos murinos de glomerulonefritis ha demostrado atenuar el acúmulo de matriz extracelular (84) evitando la pérdida de función del órgano. En el caso del PDGF, implicado en la proliferación celular y el acúmulo de matriz extracelular, sus niveles de expresión se han correlacionado con el grado de lesión glomerular en los pacientes con LES (87). El uso de inhibidores del PDGF ha demostrado en modelos murinos de NL una reducción de las manifestaciones renales y un aumento de la supervivencia (25).

1.2 Diagnóstico

Debido a su expresión clínica polimorfa y a sus características epidemiológicas, se han establecido unos criterios clínicos y serológicos para la clasificación del LES. Actualmente, son los criterios clasificatorios revisados de la *American College of Rheumatology* (ACR) de 1997 los más usados (Anexo 1) (88). No obstante, a lo largo del tiempo se ha intentado redefinir las variables de clasificación en un intento de suplir los déficits existentes (89). De este modo, en el año 2012 el *Systemic Lupus International Collaboration Clinics* (SLICC), elaboró un nuevo sistema de clasificación (Anexo 2) (89). Para los pacientes adultos, la presencia de 4 de 11 criterios ACR'97 parece aportar una sensibilidad del 89.6% y una especificidad del 98.1% para

la clasificación del LES, mientras que los criterios SLICC'12, muestran valores de sensibilidad del 94.6% y especificidad del 95.5%, siendo posible la clasificación con solo dos criterios ante presencia de inmunidad positiva (ANAs y/o anti-DNA) y biopsia renal compatible con NL (90).

En cuanto a la afectación renal en el LES, la glomerulonefritis es la forma más común de afectación, si bien suele a menudo encontrarse conjuntamente con cierto grado de afectación tubulo-intersticial y/o daño vascular (angiopatía trombótica secundaria al síndrome antifosfolípido).

1.2.1 Presentación clínica

Sólo un 25-50% de los pacientes presentan afectación renal al inicio de la enfermedad, no obstante hasta el 60% de los adultos o 80% de los niños desarrollaran alteración a dicho nivel durante el curso de la misma (91). En la mayoría de ocasiones la afectación es asintomática destacando hallazgos patológicos a través del examen de orina (92), motivo por el cual se recomienda el análisis periódico de orina durante el seguimiento. Las principales características clínicas y de laboratorio observadas en la afectación renal en el LES se citan en la Tabla 1.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas en los pacientes con NL (91,92)

Manifestaciones	Prevalencia (%)
Proteinuria	100
Síndrome nefrótico	45 - 65
Cilindros granulares	30
Cilindros hemáticos	10 - 30
Hematuria microscópica	33 - 80
Hematuria macroscópica	1 - 5
Deterioro de la función renal	40 - 80
Deterioro rápidamente progresivo	15 - 30
Hipertensión	15 - 50
Hiperpotasemia	15
Alteraciones tubulares	60 - 80

La proteinuria se considera la característica principal, tendiendo a incrementarse a medida que progresa la clase de NL y llegando en muchos casos a rango nefrótico (> 3.5gr/día) (93). Este rango de proteinuria habitualmente causa síndrome nefrótico donde se incluye hipoalbuminemia, hiperlipidemia y edemas. La hematuria microscópica es prácticamente constante, rara en rango macroscópico. En situación de insuficiencia renal no deben menostenerse las múltiples causas coincidentes en los pacientes como los tratamiento nefrotóxicos así como la posible existencia de un componente prerenal o postrenal. Las formas rápidamente progresivas ocurren en una baja pero considerable fracción de pacientes. Finalmente, el deterioro renal crónico tiene lugar debido al daño acumulativo con la consiguiente pérdida de nefronas, conduciendo en última instancia a la pérdida de la función del órgano.

1.2.2 Marcadores analíticos habituales de actividad de la enfermedad

Los marcadores usados actualmente para la evaluación del grado de actividad biológica y/o bioquímica de la enfermedad se pueden diferenciar, según su procedencia, en serológicos o urinarios.

1.2.2.1 Marcadores serológicos:

A. Tasa Filtrado Glomerular estimado (TFGe): Hoy en día, la TFGe es la técnica usada para la estimación, evaluación y seguimiento de la función renal y está recomendando por las principales organizaciones (94). Esta estimación se suele realizar mediante la ecuación de Cockcroft-Gault o la *Modification Diet in Renal Diseases*

(MDRD), las cuales incluyen la edad, el peso, el sexo y los niveles de creatinina sérica en el caso de la primera y además la superficie corporal y la raza en la segunda.

La creatinina, aminoácido de síntesis en el tejido muscular, es el marcador endógeno usado para su estimación. Esta es tanto secretada a nivel de túbulo proximal como a través de filtración glomerular y sus niveles séricos vienen determinados tanto por el índice de masa muscular como por la ingesta alimenticia lo que justifica las variaciones de los niveles observadas entre gente de distintas edades, geografías, etnias y razas (95,96). También puede tener lugar una eliminación extrarrenal de la creatinina a nivel del tracto intestinal, por degradación bacteriana de la creatinina contenida en las secreciones (97), sólo significativa en individuos con baja TFGe. Por todo ello, la relación entre los niveles de creatinina y la TFGe puede variar en un mismo individuo a lo largo del tiempo, requiriendo pues la realización de más de una determinación para la obtención de una referencia más fidedigna de la verdadera TFG (94).

B. Niveles del complemento: La actividad del sistema del complemento es un factor crucial en la génesis del daño tisular y renal en el LES. Durante la actividad de la enfermedad los niveles de C3 y C4 son consumidos, sugiriendo la existencia de una correlación inversa entre estos niveles y el grado de actividad de la misma. Algún estudio demuestra que los niveles de C3 son más sensibles y específicos como marcadores de actividad de la enfermedad (98). Sin embargo, otros parecen indicar una mayor capacidad de predicción de los niveles bajos de C4 respecto a los de C3 (99). Si bien su utilidad continua siendo de uso rutinario en la práctica clínica diaria para la monitorización de la enfermedad (100), son múltiples los estudios que concuerdan en señalar los niveles séricos del complemento como un mal indicador de actividad (101,102).

C. Anticuerpos anti C1q: Se ha descrito toda una serie de Ac con capacidad para unir con alta afinidad proteínas del complemento. En el LES el anticuerpo más importante contra proteínas del complemento es el anti-C1q que se ha descrito en alrededor de un tercio de los pacientes (103,104), siendo dicha prevalencia significativamente mayor en el grupo de pacientes afectados de NL (65% v 32%, RR = 2.0 (95% CI, 1.4 - 2.9); $p < 0.001$) especialmente con su forma activa (74% v 32%, RR = 2.3 (95% CI, 1.6 - 3.3); $p < 0.0001$) (105). Estos Ac se han correlacionado con el grado de actividad de la enfermedad así como con la presencia de hipocomplementemia y elevados niveles de anti-DNA (104,106). En el caso de pacientes afectados de NL, su presencia se ha asociado con el grado de proteinuria (107), así como con una peor evolución y un mayor grado de manifestaciones túbulo-intersticiales a nivel histológico (108). La presencia de Ac contra la región collagen-like del C1q (Ac-antiC1qCLR) a nivel glomerular ponen en evidencia el valor patogénico de estos anticuerpos en el desarrollo de las formas proliferativas de NL (109). Además, en la recurrencia del brote renal los niveles de Ac antiC1q muestran elevaciones significativas hasta en el 50% de los pacientes a partir del 6o-2o mes precedente al brote (110,111) y desapareciendo de forma posterior al tratamiento (112). Si bien el valor predictivo positivo (VPP) para el diagnóstico de la NL es de alrededor del 30%, algunos estudios han destacado su importancia en relación a valores predictivos negativos (VPN) cercanos al 100% (105).

D. Anticuerpos anti-DNAs: Los Ac anti-DNA son uno de los Ac más estudiados. Su determinación se realiza a través de múltiples técnicas como el método de inmunofluorescencia directa en *Crithidia luciliae*, radioinmunoanálisis, inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA) y el método de *Farr*, siendo este último el que parece aportar mayor sensibilidad (113). La prevalencia de estos Ac en los pacientes con LES, en función del método usado, se ha descrito del 40-90% (114), siendo mayor en aquellos pacientes con afectación renal (115). Dada la aparente correlación descrita entre

sus niveles y el curso de la enfermedad se ha deducido su rol como factor patogénico (114). Su claro papel pivotal en la enfermedad ha llevado a estos Ac a establecerse como un criterio clasificatorio de ésta. Se han descrito valores de sensibilidad de hasta el 87% y especificidad del 93% para el diagnóstico de NL (116). Además, su presencia parece avanzarse varios años al inicio de la enfermedad clínica (117).

Son muchas las discrepancias aun hoy día existentes sobre la capacidad de estos Ac en predecir la aparición de brotes de la enfermedad, y así mientras que algunos autores dan poco soporte al uso rutinario de los mismos para monitorizar el curso de la enfermedad (118,119) debido a la ausencia de variaciones significativas en sus niveles séricos, otros parecen mostrar una clara correlación serológica con un incremento rápido y precedente de los mismos (113) sugiriendo su curso como una potencial guía en la indicación de tratamiento inmunosupresor (IS) (120), y apreciándose de forma posterior al inicio del mismo su decrecimiento (120). A pesar de dichas discrepancias, la guías de la totalidad de sociedades recomiendan su determinación periódica en el seguimiento de los pacientes como marcador de riesgo de nuevos picos de actividad, especialmente si se acompañan de otros indicadores como el descenso del C3 (121). Algunos estudios también parecen mostrar una clara correlación entre los niveles de estos y el tipo y severidad de la afectación renal, siendo su presencia significativamente mayor en las formas proliferativas difusas (122,123). Sin embargo, otros estudios fallaron en demostrar dicha correlación (124). Finalmente, también se les ha atribuido cierto valor pronóstico pues se ha correlacionado sus niveles con el riesgo de progresión de enfermedad renal terminal (ERT) (125,126).

1.2.2.2 Marcadores urinarios:

A. Sedimento: En la mayoría de los casos de afectación renal el sedimento urinario muestra algún hallazgo. Estudios descriptivos en pacientes con nefritis describen

hematuria microscópica en el 33 - 78% de los casos, cuerpos grasos en 33 - 48%, cilindros celulares en un 34 - 40% y proteinuria > 1gr/24 en el 26 - 87% (127). Si bien se trata de un método de laboratorio sencillo, no invasivo y económico, la ausencia de precisión en su determinación y la baja reproductibilidad del método puede conducir a errores diagnósticos, tratamientos imprecisos e investigaciones innecesarias (128). Por otro lado, algunas alteraciones del sedimento pueden deberse a la técnica o tiempo de procesado de la muestra, sin ser claramente una representación cuantitativa del grado de afectación renal (129). No obstante, la ACR recomienda el uso del sedimento urinario para valorar la respuesta al tratamiento. Según el comité la mejoría se define como el cambio de sedimento activo a inactivo (≤ 5 hematíes, ≤ 5 leucocitos y ausencia de cilindros hemáticos o leucocitarios). Por otro lado, el empeoramiento se define en pacientes con sedimento activo cuando previamente era inactivo y en los que se descarta causa alternativa. El sedimento activo se define como la presencia de > 5 hematíes y > 5 leucocitos por campo de altos aumentos i/o presencia de cilindros celulares previamente inexistentes (130), en ausencia de infección urinaria, de menstruación en la mujer o otras patologías urogenitales. Otros autores sugieren la presencia de cilindros celulares como uno de los mayores predictores de recidiva renal, especialmente en aquellos pacientes con proteinuria > 1gr/24h (127). Y si bien los hallazgos histológicos relevantes son más frecuentes ante la presencia de proteinuria, la biopsia puede considerarse en casos de hematuria glomerular o leucocituria aislada persistente (tras exclusión de otras causas como infecciones o fármacos) (131,132).

B. Proteínas: La excreción urinaria de proteínas puede hallarse aumentada en la enfermedad glomerular y/o tubular y es reflejo de actividad y/o daño renal. Si bien la medida de proteínas en 24h se ha considerado como la técnica *gold standard*, debido a su escasa practicidad su uso ha sido sustituido por el ratio proteínas/creatinina (P/C) en determinación aislada en la primera orina de la mañana, debido a la correlación existente,

sobretudo en el rango de 300 – 3499 mg de proteinuria diaria (133–135), ampliamente aceptada por la *Sociedad Americana de Diabetes* y por *National Kidney Foundation* como técnica diagnóstica (136,137) y validada también en pacientes con NL (138).

La ACR y la *Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association* (EULAR/ERA-EDTA) recomienda la realización de biopsia renal ante niveles de proteinuria > 500mg/día persistente o un ratio P/C > 0.5, de forma especial ante presencia de hematuria glomerular así como de cilindros celulares (139,140).

1.2.3 Biopsia renal

Finalmente, la técnica definitiva y "*gold standard*" para el diagnóstico de la NL es la evaluación histológica del tejido renal a través de la biopsia renal. La biopsia renal es de realización obligada, excepto en casos contraindicados, en todos aquellos pacientes con LES y evidencia clínica o de laboratorio de afectación renal como deterioro de la función renal, proteinuria y sedimento activo con tal de poder establecer un correcto diagnóstico y determinar el subtipo histológico de afectación renal. La biopsia renal es importante dado que la presentación clínica, si bien suele mostrar cierta grado de correlación, no siempre refleja detalladamente los hallazgos histológicos (141). Por otro lado, la correlación entre las alteraciones histológicas y el pronóstico en cuanto a supervivencia del órgano ha estado ampliamente descrito en múltiples estudios (142–146).

Como ya se ha comentado anteriormente las indicaciones de biopsia renal son la presencia de proteinuria confirmada de $\geq 500\text{mg}/24\text{h}$ o coeficiente P/C en muestra matutina de ≥ 0.5 con o sin sedimento activo o presencia de deterioro inexplicable de la función renal (139,140).

1.2.3.1 Clasificación histológica de la NL

Con la introducción de la biopsia renal en 1950 y la aplicación de la inmunofluorescencia (IF) en 1960 ha habido una gran mejoría en la comprensión de los mecanismos inmunológicos de daño renal. En 1974 se generó el primer sistema de clasificación de la *World Health Organization* (WHO) (147), centrado solo en las lesiones glomerulares. En 1982 este sistema fue modificado por la *International Study of Kidney Disease in Children* que introdujo entre otras la subdivisión de las categorías III y IV en base a la presencia de lesiones activas, crónicas o ambas (148) y nuevamente en 1995 (142). Finalmente en 2004 la *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society* (ISN/RPS) propuso un nuevo sistema de clasificación con los nuevos conocimientos acumulados desde entonces, con la intención de eliminar las ambigüedades del sistema original de la WHO (149). La ACR y EULAR/ERA-EDTA (139,140) recomienda usar dicho sistema de clasificación de la ISN/RPS (Tabla 2) (149,150) con la determinación de los índices de actividad (IA) y cronicidad (ICr) (Tabla 3) así como los cambios túbulo-intersticiales y patología vascular asociada.

Tabla 2. Clasificación de la NL según ISN/RPS (2003)

Clase I. Nefritis lúpica mesangial mínima: Glomérulos normales en la microscopía óptica, con mínimos depósitos mesangiales en la IF.

Clase II. Nefritis lúpica proliferativa mesangial: Hiper celularidad y expansión mesangial leve en la microscopía óptica, con depósitos mesangiales en la IF; puede haber depósitos subepiteliales o subendoteliales en la IF o la microscopía electrónica.

Clase III. Nefritis lúpica focal: Lesiones en >50% de los glomérulos con lesiones de tipo endocapilar o extracapilar, con depósitos subendoteliales, con o sin afectación del mesangio. Pueden existir lesiones activas (A) o crónicas (C), por lo que se subdividen en:

-**Clase III (A):** lesiones activas (nefritis lúpica proliferativa focal).

-**Clase III (A/C):** lesiones activas y crónicas (nefritis lúpica proliferativa focal y esclerosante).

-**Clase III (C):** lesiones crónicas inactivas con cicatrices (nefritis lúpica esclerosante focal).

Clase IV. Nefritis lúpica difusa: lesiones en $\geq 50\%$ de los glomérulos, con depósitos difusos subendoteliales, con o sin alteraciones mesangiales. Pueden tener lesiones A o C. Además, las lesiones pueden ser segmentarias (S: cuando $\geq 50\%$ de los glomérulos afectados tienen menos de la mitad del ovillo con lesiones) o globales (G: cuando $\geq 50\%$ de los glomérulos afectados tienen más de la mitad del ovillo con lesiones). En esta clase se incluyen los depósitos en "asa de alambre". Se subdividen en:

-**Clase IV-S (A):** lesiones segmentarias activas (nefritis lúpica proliferativa segmentaria difusa).

-**Clase IV-G (A):** lesiones globales activas (nefritis lúpica proliferativa global difusa).

-**Clase IV-S (A/C):** lesiones segmentarias activas y crónicas (nefritis lúpica esclerosante y proliferativa segmentaria difusa).

-**Clase IV-G (A/C):** lesiones globales activas y crónicas (nefritis lúpica esclerosante y proliferativa global difusa).

-**Clase IV-S (C):** lesiones segmentarias crónicas (nefritis lúpica esclerosante segmentaria difusa).

-**Clase IV-G (C):** lesiones globales crónicas (nefritis lúpica esclerosante global difusa).

Clase V. Nefritis lúpica membranosa: engrosamiento de la membrana basal glomerular con depósitos inmunes de forma global o segmentaria en la vertiente subepitelial de la membrana basal; se puede asociar con expansión mesangial. Puede aparecer en combinación con las clases III o IV. También puede tener un avanzado grado de esclerosis. Muy similar a las formas idiopáticas en las fases iniciales.

Clase VI. Nefritis lúpica esclerosada: con afectación de más del 90% de los glomérulos, sin actividad residual.

Se considera adecuada aquella muestra con $\geq 8-10$ glomérulos para poder excluir de forma razonable lesiones focales, recomendándose examinar bajo microscopía óptica con hematoxilina-eosina, tinción de PAS (periodic acid-Schiff), tricrómico de Masson y tinción de plata (149,151). La inmunofluorescencia (IF) o inmunohistoquímica se requieren para una evaluación completa incluyendo tinción para IgG, IgM e IgA, cadenas ligeras κ y λ y los componentes del complemento C3 y C1q (149,152). Los depósitos glomerulares atribuidos al LES detectados por IF casi siempre contienen predominancia de depósitos policlonales IgG, así como C3 y en la mayoría de casos C1q, con codepósitos variables de IgA y IgM. En caso de restringirse los depósitos de Ig's a IgA y IgM deberían considerarse conjuntamente con las variables clínicas y analíticas otras posibilidades diagnósticas aparte del LES. La microscopía electrónica tiene un papel destacado en determinadas situaciones aportando información que impacta de forma directa en el manejo de los pacientes y por tanto debería realizarse si disponible (141).

Tabla 3. Índices de actividad y cronicidad**Lesiones activas^a***- Glomerulares*

1. Hipercelularidad endocapilar con o sin infiltración leucocitaria y disminución de luces capilares
2. Cariorrexis y necrosis fibrinoide
3. Semilunas celulares
4. Trombos hialinos (agregados intraluminales inmunes) y «asas de alambre» (depósitos subendoteliales en microscopia óptica)
5. Infiltración leucocitaria glomerular o rotura de la membrana basal glomerular

- Túbulo-intersticiales

1. Infiltración células mononucleares

Lesiones crónicas^b*- Glomerulares*

1. Esclerosis glomerular (segmentaria o global)
2. Semilunas celulares

- Túbulo-intersticiales

1. Fibrosis intersticial
2. Atrofia tubular

^a Actividad: cada variable se puntúa de 0 a 3+. La necrosis fibrinoide y las semilunas pueden alcanzar 6 puntos cada una de ellas. Máxima puntuación: 24.

^b Cronicidad: cada variable se puntúa de 0 a 3+. Máxima puntuación: 12.

1.3 Tratamiento

El objetivo del tratamiento en la NL es conseguir una remisión completa y así evitar el desarrollo de insuficiencia renal crónica (IRC) y secundariamente la progresión a enfermedad renal terminal (ERT). Actualmente el tratamiento inmunosupresor solo está indicado para las formas proliferativas, NL tipo III y tipo IV, así como para las formas membranosas puras, NL tipo V. En la NL tipo I y tipo VI solo las manifestaciones extrarenales son indicación de tratamiento inmunosupresor (139).

Las pautas actuales de tratamiento de las formas proliferativas se basan en una fase inicial de inducción a la remisión de 6 meses, seguida de una fase de mantenimiento de por lo menos 1 - 2 años. Como pauta de inducción se recomienda, tras los resultados publicados por el estudio ALMS (153), junto a los pulsos de metilprednisolona y posterior pauta decreciente de

prednisona oral, el uso de Micofenolato mofetilo (MMF) a la dosis de 2gr/día o pulsos endovenosos de Ciclofosfamida (CYC) durante un período de 6 meses. Se han descrito dos pautas de CYC (154), la inicial de altas dosis de CYC (protocolo "NIH") consistente en 0.5 - 1gr/m² al mes durante 6 meses o la pauta de bajas dosis "Euro-Lupus" consistente en 500mg de CYC cada 15 días hasta completar un total de 6 infusiones con resultados equiparables, por lo menos en caucásicos y asiáticos (155,156). La mejor tolerancia y la menor presencia de efectos secundarios y toxicidad hacen del MMF el tratamiento de elección en la mayoría de pacientes (157). Además, los pacientes Afro-americanos o Hispanos parecen presentar menor grado de respuesta al tratamiento con CYC endovenosa que los pacientes Caucásico o Asiáticos, siendo también el MMF la pauta de primera elección (158,159). Como tratamiento de mantenimiento se recomienda en el momento actual el uso de MMF (160), quedando otros regímenes, basados en el uso de Azatioprina, anti-calcineurnicos o CYC, relegados a consideraciones especiales (160,161). En los casos de NL tipo V con presencia de proteinuria en rango nefrótico se recomienda el uso de tratamiento con prednisona en asociación a MMF (140), dados resultados equivalentes con CYC y mejor perfil de seguridad (162). Para la tipo II la presencia de proteinuria persistente >1gr/día pese al tratamiento antiproteinúrico también sería considerado como indicación de corticoterapia (139).

Concomitantemente al tratamiento inmunosupresor y de forma general ante la afectación renal se recomienda control de los factores de riesgo cardiovascular, las complicaciones derivadas de la IRC así como tratamiento renoprotector ante hipertensión o proteinuria con bloqueantes del receptor de angiotensina (139). La asociación con hidroxiclороquina parece ofrecer, según resultados en ensayos epidemiológicos, resultados favorables en cuanto a respuesta al tratamiento, reducción del riesgo de recidiva y menor daño renal (163,164), por lo que su uso se recomienda según la guías internacionales (139,140), aunque no hay estudios randomizados prospectivos que lo avalen.

1.4 Pronóstico

A pesar de los avances en nefrología y en el tratamiento de la NL, así como la mejoría en el conocimiento patogénico de la enfermedad, parece que el progreso a ERT así como la mortalidad derivada de la misma no han mostrado ninguna mejoría en la última década (165), si bien es verdad que los avances en el tratamiento, con la introducción de los GC y los inmunosupresores, ha establecido un cambio significativo en el curso de la enfermedad aportando mejoras destacables a la inicial expectativa de supervivencia del 50% a los 4 años (166). De este modo, los valores actuales de supervivencia global a los 10 años en los pacientes afectos de NL son de alrededor del 88-94% (167,168), ligeramente inferior a los pacientes sin afectación renal. En cuanto a la frecuencia de ERT se estima del 3.7 - 10.8% (167,169) del global de pacientes, con incidencias acumuladas a los 5 y 10 años del 3.3 y 4.3% respectivamente (167), describiéndose mayor proporción de afectación renal (x2.2) y de enfermedad renal terminal (x3.4) en pacientes de raza negra (169).

Según las la EULAR-ERA/EDTA hasta un 10 - 30% de los pacientes con NL progresarán a ERT a los 15 años tras el diagnóstico (139), requiriéndose terapias de sustitución renal. A pesar, de la supuesta contraindicación para el trasplante otorgada a los pacientes con LES en el pasado, hoy en día se considera un tratamiento ampliamente aceptado con resultados a largo plazo similares a los pacientes sin LES, con un riesgo de recurrencia de la enfermedad en el implante relativamente bajo, siendo las mujeres (OR 1.70, IC 95% 1.05 - 2.76) jóvenes (< 33 años)(OR 1.69, IC 95% 1.23 - 2.31) y de raza negra no Hispana (OR 1.88, IC 95% 1.37 - 2.57) las de mayor riesgo (170,171). Entre las complicaciones cabe destacar los fenómenos trombóticos, especialmente en el subtipo de pacientes con Ac antifosfolípido (172).

1.5 Nuevos Biomarcadores

Los biomarcadores convencionales usados actualmente no tienen una gran sensibilidad o especificidad anticipando los brotes de la enfermedad, en la predicción de la histología renal o en el pronóstico. Dado que el tratamiento precoz asocia mejores resultados (173), es esencial trabajar con marcadores que permitan reducir al mínimo la demora diagnóstica o la realización de un tratamiento eficaz. Por ello, en los últimos años ha habido un interés creciente en el estudio y descubrimiento de posibles nuevos biomarcadores.

1.5.1 Biomarcadores de predicción de brote

Los biomarcadores tradicionales usados en la práctica clínica diaria son, como se ha indicado anteriormente, los niveles de C3 y C4 y los Ac antiDNA mostrando valores predictivos positivos en la predicción del brote renal del 28, 34 y 31%, respectivamente, con ligeros mejores resultados para los Ac antiC1q (38%) (174), considerándose insuficiente su capacidad predictiva (119). Entre los candidatos estudiados en los recientes años con capacidad predictiva de brote renal destacan:

- **Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2)**: Se trata de una quemoquina perteneciente a la familia de quimioquinas CC, la expresión de la cual se incrementaría a nivel glomerular y tubular ante circunstancias inflamatorias en relación a la severidad del proceso (175,176). Parece que puede ejercer un rol central en la migración de los leucocitos a nivel renal permitiendo la adhesión y permeabilidad en las células endoteliales así como el reclutamiento y activación macrofágica (177). Por otro lado, la presencia de albuminuria a nivel tubular parece incrementar su expresión (176). Así, los niveles urinarios de MCP-1 (uMCP-1) en pacientes con NL se han descrito superiores que en

aquellos pacientes sin nefropatía o sin actividad de la misma (178–180), correlacionándose con la severidad de esta y por lo tanto siendo sus niveles más marcados en las formas proliferativas (177,179,180). Además los niveles parecen elevarse de forma significativa de 2 a 4 meses antes de la aparición clínica del brote renal (178), y decrecer con la respuesta al tratamiento IS, persistiendo elevado en aquellos pacientes sin respuesta (177,178), sugiriendo cierto valor patogénico en el desarrollo de la enfermedad.

- **Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL):** NGAL es una proteína que participa en los procesos de inmunidad innata, mediante el secuestro de hierro para limitar el crecimiento bacteriano, presente a nivel de los neutrófilos así como en múltiples tejidos como el riñón (181). Ante lesiones renales agudas se produce una sobreexpresión de NGAL (182,183) en múltiples niveles de la nefrona mostrándose un acúmulo de proteína predominantemente en el túbulo proximal (184) donde podría jugar un papel en la re-epitelización de los túbulos dañados (183). Los niveles urinarios de NGAL (uNGAL), ajustados por creatinina, > 0.6 ng/mg creatinina han mostrado valores de sensibilidad y especificidad del 90 y 100% en la identificación de la NL en población pediátrica (185). En adultos con NL, el punto de corte de > 20 ng/mg aportó valores de sensibilidad y especificidad del 57 y 83% respectivamente (186). Los niveles de uNGAL mostraron un incremento significativa hasta tres meses antes del desarrollo del brote de NL en población pediátrica (181), y en población adulta el incremento en el ratio $\frac{\text{Fracción excreción (FE NGAL)}}{\text{FE proteínas}}$, observado entre 3 y 6 meses previo al brote, resultó un buen predictor del mismo, especialmente de tipo proteinúrico (187).
- **TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK):** TWEAK es una citoquina, de la familia de los TNF, producida mayoritariamente por monocitos y macrófagos, descrito en multitud

de procesos celulares, entre los cuales destacan su actividad inductora de la inflamación dado su papel regulador en la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión tisular (188,189). Los niveles urinarios de TWEAK (uTWEAK) se correlacionan con el renal SLEDAI score ($r = 0.405$, $p < 0.001$), elevándose durante los brotes de NL, destacando la especificidad para dicha manifestación (190). Lamentablemente, el hecho de que el incremento de los niveles uTWEAK se correlacionan con el momento del brote, hace que pierda el potencial como predictor del mismo (191).

- **Hepcidina:** La hepcidina se encarga de la regulación de la hemostasia del hierro, previniendo la movilización de los depósitos macrofágicos o la absorción intestinal. Si bien el hierro es el principal regulador, la inflamación a través de la IL-6 también media una importante regulación en su expresión (192). Un estudio sobre proteómica urinaria seriada mostró elevación significativa de la isoforma uHepcidina 20 hasta 4 meses antes del brote renal con normalización a los 4 meses tras el tratamiento, así como descenso de los niveles de uHepcidina 25 en el momento del brote con regresión a niveles normales tras el tratamiento indicando este último como un potencial marcador de respuesta (193). Posteriormente el mismo grupo describió que los niveles uHepcidin se correlacionaban con la severidad de la inflamación intersticial en los pacientes con NL pero presentaban escaso valor como marcador aislado, dada su baja especificidad (194).

1.5.2 Biomarcadores predictores de evolución

Los indicadores clásicos de progresión a insuficiencia renal crónica son la tensión arterial, la excreción urinaria de albumina, y el descenso de la TFGe (195). No obstante, a pesar de un óptimo tratamiento en muchos casos la progresión es inevitable. Disponer de marcadores predictores de dicha progresión permitiría ayudar en la toma de decisiones terapéuticas

- **Liver-type fatty acid binding protein (L-FABP):** L-FABP es un proteína de síntesis hepática o en células endoteliales del túbulo proximal y su ratio de excreción se asocia estrechamente al grado de daño renal estructural a nivel túbulo-intersticial (196). Niveles urinarios elevados de L-FAPD (uL-FAPD) se han descrito en pacientes con nefropatía diabética mostrando valor predictor en cuanto a progresión independiente del estadio renal (197,198). En la NL se ha mostrado que los niveles de uL-FABP presentan correlación con el grado de inflamación y fibrosis túbulo-intersticial con unos valores de sensibilidad y especificidad del 65 y 83% respectivamente para inflamación y del 41 y 85% para fibrosis, así como una área bajo la curva ROC de 0.75 para inflamación y de 0.6 para fibrosis (199), además de sugerirse en algún estudio cierta capacidad pronóstico en la predicción de deterioro de la función renal a los 12 meses (200,201).
- **Membrane endothelial protein C receptor (mEPCR):** Se trata de una proteína de membrana con propiedades anti-inflamatorias y anti-trombóticas, expresada en las células endoteliales (202). Los niveles de mEPCR soluble en plasma se hallan significativamente más elevados en pacientes con LES que en controles (263 ± 13 ng/mL vs. 174 ± 11 ng/mL; $p < 0.0001$), así como en aquellos con afectación renal respecto a los que no (306 ± 21 ng/mL vs. 228 ± 14 ng/mL; $p = 0.0033$) (203). A nivel histológico, la presencia tinción positiva para mEPCR en $> 25\%$ de la cortical de los capilares peritubulares distingue los pacientes con ausencia de respuesta a la pauta estándar de tratamiento respecto a aquellos con correcta respuesta, tanto a los 6 (80 vs 28%, $p = 0.0082$) como a los 12 meses (83.3 vs 33.3%; $p = 0.0116$) de su inicio, independientemente a la clase histológica, así como de los IA e ICr (204).
- **FOXP3 RNA mensajero (RNAm) urinario:** Algunos estudios han señalado la importancia del factor de transcripción FOXP3, elemento fundamental en la homeostasia de

linfocitos T reguladores (Treg), en la patogenia del LES (205). De este modo, se han descrito defectos funcionales reversible en los mecanismo supresores de los Treg en los pacientes con LES activo, asociada a una pérdida de expresión de FOXP3+, comparado con LES inactivos o controles sanos (206,207). La expresión urinaria de RNAm-FOXP3 se ha descrito incrementada en los pacientes con LES activo comparado con formas inactivas y controles, mostrando correlación al SLEDAI ($r = 0.669$, $p < 0.001$), rSLEDAI ($r = 0.735$, $p < 0.001$), la proteinuria ($r = 0.414$, $p = 0.006$) e IA ($r = 0.541$, $p = 0.009$), siendo además más marcada en los pacientes con formas proliferativas (34.6 ± 56.3 vs 2.7 ± 2.1 copias, $p = 0.019$). Además, los pacientes con ausencia de respuesta al tratamiento mostraban mayores niveles de expresión de RNAm-FOXP3 que aquellos con respuesta completa (57.6 ± 69.8 vs 2.4 ± 1.9 copias, $p = 0.02$). Debe recalarse, no obstante, que la evaluación de la respuesta se llevó a cabo a las 6 semanas, período relativamente corto (208).

- **NGAL:** Un estudio señala las propiedades de uNGAL en la predicción de remisión a través del ratio $\frac{FE\ NGAL}{FE\ proteínas}$ con valores de sensibilidad y especificidad del 87% y 62% respectivamente, para el punto de corte > 26.54 ng/mg (187)

1.5.3 Biomarcadores predictores de histología

Las características histológicas en la biopsia renal, a través del sistema de clasificación ISN/RPS y de los índices de actividad y cronicidad, sirven para determinar el grado de extensión de la afectación, el pronóstico así como la decisión de instaurar un tratamiento. Además, ciertas alteraciones histológicas, como la nefritis túbulo-intersticial activa, parecen tener importantes implicaciones pronósticas, identificando riesgo de progresión a IRC (209). Las alteraciones en el sedimento no siempre son reflejo de las características histológicas (128), resaltando la importancia de encontrar biomarcadores representativos de la histología.

- **Kidney injury molecule-1 (Kim-1)**: Se trata de una molécula transmembrana a la que se otorga un papel especial en el daño túbulo-intersticial (210). La expresión tubular de Kim-1 tiene lugar ante la existencia de daño celular y diferenciación, y los niveles urinarios (uKim-1) parecen reflejar esta expresión (210,211). Los niveles de uKim-1 parecen ser mayores en aquellos pacientes con NL activa que en ausencia de actividad (6.7 ± 0.5 vs 3.8 ± 0.9 ng/día, $p < 0.05$) correlacionándose con la severidad de la afectación histológica y con el daño tubular ($r = 0.31$, $p = 0.01$) (212), la celularidad endocapilar ($r = 0.23$, $p = 0.016$) así como con el IA ($r = 0.227$, $p = 0.018$) y la presencia de semilunas celulares ($r = 0.355$, $p < 0.001$) (213). Pese a que la NL tipo IV mostró valores mayores de uKim-1 estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (212). Además, los niveles de uKim-1 basales se correlacionaron con la TFGe ($r = 0.72$, $p = 0.005$) y los niveles de creatinina sérica ($r = 0.53$, $p = 0.005$) a los 6-8 meses de tratamiento (212), y el uso de un índice combinado con los niveles de uKim-1 y uNGAL resultó un factor predictor de mal pronóstico renal (HR: 3.954 IC 95% 1.017 - 15.374, $p = 0.047$) (213).
- **NGAL**: Los niveles de NGAL se han correlacionado con la presencia de semilunas celulares, hallazgo característico de las formas proliferativas, siendo menores en su presencia que en su ausencia (8.74 ng/ml [IQR 44.9] versus 48.5 ng/ml [IQR 64.3]; $p = 0.0033$) (213,214). Además, la excreción de NGAL ha mostrado niveles de correlación fuertes con el IA ($r = 0.73$, $p = 0.001$) y con el ICr ($r = 0.58$, $p = 0.004$) a nivel de la biopsia renal (185).
- **TWEAK**: Si bien los niveles de uTWEAK no han demostrado utilidad en el intento de diferenciar entre clases histológicas del sistema ISN/RPS (190,191), un trabajo con 20 biopsias de NL activa mostró correlación positiva significativa con el IA ($r = 0.675$, $p = 0.001$), pero no con el de cronicidad ($p = 0.278$) (215).

- **Pentraxin 3 (PTX-3)**: Las PTX son proteínas de fase aguda y por lo tanto sus niveles aumentan en situación de inflamación regulando procesos del sistema inmunitario innato, incluyendo complemento, limpieza de remanentes apoptóticos y participando en procesos de inmunotolerancia (216,217). Los niveles séricos de PTX-3 se incrementan de forma considerable en los pacientes con NL, no así en su ausencia pese a similar SLEDAI, con niveles superiores ante formas proliferativas y mostrando una correlación positiva con el IA ($r = 0.248$, $p < 0.001$), la hiper celularidad endocapilar ($r = 0.246$, $p = 0.001$) y el infiltrado leucocitario ($r = 0.191$, $p = 0.009$). A nivel de orina, los niveles de uPTX-3 también han mostrado correlación positiva con los IA ($r = 0.460$, $p = 0.002$), la presencia de semilunas celulares ($r = 0.332$, $p = 0.034$), inflamación intersticial ($r = 0.349$, $p = 0.025$), atrofia tubular ($r = 0.311$, $p = 0.001$) e infiltrado leucocitario ($r = 0.191$, $p = 0.009$) en pacientes con NL activa, siendo la inflamación intersticial el factor más significativo en el análisis de regresión múltiple ($\beta = 0.497$, $p < 0.001$) (218). Además la inmunización contra PTX-3 mediante la detección de Ac anti-PTX3 parece que podría presentar un papel protector en el desarrollo de la NL (219), describiendo ratios superiores en pacientes sin NL (40.7% vs 19.4%, $p < 0.001$) (220).

- **IFN- γ -inducible protein 10 (IP10) /CXCR3**: IP-10, también conocida como CXCL10, es una quimioquina, secretada por monocitos, fibroblastos y células endoteliales, encargada de la promoción de la migración de linfocitos T helper-1 en zonas de inflamación (221), a través de la interacción con su receptor CXCR3. Estudios han demostrado sobrerregulación de los niveles de RNAm de IP-10 y CXCR3 en células urinarias de pacientes con LES en relación a la presencia de NL tipo IV en la biopsia renal. Dicha elevación es detectada hasta 2 semanas antes de la biopsia, presentando de forma secundaria al inicio del tratamiento normalización de los mismo, con persistencia de niveles elevados en casos refractarios y, por lo tanto, estableciéndose como un posible predictor de respuesta al tratamiento (222). También se ha descrito elevación significativa de los niveles de uIP-10

en pacientes con NL, respecto a LES sin afectación renal o sin actividad ($p < 0.001$), con diferencias significativas ante formas proliferativas, siendo sus niveles superiores (180). Si bien los niveles séricos parecen correlacionarse con la actividad del LES medida mediante el índice SLEDAI ($r = 0.275$, $p = 0.001$) (223), estos no parecen ser específicos de la manifestación renal hallándose igualmente elevados en el LES activo sin NL (180,223). Por contra, los niveles de uIP-10 si parecen mostrar un mayor grado de correlación con la actividad renal ($r = 0.362$, $p < 0.001$) (180).

- ***Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)***: VCAM es una molécula de adhesión envuelta en los procesos de reclutamiento de células inflamatorias a través de la interacción con integrinas presentes en la superficie de los leucocitos. Algún estudio ha mostrado correlación positiva con el índice de actividad clínica SLEDAI ($r = 0.53$, $p < 0.001$) e IA histológico ($r = 0.42$, $p = 0.05$), así como valor discriminatorio para el subtipo histológico, a favor de formas proliferativas (224–226), además de correlacionarse con ciertas características histológicas como la presencia de semilunas celulares, necrosis fibrinoide o proliferación endocapilar (226). No obstante, en el análisis comparativo con otras glomerulonefritis se observó una baja especificidad, apareciendo en otras enfermedades (224).

Tabla 4. Resumen de los potenciales candidatos a nuevos biomarcadores en la nefritis lúpica.

	Especificidad para LES	Especificidad afectación renal	Correlación actividad (SLEDAI)	Predicción brote NL	Correlación histológica (Clase ISN/RPS)	Correlación daño	Predicción respuesta tratamiento/IRC	Correlación ICr	Correlación IA
uMCP-1	-	+	+	+	+(Clase III/IV)	+ ^{1,2,3}	-	-	+ ^{**}
uNGAL	-	+	+	+	±(Clase III/IV)	+ ⁴	+ [‡]	+	+
uTWEAK	-	+	+	-	-	n.e	-	n.e	+
uIP-10/CXCR3	-	-	+	+	+(Clase IV) ^{**}	n.e	+	n.e	n.e
uVCAM-1	-	+	+	n.e	+(Clase III/IV)	+ ^{3,4,6}	n.e	-	+
uPTX3	-	+	+	n.e	+(Clase IV) [*]	+	-	-	+
Kim-1	-	+	+	n.e	-	+	+	-	+
uHepcidina	-	+	+	+	n.e	n.e	+	n.s	n.e
uL-FABP	-	+	+	-	-	+ ⁵	+	-	-
FOXP3^{**}	-	+	+	-	+(Clase III/IV)	-	+	-	+
mEPCR^{***}	-	+	n.e	n.e	-	n.e	+	-	-

IA: Índice de Actividad; ICr: Índice de Cronicidad; + Resultados concluyentes y estadísticamente significativos en al menos un estudio; ± Resultados dispares; - Resultados negativos o estadísticamente no significativos; n.e Determinaciones no estudiadas.

* Determinación en suero pero no orina; ** Determinación de niveles de mRNA; *** Determinación en tejido renal; ‡ FE NGAL/ FE Proteínas.

1. Inflamación intersticial; 2. Proliferación mesangial; 3. Proliferación endocapilar; 4. Semilunas celulares; 5. Semilunas fibrosas; 6. Necrosis fibrinoide.

1.5.4 Exosomas como fuente de nuevos biomarcadores

Los exosomas son pequeñas vesículas (40-100nm) de membrana lipídica, formadas a partir de las membranas endosomales que se liberan de la célula por la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana celular y representan una nueva herramienta de diagnóstico en enfermedades renales. Aunque los exosomas pueden ser detectados en diferentes fluidos biológicos, la orina es la opción más conveniente para los pacientes con enfermedades renales y del tracto urinario, ya que puede obtenerse en grandes cantidades de una manera relativamente no invasiva. A nivel urinario, estos pueden ser secretados por todos los tipos celulares que recubren el sistema del tracto urinario tanto en condiciones normales como patológicas incluyendo podocitos glomerulares, células del túbulo renal y células que revisten los sistemas de drenaje urinario, si bien es verdad que en situaciones patológicas alrededor del 80-90% de los exosomas proceden de células glomerulares o tubulares (227). Por tanto, los exosomas son una fuente atractiva para el descubrimiento de biomarcadores ya que contienen moléculas procedentes de la célula de origen, incluyendo proteínas y materiales genéticos, principalmente RNAm y RNA-no codificante (ncRNA) (228–230). Otra de las ventajas de la utilización de los exosomas es la relativa estabilidad de estas microvesículas y su contenido a la acción de las proteinasas y RNAsas presentes en el medio (231).

Tras su descubrimiento en 2004, se han realizado múltiples estudios usando exosomas urinarios como material de partida para identificar biomarcadores en diferentes enfermedades renales, urogenitales y sistémicas (232,233). Como ya se ha comentado, estas vesículas extracelulares contienen material genético que, al igual que su carga proteica, deriva de todas las regiones de la nefrona (234) y por lo tanto, este RNA exosomal urinario podría ser una herramienta para examinar los cambios transcripcionales celulares del riñón ante determinados estímulos. Los microRNAs (miRNA) son moléculas de ncRNA cortas (20–25 nucleótidos) con un papel destacado en la regulación de la expresión génica a nivel posttranscripcional, modulando pues el grado de expresión de ciertas proteínas y por lo tanto los fenotipos celulares. Su especificidad

para ciertas funciones órgano-específicas, así como para ciertos estados celulares les brinda una especial característica ganándose la consideración de potenciales biomarcadores (235). Ante ciertas lesiones celulares estos miRNAs son liberados pudiendo detectarse durante un período de tiempo y volviendo a nivel basal antes de la normalización biológica del daño (236), siendo además su detección posible y estable a nivel de múltiples biofluidos entre los que se encuentra la orina (237), gracias a su disposición intravesicular.

A nivel renal, los miRNA son indispensables para regular los mecanismos de desarrollo renal, el mantenimiento de la función y los procesos de homeostasis. Del mismo modo, su papel en la progresión de la enfermedad renal se ha enfatizado recientemente (238,239). Los miRNAs urinarios pueden filtrarse de la circulación, pero con mayor frecuencia son secretados activamente a partir de células de la nefrona en el interior de exosomas (240). Varios estudios han identificado ciertos miRNAs exosómicos de utilidad como biomarcadores en ciertas enfermedades renales. En la nefropatía diabética se ha detectado el *miR-145* procedente de los exosomas urinarios como posible biomarcador de actividad y progresión de esta (241). Recientemente, el *miR-26a* de los exosomas urinarios se ha correlacionado con la progresión de daño glomerular en un modelo experimental de glomerulonefritis autoinmune y se ha observado la misma tendencia en pacientes con nefropatía IgA y NL (242). Paralelamente, nuestro grupo ha demostrado que la expresión génica del *miR-29c* en los exosomas urinarios de pacientes con NL y otras enfermedades crónicas renales está relacionada con la formación precoz de fibrosis renal (243). Estos trabajos demuestran la posible aplicación de los exosomas urinarios como fuente de biomarcadores de seguimiento de la afectación renal en las enfermedades crónicas y, en concreto, en la NL.

Hasta el momento, no existe ningún trabajo que haya estudiado de forma global la expresión génica en los exosomas urinarios en la NL. Sin embargo, existen estudios de expresión génica global utilizando tecnología de los microarrays a nivel de tejido renal (244–246), pero ningún hallazgo ha sido suficientemente significativo para poder identificar un nuevo biomarcador no invasivo de seguimiento a nivel práctico.

Actualmente, existen nuevos paneles de miRNAs mucho más eficaces, sensibles y específicos usando la nueva tecnología de detección *Locked Nucleic Acid* (LNA). Los oligonucleótidos LNA son una clase de análogos de RNA con elevada afinidad donde el anillo de la ribosa está bloqueado en su conformación ideal para tener más estabilidad e hibridar con mayor afinidad al RNA complementario. Esta técnica es ideal para hacer cribado de miRNAs al ser RNA de pequeño tamaño. Con estos paneles se puede descubrir el perfil global de los miRNAs en muestras donde haya poca cantidad de RNA sin ninguna necesidad de pre-amplificar o de añadir pasos previos al cribado y con la total seguridad de que no haya uniones inespecíficas. Así, usando esta tecnología, *Putta S et al.* descubrieron que el *miR-192* está implicado en el mecanismo de la fibrosis renal en la nefropatía diabética y que su bloqueo puede ser una nueva diana terapéutica (247). Otro ejemplo, es el cribado de miRNAs en microvesículas derivadas de células de la médula ósea donde identificaron los miRNAs responsables de la reparación renal (248). En el lupus eritematoso sistémico, no existe por ahora ningún trabajo de cribado de miRNAs con esta nueva técnica.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios para poder identificar nuevos biomarcadores no invasivos que den información del estado renal (187,249–251). En la actualidad, aunque existen diversas publicaciones evaluando el papel de diferentes moléculas como marcadores de actividad, de respuesta al tratamiento o de progresión a insuficiencia renal terminal, ninguno de estos marcadores parece tener una aplicabilidad clínica (252). Posibles dificultades para el estudio de biomarcadores con la metodología actual sería por un lado el insuficiente número de pacientes incluidos en los mismos y, por el otro, el hecho de que normalmente las proteínas en orina se hallan en escasa cantidad (por ejemplo, el caso de la nefrina o podocina) debido a que a menudo se reabsorben en el sistema tubular o se someten a la digestión proteolítica y no pueden detectarse. Un problema similar se encuentra también en el estudio a nivel de RNAm en el sedimento urinario (253). En consecuencia, deben desarrollarse nuevas estrategias que permitan identificar nuevos biomarcadores de diagnóstico, seguimiento, progresión y de respuesta al tratamiento. Estudios previos realizados en diversas enfermedades han demostrado que el aislamiento de exosomas puede resultar una buena fuente de nuevos biomarcadores, especialmente su contenido génico. Para este propósito, creemos que el aislamiento de exosomas puede representar una nueva herramienta de trabajo en la NL y contribuir a identificar nuevos biomarcadores.

Nuestra hipótesis es que mediante la nueva tecnología LNA para paneles de cribado de miRNAs en la NL utilizando exosomas urinarios podremos identificar nuevos biomarcadores de forma no invasiva y con mayor utilidad clínica.

3. OBJETIVO

- El objetivo principal es identificar un perfil de expresión génica de respuesta clínica que permita señalar biomarcadores de remisión.
- Como secundarios se encuentran los siguientes objetivos:
 - Aislar, purificar y caracterizar los exosomas procedentes de la orina de los pacientes con NL y correlacionar su perfil de expresión génica con las características clínicas, bioquímicas (proteinuria, creatinina en sangre, filtrado glomerular, urea, anti-DNAs, complemento) e histológicas de los diferentes grupos a estudio.
 - Identificar la localización renal de los biomarcadores de interés mediante hibridación *in situ*, así como el estudio de producción y asimilación de exosomas.
 - Determinar el capacidad pronóstica de remisión de los miRNAs identificados (sensibilidad, especificidad, valor pronóstico positivo y negativo), identificando biomarcadores de mal pronóstico y biomarcadores de buena respuesta al tratamiento.
 - Identificar nuevas vías relevantes en la patogénesis de la NL implicadas en la remisión o reparación.

4. DISEÑO Y PACIENTES

Los pacientes fueron reclutados en la Unidad de Lupus del Servicio de Enfermedades sistémicas y Autoinmunes de Medicina Interna del Hospital Universitaria de la Vall d'Hebrón. Los pacientes debían cumplir un mínimo de 4 de los criterios clasificatorios de LES de la ACR (254). El proyecto fue previamente aprobado por el comité de ética del hospital de la Vall d'Hebrón y se obtuvo el consentimiento informado por parte de los pacientes participantes.

Se incluyeron consecutivamente pacientes con una nefritis lúpica proliferativa activa, confirmada histológicamente mediante biopsia renal y de los cuales se disponía de muestra biológicas de forma previa, durante y de forma posterior al brote renal, principalmente orina y suero. Desde el año 2005 en la unidad de LES se obtiene muestras biológicas de pacientes, las cuales son debidamente procesadas y almacenadas juntamente con la información clínica correspondiente.

La enfermedad renal es definida por la presencia de proteinuria ≥ 0.5 gr al día, un descenso inexplicable de la TFGe (< 60 mL/min/1,73m²) o por la presencia de sedimento urinario activo en el examen microscópico, con la posterior confirmación mediante biopsia renal. El síndrome nefrótico se define como una proteinuria mayor 3.5gr al día y una albumina sérica menor a 3gr/dL. El grado de actividad de la enfermedad se cuantificó mediante el índice de actividad de la enfermedad del LES 2000 (SLEDAI-2Ks; rango 0-105; Anexo_3) (255).

Como parte del protocolo de evaluación de la afectación renal en los pacientes con LES, la biopsia renal suele practicarse como prueba diagnóstica ante sospecha clínica. La biopsia renal se realiza antes o como máximo durante la primera semana del tratamiento de inducción a menos que exista contraindicación a su realización. Las muestras de tejido renal se analizan mediante microscopía óptica e inmunofluorescencia y son categorizadas siguiendo el acuerdo de la "*International Society of Nephrology/ Renal Pathology Society Classification*" [ISN/RPS] (Tabla 2) (149) y graduados según los índices de actividad y de cronicidad (Tabla 3) (256).

Paralelamente a la obtención de las muestras biológicas se recolectaron datos de laboratorio considerados relevantes en el seguimiento de los pacientes con NL entre los que se incluían:

hemograma, creatinina, tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe), proteínas séricas totales, albumina, gammaglobulinas, niveles de complemento (C3, C4), anticuerpos anti-DNA de doble cadena, velocidad de sedimentación glomerular (VSG) y proteinuria en 24h. Los pacientes con infección del tracto urinario, diabetes mellitus, embarazo, enfermedad oncológica o insuficiencia renal no relacionada con el LES fueron excluidos.

Todos los pacientes con NL recibieron bolus de metilprednisolona (500mg x 3 días) seguido de dosis decrecientes de prednisona oral conjuntamente con micofenolato mofetilo sódico oral (Myfortic 1440 mg/día) o ciclofosfamida (0,5 - 1g/m² al mes durante 6 meses) como terapia de inducción y mantenimiento. Además, Todos los pacientes recibieron tratamiento de soporte que incluía un inhibidor del enzima convertidor de angiotensina (IECA) o un antagonista del receptor de angiotensina-II así como terapia hipolipemiente basada en estatinas.

Tras dicho tratamiento los pacientes fueron seguidos prospectivamente cada 3-6 meses y fueron clasificados como respondedores o no respondedores a lo largo de los diferentes tiempos de seguimiento. Los "Respondedores" (R) se definieron como aquellos pacientes que lograron de forma sostenida una remisión completa (RC) definida como una excreción urinaria de proteínas < 0.5gr/24h, ausencia de alteración en el sedimento urinario y función renal normal o estable (diferencia menor al 10% de la TFGe normal en aquellos casos en los que se presentaba alteración previa) (257). En el grupo de "No Respondedores" (NR) se incluía aquella cohorte de pacientes con remisión parcial de la NL (definida como una proteinuria > 0.5gr/24h pero < 3.5gr/24h o un descenso en la proteinuria de al menos el 50% del valor inicial pero siendo esta < 3.5gr/24h), así como aquellos con progresión de la afectación (incremento de los niveles séricos de creatinina \geq 0.6 mg/dL y un aclaramiento de creatinina > 15% respecto al valor basal) La muestra que se utilizó como "post-tratamiento" se recogió después de 10.9 ± 2.9 meses del debut de la enfermedad renal, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ($p = 0.704$).

El estudio se llevó a cabo a través de varias etapas. La primera etapa consistió en el cribado de potenciales biomarcadores obtenidos a partir de una cohorte de 14 pacientes, 7 correspondientes al grupo R y 7 al grupo NR, llevada a cabo mediante tecnología LNA en microarrays. Tras el análisis de los resultados obtenidos en dicha etapa se lleva a cabo una segunda etapa de validación de los potenciales biomarcadores obtenidos en la primera etapa con una cohorte mayor de 43 pacientes, 21 correspondientes al grupo R y 22 al grupo NR. El análisis se completó con la introducción de una cohorte de pacientes sanos y otra de pacientes afectados de glomerulopatías no lúpicas como grupos para análisis comparativos.

5. Metodología

- Purificación y aislamiento de exosomas urinarios:

Los exosomas se extrajeron de una muestra de orina fresca (10 ml) de primera hora de la mañana utilizando el kit de aislamiento *miRCURY™ Exosomes - Cells, urine & CSF* (Exiqon®). Una vez recogida la orina, rápidamente, las muestras se centrifugaron a 3.200 x g durante 5 minutos y se almacenaron a 4°C para eliminar los residuos. Después de agregar 4 ml de tampón de precipitación B al sobrenadante, las muestras se incubaron nuevamente a 4°C durante 60 minutos. De nuevo se centrifugó durante 30 minutos a 3.200 x g y se eliminó el sobrenadante. Los exosomas se extrajeron del sedimento restante. El sedimento se resuspendió en 100µl de tampón de resuspensión para obtener exosomas intactos que fueron almacenados a -80°C antes del posterior aislamiento del RNA.

- Purificación y aislamiento de exosomas séricos:

La sangre se recogió en BD Vacutainer SST II Advance Serum-gel Tube (BD Vacutainer, EE. UU.) centrifugándose inmediatamente a 2000 x g durante 15 min para obtener el suero (3ml). El aislamiento de exosomas séricos se llevó a cabo mediante el *exoRNeasy Serum/Plasma Kit* (Qiagen®) a través de 1ml de muestras de suero pre-centrifugadas (16.000 x g durante 10 minutos a 4°C). Se añadió un volumen de tampón *XBP* a la muestra de suero. La mezcla *suero:tampón XBP* se añadió luego a la columna de centrifugación *exoEasy* y se centrifugó durante 1 minuto a 500 x g. El filtrado se descartó y se agregaron 3,5ml de tampón *XWP* seguido de 5 minutos de centrifugado a 5.000 x g, descartando nuevamente el filtrado junto con el tubo de recogida. La columna, con su contenido de vesículas extracelulares, se transfirió luego a un nuevo tubo de recolección para mantener a -80°C hasta su caracterización o aislamiento de RNA.

- Caracterización de exosomas mediante análisis de NanoSight, Western-Blot y Cryo-TEM:

El aislamiento de proteínas de los exosomas se llevó a cabo utilizando el *Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit* (Applied Biosystems®). Para el análisis Western-Blot, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a la membrana. La incubación de la membrana se llevó a cabo mediante la utilización de diferentes anticuerpos contra marcadores exosómicos (conejo anti-CD9, conejo anti-AQP2, conejo anti-TSG101, diluciones 1:1000; Abcam®) y se detectaron las proteínas mediante el uso de reactivos de quimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoFischer®).

La caracterización por Cryo-TEM y NanoSight se realizó en la Universitat Autònoma de Barcelona. Para la caracterización de Cryo-TEM, se colocó una gota de una dilución del pellet exosomal (1:100 en PBS) en una rejilla congelada. Esto se transfirió a una cámara de criopreparación (Leica EM CPC) usando un aparato de criotransferencia GATAN para preparar la muestra para congelarla con propano y etano. La temperatura de la rejilla se mantuvo a -174°C. Las muestras vitrificadas se examinaron utilizando un microscopio electrónico JEM-1400 con un voltaje de aceleración de 40 a 120kV. Para la caracterización de NanoSight, se examinaron diferentes diluciones de exosomas utilizando el analizador de tamaño de partículas Nanosight LM-20.

- Extracción de RNA de los exosomas:

El RNA de los exosomas urinarios se extrajo siguiendo las instrucciones del kit de aislamiento *miRCURY™ RNA - Cell & Plant* (Exiqon®). El proceso de lisis se realizó mediante la adición a muestras de exosomas de 350µL de solución de lisis y 200µL de etanol al 95%. Se aplicó lisado con etanol a la columna y se centrifugó a 14.000 x g durante 1 minuto. La purificación se mejoró agregando 400µL de solución de lavado a la columna y luego se centrifugó a 14.000 x g

por minuto durante 3 veces. Finalmente, el RNA purificado unido a la columna se obtuvo agregando 50µL de tampón de elución con una breve centrifugación a 200xg durante 2 minutos para asegurar una correcta y uniforme distribución del tampón en la columna. Seguidamente se procedió a centrifugar durante 1 minuto a 14.000 x g para obtener las muestras de RNA purificadas. Estos se almacenaron a -80°C.

Los exosomas séricos se obtuvieron siguiendo la segunda parte de la metodología *ExoRNeasy Serum / Plasma Kit* (Qiagen®). Se añadió *QIAzol* (700µL) a la dilución del exosoma sérico e inmediatamente se aplicó un proceso de centrifugación de 5 minutos a 5.000 x g recogiéndose a continuación el lisado y transfiriéndose completamente a un nuevo tubo de 2ml. El lisado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Se añadieron 90µl de cloroformo y se incubó la muestra después de agitar vigorosamente durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego toda la mezcla se centrifugó a 12.000 x g a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa superior se transfirió luego a un nuevo tubo de recolección evitando la transferencia de cualquier interfase. Se añadieron dos volúmenes de etanol al 100% y se mezclaron. Se pipetearon 700µl de muestra nueva en una columna de centrifugado *RNeasy MinElute* (Qiagen®) y se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. El paso se repitió hasta completar toda la transferencia total de volumen. Una vez completado, se aplicó una nueva centrifugación de 15 segundos a 10.000 x g después de agregar 700µL de tampón *RWT*. Inmediatamente se añadieron 500µL de tampón *RPE* aplicándose a continuación un ciclo de centrifugación de 15 segundos y otro 2 minutos después. Luego, para asegurar el completo secado de la columna *RNeasy MinElute* esta se centrifugó a toda velocidad con la tapa abierta. Finalmente, se agregaron directamente 17µL de agua libre de RNAsa al centro de la membrana de la columna y, después de dejar reposar durante un minuto, se centrifugó durante 1 minuto a velocidad máxima para eluir el RNA purificado. Las muestras fueron almacenadas a -80°C para su uso posterior.

En ambos casos, la cuantificación y la evaluación de la calidad del RNA se llevó a cabo mediante el análisis de Bioanalyzer PicoChip.

- Análisis mediante microarrays prediseñados para miRNA

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando las instrucciones del fabricante de *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR* (Exiqon®). Se usaron placas de exosomas urinarios humanos prediseñados de 96 pocillos (Exiqon®, 87 conjuntos de cebadores de miRNA de LNA; ver Anexo 4) para evaluar el perfil de miRNAs. En cada pocillo de la placa se aplicaron 10µL de una mezcla de 6µL de DNA complementario (cDNA) diluido (1:80), 594µL de agua libre de nucleasas y 600µL de *PCR Master Mix* (Exiqon®). La placa se selló posteriormente con vela óptica y se aplicó un giro breve (1.500xg durante 1 minuto) para asegurar la concentración de la muestra en el fondo del pocillo. La amplificación por reacción de cadena polimerasa (PCR) en tiempo real se realizó después de un ciclo inicial de activación de la polimerasa durante 10 minutos a 95°C. El proceso de amplificación consiste en 45 ciclos de amplificación de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Finalmente se aplicó un ciclo de disociación consistente en 15 segundos a 95°C, seguidos durante 20 segundos a 60°C y finalmente 15 segundos a 95°C. La transcripción se midió utilizando ABI PRISM 7000.

- Ensayo individual qPCR-RT:

Inicialmente, se realizó una reacción de síntesis de cDNA de primera cadena para proporcionar una plantilla para todo el ensayo de PCR en tiempo real de miRNA utilizando el kit *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR* (Exiqon®). Cada muestra de RNA se normalizó a una concentración de 5ng/µl utilizando agua libre de nucleasas. Se utilizaron 2µL en combinación con una mezcla de 2µL de 5x de tampón de reacción + 1µL de mezcla de enzimas + 5µL de agua libre de nucleasas. La mezcla se homogenizó mediante agitación con vórtex. La solución resultante se incubó posteriormente durante 60 minutos a 40°C, seguido de una inactivación de la transcriptasa inversa por calor durante 5 minutos a 95°C. Inmediatamente las muestras de cDNA se almacenaron a -80°C. Para evitar la variabilidad del proceso, las muestras finalmente utilizadas

para las matrices RT-qPCR se obtuvieron repitiendo los pasos anteriores tres veces y mezclando los extractos. Todas las muestras de cDNA se diluyeron 1:6.6 en agua libre de nucleasas. Cada pocillo contiene una combinación de 5 μ L de PCR *Master Mix ExiLENT SYBR Green* (Exiqon[®]), 1 μ L de PCR *primer Mix miRCURY LNA* (Exiqon[®]) y 4 μ L de cDNA diluido. Todos los análisis se repitieron por triplicado. La cantidad requerida de cebador: solución de mezcla maestra se calculó y preparó por adelantado cuando se realizaron múltiples reacciones de PCR en tiempo real con el mismo cebador de miRNA. Un 15% de todos los reactivos se incluyeron adicionalmente para compensar la pérdida por pipeteo del material. La amplificación por PCR en tiempo real se realizó después de un ciclo inicial de activación de la polimerasa durante 10 minutos a 95°C. El proceso de amplificación consiste en 45 ciclos de amplificación de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Finalmente se aplicó un ciclo de disociación consistente en 15 segundos a 95°C, seguidos durante 20 segundos a 60°C y finalmente 15 segundos a 95°C. La transcripción se midió utilizando un ABI PRISM 7000. Los datos se normalizaron en base a la expresión de miRNA-423 que fue el miRNA con menor grado de variabilidad durante el ensayo de selección. La cuantificación relativa se calculó ($RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) usando el método Livak (258).

- Cribado de miRNAs - Análisis bioinformático:

Los datos obtenidos de los arrays de miRNA (Exiqon[®]) fueron analizados por la Unidad de Estadística y Bioinformática de nuestro instituto de investigación. Los análisis estadísticos correspondientes a microarrays se realizaron utilizando el paquete de software de estadística R (www.R-project.org) y las bibliotecas desarrolladas para el análisis de datos de microarrays por el Bioconductor Project (www.bioconductor.org). La relación biológica de los resultados obtenidos en el microarray se estudió utilizando el Ingenuity Pathway Analysis (IPA[®], QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity).

- Detección de doble hibridación in situ fluorescente (ISH):

La visualización y localización de la expresión génica de los miRNAs a estudio en muestras de tejido renal se llevó a cabo mediante el kit *miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit* (Exiqon®). Las muestras se obtuvieron del banco del laboratorio de Histopatología de HUVH y se usaron a través de un método de desparafinación, colocando los portaobjetos en una solución de xileno y una solución sucesiva de etanol de concentración más baja. Los miRNAs se desenmascararon a través de la utilización de proteinasa-K. El método de la proteinasa-K permite acceder a las sondas LNA™ marcadas en la célula e hibridar con la secuencia de RNA correspondiente. Se aplicó una mezcla de 100µL de Proteinasa-K / proteinasa-K Buffer para cubrir completamente cada muestra de tejido y luego se incubó durante 10 minutos a 37°. Posteriormente, se realizó un lavado colocando los portaobjetos en PBS siguiendo un proceso de deshidratación en distintas soluciones de etanol a concentración creciente.

La mezcla de hibridación se realizó combinando una dilución de 2x *microRNA ISH buffer* 1:1 con agua libre de RNAsa con una sonda de *microRNA LNA™* en una concentración de 1:650. Se utilizó como control positivo una sonda *LNA™ U6 snRNA* a concentración de 1:500. La concentración de la sonda se optimizó para obtener una señal ISH de miRNA óptima utilizando las instrucciones del proveedor. Luego se aplicó la mezcla de hibridación y se mantuvo a 50° durante 120 minutos. La sección del tejido se lavó posteriormente en solución salina-citrato de sodio (SSC) con concentración decreciente. Primero, se realizó un lavado de 5xSSC durante 5 minutos a temperatura de hibridación seguido de un lavado de 1xSSC durante 10 minutos a temperatura de hibridación y un lavado de 0.2xSSC durante 10 minutos a temperatura de hibridación y finalmente un lavado de 0.2xSSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Antes de la detección de la hibridación, la sección de tejido se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente utilizando H₂O₂ al 3% para bloquear las peroxidasas endógenas antes de aplicar anticuerpos conjugados con HRP para evitar una señalización de fondo alta debido a la actividad intrínseca de la peroxidasa tisular. También se aplicó para la extinción de la

autofluorescencia una dilución de Negro Sudán al 0.5% sobre Etanol al 70% durante 20 minutos mediante inmersión. Después, los portaobjetos se lavaron 3 veces, tres minutos por lavado, con tampón TN (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M). El siguiente paso consiste en una incubación de 30 minutos con tampón de bloqueo (10 ml de tampón TN + 0,5 g BSA + 200µL de suero de oveja) a temperatura ambiente. Después de eso, se eliminó la solución de bloqueo y se aplicó una solución de anticuerpo primario (anti-DIG / HRP o anti-FITC / HRP) con una dilución 1:400 en tampón de bloqueo. Después de 30 minutos de incubación se aplicaron 5 minutos de lavado mediante de tampón TNT [Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, 0,3% (vol / vol) Triton X-100] por triplicado. Se utilizó una tecnología de *amplificación de señal de Tyramide* (TSA) (Exiqon®) para mejorar y amplificar la señal fluorescente. Diez minutos de incubación con 500µl de *TSA working solution*, una dilución 1:50 de *TSA Plus Stock Solution* y 1x *Amplification Diluent*. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron tres veces, 5 minutos por lavado, con tampón TNT en la oscuridad y con agitación. Luego se repitieron los últimos pasos aplicando el otro anticuerpo primario (anti-FITC / HRP en lugar de anti-DIG / HRP u opuesto). De forma previa a la visualización, se realizó una aplicación de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) de 10 segundos para visualizar el núcleo celular. Finalmente, utilizando un microscopio vertical motorizado Olympus BX61 con fluorescencia y óptica de fase para imágenes de inmunofluorescencia, se visualizaron todas las secciones de tejido.

- Marcaje mediante fluorescencia de exosomas urinarios e internalización por celulares renales primarios:

Los exosomas urinarios se extrajeron de la orina de pacientes con NL, tanto del grupo "Respondedor" como del "No Respondedor", así como de controles sanos, mediante la técnica descrita anteriormente. Se marcaron 100µg de exosomas urinarios de forma fluorescente utilizando el kit *ExoGlow-Membrane EV Labeling kit* (System Biosciences®). Tras dicho proceso se agregaron 10µg de exosomas urinarios marcados a placas de 24 pocillos con células

renales tubulares, mesangiales, endoteliales o epiteliales. La internalización de los exosomas urinarios marcados se analizó después de 3, 6 y 24 h de incubación mediante microscopía de inmunofluorescencia (465nm de excitación / 635nm de emisión).

- Producción de exosomas con *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* en células renales primarias:

Para evaluar la producción de los exosomas que contengan *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* en las diferentes células renales estudiadas (mesangiales, endoteliales y tubulares) se despertaron las líneas celulares y se cultivaron durante 2-3 días con su medio correspondiente junto a suero fetal bovino depleccionado de exosomas (Exo-FBS, 5%, System Biosciences®). A continuación se plantaron en una placa de 24 pocillos una cantidad de 1×10^5 células por pocillo. Los experimentos se realizaron por triplicados. Las células fueron estimuladas durante 6, 18 y 36h con una combinación de múltiples citoquinas (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , INF- α y IL-6). El control fue estimulado con PBS estéril. A continuación, se obtuvieron los exosomas del sobrenadante del cultivo usando el kit *miRCURY™ RNA - Cell & Plant* (Exiqon®). Una vez aislados los exosomas, se obtuvo los miRNAs usando la metodología descrita anteriormente. Mediante RT-qPCR se evaluó la expresión génica del *miR-31*, *miR-107*, *miR-135b-5p* y *miR-423-3p*. Este último, es un miRNA que tendría que ser constante en todas las condiciones, por lo tanto, se utilizó como control de la técnica. Los datos se normalizaron mediante la condición no estimulada y con el control endógeno snRNA U6 (4427975).

- Cuantificación de exosomas urinarios:

La cuantificación de exosomas urinarios se realizó a través del *FLUOROCET Usensitive Exosome Quantification Assay Kit* (System Biosciences®), un sistema basado en fluorescencia

que mide la actividad esterasa presente en el interior de los exosomas, a partir de 1mL de primera orina de la mañana. Primero se procedió al precipitado de exosomas mediante el kit *miRCURY™ Exosomes - Cells, urine & CSF* (Exiqon®), tal y como se indica en el apartado 1 de la metodología. Los exosomas precipitados se resuspendieron con 60µL de PBS. A continuación se añadieron 60µL de Lysis buffer, incubándose a continuación durante 30 minutos en hielo para permitir la liberación de las proteínas de los exosomas. A continuación se procedió a la realización de diluciones sucesivas de la muestra lisada (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) a las que se añadió 50µL de Buffer A y 50µL de Buffer B. Las muestras resultantes se aplicaron de forma triplicada en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 20 minutos. La placa se analizó mediante un lector de fluorescencia (Excitación: 530-570nm, Emisión: 590-600nm). Antes del ensayo se realizó una curva patrón para evaluar la eficacia y sensibilidad del test (Gráfico 1).

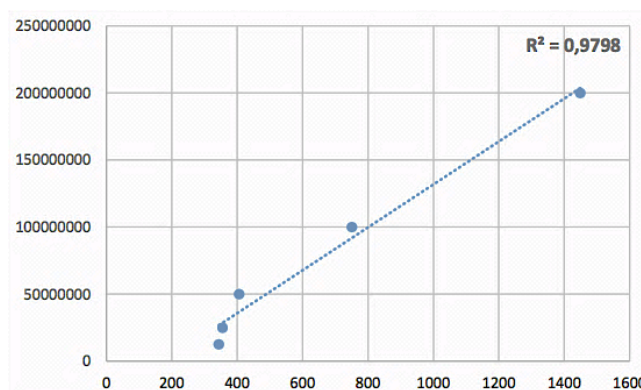


Gráfico 1: Curva estándar de calibración para el análisis de cuantificación de exosomas

- Cultivos celulares:

Para realizar los experimentos *in vitro* se compraron líneas celulares primarias renales de: células renales endoteliales glomerulares humanas (CEGRH), células renales mesangiales humanas (CMRH) y células renales epiteliales tubulares humanas (Innoprot®). El medio utilizado para cada línea celular fue el recomendado por el suministrador (“*Endothelial Cell*

Medium", "*Mesangial Cell Medium*" y "*Epithelial Tubular Cell Medium*", Innoprot®) junto a sus factores de crecimiento y antibiótico correspondientes. Las células se expandieron en flascos de 75cm² en una incubadora a temperatura de 37°C y contenido de CO₂ del 5%. Tras conseguir una confluencia del 70-90%, se tripsinizaron las células para lograr desadherirlas del frasco de cultivo y así poder ser resembradas en varios flascos de cultivo (pase 1) con una relación 1:2 o 1:3. Las células fueron mantenidas siguiendo este proceso, realizando sucesivas reparticiones, una vez adquirida la confluencia del 80 - 90%, cada 3 - 4 días. Todos los experimentos con células se realizaron con células de pase 2 a 4.

- Transfección y Estimulación de las células *in vitro*:

Para las transfecciones celulares, las células fueron sembradas en placas de 24 o 96 pocillos, con una cantidad de 1x10⁵ células (1mL) o 1x10⁴ células (200µL) por pocillo, respectivamente. Tras asegurar la correcta adherencia y proliferación sobre las 24-48 horas se procedió a transfectar, mediante método basado en el uso de lipofectamina, el miR-mimético o miR-inhibidor a una concentración de 5µM. Tras 24 horas de cultivo se procedió a estimular los diferentes cultivos celulares mediante la administración de distintas citoquinas descritas en la literatura como importantes en estos tipos celulares. En el caso de los cultivos de CEGRH se usó VEGF e IL-1α, mientras que en los cultivos de CMRH se usó IL-1α, IL-1β e INF-γ, a una concentración de 10ng/mL. Paralelamente a cada estimulación se mantuvo una condición sin estimulación para cada condición. Tras 24 horas de incubación se procedió a realizar los correspondientes estudios.

- Estudios de proliferación celular:

Los estudios de proliferación se realizaron usando el *CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay Kit* (ThermoFisher®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa en la medición del contenido de DNA celular a través de la unión de tinte fluorescente. Debido a que el contenido de DNA celular está altamente regulado, es estrechamente proporcional al número de células. El alcance de la proliferación se determina comparando el recuento de células para las muestras tratadas (inhibición/sobreexpresión de cada miRNA con las diferentes estimulaciones) con los controles no tratados (no estimulados). El reactivo de colorante *CyQUANT® NF* diluido se añadió a cada pocillo y la fluorescencia se midió utilizando un lector de microplacas de fluorescencia con excitación a 485nm y detección de emisiones a 530nm.

- Estudios de apoptosis celular:

El ensayo de apoptosis se llevó a cabo utilizando *APC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with APC annexin V and SYTOX® Green Flow Cytometry* (Thermo Fisher®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo se utilizaron células vivas y como control positivo se eliminaron las células con H₂O₂ 2mM. Estos controles se utilizaron para caracterizar nuestra población celular en células vivas, apoptóticas y muertas. Para cada ensayo de citometría, se contabilizaron 10.000 eventos para obtener resultados significativos. En primer lugar, las células se tiñeron con 2 fluoróforos: annexina V conjugada con aloficocianina (APC) para detectar células apoptóticas, y SYTOXR Green, que es impermeable a las células vivas y apoptóticas, pero tiñe las células muertas con una fluorescencia verde intensa mediante la unión a ácidos nucleicos celulares. Después de la incubación durante 15 min a 37°C, las células teñidas se analizaron mediante el analizador de citometría de flujo *BD LSRFortessa™*, midiendo la emisión de fluorescencia a 530nm y 660nm.

- Estudios de expresión génica mediante qPCR a nivel *in vitro*:

Una vez transfectadas y estimuladas, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 12.000 x g durante 5 minutos y, a continuación, se lisó el pellet celular usando el *Lysis Buffer* del kit comercial *Purelink[®] RNA Mini Kit* (Invitrogen[®]). Mediante las columnas de separación y siguiendo las instrucciones del manual del kit, se obtuvo el RNA celular. Su cuantificación se realizó mediante el sistema de espectrofotometría *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific[®]) y se almacenó a -80°C. La reacción de retrotranscriptasa para evaluar el mRNA se realizó usando el kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher[®]) y con el termociclador usando el programa: 25°C durante 5min, 37°C durante 2 horas y 82°C durante 5min. Para evaluar los miRNAs se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher[®]) y el programa del termociclador fue: 16°C durante 30min, 42°C durante 30min y 85°C durante 5min. A continuación, se evaluó la expresión génica de los miRNAs o de los RNAm de los genes de interés mediante qPCR real time usando *MicroTaqMAN Gene Expression assays* o el *Taqman Gene Expression Assays* o (FAM dye-labeled MGB probe, Applied Biosystems[®]) con el ABI Instrument 7000 termociclador a 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Los datos se normalizaron según la expresión del control endógeno GAPDH para la cuantificación de RNAm (Hs02786624_g1) y con el control endógeno snRNA U6 para la cuantificación de miRNA (4427975).

- Estudio sobre efecto angiogénico y de migración celular ("*wound healing assay*"):

La determinación de la habilidad celular en cuanto a migración se realizó mediante la técnica de "*wound healing assay*". Se plantaron 1×10^5 células en placas de 30mm de diámetro practicándose mediante la punta de una pipeta estéril de 200µL una herida incisa de 1mm de ancho para romper la confluencia adquirida de forma previa. Este proceso se llevo a cabo tras

comprobar un grado de confluencia celular del 80%. De forma inicial las células fueron transfectadas con mimic-miR-107 o scr-miR y 24h después estimuladas con VEGF o no estimuladas. El movimiento de las células sobre el área de incisión en las distintas condiciones fue examinado y fotografiado en el mismo sitio en distintos momentos (2, 4, 6, 8, 20, 24 y 32h) usando microscopía óptica. La distancia entre los bordes de los márgenes de incisión se estimó a través del índice de confluencia, entendido a través de la siguiente fórmula: $IC = \left(1 - \frac{\text{distancia entre márgenes tiempo } X}{\text{distancia entre márgenes tiempo inicial}}\right) \times 100$. Todos los estudios se realizaron por triplicado calculando la mediana para las comparaciones posteriores.

- Análisis estadístico:

La información cuantitativa está expresada mediante media \pm error estándar de la media (EEM) o mediana y rango (mínimo, máximo) o rango intercuartil (IQR). Los análisis comparativos de variables cuantitativas entre grupos se han realizado mediante el test de *t-Student* para variables independientes o apareadas en función de la relación entre las mismas. Los análisis de correlación entre variables cuantitativas continuas se han realizado mediante el test de correlación de rango de Spearman. El rendimiento diagnóstico de los biomarcadores se evaluó mediante el cálculo de su sensibilidad y especificidad utilizando curvas de característica operativa del receptor (ROC). Los valores de corte se determinaron según el índice de Youden. Los valores del ciclo de umbral sin procesar (Ct) se importaron del software ABI7000 SDS y los niveles de expresión relativa para cada miRNA se calcularon usando el método comparativo Ct. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.) Y SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de exosomas

Los exosomas urinarios se aislaron mediante diversas centrifugaciones utilizando kits comerciales que favorecen su precipitación. A través del buffer de precipitación se capturan las partículas de H₂O que hidratan la envoltura de las vesículas disminuyendo su hidratación y permitiendo su fácil precipitación mediante un proceso de centrifugación a baja velocidad. Una vez centrifugadas las vesículas extracelulares fueron caracterizadas mediante un sistema electrónico de Crio-microscopia (Figura 2A) y de rastreo de nanopartículas (Figura 2B) mostrando una población de nanovesículas de tamaño medio de $93.4 \pm 36.6\text{nm}$ con la morfología características de los exosomas.

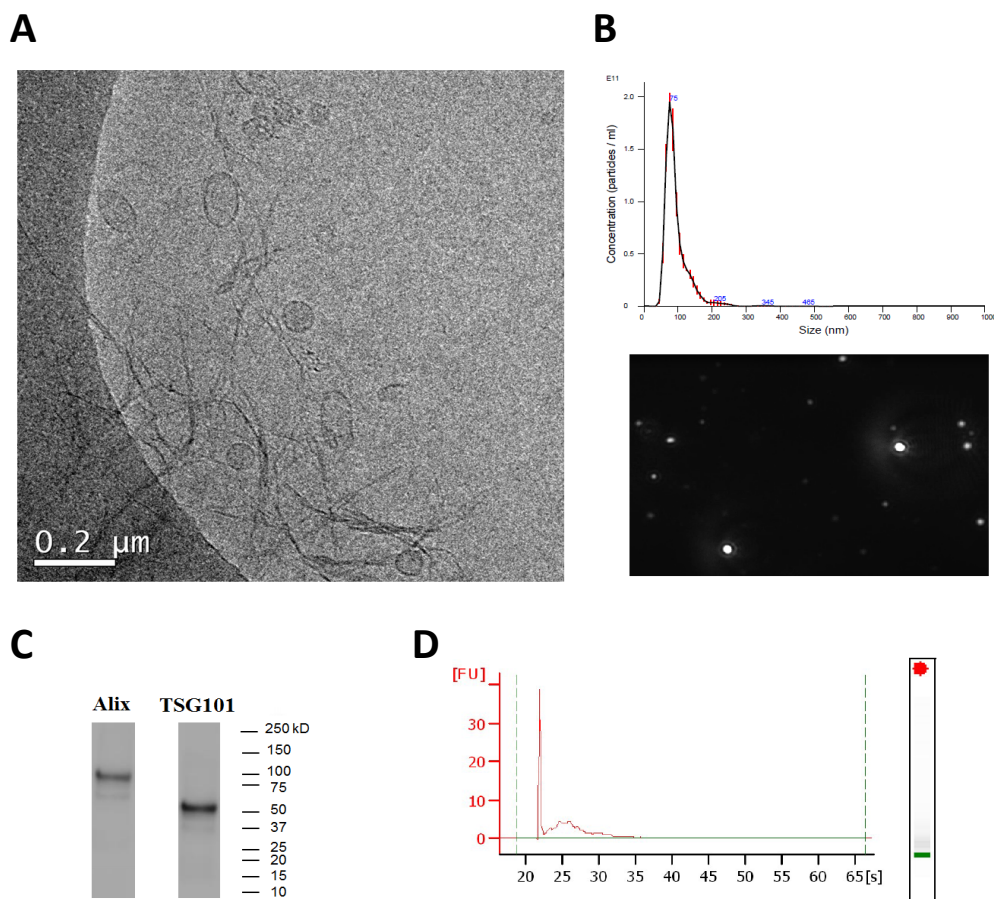


Figura 2: Caracterización y identificación de los exosomas urinarios. (A) Micrografía electrónica de crio-transmisión de exosomas urinarios mostrando microvesículas entre 57 y 130nm de diámetro. (B) Distribución del tamaño de los exosomas urinarios analizados a través del análisis de rastreo de nanopartículas. (C) Western-Blot para las proteínas Alix y TSG101 características de los exosomas urinarios. (D) PicoBioanalyser del RNA extraído de los exosomas urinarios mostrando predominio de RNAs de pequeño tamaño (<200nt).

La detección de la proteína Alix y TSG101 mediante Western-Blot confirmó su expresión, característica de los exosomas (Figura 2C). La calidad y cantidad del RNA extraído de los exosomas urinarios se analizó mediante el sistema Agilent 2100 Bioanalyser obteniendo concentraciones de RNA entre 100 y 1500pg/ μ L en función de la muestra (Figura 2D).

6.2 Características demográficas

El proceso inicial de cribado se llevó a cabo mediante una cohorte de 14 pacientes con glomerulonefritis tipo III/IV, 7 de los cuales presentaron remisión completa con el tratamiento instaurado y siendo por lo tanto clasificados como grupo "Respondedores" (R) y 7 correspondientes al grupo "No Respondedores" (NR) ante ausencia de la misma. Las características clínicas, demográficas y analíticas de dicha cohorte se recogen en la Tabla 5. De forma general no había diferencias significativas entre las dos grupos a estudio con excepción de la distribución de géneros ($p = 0.031$), siendo mayor la proporción de hombres (6/1) en la cohorte NR respecto la cohorte R (2/5). Los pacientes de la cohorte R mostraron mayor grado de actividad de la enfermedad según el score SLEDAI-2k, si bien estas diferencias no fueran estadísticamente significativas (19.6 ± 1.8 vs 16.6 ± 3 , $p = 0.409$). En cuanto al tratamiento de inducción, los 7 pacientes (100%) de la cohorte R recibieron pauta con MMF, mientras que en la cohorte NR, 6 pacientes (86%) recibieron MMF y 1 recibió CYC (14%).

Tabla 5. Datos demográficos, de laboratorio y clínicos basales de la cohorte de cribado

	<i>Respondedores</i> (n = 7)	<i>No Respondedores</i> (n = 7)	<i>P</i>
Demografía,			
Edad (años)	33.6 (3.8)	29.1 (2.6)	0.330
Duración LES (años)	6.6 (3.7)	6.5 (1.2)	0.981
Sexo, hombre/mujer	2/5	6/1	0.031
Raza/etnia, n (%)			0.515
Caucásica	6 (85.7)	5 (72.4)	
Hispano	1 (14.3)	2 (28.6)	
Tiempo muestra post-brote (meses)	12.0 (5.5)	9.7 (2.3)	0.704
Laboratorio,			
Creatinina, mg/dL	1.4 (0.4)	1.2 (0.2)	0.551
eGFR, mL/min/1.73 m ²	70.6 (11.7)	67.7 (20.8)	0.901
Anti-dsDNA Abs, IU/mL	166.9 (82.3)	336.4 (163.4)	0.372
C3, mg/dL	58.7 (13.1)	69.4 (7.3)	0.309
C4, mg/dL	10.0 (1.8)	11.3 (1.9)	0.635
Gammaglobulinas, %	17.9 (3.8)	16.0 (2.9)	0.709
Hemoglobina, gr/dL	11.9 (0.7)	11.9 (1.1)	0.983
Leucocitos, x10E9/L	6.9 (1.2)	7.2 (1.0)	0.893
Linfocitos, x10E9/L	1.5 (0.3)	1.1 (0.2)	0.208
Colesterol, mg/dL	222.3 (18.7)	245.6 (25.6)	0.476
Triglicéridos, mg/dL	165.0 (38.6)	211.1 (19.7)	0.308
VGS, mm/h	44.6 (14.5)	52.0 (16.1)	0.746
Proteínas, gr/dL	6.5 (0.5)	5.5 (0.3)	0.114
Albumina, gr/dL	3.4 (0.3)	2.7 (0.3)	0.100
Proteinuria, g/24 h	4375.6 (1137.6)	3907.7 (929.0)	0.756
Leucocituria	143.2 (83.2)	103.5 (36.4)	0.672
Hematuria	926.9 (832.9)	281.5 (161.4)	0.496
Cilindros	2.7 (2.2)	5.8 (4.5)	0.609
SLEDAI-2k global score,			
Remisión Completa, n (%)	7 (100)	NA	0.409
Tiempo hasta remisión (días),	149 (25)	NA	
Biopsia renal (%)			
Clase III	2 (29)	3 (43)	0.577
Clase IV	5 (71)	4 (57)	
Índice de actividad,			
Proliferación endocapilar	9.8 (1.1)	8.7 (1.5)	0.607
Infiltrado leucocítico	1.4 (0.4)	1.4 (0.4)	1.000
Infiltrado leucocítico	1.2 (0.2)	1.0 (0.4)	0.662
Depósitos hialinos subendoteliales	1.0 (0.4)	1.0 (0.0)	1.000
Necrosis fibrinoide/Cariorrhexis	2.0 (0.7)	1.8 (0.6)	0.858
Semilunas celulares	1.9 (0.6)	2.9 (0.7)	0.312
Inflamación intersticial	0.7 (0.3)	1.0 (0.2)	0.442
Índice de cronicidad,			
Esclerosis glomerular	1.8 (0.8)	2.4 (0.6)	0.547
Semilunas fibrosas	0.6 (0.4)	0.5 (0.2)	0.877
Semilunas fibrosas	0.3 (0.2)	0.3 (0.2)	0.867
Atrofia tubular	0.4 (0.2)	0.7 (0.4)	0.505
Fibrosis intersticial	0.4 (0.2)	0.9 (0.3)	0.218

Los datos se expresan mediante la media (error estándar de la media) y el valor p se obtiene mediante la comparación de la prueba t-student en el caso de comparaciones cualitativas-cuantitativas o *Chi-cuadrado* en el caso de comparaciones cualitativas.

SLEDAI= Índice de actividad del lupus eritematosos sistémico.

En la cohorte de validación se incluyeron un total de 43 pacientes, 30 nuevos además de 13 pacientes del grupo inicial. Un paciente de los 14 de la cohorte inicial se excluyó por falta de suficiente muestra. Por lo tanto, el proceso de validación mediante técnica de RT-qPCR individual para cada miRNA se realizó en 22 pacientes en el grupo R y 21 en el grupo NR. La Tabla 6 muestra las características demográficas en el momento de la inclusión. Como en la cohorte inicial, en esta nueva cohorte se evidenciaron diferencias significativas en la distribución de género ($p = 0.034$) mostrando de forma diferencial mayor número de hombres en la cohorte de NR (8/21) respecto a la de R (2/22). En relación al resto de los parámetros de laboratorio, en el grupo R se observó de forma estadísticamente significativa un nivel de proteínas en sangre mayor (6.3 ± 0.2 vs 5.6 ± 0.2 , $p = 0.026$) y albumina sérica (3.2 ± 0.1 vs 2.7 ± 0.1 , $p = 0.021$) comparado con el grupo NR. Al igual que en la cohorte de cribado, en el grupo R de la cohorte de validación se observó que la actividad de la enfermedad, cuantificada mediante el score SLEDAI-2k, mostraba mayores valores al compararlo con el grupo NR, si bien en estas ocasiones las diferencias si resultaron estadísticamente significativas (21.5 ± 1.2 vs 16.5 ± 1.5 , $p = 0.022$). En cuanto al tratamiento de inducción, a nivel de la cohorte R, 21 pacientes (95%) recibieron pauta con MMF y 1 paciente (5%) recibió CYC, y en la cohorte NR, 19 pacientes (90%) recibieron pauta con MMF y 2 pacientes (10%) CYC.

Tabla 6. Datos demográficos, de laboratorio y clínicos basales de la cohorte de validación.

	<i>Respondedores</i> (n = 22)	<i>No-Respondedores</i> (n = 21)	<i>P</i>
Demografía,			
Edad (años)	34.3 (2.3)	34.3 (2.3)	0.981
Duración LES (años)	7.1 (1.6)	5.8 (1.6)	0.571
Sexo, masculino/femenino	2/20	8/13	0.034
<i>Raza/etnia, n (%)</i>			<i>0.214</i>
Caucásica	21 (95.5)	16 (76.2)	
Hispana	1 (4.5)	3 (14.3)	
Otras	0 (0)	2 (9.5)	
Tiempo muestra post-brote (meses)	8.7 (1.9)	10.6 (3.4)	0.630
Parámetros laboratorio,			
Creatinina, mg/dL	1.1 (0.1)	1.3 (0.2)	0.387
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	72.6 (10.1)	66.7 (12.3)	0.710
Anti-dsDNA Abs, IU/mL	234.4 (54.1)	255.2 (68.3)	0.812
C3, mg/dL	60.0 (6.3)	68.4 (4.0)	0.265
C4, mg/dL	8.9 (1.2)	11.0 (1.4)	0.274
Gammaglobulina, %	19.9 (1.8)	17.9 (1.7)	0.441
Hemoglobina, gr/dL	10.8 (0.5)	11.2 (0.5)	0.515
Leucocitos, x10E9/L	6.8 (0.6)	7.1 (0.8)	0.787
Linfocitos, x10E9/L	1.7 (0.2)	1.1 (0.1)	0.007
Colesterol, mg/dL	229.9 (11.9)	236.3 (14.1)	0.727
Triglicéridos, mg/dL	190.5 (27.3)	224.9 (20.2)	0.317
VSG, mm/h	63.3 (6.7)	47.3 (8.4)	0.140
Proteínas, gr/dL	6.3 (0.2)	5.6 (0.2)	0.026
Albumina, gr/dL	3.2 (0.1)	2.7 (0.1)	0.021
Proteinuria, g/24 h	3590.3 (736.1)	4589.3 (671.1)	0.322
Leucocituria	173.2 (49.1)	149.6 (54.9)	0.750
Hematuria	553.6 (286.0)	307.8 (164.2)	0.472
Cilindros	3.1 (1.5)	3.8 (1.2)	0.416
SLEDAI-2k global score,			
Remisión Completa, n (%)	21.5 (1.2)	16.5 (1.5)	0.022
Tiempo hasta remisión (días),	22 (100)	NA	
	214 (48)	NA	
Biopsia renal (%)			
			<i>0.666</i>
Clase III	7 (32)	8 (38)	
Clase IV	15 (68)	13 (62)	
Índice de actividad,			
Proliferación endocapilar	8.6 (1.1)	7.6 (1.2)	0.625
Infiltrado leucocítico	1.6 (0.2)	1.6 (0.3)	0.913
Infiltrado leucocítico	1.0 (0.2)	0.9 (0.3)	0.849
Depósitos hialinos subendoteliales	0.8 (0.4)	1.0 (0.2)	0.715
Necrosis fibrinoide/Cariorrexis	0.8 (0.4)	1.0 (0.2)	0.715
Necrosis fibrinoide/Cariorrexis	1.8 (0.6)	1.6 (0.5)	0.792
Semilunas epiteliales	1.8 (0.5)	1.8 (0.5)	0.991
Inflamación intersticial	1.8 (0.5)	1.8 (0.5)	0.991
Inflamación intersticial	0.7 (0.3)	0.9 (0.2)	0.575
Índice de cronicidad,			
Esclerosis glomerular	1.8 (0.6)	2.4 (0.6)	0.487
Esclerosis glomerular	0.6 (0.3)	0.6 (0.2)	0.801
Semilunas fibrosas	0.2 (0.1)	0.2 (0.1)	0.700
Semilunas fibrosas	0.2 (0.1)	0.2 (0.1)	0.700
Atrofia tubular	0.7 (0.2)	0.9 (0.2)	0.598
Fibrosis intersticial	0.7 (0.2)	0.9 (0.2)	0.598
Fibrosis intersticial	0.6 (0.2)	0.8 (0.2)	0.594

Los datos se expresan mediante la media (error estándar de la media) y el valor p se obtiene mediante la comparación de la prueba t-student en el caso de comparaciones cualitativas-cuantitativas o *Chi-cuadrado* en el caso de comparaciones cualitativas.

SLEDAI= Índice de actividad del lupus eritematosos sistémico.

6.3 Cribado de perfil de expresión de miRNA mediante técnica

de microarrays en función de respuesta al tratamiento:

Inicialmente se evaluó la expresión diferencial de miRNAs en orina de pacientes con NL proliferativa, mediante el uso de microarrays prediseñados con 96 miRNAs purificados y tecnología LNA. En la fase de cribado, realizada sobre una cohorte de 14 pacientes, se realizaron dos paneles de microarrays para cada paciente, incluyendo 7 pacientes en la condición R y 7 en la condición NR. La primera placa de microarray para cada paciente se realizó en el momento del brote y antes del inicio del tratamiento y la segunda de forma evolutiva (post-brote) con una media de 10.9 ± 2.9 meses, sin encontrarse diferencias significativas entre grupos de estudio en cuanto al tiempo de obtención de la segunda muestra ($p = 0.704$).

Las placas se repartieron en los siguientes grupos o condiciones:

- Grupo NR: 7 pacientes en dos condiciones
 1. Durante el brote: NL011, NL021, NL031, NL041, NL051, NL061 y NL071
 2. Después del brote: NL012, NL022, NL032, NL042, NL052, NL062 y NL072
- Grupo R: 7 pacientes en dos condiciones
 1. Durante el brote: NL081, NL091, NL101, NL111, NL121, NL131 y NL141
 2. Después del brote: NL082, NL092, NL102, NL112, NL122, NL132 y NL142

6.3.1 Control de calidad del estudio de microarrays

En el primer paso del análisis de resultados se realizó un control de calidad exhaustivo para determinar si había alguna muestra susceptible de ser eliminada del estudio con el objetivo de mejorar la calidad del mismo. En dicho control se realizaron algunos gráficos para permitir evaluar la calidad y la estructura de las muestras. Se realizó un diagrama de cajas para cada una de las muestras así como la representación de los NAs (miRNA donde el valor de Ct ["Cycle threshold" o ciclo umbral] es 40 o superior) en las muestras y se miraron algunos de los controles que incluye la casa Exiqon® en los paneles de microarray.

- Análisis de componentes principales de las muestras

El análisis de componentes principales sirve para ver la diferente agrupación de las muestras. Sirve para describir un conjunto de datos en términos de nuevas variables no correlacionadas, ordenándose los componentes en función del grado de varianza que describen. El análisis por componentes principales separa por el primer componente, con un 34% de variabilidad total, a la mayoría de muestras en el momento del brote en función de su respuesta al tratamiento.

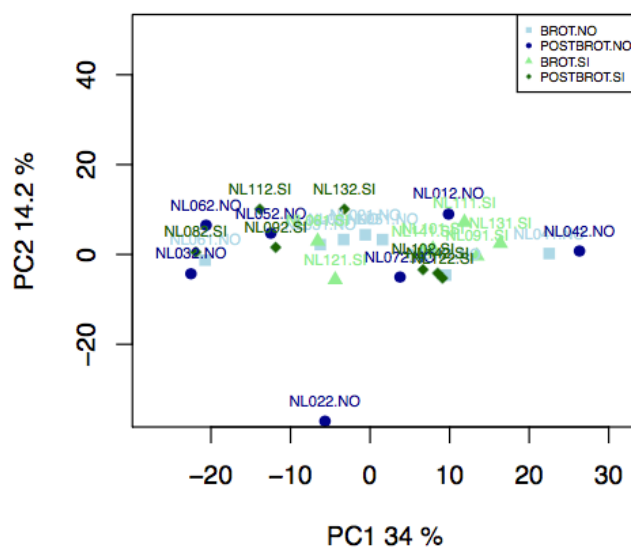


Gráfico 2: Análisis de componentes principales entre los grupos R y NR. Se puede detectar como una muestra (NL022) no se separa claramente en comparación al resto de muestras a estudio.

- Diagrama de cajas de los Ct para cada una de las muestras

La siguiente gráfica muestra la distribución de los Ct por muestras destacando en las muestras NL022 y NL111 una mayor dispersión de datos que en las otras.

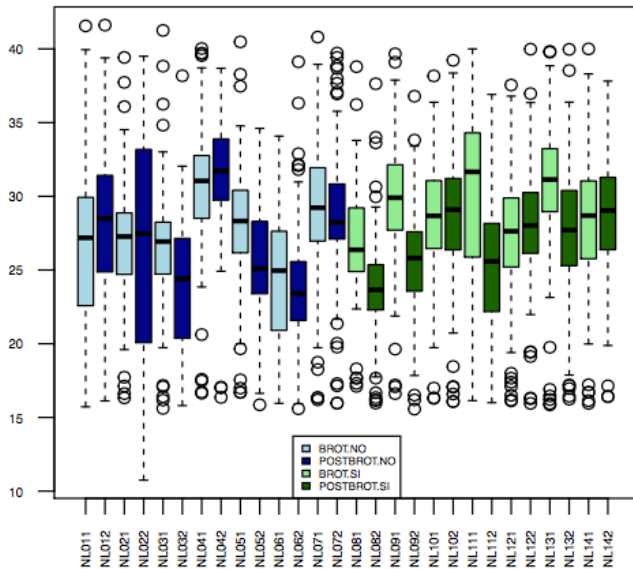


Gráfico 3: Diagrama de cajas de Cts.
 Dos de las muestras (NL022 y NL111) presentan una mayor dispersión de datos.
Eje de ordenadas = valores de Cts.

- Número de NAs en cada una de las muestras

En el Gráfico 4 se observa que la muestra NL022 presenta un elevado número de NAs en comparación con el resto de las muestras. Es decir, un elevado número de determinaciones en las que el valor de Ct resulta ≥ 40 .

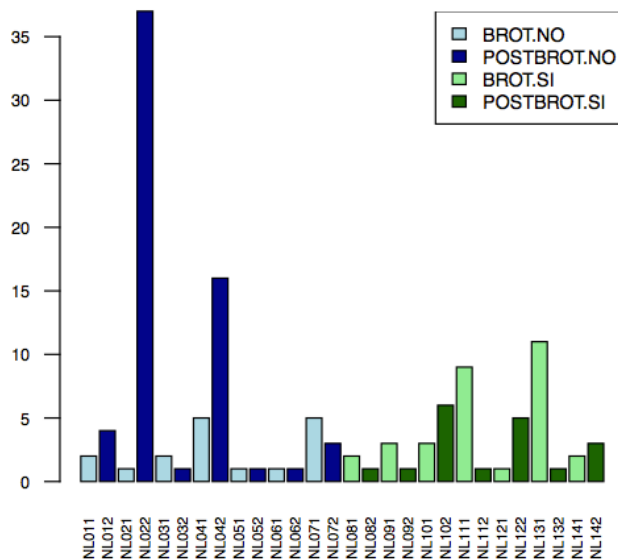


Gráfico 4: Número de NAs por muestra.
 Se observa que la muestra NL022 presenta un elevado número de NAs en comparación al resto de muestras. La siguiente muestra que presenta más NAs es la muestra NL042. *Eje de ordenadas = valores de Cts.*

- Diagrama de cajas de Cts para cada uno de los microRNAs

La gráfica boxplot muestra como la mayoría de los Cts para los distintos miRNAs se concentran entre los valores 20 y 30, encontrándose no obstante los correspondientes a los genes *hsa-mir-145* y *Cel-mir-39-3p CP* cercanos a 40, considerado esté como el límite de detección y por lo tanto asumiendo escasas concentraciones de RNA o ausencia del mismo.

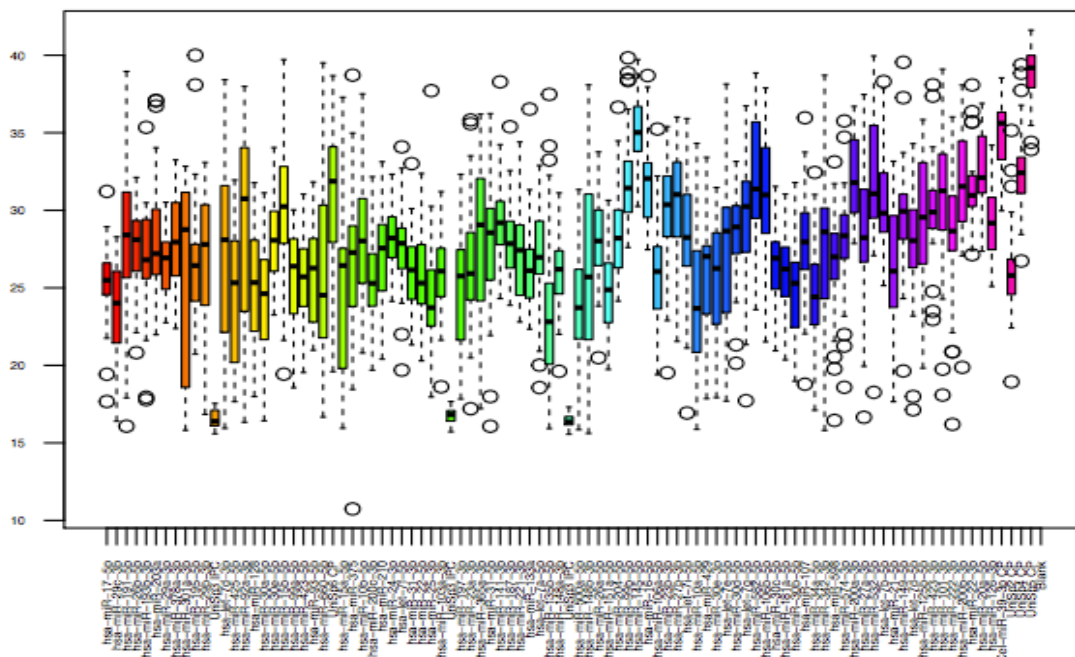


Gráfico 5: Diagrama de cajas de los Cts para cada uno de los miRNA. Los valores de Cts correspondientes a los genes *hsa-mir-145* y *Cel-mir-39-3p* se encuentran cercanos a 40. *Eje de ordenadas = valores de Cts.*

- Número de NAs en cada uno de los miRNA

Como muestra la gráfica no hay ningún miRNA que de manera habitual haya tenido valores de Ct superiores a 40, en los diferentes paneles procesados.

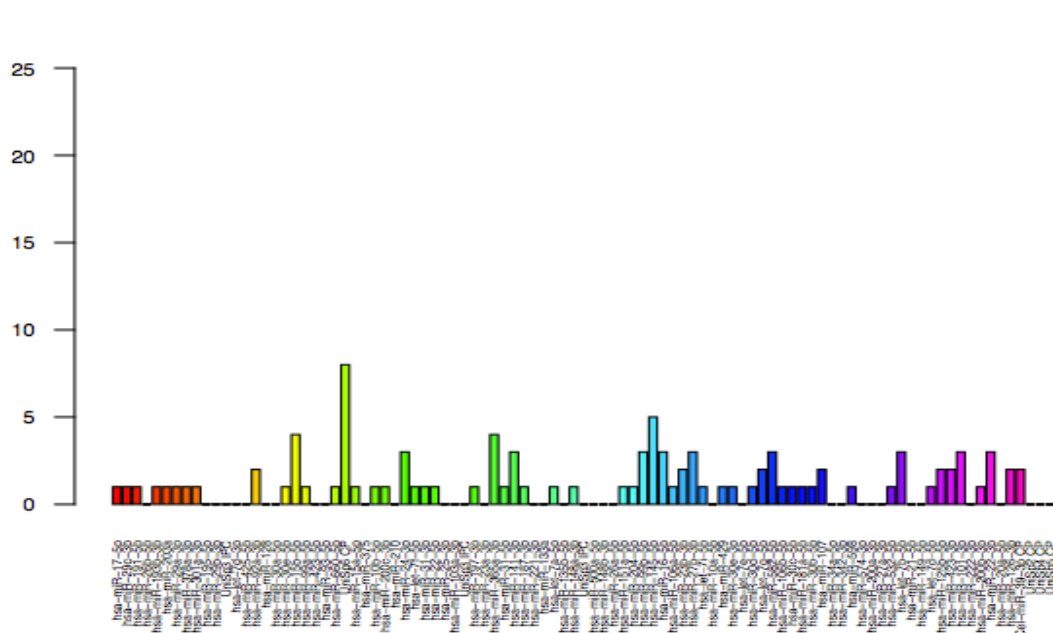


Gráfico 6: Número de NAs para cada miRNA. Ningún miRNA ha presentado de forma habitual valores de Cts superiores a 40. *Eje de ordenadas = valores de Cts.*

- Expresión de los controles *UniSp2*, *UniSp4* y *UniSp5*

Para comprobar la eficacia del proceso de qPCR se usaron tres controles sintéticos (*UniSp2*, *UniSp4* y *UniSp5*) introducidos deliberadamente durante el proceso de extracción del RNA. Estas sondas presentaban una concentración creciente, siendo *UniSp2* la de menor concentración y *UniSp5* la de mayor como se muestra en los resultados de el Gráfico 7. El análisis de resultado permitió la apreciación de lo esperado en cuanto a concentración creciente, pese a apreciarse mayor dispersión de datos en las concentraciones más bajas.

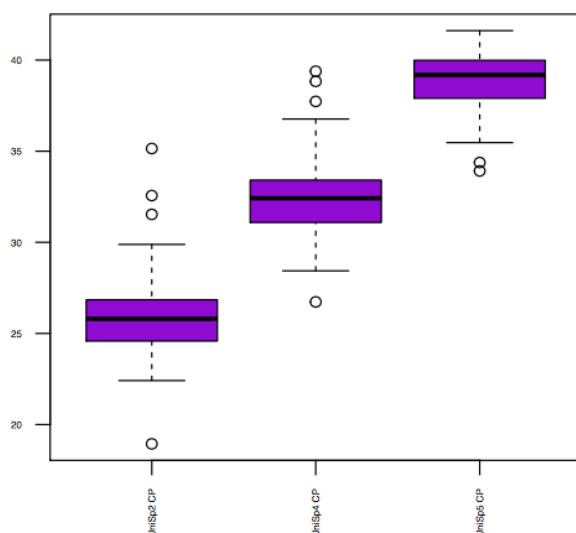


Gráfico 7: Expresión de los controles *UniSp2*, *UniSp4* y *UniSp5*. El resultado muestra lo esperado en cuanto a concentración creciente de los distintos controles. Las concentraciones más bajas muestran mayor dispersión de datos. *Eje de ordenadas = valores de Cts.*

○ Expresión del control *UniSp3*

El control *UniSp3* consta de una sonda sintética incluida tres veces en cada panel de microarray usado para evaluar la eficacia de la reacción de qPCR así como de control inter-placa para permitir el ajuste de resultados. Tal y como se pudo observar en el Gráfico 8 el control *UniSp3* se comportó de la misma manera en todas las placas.

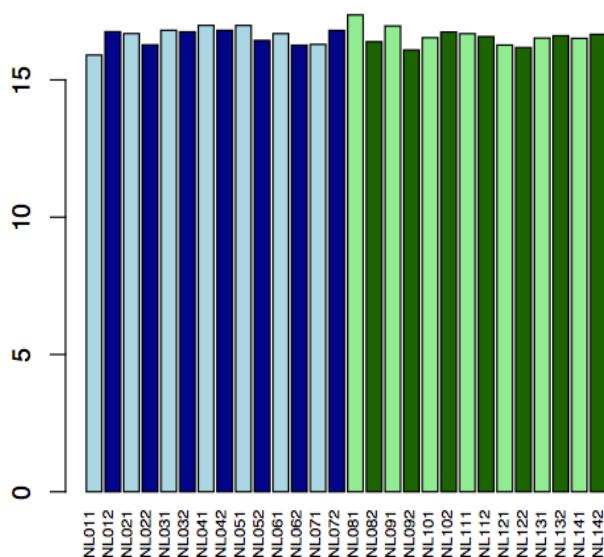


Gráfico 8: Expresión de los controles *UniSp3*. El control mostró comportamiento equiparable en todas las placas. *Eje de ordenadas = valores de Cts.*

○ Expresión de los controles *UniSp6* y *cel-39-3p*

Estos dos controles se añadieron en el momento de la síntesis del cDNA y se usaron para verificar la ausencia de inhibición en dicho paso y por lo tanto la eficacia del mismo. Los Ct obtenidos para dichos controles mostraron cierta variabilidad, remarcando de forma especial la muestra NL091 ya que no se observaron Ct ni para un control ni para el otro.

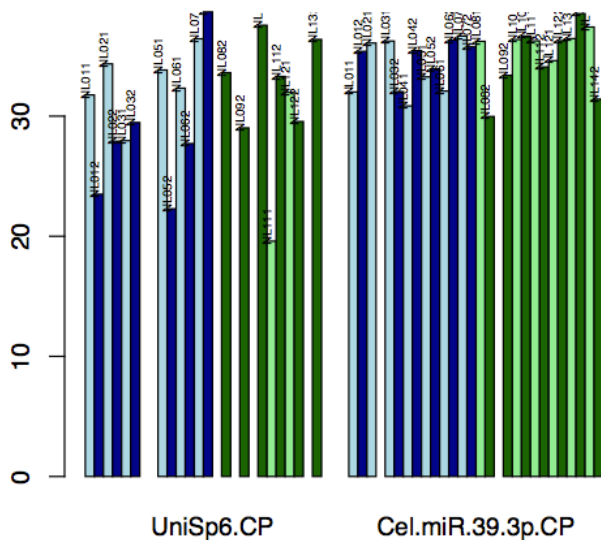


Gráfico 9: Expresión de los controles *UniSp6* y *cel-39-3p*. Número de NAs para cada miRNA. Existen muestras en las que no se encuentran Cts inferiores a 40 para el control *UniSp6* y en otros casos para el control *Cel-miR-39-9p*. La muestra NL091 no muestra Cts ni para un control ni para el otro. *Eje de ordenadas = valores de Cts.*

○ Expresión del control *miR-30c*

El *miR-30c* es un miRNA que se halla presente de forma habitual en las muestras de orina, por lo que se espera que su evaluación demuestre su presencia en todas las muestras tal y como se aprecia en el Gráfico 10, exceptuando la muestra NL022.

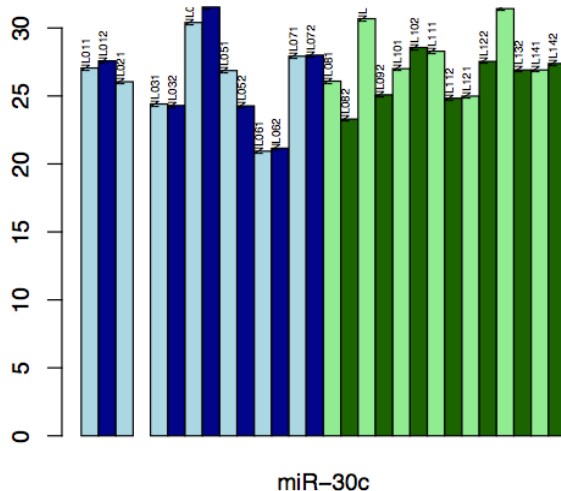


Gráfico 10: Expresión del control *miR-30c*. Todas las muestras muestran expresión del *miR-30c* a excepción de la muestra NL022. Eje de ordenadas = valores de Cts.

○ Conclusiones análisis de calidad:

En los análisis de calidad realizados se pudo observar que:

- Las muestras NL022 y NL111 presentaban mucha variabilidad en los valores obtenidos de Ct en las distintas muestras.
- El número de Cts superiores a 40 (número de NA) fue muy elevado en la muestra NL022.
- El control *UniSp6* presentó un número relativamente elevado de Ct por encima de 40.
- Todos los genes presentaban variabilidad interplaca con excepción del control *UniSp3*.
- Los controles de la retrotranscriptasa (*UniSp6* y *Cel-miR-39-3p CP*) presentaban variabilidad indicando cierta falta de eficacia en dicho paso, especialmente en la muestra NL091, donde no se observó expresión de ninguno de los dos.

- No se observó expresión de *miR-30c* (gen específico orina) en la muestra NL022.

Con todo ello, y para mejorar la validez de los resultados posteriores se decidió: (1) **eliminar del estudio la muestra NL022 y también la muestra NL021 en aquellas comparaciones que fueran apareadas;** (2) **utilizar el control *UniSp3* como normalizador ya que se vio que era el que menor variabilidad mostraba.**

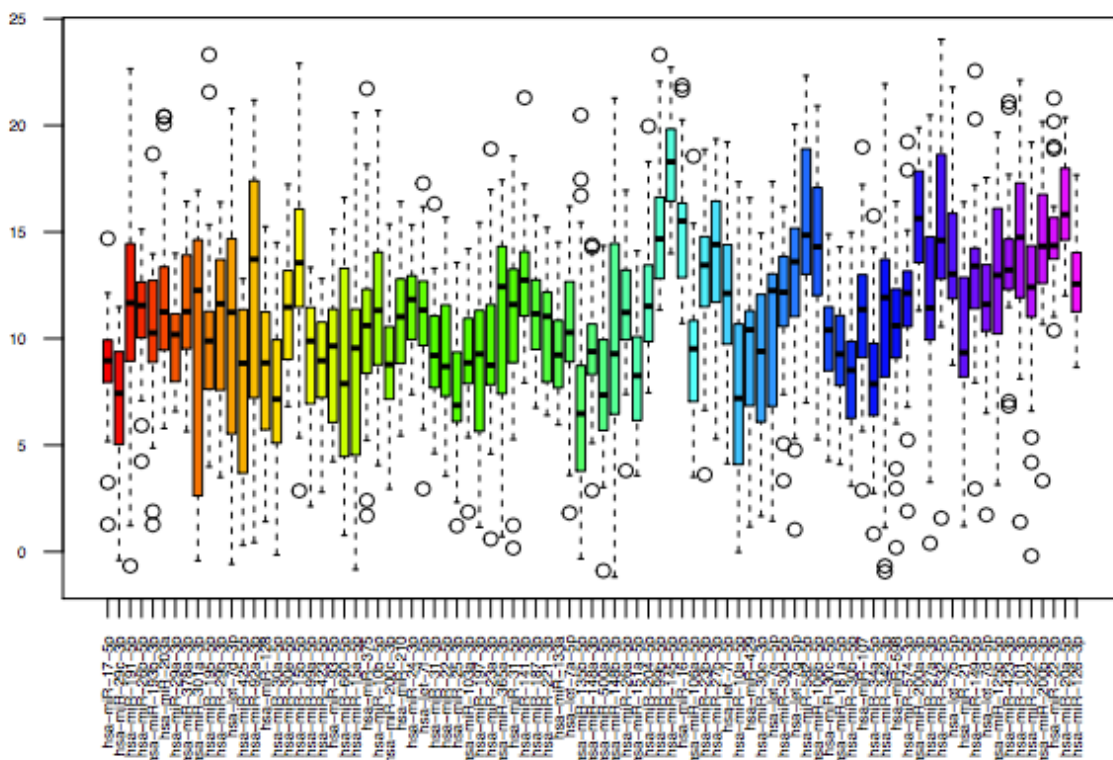


Gráfico 11: Valores de Ct normalizados para cada miRNA. A los valores de Ct de cada miRNAs se resta el valor de la media del control *UniSp3* que ha salido en cada placa. *Eje de ordenadas = valores de Cts.*

6.3.2 Análisis de resultados del estudio de microarrays

Una vez consideradas las conclusiones anteriormente expresadas en el análisis de calidad se procedió a realizar el análisis de resultados mediante el cálculo de la cuantificación relativa ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$), según el método de Livak (258), que se puede resumir de la siguiente manera:

1. $\Delta Ct = Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ endógeno}$
2. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra 1} - \Delta Ct \text{ calibrador}$
3. $RQ = \text{"Relative quantification"} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

El valor de RQ es la tasa de cambio (o "fold change") de la muestra problema, comparada con la muestra calibradora (muestra no tratada, muestra de referencia, ...). La muestra calibradora tiene un valor de RQ de 1, por lo que por ejemplo, un valor de RQ de 10 significa que el gen está 10 veces más expresado en la muestra problema que en la muestra calibradora y un RQ de 0.1, significa que el gen está 10 veces menos expresado.

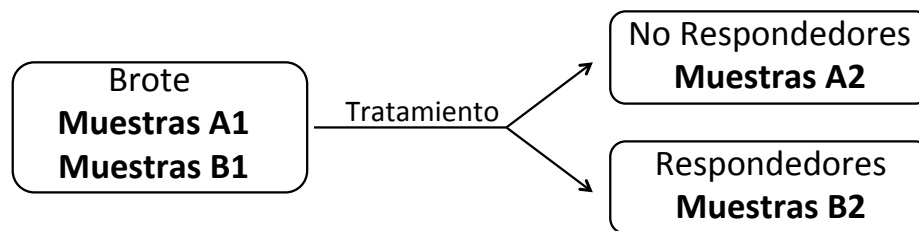
Una vez calculadas las expresiones relativas, se procedió a realizar el test estadístico t-student para determinar si había diferencias entre los dos grupos de muestras que se compararon.

- **Comparaciones**

Las cuatro comparaciones que se llevaron a cabo se realizaron mediante el uso de métodos estadísticos apareados en dos casos (en las cuales fueron excluidos los resultados de las muestras NL021 y NL022) y métodos no apareados en otros dos (que se hicieron sin la muestra NL022). Las comparaciones realizadas se describen a continuación y en la Figura 3:

- *Comparaciones con muestras apareadas:*
 1. Post-Brote No Respondedores vs Brote No Respondedores (A2 vs A1).
 2. Post-Brote Respondedores vs Brote Respondedores (B2 vs B1).

- *Comparaciones muestras no apareadas:*
 3. Brote Respondedores vs Brote No Respondedores (B1 vs A1).
 4. Post-Brote Respondedores vs Post-Brote No Respondedores (B2 vs A2).



4 Análisis comparativos:

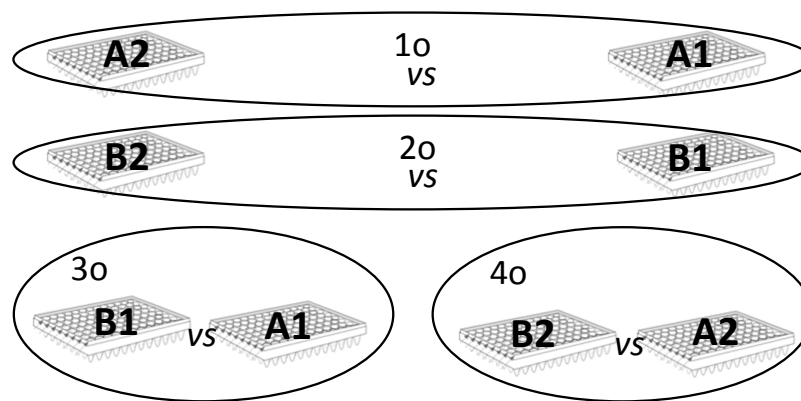


Figura 3. Esquema de las 4 comparaciones realizadas en la fase de cribado de miRNAs en los exosomas urinarios de los pacientes con nefritis lúpica. A1 = No Respondedores en el momento del brote; A2 = No Respondedores en el momento post-brote; B1 = Respondedores en el momento del brote; B2 = Respondedores en el momento post-brote.

En la **comparación 1** (Post-Brote No Respondedores vs Brote No Respondedores), realizada mediante el test estadístico t-student para muestras apareadas se obtuvo un total de 9 miRNAs con expresión diferencial entre grupos de comparación siguiendo el criterio de valor de $p < 0.05$, tal y como muestra la Tabla 7A (resultados según valor decreciente del valor de p) y Figura 4.

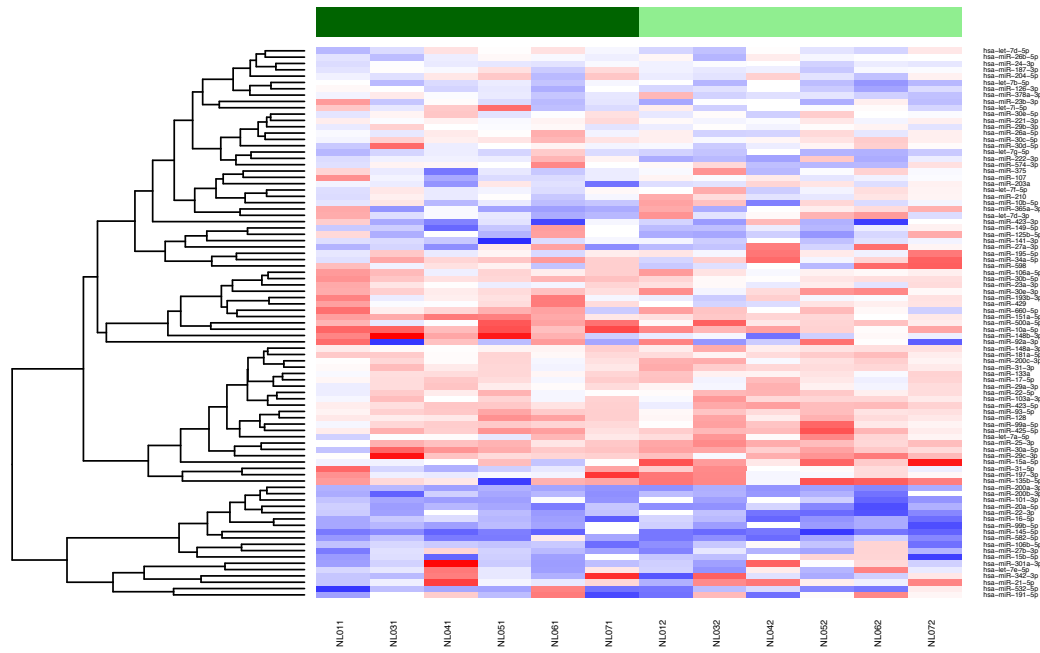


Figura 4. Heatmap que muestra los genes más diferencialmente expresados entre el momento del brote (verde oscuro) y el post-brote (verde claro) en el grupo de "No Respondedores".

En la **comparación 2** (Post-Brote Respondedores Vs Brote Respondedores), realizada mediante el test estadístico t-student para muestras apareadas se obtuvo un total de 12 miRNAs con expresión diferencial entre grupos de comparación siguiendo el criterio de valor de $p < 0.05$, tal y como muestra la tabla 7B (resultados según valor decreciente del valor de p) y Figura 5.

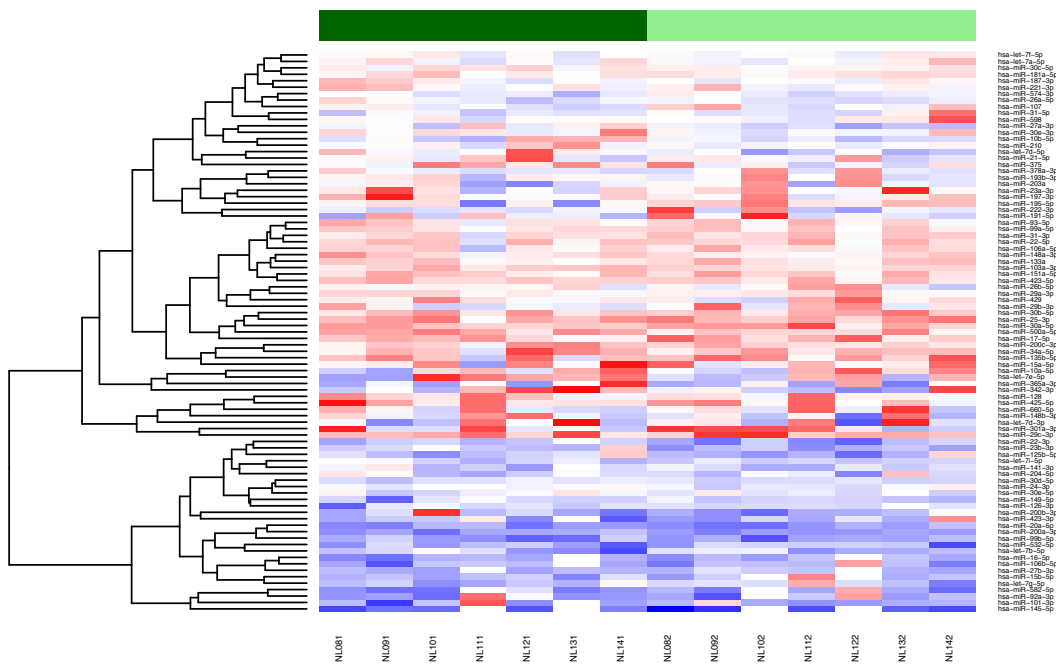


Figura 5. Heatmap que muestra los genes más diferencialmente expresados entre el momento del brote (verde oscuro) y el post-brote (verde claro) en el grupo de "Respondedores".

Tabla 7. Comparación entre los niveles de expresión génica de los distintos miRNAs en las comparaciones pareadas entre post-brote y brote en función de su respuesta al tratamiento.

A. Comparación 1: Post-Brote No Respondedores Vs Brote No Respondedores				B. Comparación 2: Post-Brote Respondedores Vs Brote Respondedores			
Gen	ddCt	RQ	P	Gen	ddCt	RQ	p
<i>miR-26b-5p</i>	-1.19498	2.28942	0.00055	<i>miR-107</i>	-3.34235	10.14259	0.01792
<i>miR-15a-5p</i>	-6.70283	104.17213	0.00398	<i>miR-203a</i>	-4.85630	28.96633	0.01808
<i>miR-10a-5p</i>	2.68488	0.15551	0.01734	<i>miR-378a-3p</i>	-3.73605	13.32485	0.02088
<i>miR-31</i>	-1.80563	3.49583	0.01990	<i>miR-17-5p</i>	-3.02740	8.15342	0.02178
<i>miR-22-5p</i>	-1.81092	3.50865	0.02431	<i>let-7b-5p</i>	-3.15765	8.92373	0.02436
<i>miR-148b-3p</i>	7.22065	0.00670	0.02900	<i>miR-195-5p</i>	-6.54653	93.47660	0.02982
<i>miR-99b-5p</i>	3.89147	0.06738	0.03883	<i>miR-532-5p</i>	-3.10358	8.59547	0.03533
<i>miR-195-5p</i>	-3.29808	9.83608	0.04394	<i>miR-29a-3p</i>	-2.28568	4.87593	0.03548
<i>miR-25-3p</i>	-2.10507	4.30218	0.04952	<i>miR-29b-3p</i>	-4.52032	22.94836	0.03713
				<i>miR-135b-5p</i>	-4.06065	16.68694	0.03769
				<i>miR-598</i>	-3.17308	9.01968	0.04023
				<i>miR-31</i>	-3.73175	13.28520	0.04180

En la **comparación 3** (Brote Respondedores Vs Brote No Respondedores), realizada mediante el test estadístico t-student para muestras no apareadas se obtuvo un total de 4 miRNAs con expresión diferencial entre grupos de comparación siguiendo el criterio de valor de $p < 0.05$, tal y como muestra la Tabla 8A (resultados según valor decreciente del valor de p) y en la Figura 6.

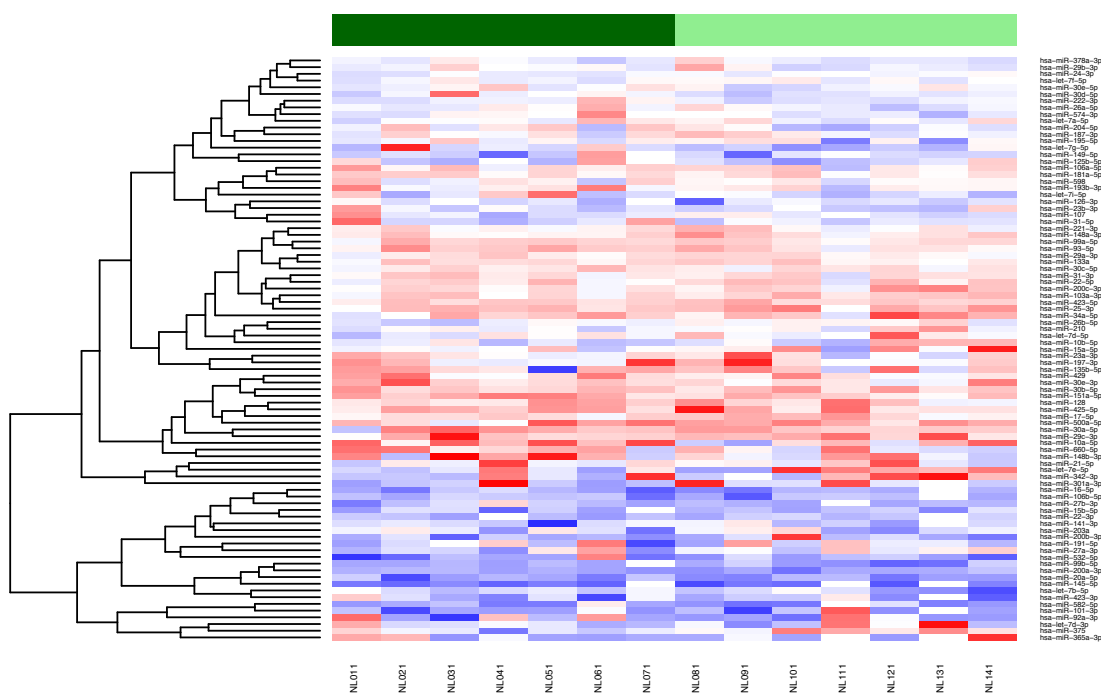


Figura 6. Heatmap que muestra los genes más diferencialmente expresados entre el grupo de "Respondedores" (verde oscuro) y "No Respondedores" (verde claro) en el momento del brote.

En la **comparación 4** (Post-Brote Respondedores Vs Post-Brote No Respondedores), realizada mediante el test estadístico t-student para muestras no apareadas se obtuvo un total de 1 miRNAs con expresión diferencial entre grupos de comparación siguiendo el criterio de valor de $p < 0.05$, tal y como muestra la Tabla 8B (resultados según valor creciente del valor de p) y Figura 7.

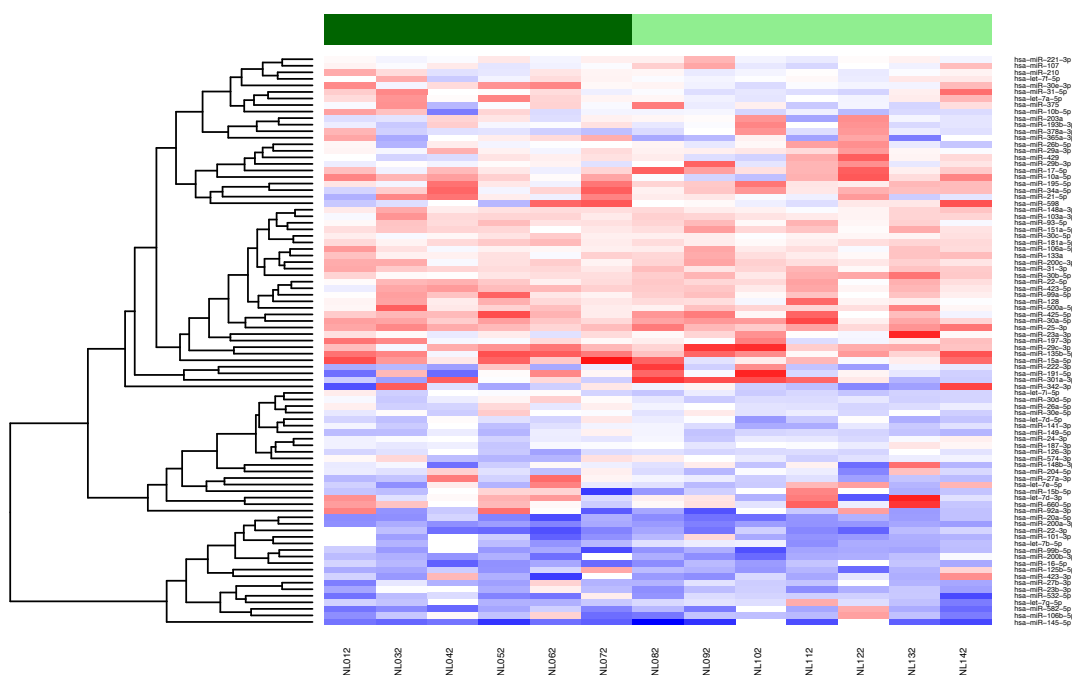


Figura 7. Heatmap que muestra los genes más diferencialmente expresados entre el grupo de "Respondedores" (verde oscuro) y "No Respondedores" (verde claro) en el momento del post-brote.

Tabla 8. Comparación entre los niveles de expresión génica de los distintos miRNAs en el momento del brote y del post-brote grupos de respuesta al tratamiento en función del período evolutivo.

A. Comparación 3: Brote Respondedores Vs Brote No Respondedores				B. Comparación 4: Post-Brote Respondedores Vs Post-Brote No Respondedores			
Gen	ddCt	RQ	P	Gen	ddCt	RQ	p
<i>miR-10a-5p</i>	5.64337	0.02001	0.02369	<i>miR-365a-3p</i>	8.06055	0.00375	0.03751
<i>miR-151a-5p</i>	3.44778	0.09165	0.02419				
<i>miR-204-5p</i>	3.76464	0.07358	0.02971				
<i>let-7i-5p</i>	4.07638	0.05928	0.04722				

6.4 Validación de los resultados mediante análisis de RT-qPCR

individual

En la fase de validación, con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos en el cribado se escogieron los miRNAS con mayor grado de sobreexpresión ($RQ > 10$) y significancia estadística ($p < 0.05$) (*miR-15a-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-31-5p*, *miR-107*, *miR-135b-5p*, *miR-195-5p*, *miR-203-5p* y *miR-378a-3p*) y aquellos con el mayor grado de supresión ($RQ < 0.1$) y significancia estadística ($p < 0.05$) (*miR-10a-5p*, *miR-99b-5p*, *miR-148b-3p*, *miR-151a-5p*, *miR-204-5p*, *miR-365b-3p* y *let-7i-5p*) como miRNAs candidatos para el análisis mediante RT-qPCR individual. Los miRNAS seleccionados fueron evaluados en cada una de las diferentes comparaciones establecidas, ya descritas en el cribado inicial (ver Figura 2), en una nueva cohorte de pacientes con glomerulonefritis tipo III/IV compuesta de un total de 43 pacientes, 22 en el grupo R y 21 en el grupo NR. Como normalizador se usó el *miR-423-3p* al ser uno de los miRNAs con menor variabilidad en los resultados obtenidos con muestras de pacientes afectos de NL en la etapa de cribado. Debido a la falta de suficiente muestra el análisis correspondiente al *miR-29a-3p*, *miR-204-5p* y *let-7i* sólo pudo realizarse en las comparaciones con resultado significativo en la etapa de cribado no siendo posible su determinación en todas las muestras y por tanto no siendo posible todas las 4 comparaciones.

Tabla 9. Comparación entre los niveles de expresión génica de los distintos miRNAs en las comparaciones pareadas entre post-brote y brote en función de su respuesta al tratamiento.

A. Comparación 1: Post-Brote No Respondedores Vs Brote No Respondedores			B. Comparación 2: Post-Brote Respondedores Vs Brote Respondedores		
Gen	RQ	P	Gen	RQ	p
<i>miR-10a-5p</i>	1.1966	0.519	<i>miR-10a-5p</i>	0.7233	0.104
<i>miR-15a-5p</i>	0.6455	0.120	<i>miR-15a-5p</i>	0.8360	0.597
<i>miR-29a-3p</i>	n.d.	-	<i>miR-29a-3p</i>	1.1649	0.601
<i>miR-31-5p</i>	1.0188	0.989	<i>miR-31-5p</i>	1.6345	0.075
<i>miR-99b-5p</i>	1.4134	0.382	<i>miR-99b-5p</i>	0.4260	0.035
<i>miR-107</i>	1.7606	0.048	<i>miR-107</i>	1.6738	0.005
<i>miR-135b-5p</i>	0.5879	0.132	<i>miR-135b-5p</i>	1.2416	0.231
<i>miR-148b-3p</i>	2.1949	0.013	<i>miR-148b-3p</i>	0.7507	0.449
<i>miR-151a-5p</i>	1.1694	0.271	<i>miR-151a-5p</i>	1.0309	0.887
<i>miR-195-5p</i>	1.2251	0.643	<i>miR-195-5p</i>	1.1635	0.573
<i>miR-203-5p</i>	1.2423	0.669	<i>miR-203-5p</i>	4.4454	0.182
<i>miR-204-5p</i>	n.d.	-	<i>miR-204-5p</i>	n.d.	-
<i>miR-365a-3p</i>	2.7308	0.192	<i>miR-365a-3p</i>	3.2674	0.034
<i>miR-378a-3p</i>	0.4159	0.189	<i>miR-378a-3p</i>	0.9241	0.952
<i>Let-7i</i>	n.d.	-	<i>Let-7i</i>	n.d.	-

n.d.= No determinado.

Los resultados de las **comparaciones 1 y 2** en el proceso de validación se muestran en la Tabla 9. Como se puede observar, en la comparación 1 solamente el *miR-107* y el *miR-148b-3p* fueron diferencialmente expresados entre los subgrupos de estudio ($p = 0.048$ y 0.013 respectivamente; Gráfico 12). En la comparación 2, tanto el *miR-107*, el *miR-99b-5p* como el *miR-365a-3p* fueron diferencialmente expresados de forma significativa ($p = 0.005$, 0.035 y 0.034 respectivamente; Gráfico 12). El *miR-31-5p* tenía una clara tendencia aunque no era significativo ($p = 0.075$), por lo que se decidió no descartarlo en el estudio.

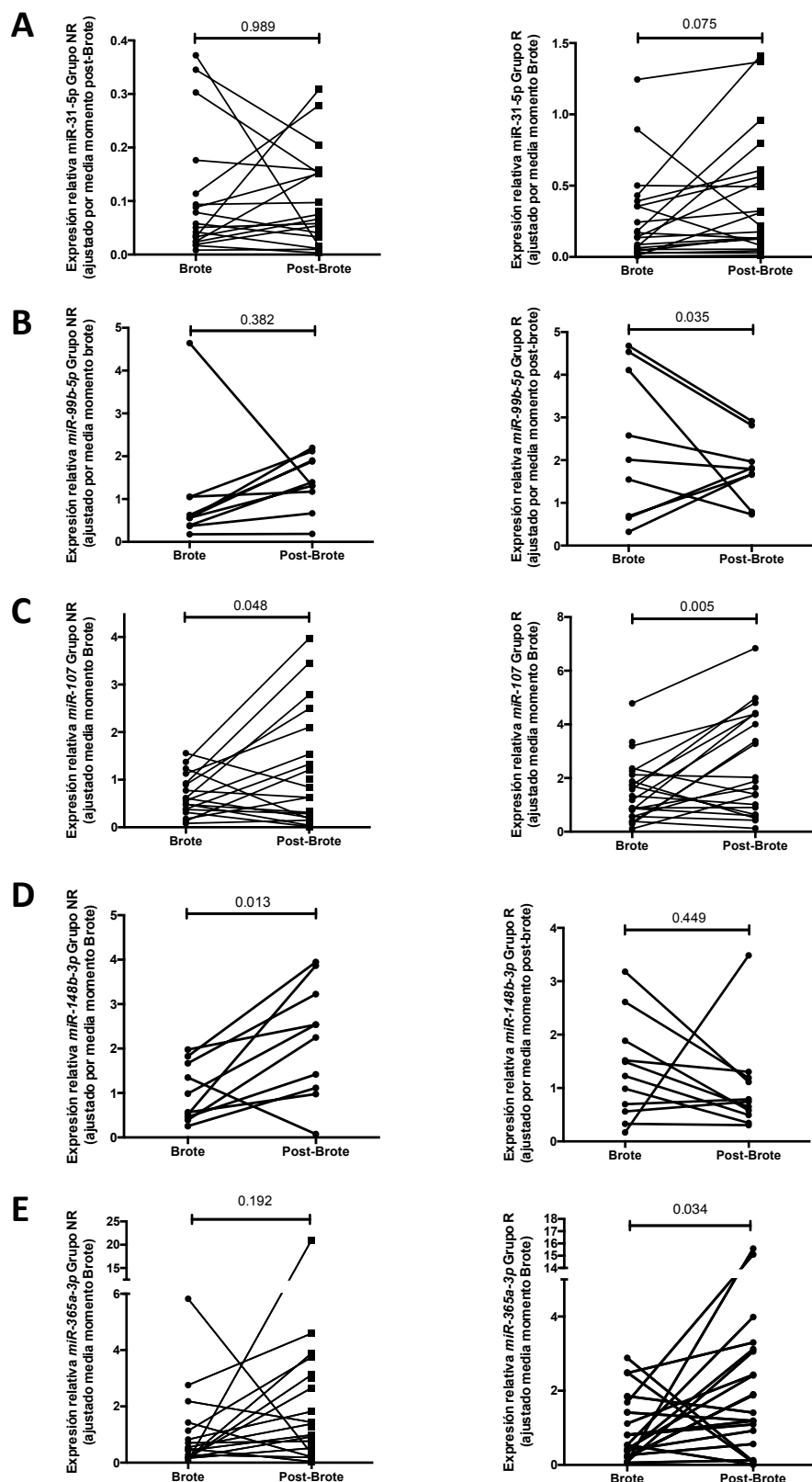


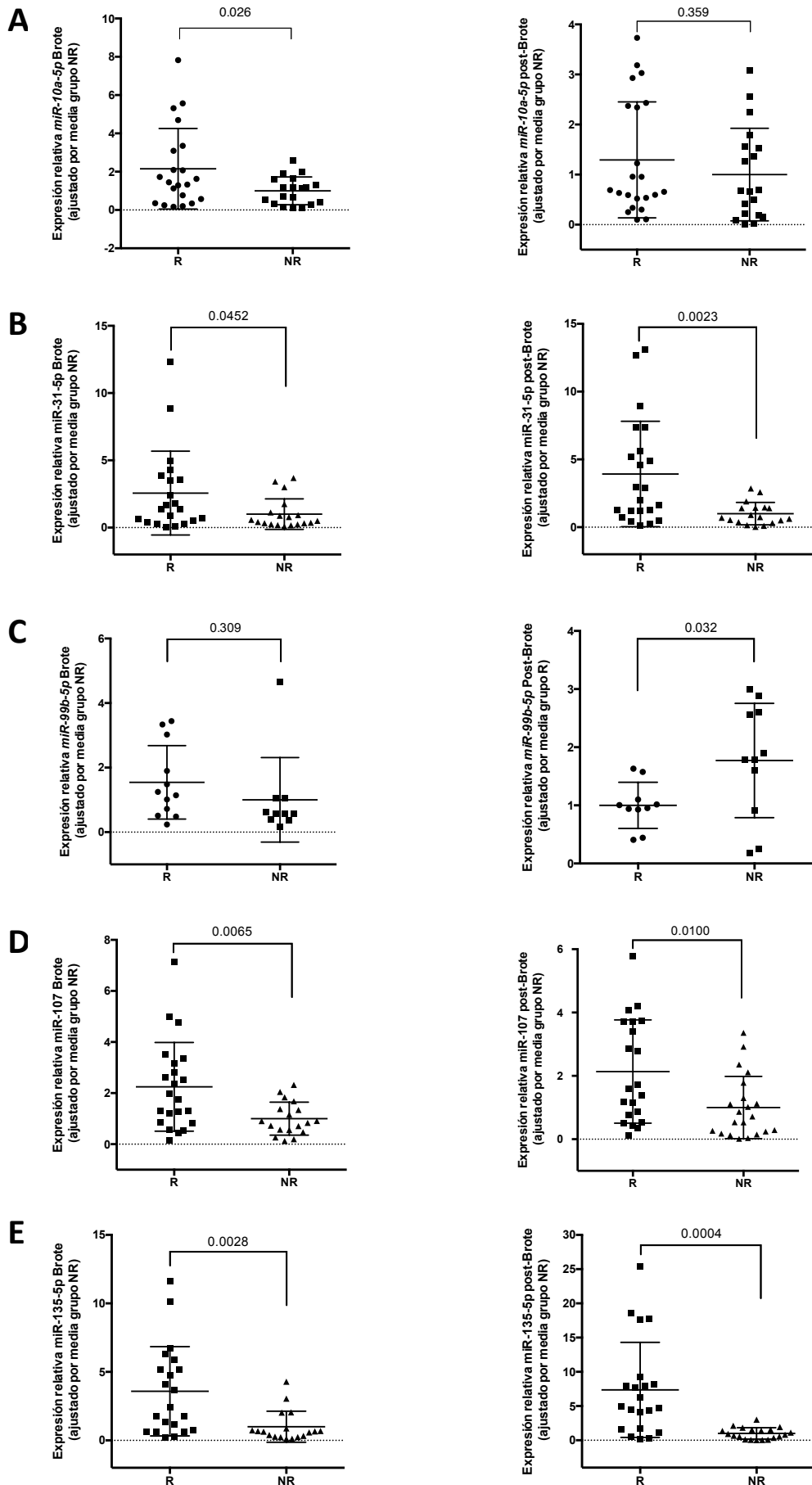
Gráfico 12. Representación gráfica de los valores de expresión relativa del (A) *miR-31-5p*, (B) *miR-99b-5p*, (C) *miR-107*, (D) *miR-148b-3p* y (E) *miR-365a-3p* en función del momento evolutivo correspondiente al grupo NR (Columna de la izquierda) y al grupo R (Columna derecha) Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student para muestras apareadas considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$. R = Respondedores; NR = No Respondedores

Los resultados de las **comparaciones 3 y 4** en el proceso de validación se muestran en la Tabla 10. En la comparación 3, se obtuvieron diferencias significativas en seis miRNAs (*miR-10a-5p*, *miR-31-5p*, *miR-107*, *miR-135b-5p*, *miR-148b-3p* y *miR-365a-3p*), de los cuáles el *miR-135b-5p* fue el más significativo entre los subgrupos (RQ = 3.48, p = 0.002) (Gráfico 13, columna izquierda). En la comparación 4, también se observaron diferencias significativas en cinco miRNAs (*miR-31-5p*, *miR-99b-5p*, *miR-107*, *miR-135b-5p* y *miR-378a-3p*) donde el más significativo volvió a ser el *miR-135b-5p* (RQ = 7.36, p < 0.0001) (Gráfico 3, columna derecha).

Tabla 10. Comparación entre los niveles de expresión génica de los distintos miRNAs en las comparaciones no pareadas entre post-brote y brote en función de su respuesta al tratamiento.

C. Comparación 3: Brote Respondedores Vs Brote No Respondedores			D. Comparación 4: Post-Brote Respondedores Vs Post-Brote No Respondedores		
Gen	RQ	p	Gen	RQ	p
<i>miR-10a-5p</i>	2.1518	0.026	<i>miR-10a-5p</i>	1.3009	0.359
<i>miR-15a-5p</i>	1.5405	0.257	<i>miR-15a-5p</i>	1.9950	0.149
<i>miR-29a-3p</i>	n.d.	-	<i>miR-29a-3p</i>	n.d.	-
<i>miR-31-5p</i>	2.5675	0.041	<i>miR-31-5p</i>	4.1188	0.002
<i>miR-99b-5p</i>	1.5443	0.309	<i>miR-99b-5p</i>	0.5646	0.032
<i>miR-107</i>	2.2462	0.004	<i>miR-107</i>	2.1355	0.010
<i>miR-135b-5p</i>	3.4849	0.002	<i>miR-135b-5p</i>	7.3600	0.000
<i>miR-148b-3p</i>	2.0982	0.031	<i>miR-148b-3p</i>	0.6954	0.209
<i>miR-151a-5p</i>	1.4882	0.184	<i>miR-151a-5p</i>	1.3119	0.412
<i>miR-195-5p</i>	0.8832	0.787	<i>miR-195-5p</i>	0.8388	0.713
<i>miR-203-5p</i>	2.0940	0.131	<i>miR-203-5p</i>	7.4933	0.225
<i>miR-204-5p</i>	0.2559	0.139	<i>miR-204-5p</i>	n.d.	-
<i>miR-365a-3p</i>	2.2535	0.025	<i>miR-365a-3p</i>	2.6963	0.071
<i>miR-378a-3p</i>	2.8007	0.182	<i>miR-378a-3p</i>	6.2234	0.026
<i>let-7i-5p</i>	0.3839	0.144	<i>let-7i-5p</i>	n.d.	-

n.d.= No determinado.



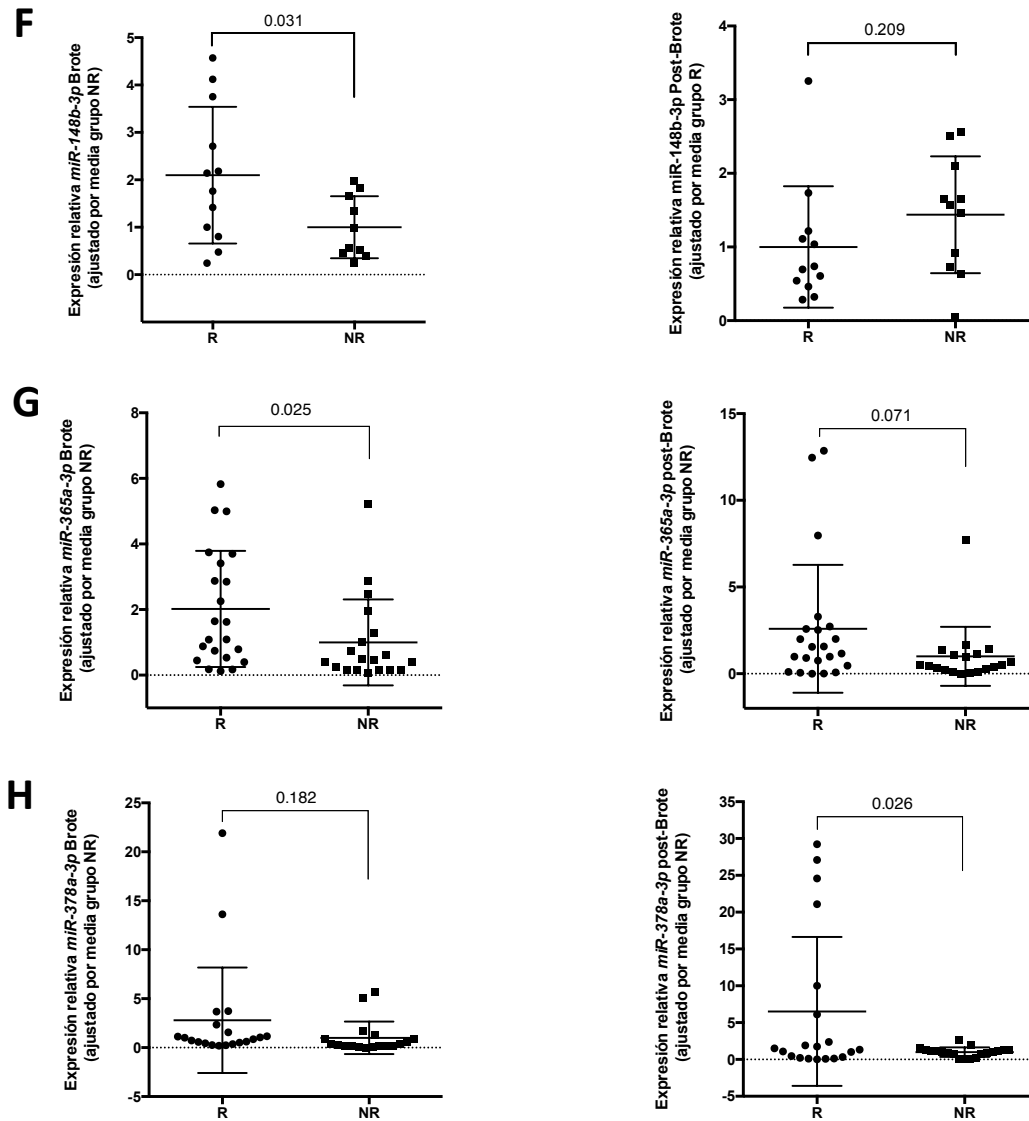


Gráfico 13. Representación gráfica de los valores de expresión relativa del (A) *miR-10a-5p*, (B) *miR-31-5p*, (C) *miR-99b-5p*, (D) *miR-107*, (E) *miR-135b-5p*, (F) *miR-148b-3p*, (G) *miR-365a-3p* y (H) *miR-378a-3p* en función respuesta al tratamiento en el momento del Brote (columna izquierda) o en el momento del post-Brote (columna derecha). Valores ajustados a media de grupo NR. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$. R = Respondedores; NR = No Respondedores.

Después de los estudios de validación ocho miRNAs se confirmaron como diferentes entre los subgrupos de estudio:

- **Comparación 1:** *miR-107* y *miR-148b-3p*.
- **Comparación 2:** *miR-107*, *miR-31-5p*, *miR-99b-5p* y *miR-365a-3p*.
- **Comparación 3:** *miR-107*, *miR-31-5p*, *miR-148b-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-365a-3p* y *miR-10a-5p*.
- **Comparación 4:** *miR-107*, *miR-31-5p*, *miR-99b-5p*, *miR-135b-5p* y *miR-378a-3p*.

A partir de estos resultados, y para los siguientes estudios se decidió escoger aquellos miRNAs diferencialmente sobreexpresados ($RQ > 1$) y entre ellos, aquellos con mayor grado de sobreexpresión y mayor significancia en las diferencias estadísticas encontrada. Se prestó especial énfasis a las comparaciones 3 y 4 al considerar dichos grupos de estudio especialmente relevantes desde el punto de vista clínico. Finalmente, el *miR-107*, el *miR-31-5p* y el *miR-135b-5p* fueron los miRNAs escogidos y por lo tanto los usados en los siguientes estudios.

6.5 Análisis de los niveles séricos de los miRNAs elegidos

Para demostrar el origen renal de los miRNAs, en lugar de la simple identificación en orina de los miRNAs séricos por filtración glomerular en pacientes con nefropatía, se hizo una evaluación de los niveles de estos en sangre con muestras recogidas en la misma fecha que la de las muestras de orina usadas para los análisis previos, intentando identificar diferencias significativas.

Tras el análisis estadístico, usando las mismas comparativas que en los estudios realizados sobre los niveles urinarios, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación 2 para los niveles de *miR-31-5p* ($RQ = 0.5833$, $p = 0.005$), pero en sentido contrario a lo observado en la orina, es decir, así como a nivel urinario el grupo R mostró un incremento en la expresión en los niveles de *miR-31-5p* a medida que evolucionaba ($RQ > 1$), a

nivel sérico los niveles fueron presentando una supresión ($RQ < 1$) de forma evolutiva. También los niveles de *miR-135b-5p* mostraron diferencias significativas a nivel sérico en la misma comparación 2 ($RQ = 0.5926$, $p = 0.046$). Los resultados de los valores de expresión relativa, así como la significancia estadística, se muestran en la Tabla 11. La representación gráfica de estos miRNAs puede observarse en el Gráfico 14.

Tabla 11. Comparación entre los niveles de expresión génica de los distintos miRNAs en suero.

A. Comparación 1: Post-Brote No Respondedores Vs Brote No Respondedores			B. Comparación 2: Post-Brote Respondedores Vs Brote Respondedores		
Gen	RQ	P	Gen	RQ	p
<i>miR-31-5p</i>	1.6923	0.626	<i>miR-31-5p</i>	0.5833	0.005
<i>miR-107</i>	1.3451	0.644	<i>miR-107</i>	0.6148	0.270
<i>miR-135b-5p</i>	3.5000	0.370	<i>miR-135b-5p</i>	0.5926	0.046

C. Comparación 3: Brote Respondedores Vs Brote No Respondedores			D. Comparación 4: Post-Brote Respondedores Vs Post-Brote No Respondedores		
Gen	RQ	P	Gen	RQ	p
<i>miR-31-5p</i>	2.4286	0.075	<i>miR-31-5p</i>	1.0526	0.933
<i>miR-107</i>	1.8365	0.214	<i>miR-107</i>	1.2145	0.685
<i>miR-135b-5p</i>	4.3333	0.093	<i>miR-135b-5p</i>	0.6667	0.669

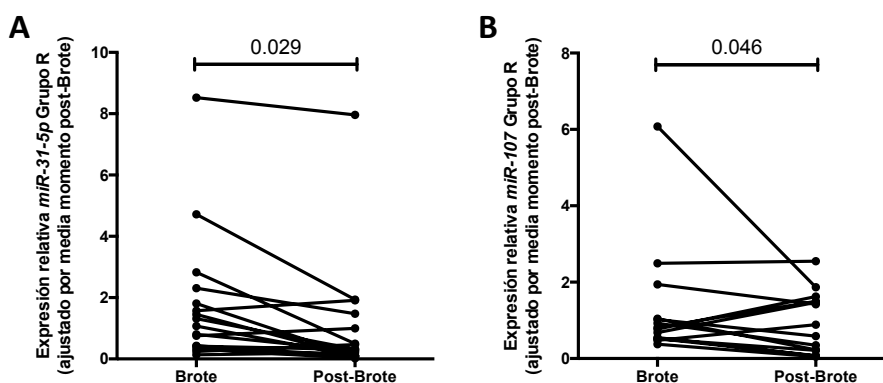


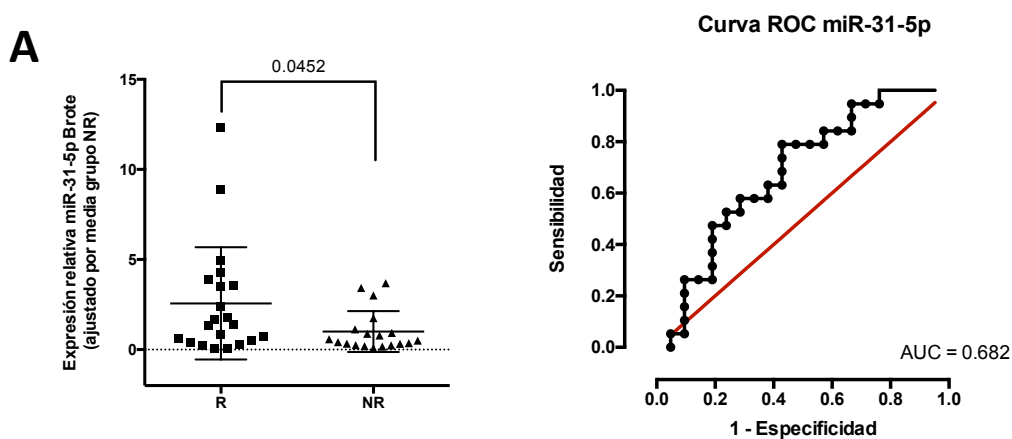
Gráfico 14. Representación gráfica de los valores de expresión relativa del (A) *miR-31-5p* y (B) *miR-135b-5p* a nivel sérico en el grupo R de pacientes de forma evolutiva. Valores ajustados a media del grupo R en el momento del post-brote. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student para muestras apareadas considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$. R = Respondedores.

6.6 Curvas ROC

Para evaluar el valor pronóstico de los diferentes miRNAs se realizaron curvas ROC entre los distintos grupos, des este modo se comparando los pacientes con LES en función de su respuesta al tratamiento.

6.6.1 Curvas ROC Respondedores vs No Respondedores

Se calcularon las curvas ROC con los niveles urinarios de los miRNAs seleccionados a estudio, con el objetivo de permitir una predicción de respuesta o remisión con el tratamiento inmunosupresor en pacientes con nefritis lúpica. De esta forma, en el momento del brote tanto el *miR-135b-5p* (ROC AUC 0.783 [IC 95% 0.639 - 0.926]) como el *miR-107* (ROC AUC 0.735 [IC 95% 0.580 - 0.899]) y el *miR-31* (ROC AUC 0.682 [IC 95% 0.515 - 0.849]) mostraron unas buenas curvas para permitir dicha diferenciación. Las representaciones de las distintas curvas ROC de los miRNAs a estudio se pueden observar en la Gráfico 15.



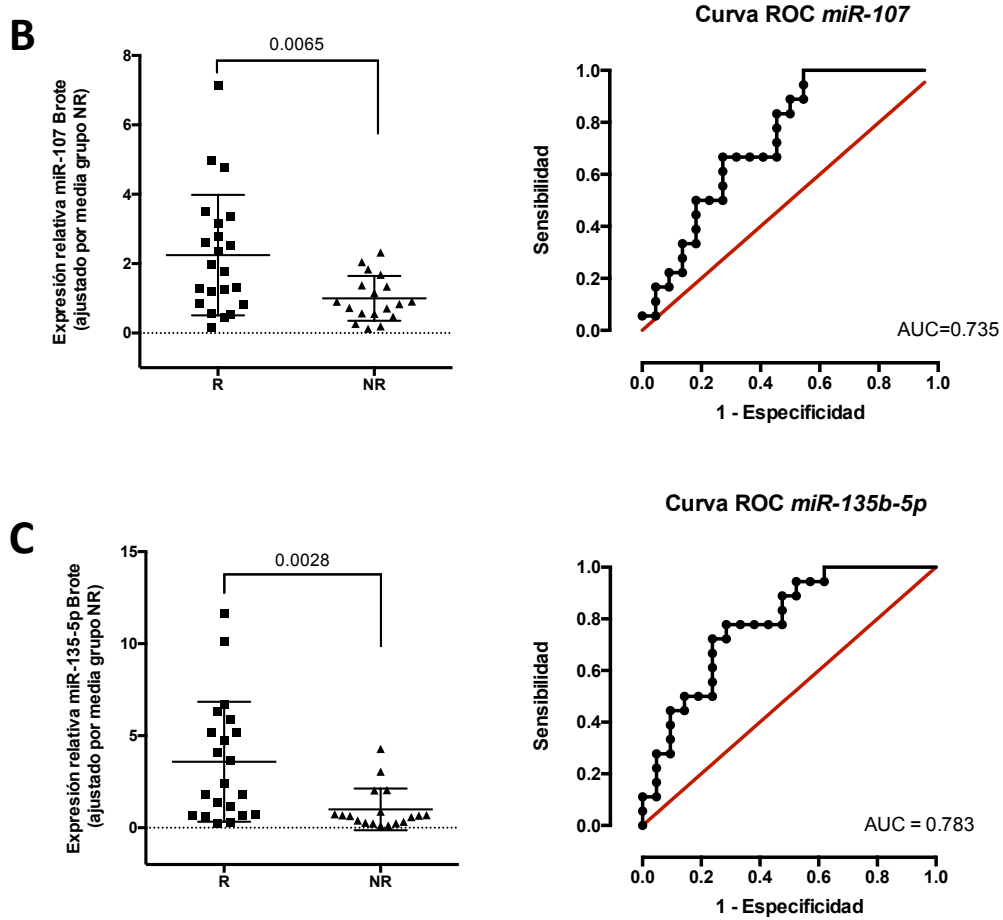


Gráfico 15. Curvas ROC correspondientes a los niveles de (A) *miR-31-5p*, (B) *miR-107*, y (C) *miR-135b-5p* en el momento del brote tras comparar los pacientes con NL usando como control el grupo R. AUC = Área bajo la curva; R = Respondedores; NR = No Respondedores.

También se realizaron las curvas ROC para los valores urinarios del *miR-31-5p* (AUC 0.755 [IC 95% 0.605 - 0.905]), *miR-107* (AUC 0.726 [IC 95% 0.572 - 0.880]) y *miR-135b-5p* (AUC 0.855 [IC 95% 0.732 - 0.978]) en el momento del postbrote con buenos resultados (Gráfico 16).

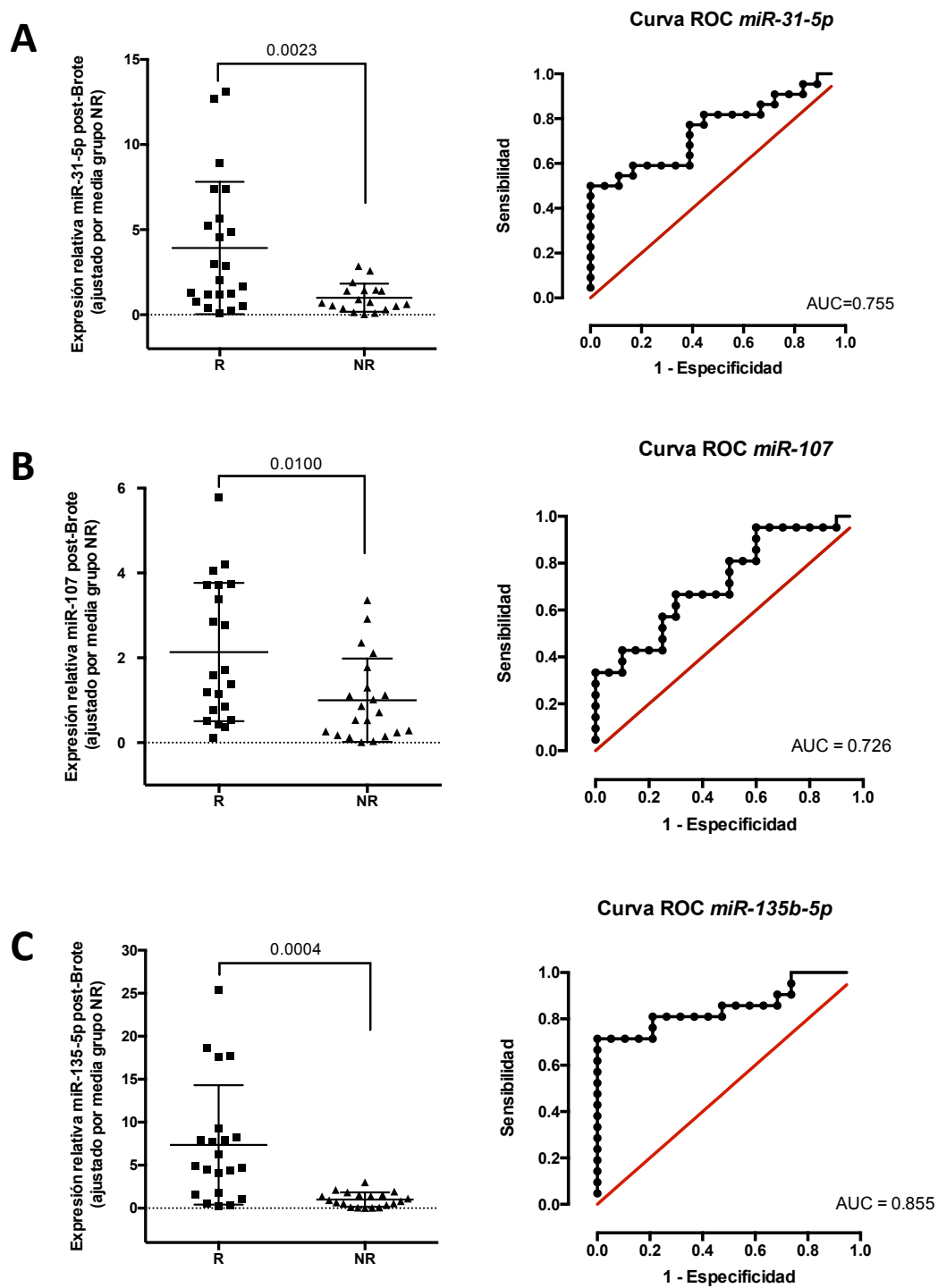


Gráfico 16. Curvas ROC correspondientes al (A) *miR-31-5p*, el (B) *miR-107* y el (C) *miR-135b-5p* en el momento del post-brote tras comparar a los pacientes con NL usando como control el grupo NR. AUC = Área bajo la curva; R = Respondedores; NR = No Respondedores.

Los resultados obtenidos en las curvas ROC, en el momento del brote, permiten elegir el punto de corte más adecuado, comprobado a través del índice de Youden, para diferenciar en los pacientes con NL aquellos que presentan escasa respuesta al tratamiento inmunosupresor respecto a aquellos que sí presentan remisión completa con la terapia estándar, posibilitando así anticipar dicha falta de respuesta y valorar el inicio de terapias más agresivas o planear controles y seguimientos más estrechos. Evolutivamente, también se han establecido los puntos de corte, para los valores más adecuados de las curvas ROC, que permiten identificar en este punto, aquellos pacientes susceptibles de presentar remisión completa, en el caso de no haberla presentado aún. Los valores resultantes en cuanto a sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, así como valor predictivo negativo para cada valor de corte de los diferentes miRNAs se especifican en la Tabla 12. Así, en el momento del brote tanto el *miR-107* como el *miR-135b-5p* mostraron buenas curvas para diferenciar los pacientes R de los NR. El mayor valor para el índice de Youden correspondió para el punto de corte < 0.08843 para el *miR-135b-5p* en el que se describe una sensibilidad del 77.8%, una especificidad del 71.4%, un VPP del 70% y un VPN del 78.9%. En el momento del post-brote, el mayor valor para el índice de Youden también correspondió al *miR-135b-5p* con el punto de corte > 0.0818 donde se encontraban unos valores de sensibilidad del 81%, especificidad del 79%, VPP del 80.9% y un VPN del 78.9% (Tabla 12).

Tabla 12. Valores resultantes de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para cada punto de corte de los valores de expresión de cada miRNA.

Gen	AUC	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Brote						
<i>miR-31</i>	0.682	< 0.0829	63.2	61.9	60	65
<i>miR-107</i>	0.735	< 0.7915	66.7	72.7	66.7	72.7
<i>miR-135b-5p</i>	0.783	< 0.0884	77.8	71.4	70	78.9
Post-Brote						
<i>miR-31</i>	0.755	> 0.1125	77.3	61.1	80.9	68.7
<i>miR-107</i>	0.726	> 1.3460	66.7	70	70	66.7
<i>miR-135b-5p</i>	0.855	> 0.0818	81	79	80.9	78.9

AUC = Área bajo la curva; VPN = Valor predictivo negativo; VPP = Valor predictivo positivo.

6.7 Cohorte control 1 (Sana)

El siguiente paso en la fase de cribado fue añadir una cohorte de control comparativa constituida por 15 pacientes sanos con una media de edad de 32.5 ± 1.1 años. Las medidas de tendencia central y valores de dispersión para los distintos miRNAs en dicha cohorte control se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Expresión relativa de los distintos miRNAs en la cohorte control de pacientes sanos (C).

Gen	RQ
<i>miR-31-5p</i>	0.55879 ± 0.07393
<i>miR-107</i>	1.62999 ± 0.19417
<i>miR-135b-5p</i>	0.16919 ± 0.02708

En el momento del brote la expresión relativa de los miRNAs del grupo control fue diferente de forma estadísticamente significativa respecto tanto en relación a la cohorte R como NR para el caso del *miR-31-5p* (tasa de cambio de 2.16 y 5.54, respectivamente; $p < 0.0001$) y *miR-135b-5p* (tasa de cambio de -1.84 y 1.89, respectivamente; $p = 0.0022$). El *miR-107* sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en relación a la cohorte NR (tasa de cambio de 2.43; $p = 0.0002$). Las representaciones gráficas de la distribución de los valores de expresión relativa de los distintos miRNAs se pueden observar en el Gráfico 17.

En el momento del post-brote, se observaron diferencias de expresión relativa estadísticamente significativas entre la cohorte control y las cohortes R y NR para el *miR-135b-5p* (Tasa de cambio de -2.28 y 3.22, respectivamente; $p < 0.0001$). En el caso del *miR-31-5p* sólo se apreciaron diferencias con la cohorte NR (Tasa de cambio de 5.44; $p < 0.0001$) (Gráfico 17).

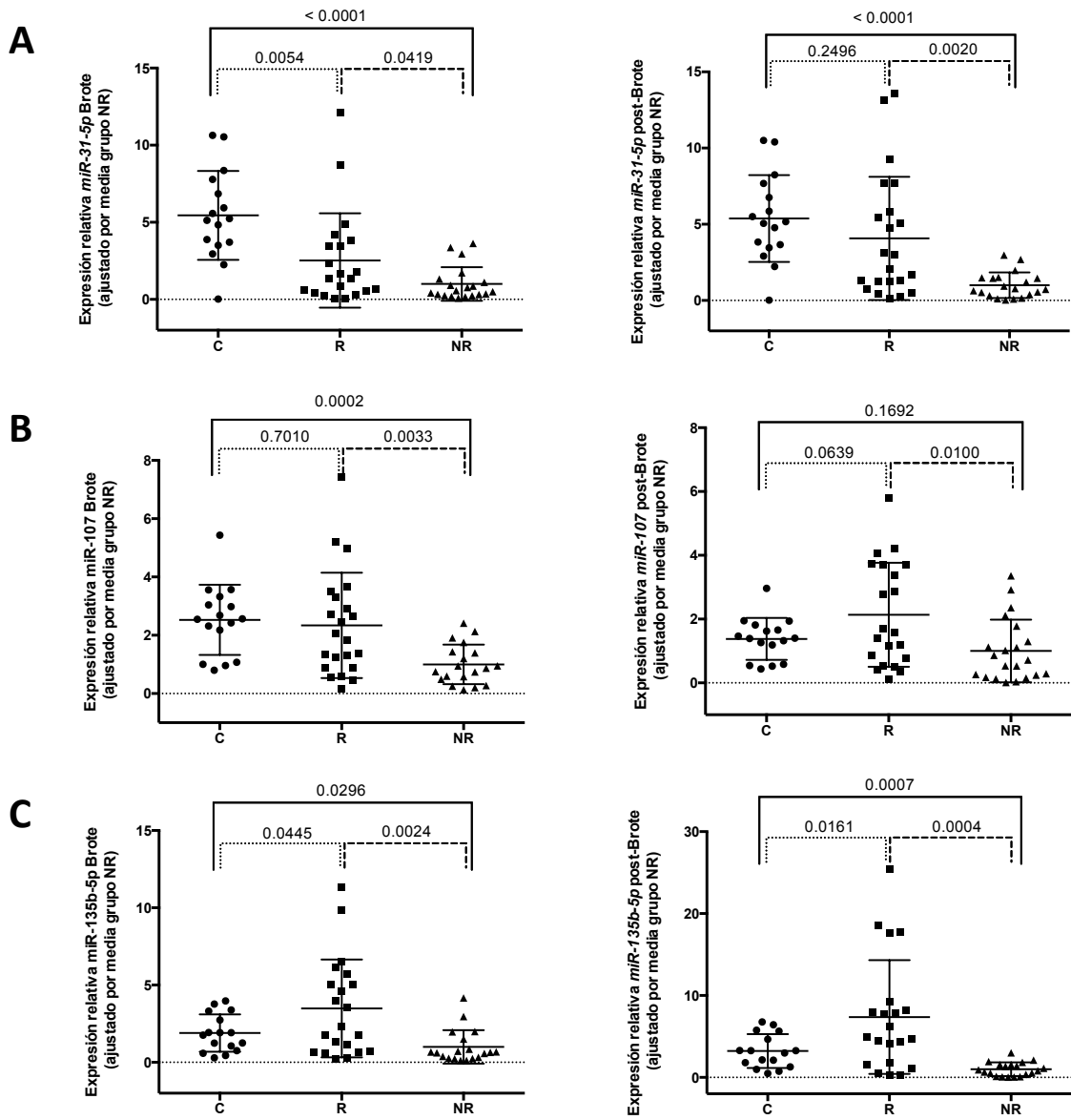


Gráfico 17: Representación gráfica de los valores de expresión relativa del (A) *miR-31-5p*, (B) *miR-107* y (C) *miR-135b-5p* en las cohortes control, R y NR en el momento del brote (columna izquierda) y en el momento del post-brote (columna derecha). Los valores de expresión relativa se han ajustada a la media del grupo de menor magnitud, en este caso el grupo NR. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$. C = Control sano; R = Respondedores; NR = No Respondedores.

6.8 Cohorte control 2 (Nefropatía médica)

Para valorar el comportamiento de los miRNAs seleccionados en otras patologías glomerulares se decidió añadir una cohorte de pacientes afectados de distintos grados de nefropatía médicas (n=12). La media de edad al diagnóstico era de 61.4 ± 4.5 años, con ratio hombre:mujer de 1:1. Las características demográficas y clínicas de la cohorte se muestran en la siguiente Tabla 14.

Tabla 14. Características clínicas y demográficas de la cohorte de nefropatías médicas

Edad al diagnóstico (años)	61.4 ± 4.5
Hombre : mujer	6 : 6
Tiempo de evolución (años)	5.1 ± 1.2
Creatinina (mg/dL)	2.00 ± 0.39
Proteinuria (gr/24h)	3.56 ± 1.06
Tipo de nefropatía	
• <i>GMN membranosa</i>	3 (25%)
• <i>GMN membranoproliferativa</i>	2 (16.7%)
• <i>GMN cambios mínimos</i>	1 (8.3%)
• <i>Vasculitis ANCA-MPO</i>	1 (8.3%)
• <i>Nefropatía diabética</i>	3 (25%)
• <i>ND/Nefroangioesclerosis</i>	2 (16.7%)

GMN: Glomerulonefritis

Los resultados de expresión relativa de los distintos miRNAs evaluados a nivel urinario se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Expresión relativa de los niveles de miRNAs en orina en la cohorte de pacientes con NL en función de respuesta al tratamiento (R y NR), en la cohorte control sana (C) y en la cohorte de nefropatías médicas (GNM)

Gen	RQ (R)	RQ (NR)	RQ (C)	RQ (GNM)
Brote				
<i>miR-31-5p</i>	0.2588 ± 0.0685	0.1008 ± 0.0263	0.55879 ± 0.07393	4.62765 ± 1.48760
<i>miR-107</i>	1.5079 ± 0.2486	0.6713 ± 0.1023	1.62999 ± 0.19417	8.68962 ± 2.83447
<i>miR-135b-5p</i>	0.3111 ± 0.0617	0.0893 ± 0.0221	0.16919 ± 0.02708	0.07191 ± 0.02111
Post-Brote				
<i>miR-31-5p</i>	0.4230 ± 0.0894	0.1040 ± 0.0217	0.55879 ± 0.07393	4.62765 ± 1.48760
<i>miR-107</i>	2,5239 ± 0.4206	1.2310 ± 0.2923	1.62999 ± 0.19417	8.68962 ± 2.83447
<i>miR-135b-5p</i>	0.3864 ± 0.0795	0.0515 ± 0.0102	0.16919 ± 0.02708	0.07191 ± 0.02111

Entre estos resultados cabe destacar que tanto el *miR-31-5p* como el *miR-107* mostraron niveles de expresión muy superiores a los observados en las demás cohortes de forma global y estadísticamente significativa (Gráfica 18A y 18B). El *miR-135b-5p* mostró unos niveles de expresión suprimidos respecto a la cohorte control y R, sin diferencias estadísticamente significativas en relación a la cohorte NR (Gráfico 18C).

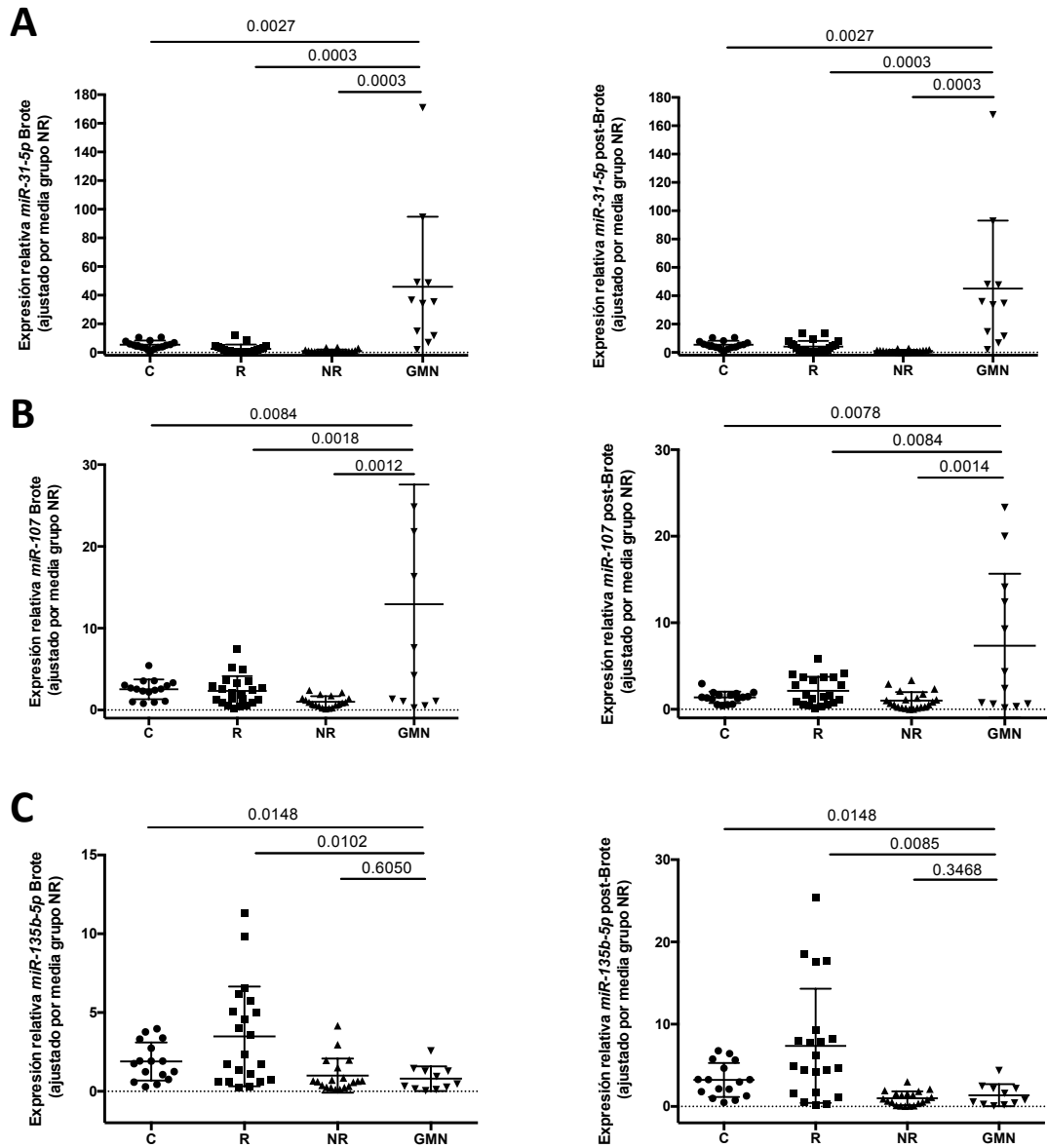


Gráfico 18: Representación gráfica de los niveles de expresión relativa del (A) *miR-31-5p*, (B) *miR-107* y (C) *miR-135b-5p* entre las distintas cohortes (C=Control sano, R=Respondedores, NR=No Respondedores, GMN=Nefropatías médicas) en el momento del brote (columna izquierda) y en el post-brote (columna derecha). Los valores de expresión relativa se han ajustada a la media del grupo de menor magnitud, en este caso correspondiente al grupo NR. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < a 0.05$.

6.9 Relación miRNAs con parámetros clínicos y histológicos

Además evaluamos la relación entre los niveles de expresión génica de los miRNAs significativos a través de su cuantificación relativa y los parámetros clínicos e histológicos.

En relación a los parámetros clínicos cabe destacar que los niveles de *miR-135b-5p* mostraron, en el momento de la biopsia, una correlación inversa y modesta con la proteinuria de forma global ($r = -0.370$, $p = 0.020$). Tras analizar por subgrupos, se objetivó un incremento significativo en el grado de correlación con el grupo NR ($r = -0.600$, $p = 0.009$) (Gráfico 19). En el mismo grupo se encontró una correlación entre los niveles de *miR-135b-5p* y gammaglobulinas ($r = -0.520$, $p = 0.033$). El *miR-31* se relacionó con PCR ($r = 0.857$, $p = 0.014$) en el grupo R pero no en el NR.

Cuando se evaluó toda la cohorte, tomando en consideración de forma simultánea los parámetros analíticos tanto en el momento del brote como en el momento del post-brote se pudo observar que el *miR-31-5p* mostraba una correlación con los niveles de proteinuria ($r = -0.295$, $p = 0.008$), así como el *miR-135b-5p* ($r = -0.270$, $p = 0.016$).

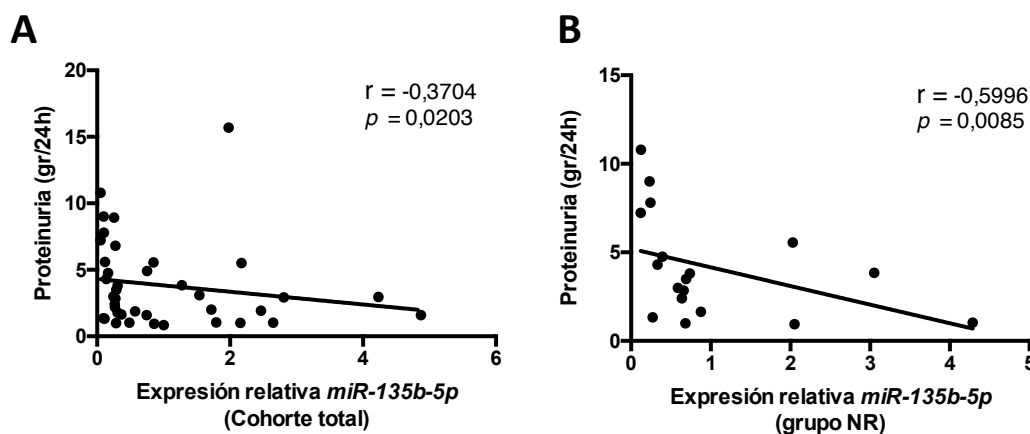


Gráfico 19: Representación gráfica de las rectas de regresión lineal así como de los niveles de correlación mediante el test de Spearman para el *miR-135b-5p* y los niveles de proteinuria correspondiente a (A) cohorte total y (B) grupos NR. (NR= No Respondedores). Los valores de expresión relativa se han ajustada a la media de los valores para el grupo a estudio.

Resultados

En cuanto a los parámetros histológicos se evaluó la correlación con los índices de actividad y cronicidad. El *miR-31-5p* mostró una correlación global con el índice de actividad ($r = -0.551$, $p = 0.018$). Después de analizar por subgrupos, la correlación se vuelve más robusta en el grupo R ($r = -0.873$, $p = 0.010$). La Tabla 16 muestra las correlaciones significativas halladas entre los distintos miRNAs y los parámetros histológicos comúnmente evaluados en la NL.

Tabla 16. Correlación entre los distintos miRNAs urinarios a estudio y las características histológicas de la nefritis lúpica.

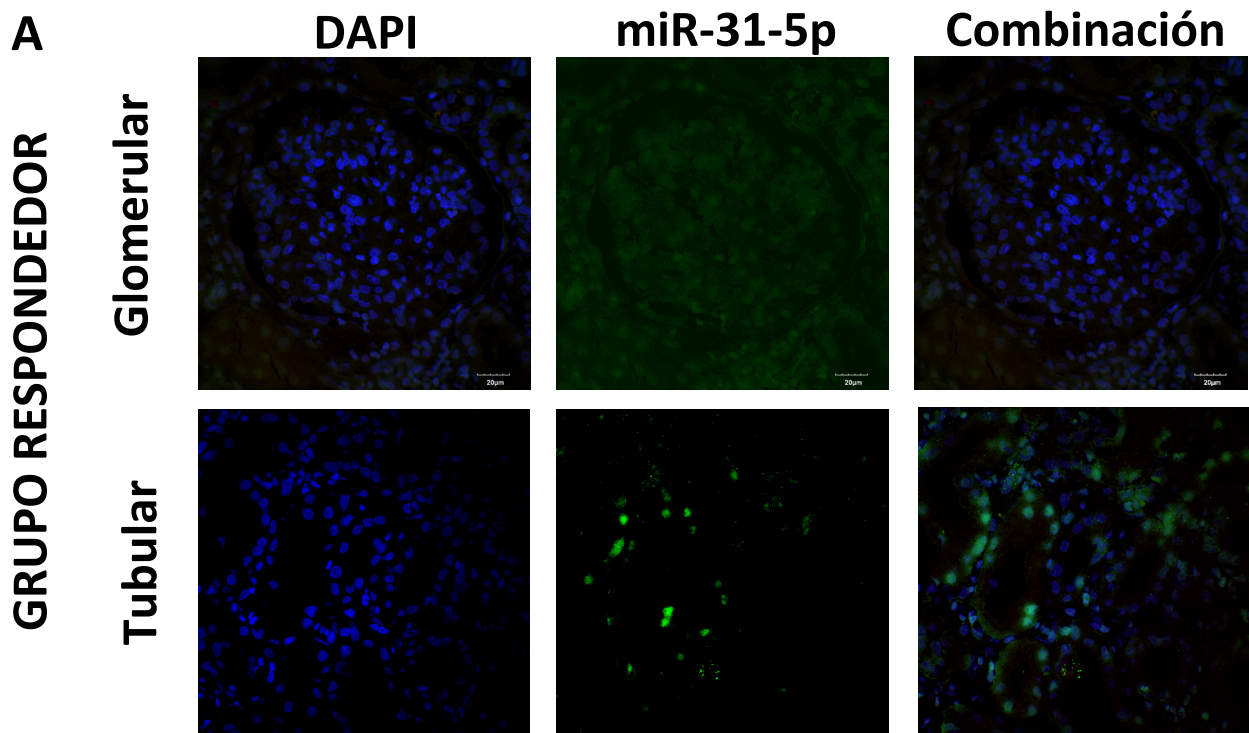
	Índice de Actividad	Proliferación endocapilar	Depósitos subendot.	Infiltrado leucocit.	Necrosis fibrinoide/ kariorexis	Semilunas celulares	Inflamación intersticial	Índice de cronicidad	Esclerosis Glomerul	Semilunas fibrosas	Atrofia tubular	Fibrosis intersticial
Cohorte total												
miR-31-5p												
<i>r</i>	-0.551	0.241	-0.140	-0.229	-0.380	-0.287	-0.124	0.168	0.067	0.036	0.379	0.280
<i>P</i>	0.018	0.292	0.605	0.299	0.108	0.220	0.593	0.492	0.774	0.879	0.082	0.208
<i>miR-107</i>												
<i>r</i>	-0.306	-0.229	-0.240	-0.327	-0.319	0.055	0.264	0.179	-0.021	-0.184	0.073	0.123
<i>P</i>	0.232	0.332	0.389	0.200	0.198	0.822	0.247	0.477	0.931	0.450	0.748	0.586
<i>miR-135b-5p</i>												
<i>r</i>	-0.177	0.157	-0.266	-0.164	-0.076	-0.044	-0.268	0.013	0.075	-0.031	0.043	0.063
<i>P</i>	0.496	0.507	0.338	0.528	0.766	0.859	0.254	0.960	0.752	0.899	0.854	0.786
Cohorte R												
miR-31-5p												
<i>r</i>	-0.873	0.618	-0.247	-0.668	-0.586	-0.310	0.000	0.327	0.279	-0.207	0.693	0.346
<i>P</i>	0.010	0.076	0.637	0.101	0.127	0.416	1.000	0.429	0.467	0.593	0.039	0.361
Cohorte NR												
miR-107												
<i>r</i>	-0.281	-0.387	-0.443	-0.272	-0.165	0.291	0.682	0.520	0.101	0.290	-0.022	0.245
<i>P</i>	0.431	0.240	0.232	0.448	0.648	0.415	0.021	0.123	0.769	0.416	0.945	0.443

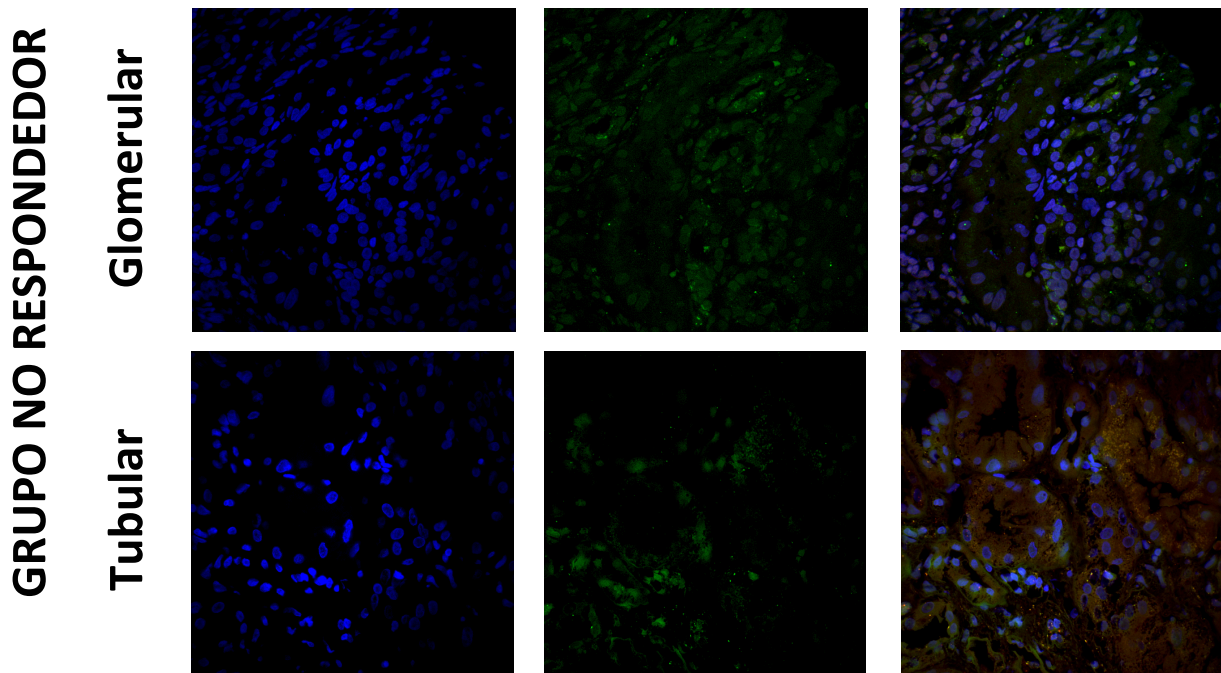
Correlación calculada mediante el índice *Rho de Spearman*, considerándose significativo ante valores de $p < 0.05$. *R* = Respondedores; *NR* = No Respondedores.

6.10 Hibridación *in-situ* sobre muestras de tejido renal

Para entender el rol biológico de cada miRNA, así como la red de interrelaciones posibles se intentó definir con la mayor exactitud posible su situación espacial mediante la técnica de hibridación *in situ* para valorar los patrones tisulares así como celulares de acumulación de los distintos miRNAs en muestras de tejido renal de pacientes con brote de NL. Para ello se llevó a cabo un sistema de doble hibridación en las muestras de tejido renal en el momento del brote en pacientes correspondientes al grupo R (n=3) y en el grupo NR (n=3). Posteriormente se otorgó una puntuación según el número e intensidad de señal del fluorocromo para permitir el análisis diferencial cuantitativo entre los distintos miRNAs.

Los resultados mostraron que el *miR-31*, el *miR-107* y el *miR-135b-5p* están altamente expresados en el grupo R en comparación a los niveles de expresión en el grupo NR (2.27, 13.3 y 3.79 veces mayor tasa de cambio de intensidad de fluorescencia respectivamente, Figura 8 y 9). Los 3 miRNAs a estudio: *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* estaban sobreexpresados claramente en la sección tubular (p = 0.005, p = 0.01, p = 0.23, respectivamente, Figura 8B y 8B) pero el *miR-135b-5p* mostró además una expresión glomerular leve (Figura 8B).





B

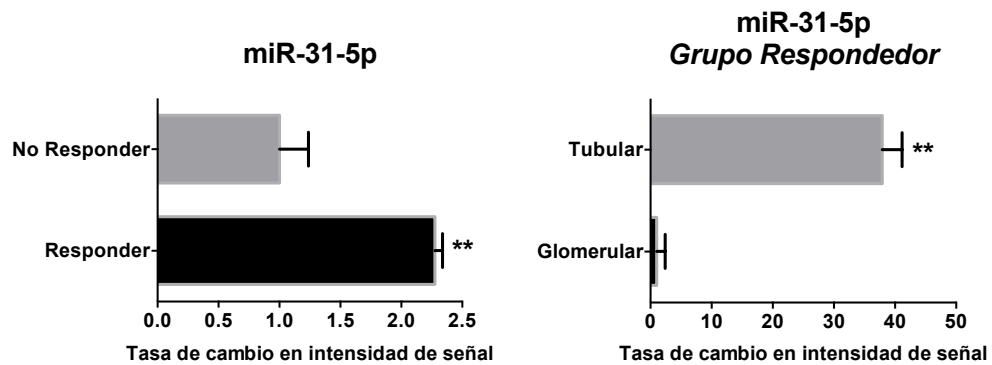
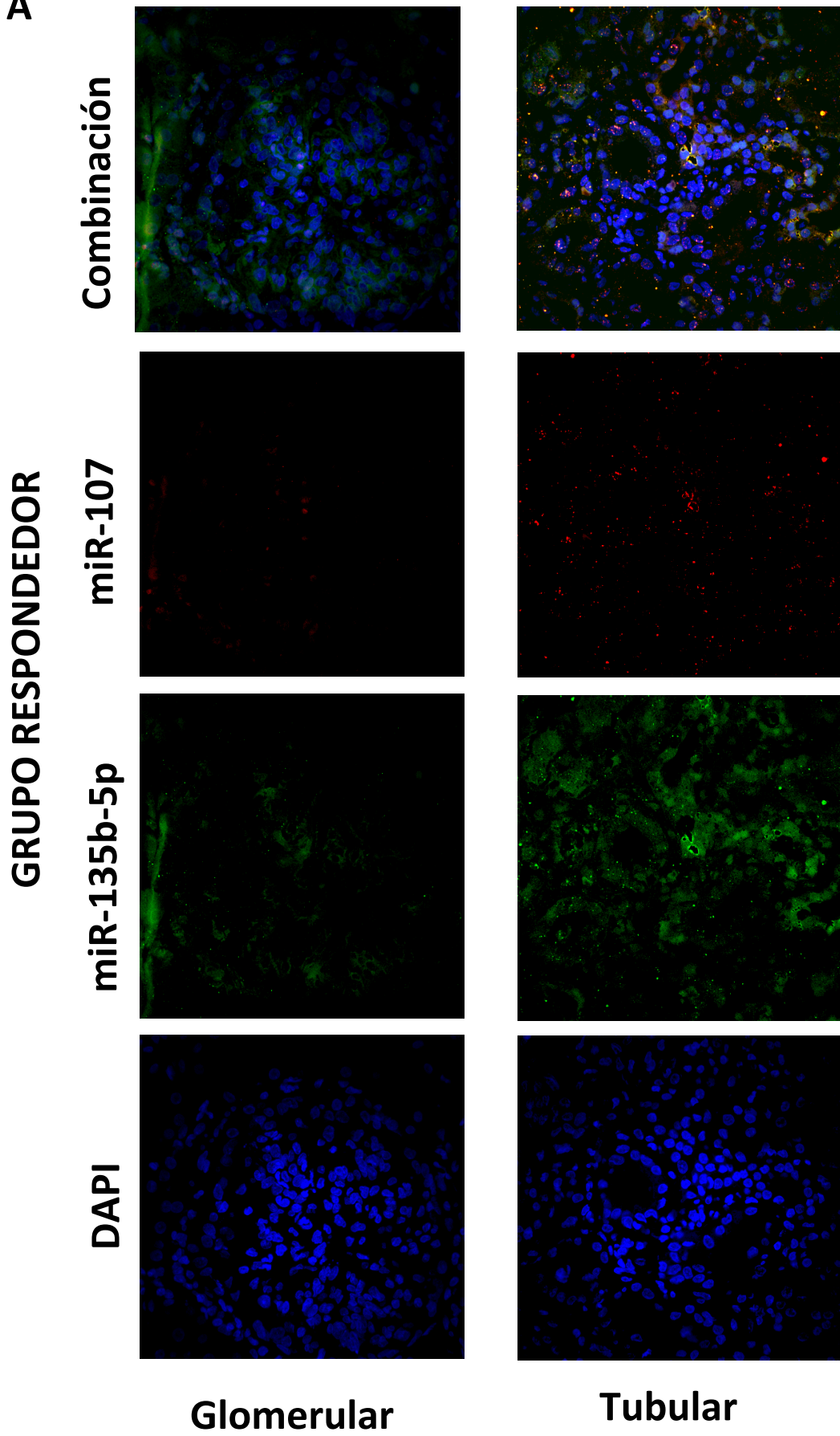
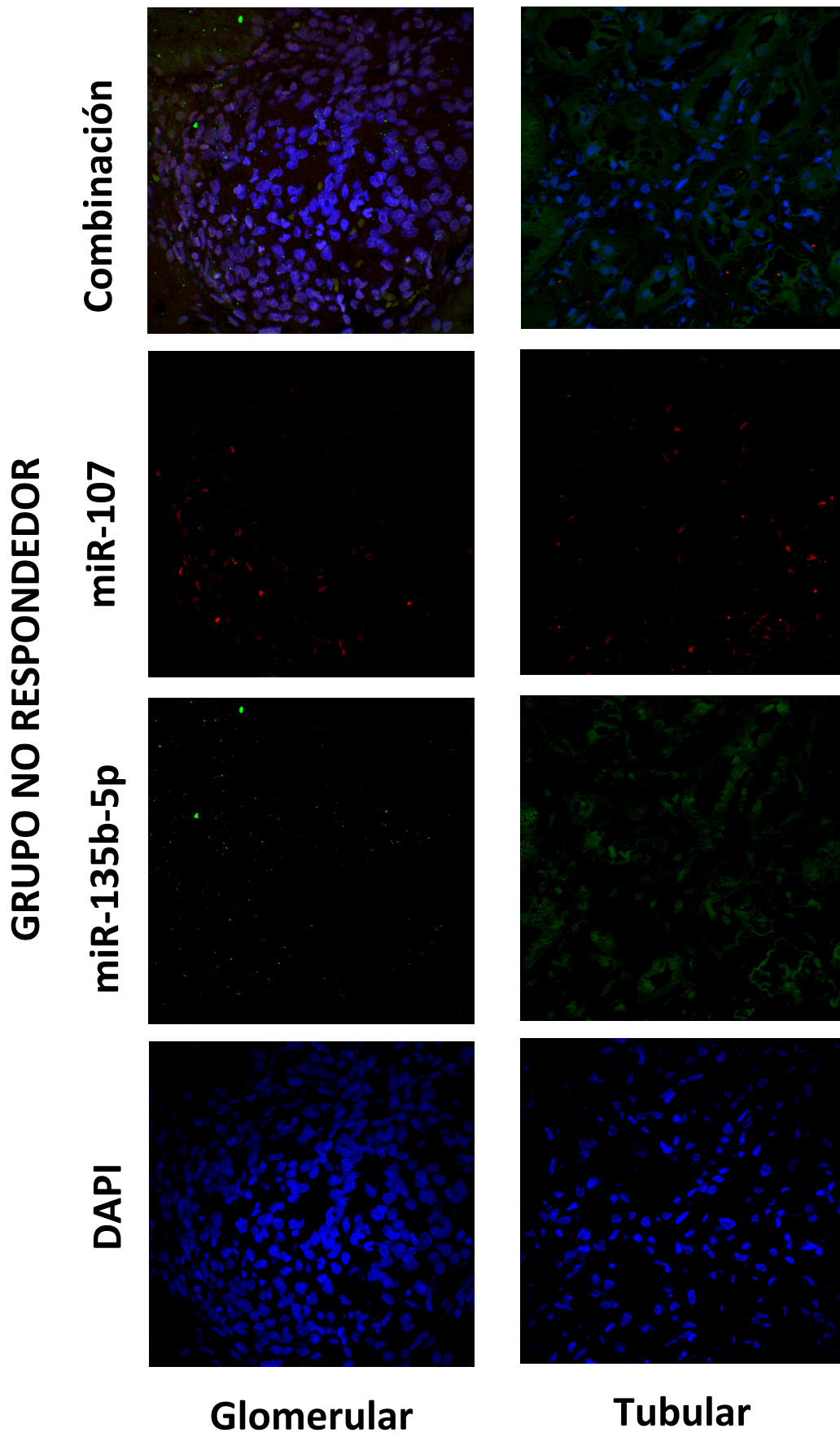


Figura 8: (A) Hibridación in situ del *miR-31-5p* en biopsias de tejido renal en pacientes con NL (grupo R y NR) con representación de secciones glomerulares y tubulares. (B) Representación gráfica de la intensidad de la señal del fluorocromo, expresado según tasa de cambio, comparando los distintos grupos de respuesta al tratamiento como las secciones de tejido renal evaluadas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

A





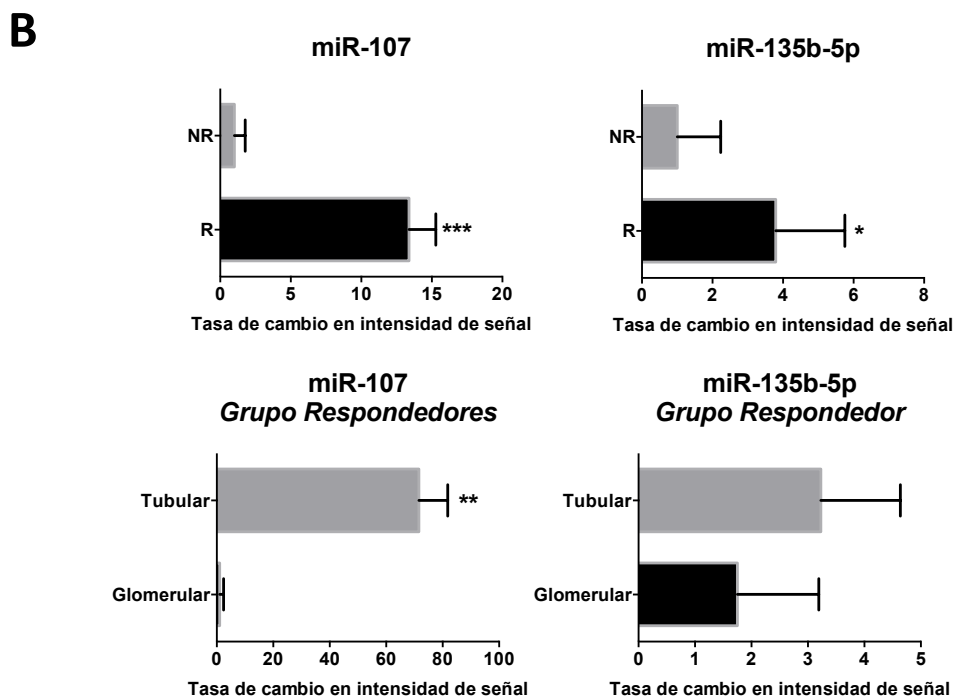


Figura 9. (A) Hibridación in situ del *miR-107* y *miR-135b-5p* en biopsias de tejido renal en pacientes con NL (grupo R y NR) con representación de secciones glomerulares y tubulares. (B) Representación gráfica de la intensidad de la señal del fluorocromo, expresado según la tasa de cambio, comparando los distintos grupos de respuesta al tratamiento como las secciones de tejido renal evaluadas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

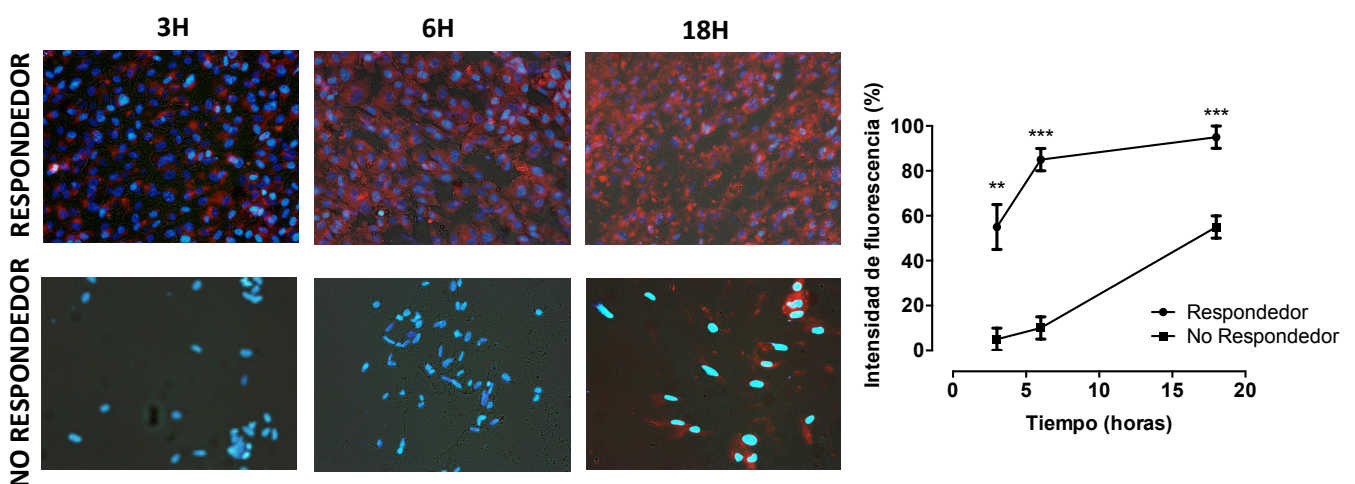
6.11 Internalización de los Exosomas

Ante el hecho de que los exosomas urinarios pueden interactuar indistintamente con cualquier célula renal, quisimos determinar si los exosomas urinarios de pacientes con NL presentaban capacidades diferenciales para ser engullidos por distintos grupos celulares en función de si estos procedían de pacientes con buena respuesta al tratamiento (grupo R) o de pacientes no respondedores (grupo NR). Entre los estirpes celulares estudiados se encontraron las células primarias mesangiales renales, las células epiteliales tubulares y las endoteliales glomerulares. Para ello, los exosomas urinarios purificados se marcaron con fluorescencia y se incubaron conjuntamente con las distintas estirpes celulares durante 3 h, 6 h y 18 h (Figura 10).

Tras analizar los resultados, observamos que los exosomas urinarios provenientes de pacientes respondedores fueron totalmente internalizados de forma progresiva por las células mesangiales, las epiteliales tubulares y las endoteliales glomerulares, sin mostrar diferencias significativas entre las distintas estirpes en cuanto al grado de internalización, alcanzándose el punto de máxima internalización a las 18 horas. Sí parecía existir una menor velocidad de internalización a nivel de las células mesangiales. Por contra, los exosomas urinarios provenientes de pacientes no respondedores, mostraron una internalización enlentecida a nivel de la estirpe de células mesangiales renales, alcanzando un 55% a las 18 horas de incubación (Figura 10A) en comparación con la internalización de los exosomas provenientes de respondedores a las 18 horas de incubación. Además, éstos presentaron también un enlentecimiento significativo de la internalización a nivel de las células mesangiales y endoteliales glomerulares en comparación con los exosomas urinarios de pacientes respondedores a las 3 horas (5 vs. 55% y 15 vs. 85% de intensidad de fluorescencia, $p = 0,002$ y $0,0001$, respectivamente, Figura 10A y B). En cuanto a las células renales tubulares epiteliales, los exosomas urinarios de ambos grupos mostraron similar capacidad de internalización siendo esta muy elevada y sin mostrar diferencias significativas entre los distintos tipos de exosomas (85 vs. 73% a las 3h, 91 vs. 86% a las 6h y 95 vs. 98% a las 18h) (Figura 10B).

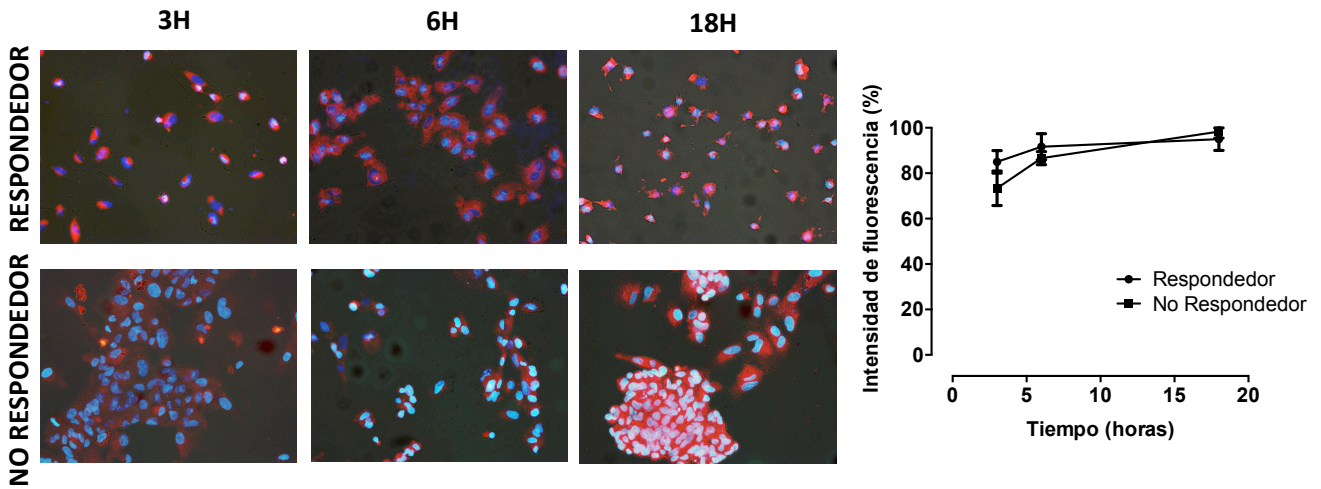
A

Células mesangiales renales humanas



B

Células epiteliales tubulares renales humanas



C

Células endoteliales glomerulares renales humanas

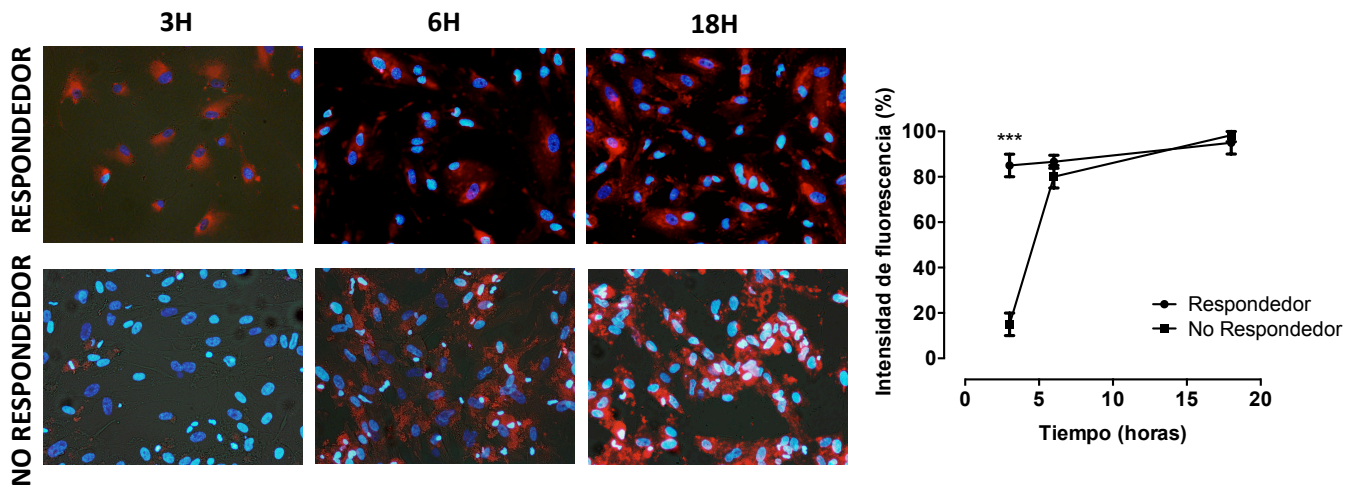


Figura 10. Imágenes de los distintos cultivos celulares primarios junto a exosomas urinarios internalizados, provenientes de pacientes con NL (grupo R y NR), marcados con fluorocromo rojo en distintos momentos (a las 3, 6 y 18h) (columna izquierda) y representación gráfica del porcentaje de internalización (columna derecha). (A) Cultivo primario de células mesangiales renales. (B) Cultivo primario de células epiteliales tubulares. (C) Cultivo primario de células endoteliales glomerulares. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

Para estudiar si el patrón de internalización era diferente en individuos sanos, se estudió la internalización de exosomas urinarios provenientes de donantes sanos. Los resultados mostraron que sólo hay interacción con las células renales mesangiales después de 18 horas de incubación, siendo esta del 60% (Figura 11). En el caso de las células tubulares o endoteliales no se observó ninguna grado de internalización.

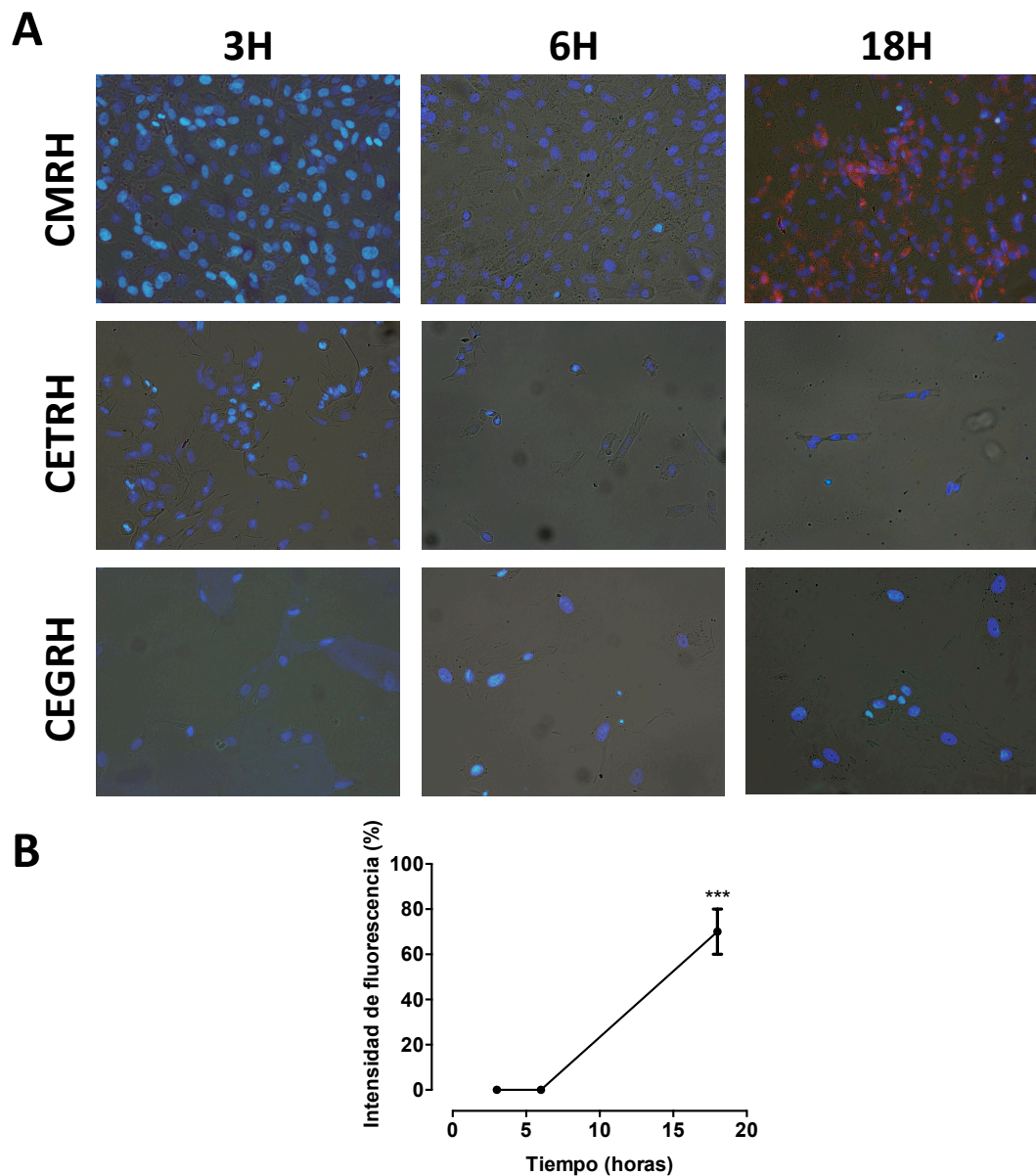


Figura 11: (A) Imágenes de la internalización de exosomas urinarios, provenientes de sujetos sanos, marcados con fluorocromo rojo en distintos momentos (a las 3, 6 y 18h) y distintas líneas celulares y (B) representación gráfica del porcentaje de internalización en sujetos sanos. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001). *CEGRH*: Célula endotelial glomerular renal humana; *CETRH*: Célula epiteliales tubular renal humana; *CMRH*: Célula mesangial renal humana.

6.12 Producción de los exosomas urinarios

Para poder saber qué células renales producen los exosomas urinarios, se procedió a estimular las distintas células renales primarias mediante una combinación de varias citoquinas (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , INF- α y IL-6) durante 6h, 18h y 36h (Figura 12). Una vez incubadas bajo condiciones de estimulación, se extrajeron los exosomas del medio sobrenadante y se cuantificó la expresión génica del *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p*. Como control, se usó una condición sin estimular medida de forma simultánea en los mismos tiempos (6, 18 y 36h) y un miR-control (*miR-423*) que se considera endógeno y, por lo tanto, no debería variar con los estímulos externos.

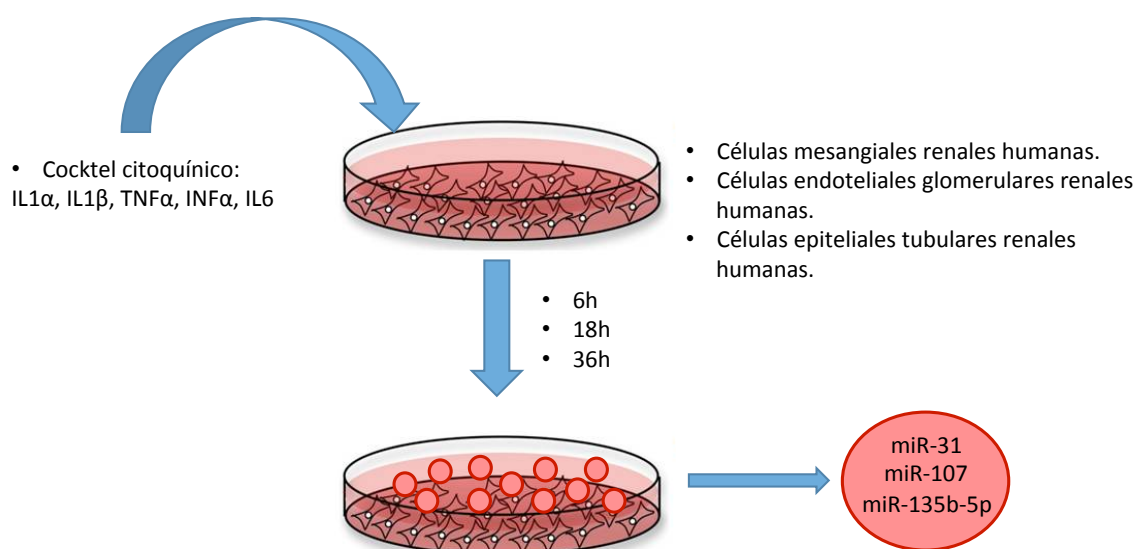


Figura 12. Imágenes del procedimiento de cuantificación de la producción de exosomas urinarios los distintos cultivos celulares primarios en distintos momentos (a las 6, 18 y 36h).

Al evaluar la cinética se pudo observar que el punto más alto de producción de los miRNAs de interés era a las 18 horas (Gráfico 20). Por lo tanto, nos centramos en este tiempo para estudiar la expresión génica en las diferentes células renales.

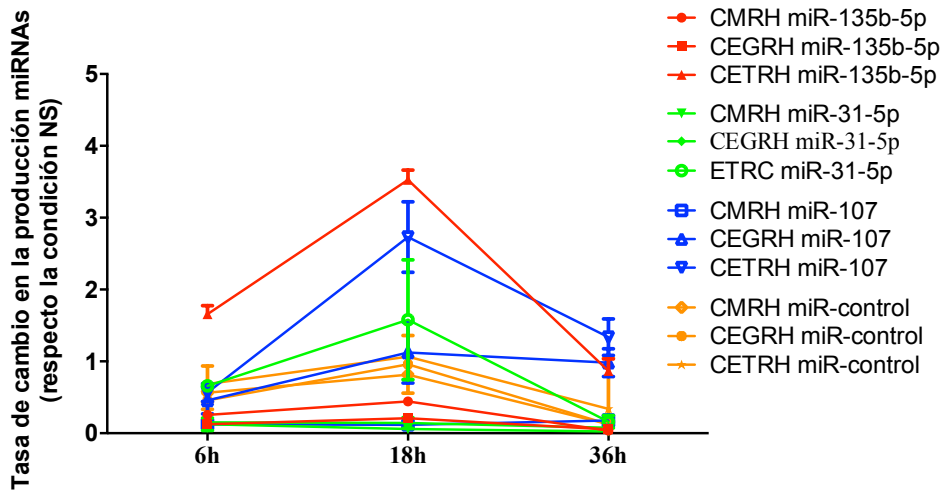


Gráfico 20: Cinética de expresión de los miRNAs de interés en los distintos grupos celulares a estudio. En ella se puede observar un pico de producción de miRNAs a las 18h. *CEGRH*: Célula endotelial glomerular renal humana; *CETR*H: Célula epiteliales tubular renal humana; *CMRH*: Célula mesangial renal humana.

Los resultados mostraron claramente que las células tubulares son las mayores productoras de exosomas enriquecidos con *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* en comparación con las células mesangiales o endoteliales ($p < 0.0001$). No obstante, en la célula endotelial también pudo observarse una producción significativa de *miR-107* en comparación con la célula mesangial (tasa de cambio de 1.2; $p = 0.014$) (Gráfico 21).

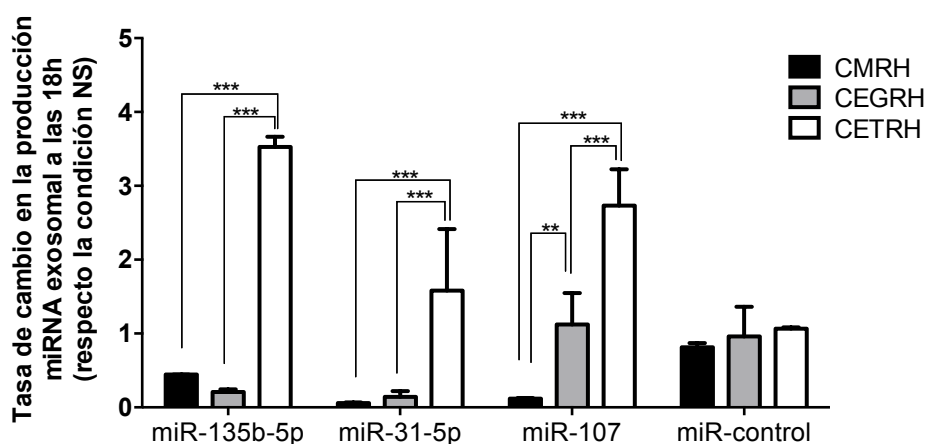


Gráfico 21: Producción de los miRNAs de interés en los distintos grupos celulares a estudio. *CEGRH*: Célula endotelial glomerular renal humana; *CETR*H: Célula endotelial tubular renal humana; *CMRH*: Célula mesangial renal humana.

6.13 Cuantificación de exosomas urinarios

Los túbulos renales y el intersticio tubular ocupan alrededor del 90% del volumen renal, y las células del epitelio tubular proximal constituyen su mayor tipo, encargándose principalmente de procesos de transporte activo y reabsorción de solutos. No obstante, la evidencia actual no limita su papel al mero intercambio de sustancias, destacando el rol que este grupo celular puede presentar en los procesos inmunopatogénicos actuando como reguladores de la inflamación y la fibrosis. Además, los procesos patológicos centrados en la afectación túbulo-intersticial han demostrado un efecto sustancial en la función renal, reuniéndose cada vez una mayor evidencia que demuestra que es el grado de daño túbulo-intersticial, en lugar de la lesión glomerular, el que muestra mayor correlación con el mal pronóstico renal (259).

De los experimentos previos se desprenden las siguientes conclusiones: (A) que es en las células tubulares donde se acumulan mayor diferencias en cuanto a la presencia de exosomas urinarios entre los grupos de estudio, (B) que aparentemente son el grupo celular, entre los estudiados, con mayor capacidad de producción de exosomas enriquecidos con los miRNAs de interés, y (C) que no presenta diferencias en su capacidad de internalizar exosomas en función de si estos son o no provenientes del grupo R o NR. Dados los resultados obtenidos y la evidencia existente de que es la atrofia tubular uno de los mayores indicadores de pronóstico a nivel de la supervivencia renal nos preguntamos si no sería la existencia de un mayor grado de disfunción tubular, expresado a través de una menor producción de exosomas urinarios, la causa principal de las diferencias pronosticas observadas en los grupos a estudio. Por ello realizamos la cuantificación de los exosomas urinarios en muestras de 1 mL de orina, proveniente de la primera muestra matutina, de pacientes correspondientes al grupo R y NR. Los resultados no sólo no mostraron un menor número de exosomas en las muestras correspondientes a la cohorte NR, sino que pese a no resultar estas diferencias significativas, la cuantificación de exosomas resultó mayor en esta cohorte ($3.928 \times 10^7 \pm 1.038 \times 10^7$ vs. $1.939 \times 10^7 \pm 2.365 \times 10^6$, $p = 0.078$) (Gráfico 22), descartando la posibilidad de que fuera el defecto cuantitativo y no las diferencias cualitativas la causa de la variación pronóstica apreciada entre los grupos a estudio.

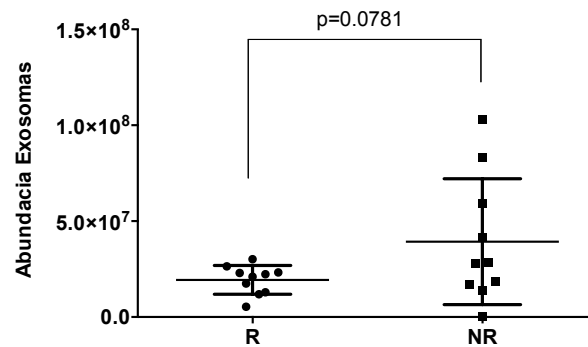


Gráfico 22: Cuantificación del número de exosomas urinarios en primera orina de la mañana en función de las respuesta al tratamiento. R = Respondedores; NR = No Respondedores.

6.14 Pathway análisis (análisis de vía)

Para identificar los posibles mecanismos de acción y las cuales podrían actuar se realizó un análisis funcional de las dianas ya conocidas e identificadas hasta el momento para los distintos miRNAs. Para ello se llevó a cabo un estudio de las distintas dianas validadas para cada miRNA a través de tres bases de datos: el miRecords, miRTarBase y miRWalk usando el paquete de análisis multiMiR R. Encontramos 177, 281 y 63 dianas genéticas validadas para el *miR-31-5p*, el *miR-107* y el *miR-135b-5p*, respectivamente. Debido a que estos miRNAs aumentaron al mismo tiempo en el grupo R, buscamos si regulaban objetivos comunes. En el estudio se encontró una diana común a nivel de los tres miRNAs, el HIF-1 α , además de múltiples objetivos comunes en la combinación de dos miRNAs (*miR-31-5p/miR-107*, *miR-31-5p/miR-135b* y *miR-107/miR-135b-5p*) (Figura 13).

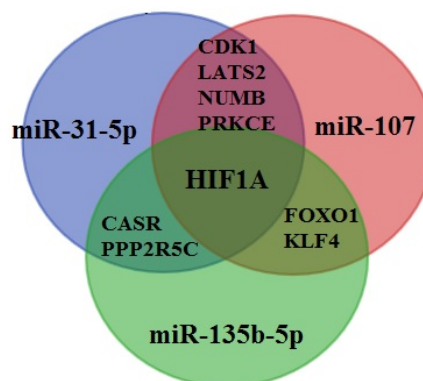


Figura 13: Diagrama de Venn de las dianas validadas para los miRNAs a estudio.

Resultados

Usando la base de datos KEGG (Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes), encontramos que nueve de los genes diana comunes se asociaron con el sistema inmune (producción de citoquinas, formación de células T, NOD-Pathway y vía Nf-κβ), procesos celulares (muerte celular, homeostasis) y transducción de señales (apoptosis, proliferación, inflamación) (Tabla 17). Ocho de ellos se han implicado en enfermedades renales, y cuatro de ellos están relacionados específicamente con la nefritis lúpica. Tras el análisis, fue la combinación *miR-31-5p/miR-107* la que mostró mayor número de dianas comunes estando actualmente el *miR-31-5p* ya descrito en el lupus y el *miR-107* en otras enfermedades renales y con el lupus de forma indirecta a través del VEGF. El *miR-135b-5p*, no muestra hasta el momento ninguna descripción ni con el LES ni con las enfermedades renales.

mRNA targets	miRNAs			Implicaciones en vías biológicas	Sistema inmunológico				Procesos celulares			Transducción de señales			Descrito en la literatura	
	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-107	hsa-miR-135b-5p		KEGG Pathways	Producción de citoquinas inflamatorias	NOD-pathway	Notch Pathway	Formación cél T memoria	Muerte celular	Homeostasis celular	Supervivencia celular	Proliferación celular	Apoptosis	Inflamación	Nefritis lúpica
CDK1	x	x		9	•				•	•			•	•	✓	✓
HIF1A	x	x	x	12	•				•			•	•	•	✓	✓
LATS2	x	x		1								□	•			✓
NUMB	x	x		1			□					□	□			✓
PRKCE	x	x		12					•	•		•	•	•		✓
FOXO1		x	x	14	•			•	•			•	•	•	✓	✓
KLF4		x	x	1					□		•			□/•	✓	✓
CASR	x		x	2		•				•						✓
PP2R5C	x		x	8						•		•	•	•		

X: Pares de dianas miRNA-mRNA descritos experimentalmente; •: Sobreexpresión génica en vías biológicas; □: Atenuación en la expresión génica en vías biológicas; ✓: Se ha descrito un rol en patología.

Tabla 17: Tabla representativa de las dianas comunes de los distintos miRNAs usando el sistema de enriquecimiento de vías KEGG (Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes).

6.15 Estudios *in vitro* para descubrir el rol de los miRNAs a nivel

renal

Para estudiar el rol de los miRNAs elegidos a nivel renal se procedió a realizar estudios con cultivos celulares *in vitro*. Aunque en la hibridación *in situ* se observó una tinción mayoritariamente en las células tubulares, después se demostró que los exosomas procedentes de los pacientes respondedores eran internalizados más en las células mesangiales y endoteliales en comparación con los no respondedores (Figura 10; descrita en el apartado anterior 6.11). También se comprobó que la célula tubular era la mayor productora de los exosomas con los miRNAs de estudio (Gráfico 21; descrita en el apartado anterior 6.12). Por este motivo y con el objetivo de encontrar la vía molecular de reparación en la NL, los miRNAs seleccionados fueron estudiados a nivel de estirpe de células endoteliales glomerulares renales humanas (CEGRH) y células mesangiales renales humanas (CMRH) al considerarlas las principales efectoras de la modulación ejercida por los miRNAs de interés.

6.15.1 Transfección de mimic-miR, inhibidor-miR y Scr-miR

Una vez realizada la transfección de los miRNAs de interés (*miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p*), se llevó a cabo la comprobación de la eficacia de la transfección. Una manera fácil de hacerlo es mediante la cuantificación de los miRNAs por técnica de RT-qPCR. Las células transfectadas con mimic-miR tendrían que tener altos niveles de expresión génica del miRNA transfectado; por lo contrario, las células transfectadas con inhibidor-miR tendrían que tener niveles bajos. Siempre tenemos una condición control (Scr-miR) para normalizar la expresión génica de cada miRNA. El Gráfico 23 muestra los resultados de la expresión génica del *miR-31-5p* (A,B), el *miR-107* (C,D) y el *miR-135b-5p* (E,F) tras la transfección. En el caso de los cultivos de CMRH la transfección de los mimic-miR e inhibidor-miR resultó en la sobreexpresión/silenciamiento tanto del *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* en todas las

condiciones de estimulación a excepción de la inhibición del *miR-107* en la condición no estimulada (NS) ($p = 0.08$).

En la comprobación de la correcta transfección sobre células endoteliales glomerulares (CEGRH), si bien se logró una correcta estimulación/supresión de los niveles de *miR-31-5p* bajo la mayoría de condiciones, no fue posible una correcta supresión del mismo en la condición VEGF e IL-1 ($p = 0.09$; Gráfica 22B). Referente al *miR-107*, sólo se obtuvieron resultados satisfactorios con el mimic-miR (Gráfico 23D). Al no ser efectiva la transfección, se intentó optimizar con las siguientes metodologías: 1) aumento de la concentración de mimic-miR o inhibidor-miR; 2) aumento del tiempo de transfección; 3) cambio del tipo de lipofectamina; 4) realización de la transfección mediante otro método experimental, por ejemplo, transfección por electroporación. No obstante, en nuestro caso, no pudimos inhibir en ningún momento el *miR-107*; por lo tanto, con este miRNA decidimos centrarnos solamente en la condición de sobreexpresión en la línea CEGRH. Finalmente, y en relación al *miR-135b-5p*, se comprobó una correcta estimulación/supresión de sus niveles en todas las condiciones a excepción de la IL-1 α ($p = 0.06$) (Gráfico 23F).

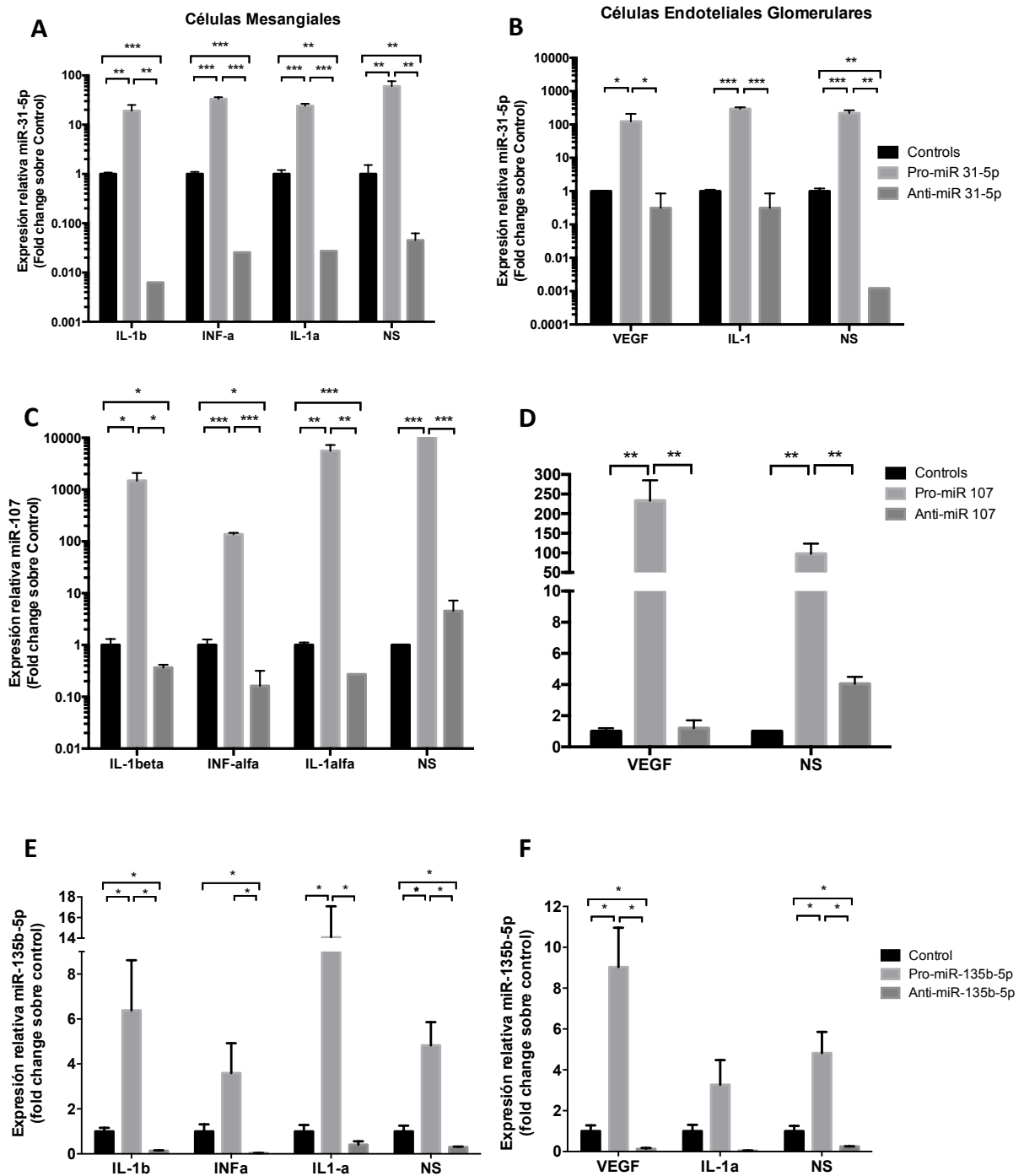


Gráfico 23: Gráficas de los niveles de expresión/represión de los miRNAs a estudio en función de la transfección de mimic-miR, scr-miR y inhibidor-miR correspondientes a los distintos estirpes celulares bajo diferentes condiciones de estimulación. (A) *miR-31-5p* en células mesangiales; (B) *miR-31-5p* en endoteliales glomerulares; (C) *miR-107* en células mesangiales ; (D) *miR-107* en células endoteliales glomerulares; (E) *miR-135b-5p* en células mesangiales; (F) *miR-135b-5p* en células endoteliales glomerulares. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

6.15.2 Efecto de los miRNAs en la proliferación celular

Una vez transfectados los distintos cultivos celulares (CGERH y CMRH) con los mimic-miR, inhibidor-miR y control (scr-miR) correspondientes se procedió a cuantificar el grado de proliferación celular mediante la medida del DNA celular contenido a través de la unión de método fluorimétrico (*CyQUANT[®] NF assay*), con la intención de determinar el efecto que dichos miRNAs, *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p*, podrían tener en cuanto a la proliferación celular.

El análisis de resultados sólo mostró diferencias significativas a nivel del *miR-135b-5p* sobre las CMRH en donde pudo observarse un efecto negativo sobre la proliferación mesangial bajo las condiciones de estimulación IL-1 β , INF- α e IL-1 α y ante presencia de *miR-135b-5p*, así como el efecto contrario ante su inhibición (tasa de cambio de -1.74, -1.63, -1.61, respectivamente) (Gráfico 24E). A nivel del grupo celular CGERH, no se apreció ningún cambio significativo sobre la proliferación. En cuanto a los otros miRNAs de interés, *miR-31-5p* y *miR-107*, no se hallaron diferencias significativas entre la inhibición y sobreexpresión bajo las condiciones estudiadas, siendo las mínimas diferencias detectadas no relevantes desde el punto de vista clínico, ya que las tasas de cambio mostrados en estas resultaron < 11.51 y por lo tanto exentos de relevancia (Gráfico 24). En consecuencia, podemos decir que sólo el *miR-135b-5p* mostró un efecto relevante sobre la modulación de la proliferación sobre las CMRH condicionando su presencia una disminución en la tasa de proliferación mesangial (Gráfico 24E).

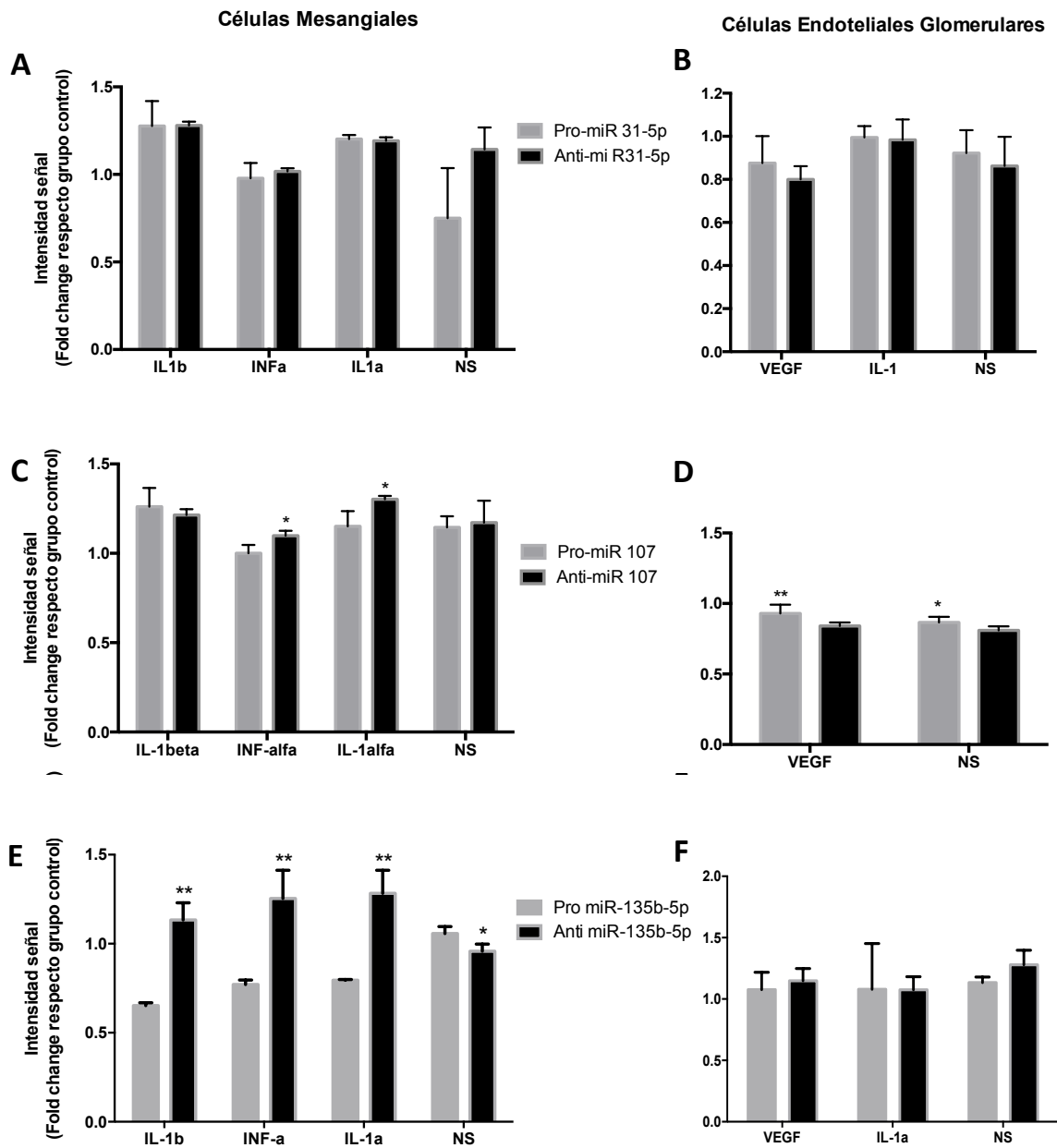


Gráfico 24: Gráficas del grado de proliferación celular medido mediante la cuantificación del DNA celular en función de la estimulación/inhibición de los microRNAs a estudio en las distintas estirpes celulares bajo diferentes condiciones de estimulación. (A) *miR-31-5p* en células mesangiales. (B) *miR-107* en células mesangiales. (C) *miR-135b-5p* en células mesangiales. (D) *miR-31-5p* en células endoteliales glomerulares. (E) *miR-107* en células endoteliales glomerulares. (F) *miR-135b-5p* en células endoteliales glomerulares. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

6.15.3 Efecto de los miRNAs en la apoptosis celular

Además de los efectos sobre la proliferación también se estudió como la sobreexpresión o silenciamiento de los distintos miRNAs podría afectar sobre los fenómenos de apoptosis celular en los distintos grupos celulares mediante la técnica de citometría de flujo, que mide la expresión de Anexina V/APC a nivel de la superficie celular así como la permeabilidad de la membrana celular al SYTOXR Green, un fluorocromo que resulta impermeable a las células vivas y apoptóticas pero no a las necróticas (Figura 14).

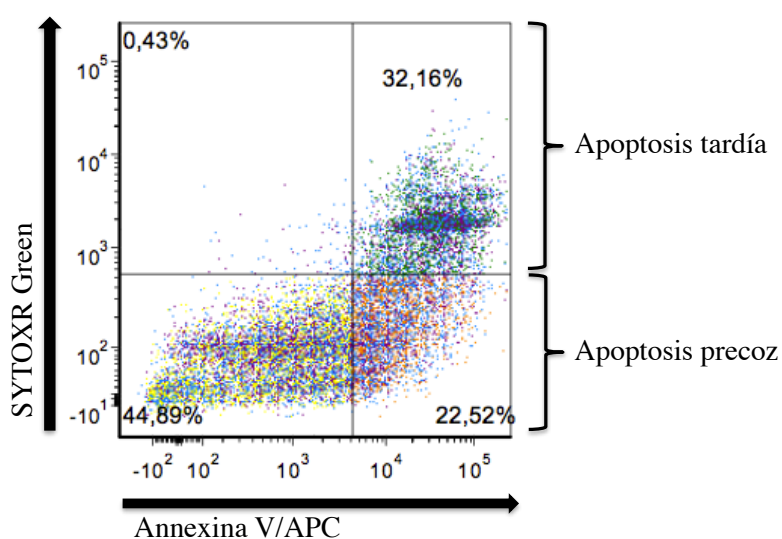


Figura 14: Citometría de flujo. El histograma biparamétrico muestra las células en una etapa precoz (cuadrante inferior derecho) o tardana de la apoptosis o necrosis (cuadrante superior derecho). Las células doble negativas (cuadrante inferior izquierdo) se consideran como biológicamente viables.

La Figura 15 muestra el resultado del análisis de citometría de flujo para los efectos de la modulación (estimulación/supresión) de la expresión del *miR-31-5p* en las células mesangiales renales humanas bajo las distintas condiciones de estimulación. En esta, si bien se aprecia alguna diferencia en el porcentaje de células vivas, de forma global no puede observarse ningún patrón ni tendencia que sugiriese un claro efecto en la modulación de la apoptosis.

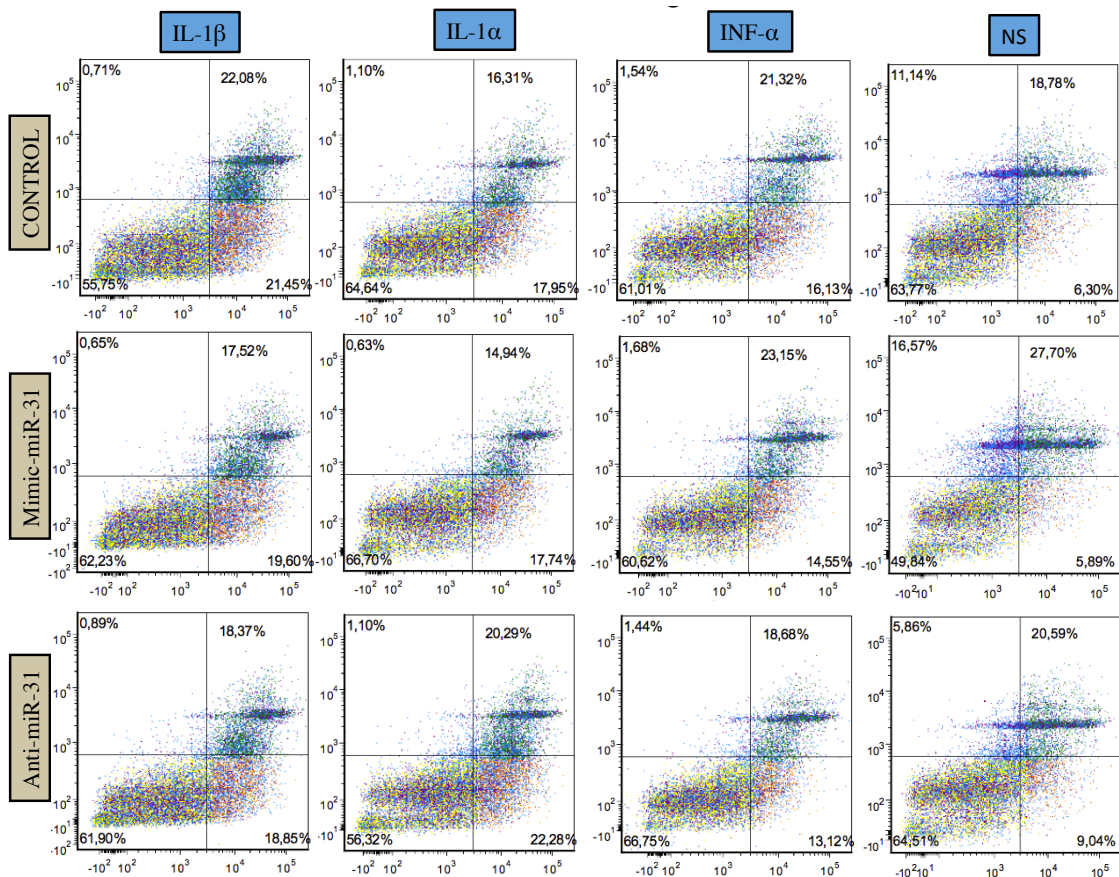


Figura 15: Perfil de apoptosis celular analizado mediante citometría de flujo. Los experimentos se repitieron por triplicado en los distintos estirpes celulares tras transfección de mimic-miR, inhibidor-miR- y scr-miR para los miRNAs a estudio (*miR-135b-5p*, *miR-31-5p* y *miR-107*). La imagen corresponde a la estirpe celular de células mesangiales tras transfección del *miR-31-5p*. El histograma biparamétrico muestra las células en una etapa precoz (cuadrante inferior derecho) o tardana de la apoptosis (cuadrante superior derecho). Las células doble negativas (cuadrante inferior izquierdo) se consideran como biológicamente viables.

De manera global, la sobreexpresión/supresión del *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* no pareció afectar de forma significativa el porcentaje de células apoptóticas en las distintos estirpes celulares tal y como se muestra en la Gráfico 25.

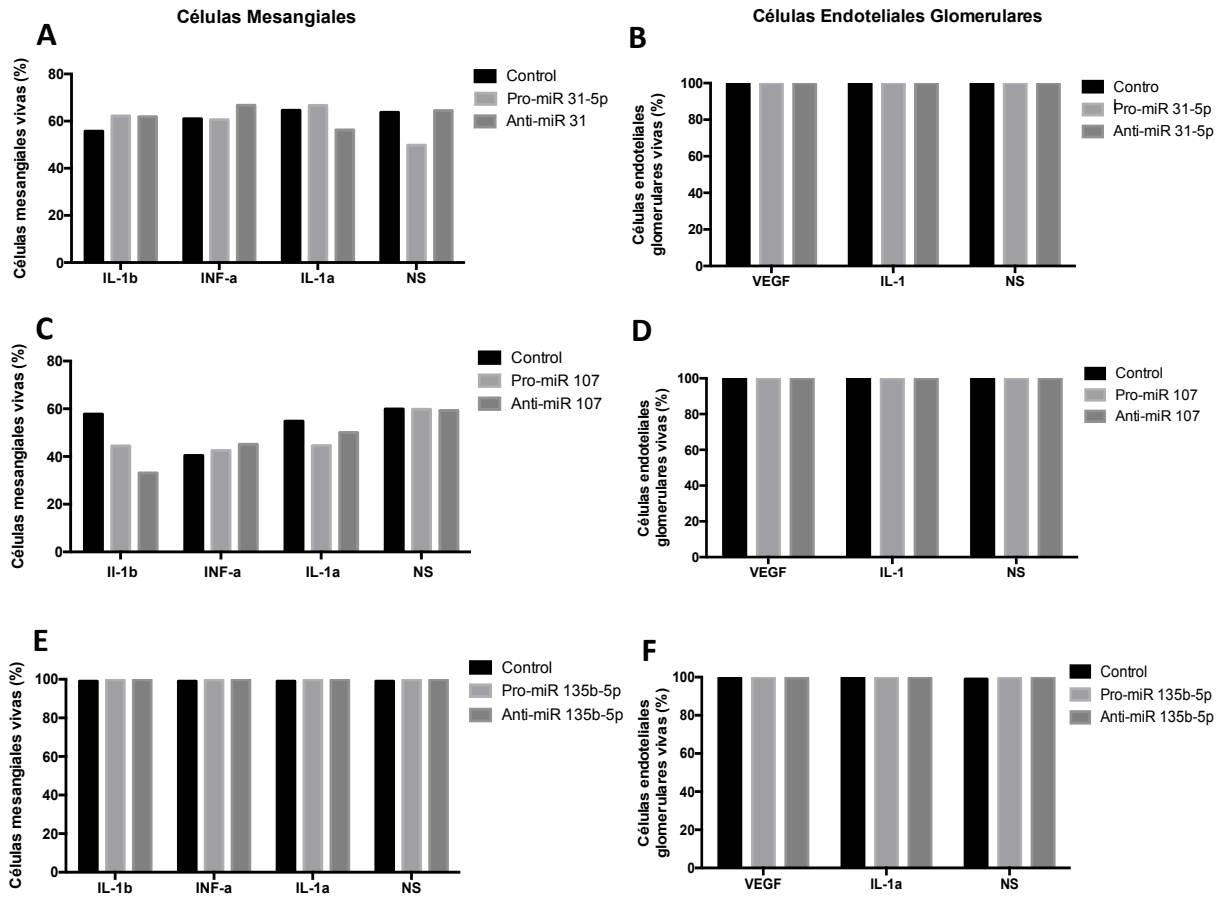


Gráfico 25: Porcentaje de viabilidad celular en los distintos estirpes celulares tras transfección mimic-miR, inhibidor-miR- y scr-miR para los miRNAs a estudio (miR-135b-5p, miR-31-5p y miR-107) y bajo estimulación con múltiples citoquinas (IL-1β, INF-α, IL-1α, VEGF y NS). (A) *miR-31-5p* en células mesangiales. (B) *miR-107* en células mesangiales. (C) *miR-135b-5p* en células mesangiales. (D) *miR-31-5p* en células endoteliales glomerulares. (E) *miR-107* en células endoteliales glomerulares. (F) *miR-135b-5p* en células endoteliales glomerulares. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

6.15.4 Vías de acción de los miRNAs a nivel de las CMRH

La proliferación aberrante, la apoptosis y la activación de estas células mesangiales se observa con frecuencia en la NL (260). Por ello, decidimos estudiar otros posibles efectos de los diferentes miRNAs de interés a nivel mesangial. Los cultivos celulares con CMRH fueron estudiados tras la sobreexpresión e inhibición del *miR-135b-5p*, *miR-31-5p* y *miR-107* y

estimulación con varias citoquinas relevantes en la NL como IL-1 α , INF- α e IL-1 β . El estudio se completó con la condición de "no estimulación" (NS) en la que se añadió PBS como estimulante.

1. **Efecto de los miRNAs a estudio en la fibrosis:**

Las células mesangiales se hallan integradas en la matriz extracelular mesangial controlando su estado a través de un estrecho equilibrio dinámico entre su síntesis y su degradación (261). La proliferación mesangial, así como el acúmulo de matriz extracelular y la esclerosis glomerular representan uno de los componentes principales de la progresión de la enfermedad glomerular (262).

a. Efecto del *miR-135b-5p* en la fibrosis

Para estudiar los efectos que el *miR-135b-5p* podría presentar sobre los procesos de fibrosis renal se evaluaron los niveles de expresión de RNAm correspondientes a los genes de proteínas de matriz extracelular como el colágeno 3A1 (Col3A1) y la fibronectina-1 (FN-1). Además, y dado el conocido papel del TGF- β en la promoción de la fibrosis renal, también quiso observarse si la modulación sobre la expresión de estas proteínas de matriz extracelular podría tener lugar a través de esta vía mediante el análisis de RNAm para el TGF- β 1 y su receptor. De forma global y pese a la estimulación con varias citoquinas (IL-1 β , INF- α , IL-1 α y NS) no pudieron observarse cambios relevantes significativos en los niveles de expresión de estos genes. Sólo en el caso de la FN-1 pudo apreciarse un escaso incremento en su expresión bajo la condición INF- α , IL-1 α (tasa de cambio de 1.26 y 2.12,

respectivamente; Gráfico 26B) tras la supresión del *miR-135b-5p*, sugiriendo globalmente un escaso papel de este miRNA sobre la fibrosis renal (Gráfico 26).

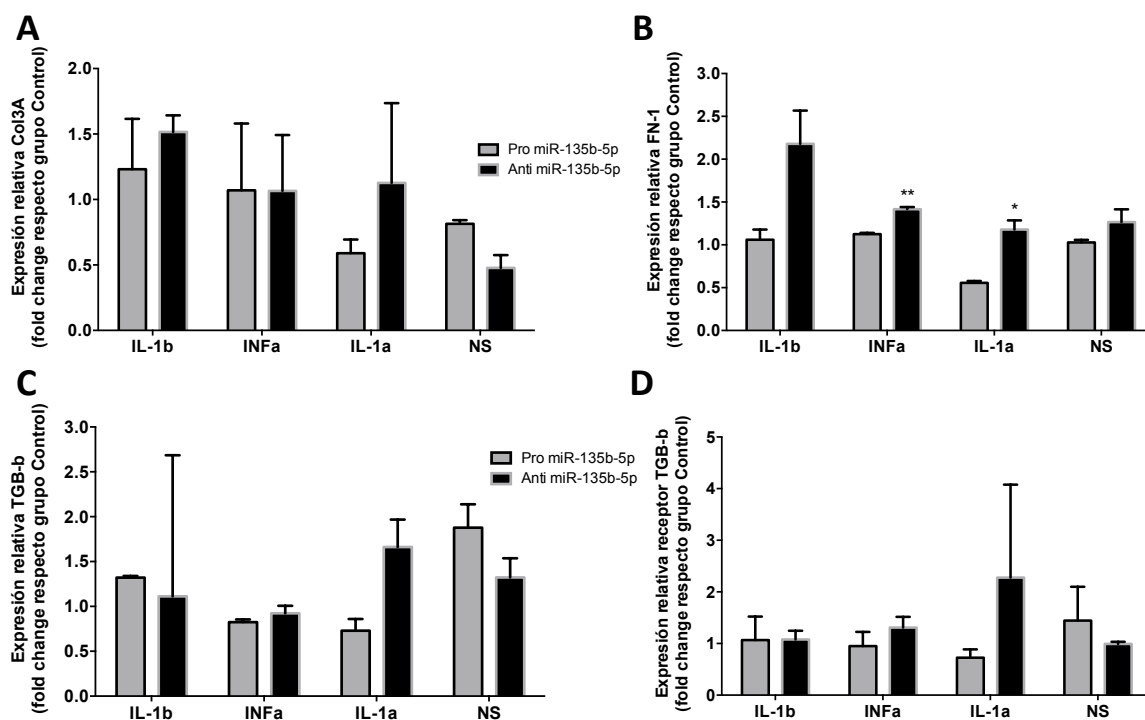


Gráfico 26. Niveles de transcripción génica para los genes (A) Col3A1, (B) FN-1, (C) TGF-β1 y (D) el receptor de TGF-β, en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-135b-5p*, bajo distintas condiciones (IL-1β, INF-α, IL-1α y NS) sobre células mesangiales renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

b. Efecto del *miR-31-5p* en fibrosis

En el caso del *miR-31-5p* se pudo observar principalmente que la presencia de anti-*miR-31-5p* condicionó un incremento significativo en la expresión de la proteína de matriz extracelular ColA31 respecto a la estimulación con *miR-31-5p* (tasa de cambio de 1.43, 1.75, 1.52 y 1.57, respectivamente; Gráfico 27A), siendo las diferencias especialmente relevantes en el caso de la FN-1 (tasa de cambio de 7.3×10^5 , 12.23×10^5 , 4.03×10^5 y 4.06×10^5 , respectivamente; Gráfico 27B). En cuanto a la vía del TGF-β1, el resultado fue un silenciamiento significativo en la expresión

de su RNAm tras el bloqueo del *miR-31-5p* bajo las distintas condiciones de estimulación (tasa de cambio de -1.78, -1.47, -2.47 y -2.25, respectivamente) así como de su receptor (tasa de cambio de -2.27, -1.11, -1.61 y -2.06, respectivamente; Gráfico 27C y D).

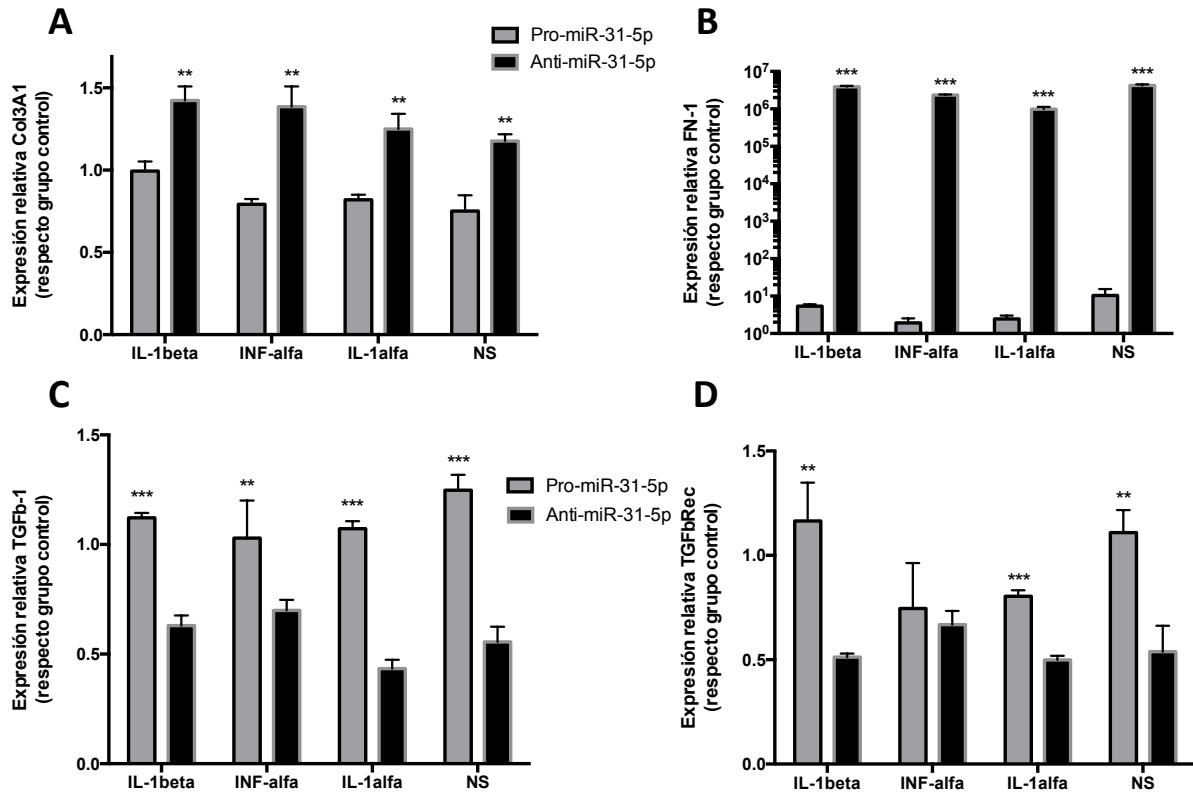


Gráfico 27. Niveles de transcripción génica para los genes del Col3A1 (A), FN-1 (B), TGF-β1 (C) y para el receptor de TGF-β (D) en función de estimulación o inhibición del *miR-31-5p*, bajo distintas condiciones (IL-1β, INF-α, IL-1α y NS). Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

c. Efecto del *miR-107* en fibrosis

En el caso del este miRNA no se evaluaron los resultados del bloqueo del *miR-107* en la condición NS, al no ser posible la correcta supresión, por lo que dichos resultados se obviaron en el estudio. En las demás condiciones, la inhibición del *miR-107* endógeno produjo una reducción poco relevante del Col3A1 bajo la

condición IL-1 α (tasa de cambio de -1.49; Gráfico 28A). Más relevante fue la reducción a nivel de la expresión de FN-1 bajo las condiciones IL-1 β , INF- α e IL-1 α (tasa de cambio de -1.69, -1.41 y -1.20, respectivamente; Gráfico 28B). A nivel de la expresión del receptor de TGF- β pudo apreciarse una reducción en la expresión de RNAm bajo las condiciones IL-1 β , IL-1 α (tasa de cambio de -1.19 y -1.82, respectivamente; Gráfico 28D).

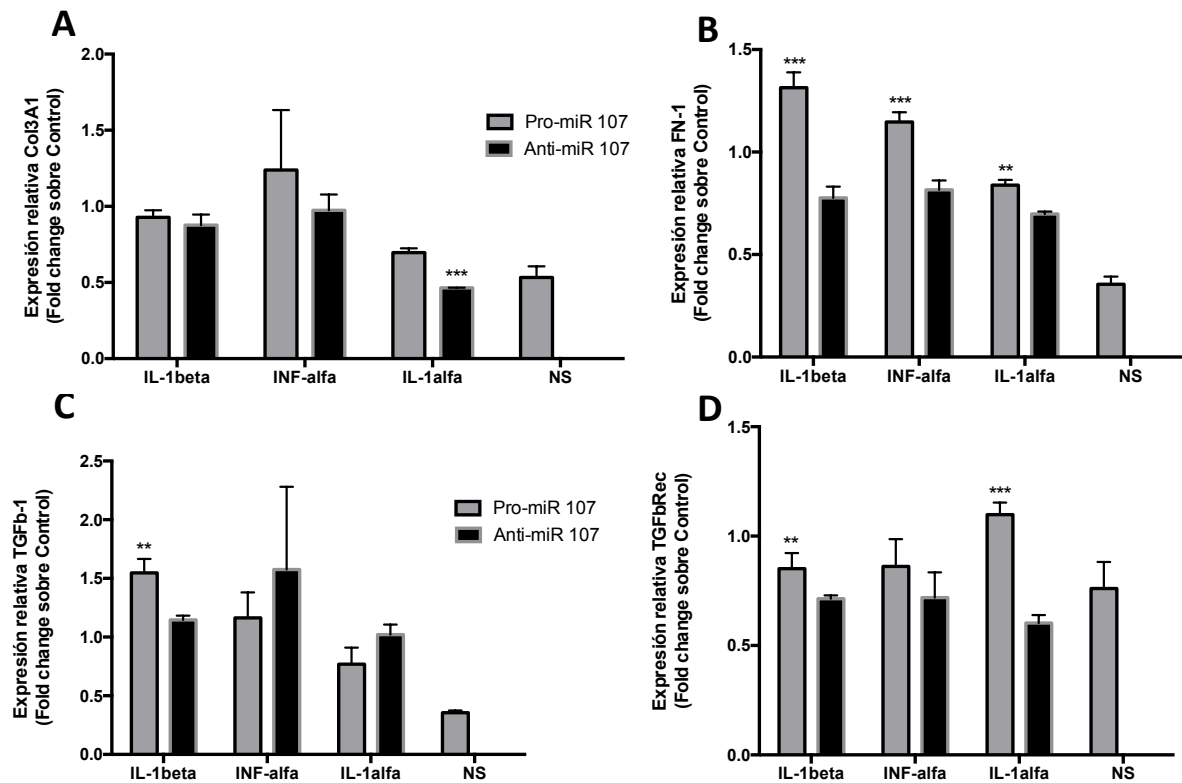


Gráfico 28. Niveles de transcripción génica para los genes del (A) Col3A1, (B) FN-1, (C) TGF β -1 y (D) el receptor de TGF- β , en función de estimulación o inhibición del *miR-107*, bajo distintas condiciones (IL-1 β , INF- α , IL-1 α y NS) sobre células mesangiales renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

2. Efecto de los miRNAs a estudio a nivel de los procesos inflamatorios

Varios trabajos han descrito como los Ac. anti-DNA presentan capacidad de unirse a las CMRH en los pacientes con NL (263), correlacionándose esta con los índices de

actividad de la enfermedad y resultando en la inducción de mediadores proinflamatorios (51,263,264), iniciadores de este proceso el cual en caso de perpetuarse conduciría a la fibrosis renal.

a. Efecto proinflamatorio del *miR-135b-5p*:

A nivel de la modulación de la respuesta inflamatoria sí pudieron observarse cambios destacables secundarios al efecto del *miR-135b-5p*. De esta forma pudo apreciarse como su inhibición producía un incremento significativo en los niveles de expresión génica de IL-6 e IL-8. Así, los niveles de RNAm de IL-6 mostraron elevaciones bajo todas las condiciones de estimulación, IL-1 β , INF- α , IL-1 α y NS (tasa de cambio de 4.64, 3.16, 5,10 y 13.13, respectivamente; Gráfico 29A). En cuanto a la expresión génica de IL-8 las diferencias observadas siguieron el mismo patrón que para IL-6, resultando significativas bajo las condiciones IL-1 β , INF- α e IL-1 α sin diferencias en la condición NS (tasa de cambio de 2.92, 2.26 y 4.54, respectivamente; Gráfico 29B).

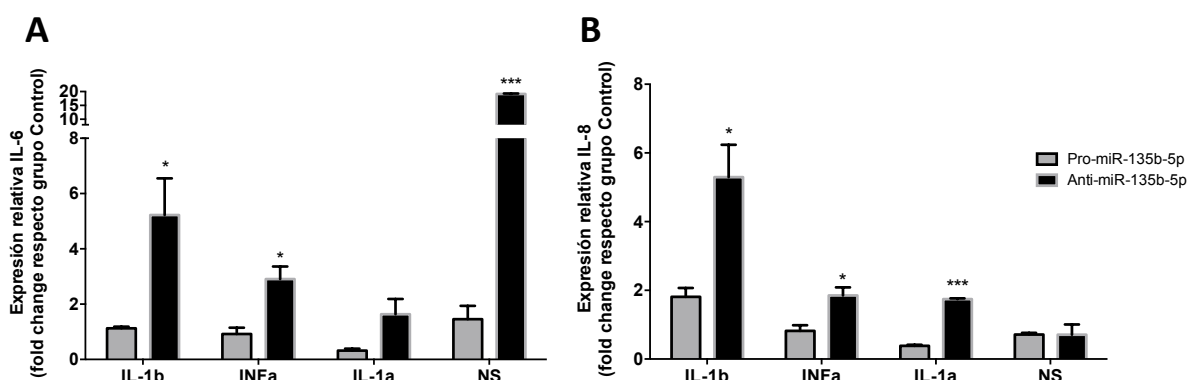


Gráfico 29. Niveles de transcripción génica para los genes (A) IL-6 y (B) IL-8, en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-135b-5p*, bajo distintas condiciones (IL-1 β , INF- α , IL-1 α y NS) sobre células mesangiales renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

Finalmente, se evaluaron los niveles de expresión de moléculas quimiotácticas involucradas en los procesos de reclutamiento celular en la fase aguda de la inflamación como el CXCL1, el CCL2 y el CCL3. Así, la inhibición del *miR-135b-5p* puso en evidencia un incremento significativo en los niveles de CXCL1 bajo la condición IL-1 β (tasa de cambio de 2.59). A su vez, la estimulación con *miR-135b-5p* condicionó un descenso en la expresión del RNAm para CXCL1 a nivel de la condición IL-1 α (tasa de cambio de -3.13; Gráfico 30A). A nivel de la expresión de CCL2 solo bajo la condición NS pudo observarse una menor expresión tras la inhibición del *miR-135b-5p* (tasa de cambio de -2.48; Gráfico 30B) sin apreciarse diferencias significativas en las demás condiciones. Finalmente, la inhibición del *miR-135b-5p* demostró incrementar los niveles de expresión génica de CCL3 bajo las condiciones IL-1 β , INF- α e IL-1 α (tasa de cambio de 11.18, 4.25 y 23.37, respectivamente; Gráfico 30C).

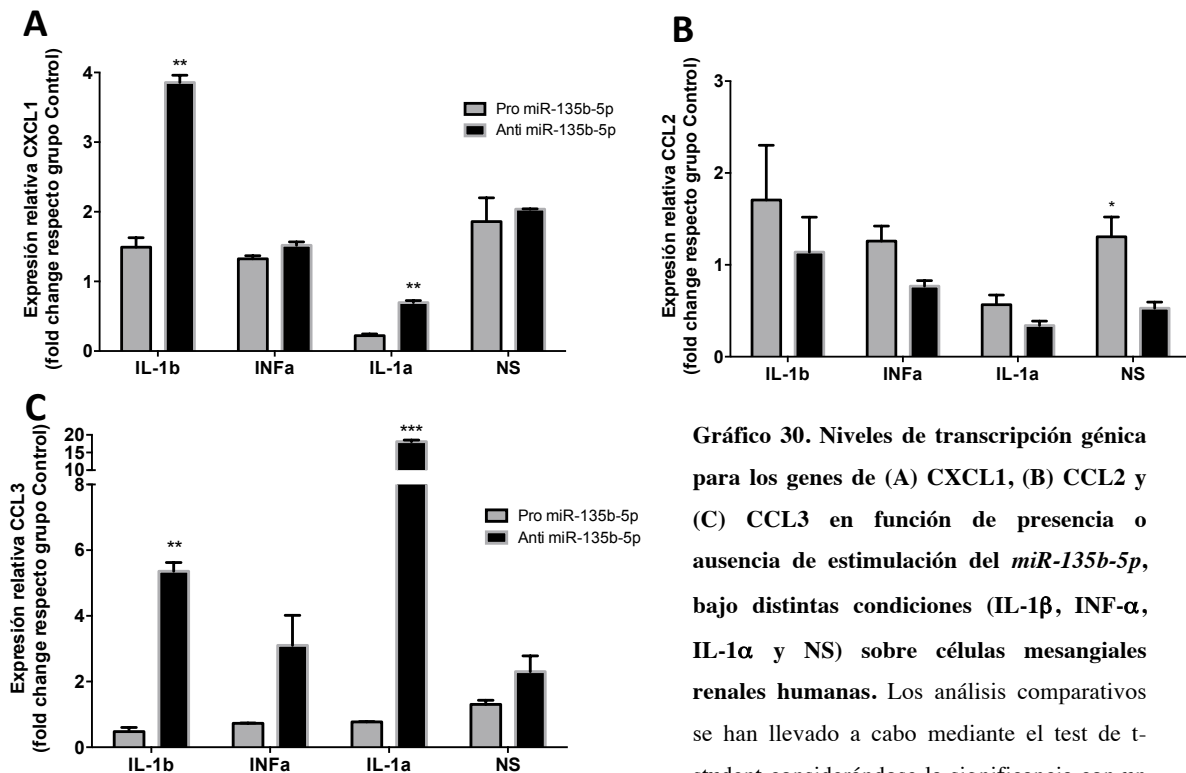


Gráfico 30. Niveles de transcripción génica para los genes de (A) CXCL1, (B) CCL2 y (C) CCL3 en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-135b-5p*, bajo distintas condiciones (IL-1 β , INF- α , IL-1 α y NS) sobre células mesangiales renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerando la significancia con un valor de p < 0.05 (* < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001).

b. Efecto proinflamatorio del *miR-31-5p*:

El *miR-31-5p* también pareció presentar un papel en la modulación de la respuesta inflamatoria, pues su bloqueo condicionó *in vitro* un incremento en la expresión de IL-6 bajo la condición INF- α e IL-1 α (tasa de cambio 2.09 y 8.96, respectivamente; Gráfico 31A) y de IL-8 de forma significativa bajo las mismas condiciones (tasa de cambio 4.38 y 38.24 respectivamente; Gráfico 31B).

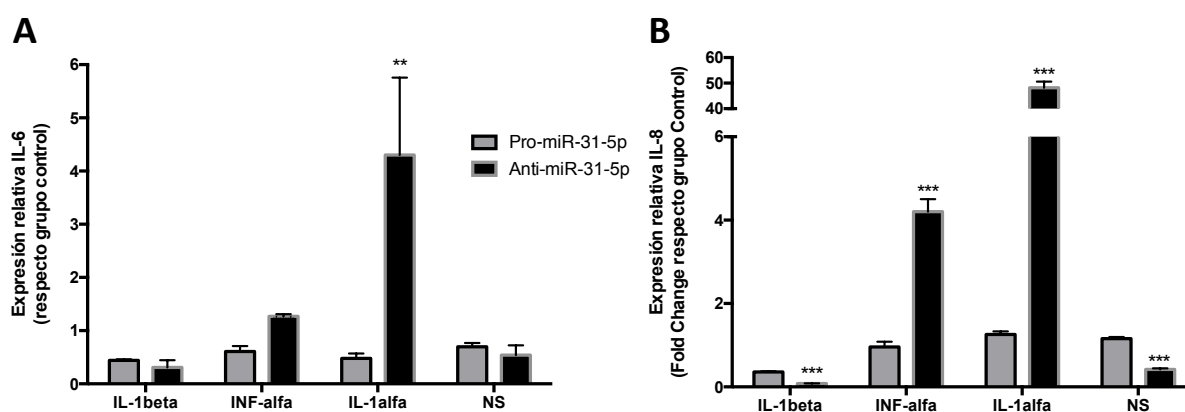


Gráfico 31. Niveles de transcripción génica para los genes (A) IL-6 y (B) IL-8, en función de estimulación o inhibición del *miR-31-5p*, bajo distintas condiciones (IL-1 β , INF- α , IL-1 α y NS) en células mesangiales. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

A su vez se apreció, bajo estas mismas condiciones y ante el bloqueo del *miR-31-5p*, un incremento significativo de la transcripción de CXCL-1 (tasa de cambio 4.59 y 28.52, respectivamente; Gráfico 32A) y de CCL3 (tasa de cambio 4.63 y 20.07, respectivamente; Gráfico 32C). De forma contrario, se pudo observar una reducción significativa de la transcripción de CXCL-2 bajo todas las condiciones de estimulación ante presencia de anti-*miR-31-5p* (tasa de cambio -30.52, -2.88, -3.46 y -12.95, respectivamente; Gráfico 32B).

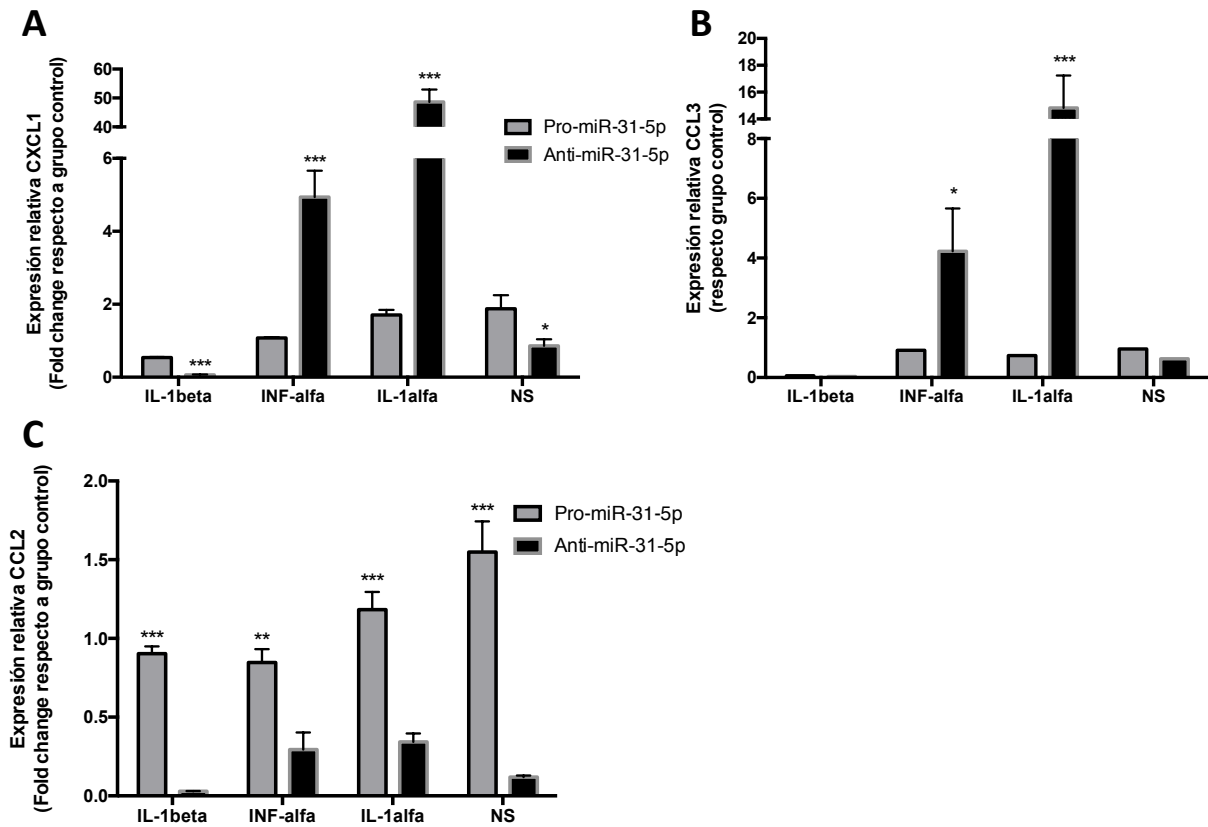


Gráfico 32. Niveles de transcripción génica para los genes (A) CXCL-1, (B) CCL3 y (C) CCL2 en función de estimulación o inhibición del *miR-31-5p*, bajo distintas condiciones (IL-1 β , INF- α , IL-1 α y NS). Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; * < 0.001).**

c. Efecto proinflamatorio del *miR-107*

A nivel del papel del *miR-107* también pudo observarse como de la presencia de *miR-107* condicionaba una reducción en la expresión génica de IL-6 bajo la condición IL-1 α (tasa de cambio de -6.11; Gráfico 33A). A nivel de la expresión de IL-8 pudo apreciarse también una reducción en las condiciones INF- α e IL-1 α (tasa de cambio de -3.00 y -4.22, respectivamente), con respuesta contraria bajo la condición IL-1 β (tasa de cambio de 1.78; Gráfico 33B). Finalmente, se evaluaron los niveles de expresión génica para el CXCL1 y CCL2, objetivando un descenso de la expresión de CXCL1 bajo la condición IL-1 α (tasa de cambio de -2.22; Gráfico 33C) tras la sobreexpresión

de *miR-107*, y en el caso del *CCL2* un incremento significativo en los niveles de este RNAm tras el bloqueo del *miR-107* en la condición IL-1 β e INF- α (tasa de cambio de 8.88 y 6.39, respectivamente; Gráfico 33D). Los niveles de *CCL3* resultaron indetectables en todas las condiciones.

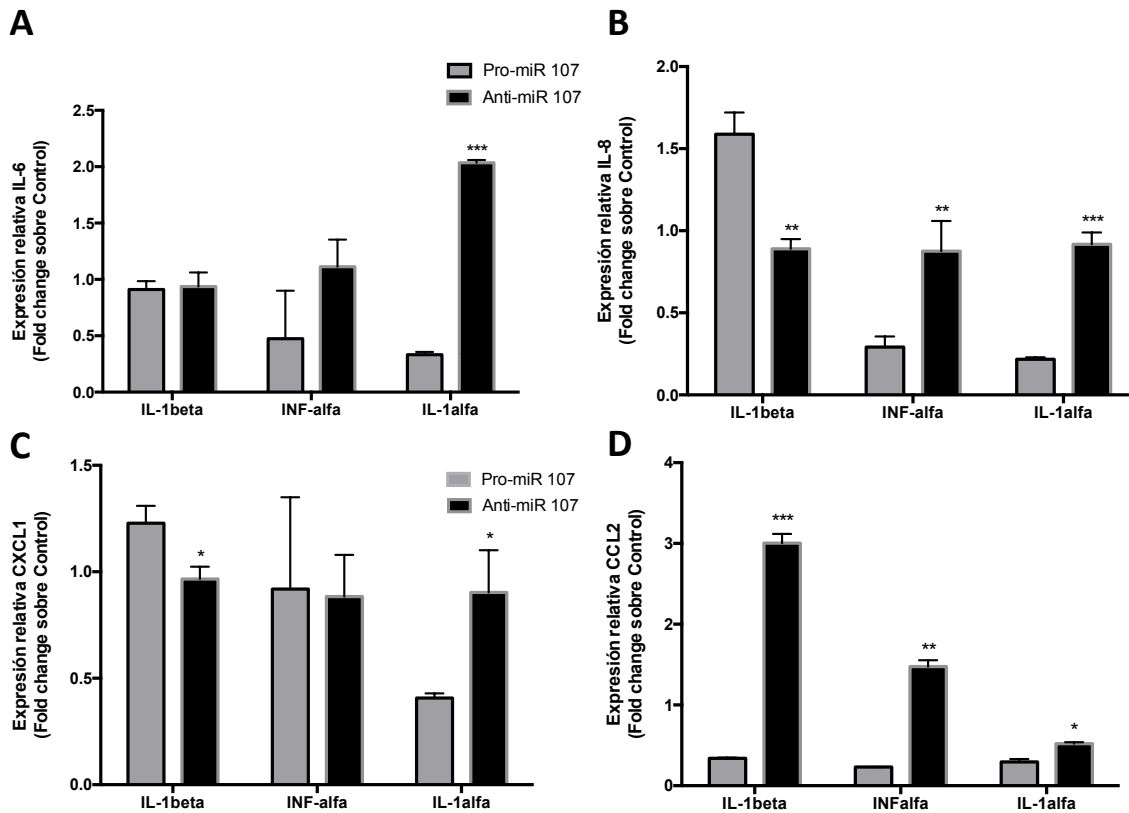


Gráfico 33. Niveles de transcripción génica para los genes del (A) IL-6, el (B) IL-8 y (C) CXCL-1, en función de estimulación o inhibición del *miR-107*, bajo distintas condiciones (IL-1 β , INF- α , IL-1 α) sobre células mesangiales renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

3. Otros efecto de los miRNAs a estudio: HIF-1 α

Dada la confluencia en el "*Pathway análisis*" (ver apartado 6.14) sobre el HIF-1 α como diana común de los 3 miRNAs a estudio se decidió valorar el efecto de su modulación sobre la expresión génica de esta vía. Así, de forma global pudo observarse una incremento en los niveles de expresión del HIF-1 α ante la supresión de los miRNAs a estudio así como la respuesta contraria, una abolición en la expresión, tras la sobreexpresión de los miRNAs (Gráfico 34).

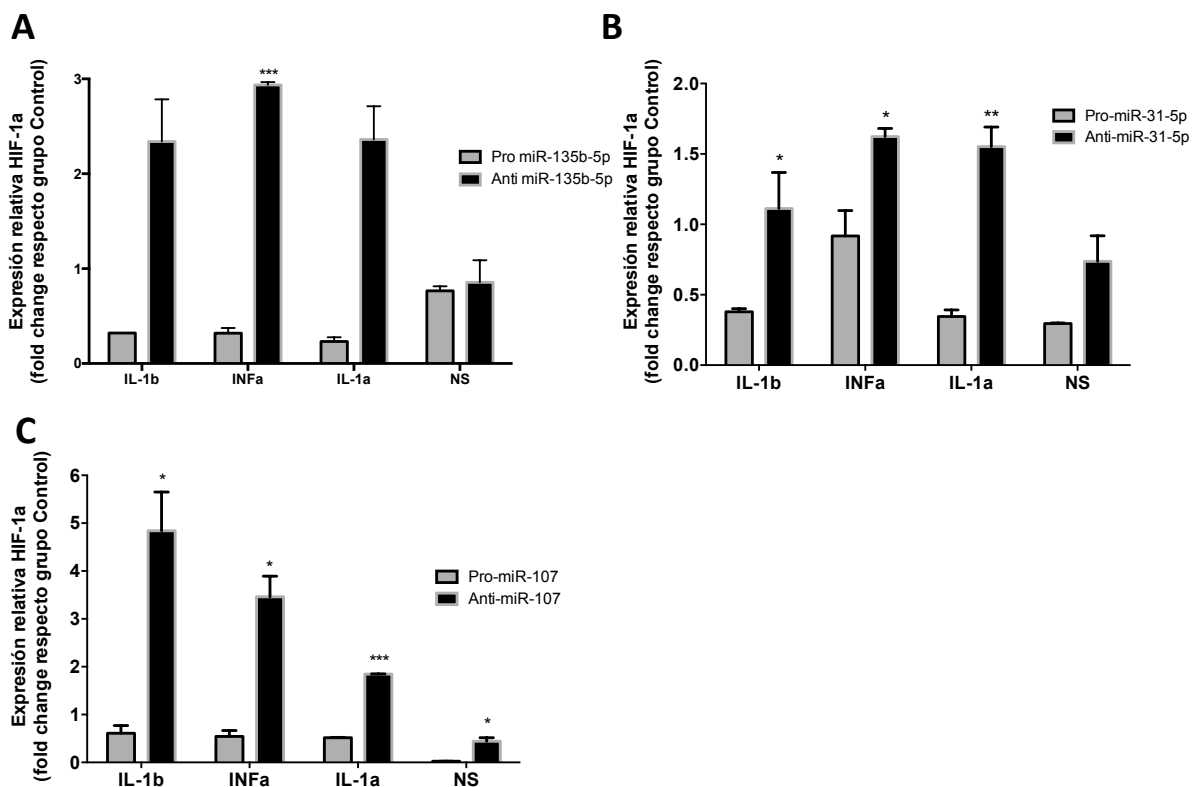


Gráfico 34. Niveles de transcripción génica para el gen HIF-1 α en función de la modulación de la expresión del (A) miR-135b-5p, (B) miR-31-5p y (C) miR-107 bajo distintas condiciones (IL-1 β , INF α , IL-1 α y NS) sobre células mesangiales renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerando la significancia con un valor de p < 0.05 (* < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001).

6.15.5 Vías de acción de los miRNAs a nivel de las CEGRH

Numerosos estudios señalan la estrecha relación existente entre las células endoteliales glomerulares y los podocitos glomerulares para el mantenimiento de la integridad de la barrera de filtración glomerular (259), condicionando su afectación la progresión de la enfermedad glomerular.

1. Efecto de los miRNAs a estudio en la fibrosis

Se ha propuesto la disfunción endotelial como al base fisiopatológica de la insuficiencia renal crónica (265), estando la fibrosis renal en dicha insuficiencia renal crónica estrechamente relacionada con la progresión de la obstrucción microvascular y con la pérdida de la función capilar de la nefrona inducida por esta disfunción endotelial. Además, en los últimos años el concepto de transición epitelio-mesenquimal, que describe el proceso de transición de células epiteliales totalmente diferenciadas a células de fenotipo fibroblástico a surgido como una importante vía de generación de fibroblastos y miofibroblastos a nivel renal (266).

a. Efecto del *miR-135b-5p* en fibrosis

La evaluación del papel del *miR-135b-5p* sobre los procesos de fibrosis celular se llevó a cabo a través de la expresión génica de los RNAm correspondientes al Col3A1, la FN-1 y el TGF- β 1. De forma general no se apreció un papel relevante de este miRNA (Gráfico 35), apreciándose solamente una aumento en la transcripción del gen del receptor de TGF- β bajo la condición de estimulación con VEGF (tasa de cambio de 2.77, $p = 0.012$; Gráfico 35C) tras el silenciamiento de este *miR-135b-5p*.

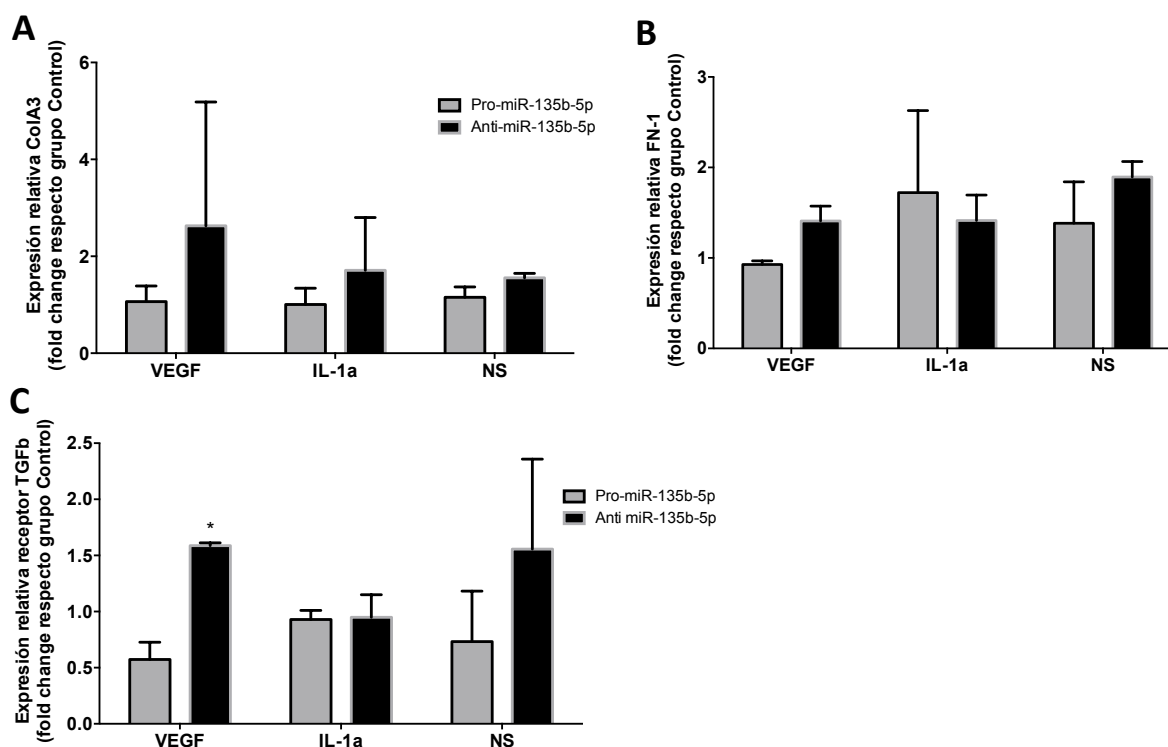


Gráfico 35. Niveles de transcripción génica para los genes de (A) Col3A, (B) FN-1 y (C) receptor TGF-β en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-135b-5p*, bajo distintas condiciones (VEGF, IL-1α y NS) sobre células endoteliales glomerulares renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; * < 0.001).**

b. Efecto del *miR-31-5p* en fibrosis

La evaluación del *miR-31-5p* sobre los procesos de fibrosis renal mostró a nivel de las proteínas de matriz extracelular como su bloqueo condicionaba un incremento en los niveles de expresión de Col3A1 bajo estimulación con VEGF (tasa de cambio de 1.29), mientras que bajo IL-1 e NS se observó una reducción de la expresión (tasa de cambio de -1.61 y -1.46, respectivamente; Gráfico 36A). Los niveles de expresión de FN-1 mostraron mayor expresión tras el bloqueo del *miR-31-5p* y bajo la estimulación con VEGF (tasa de cambio de 3.82; Gráfico 36B). En la misma dirección se pudo observar una elevación de los niveles del TGF-β1 tras el bloqueo del *miR-31-5p* y tras la estimulación con VEGF (tasa de cambio de 2.43; Gráfico 36C).

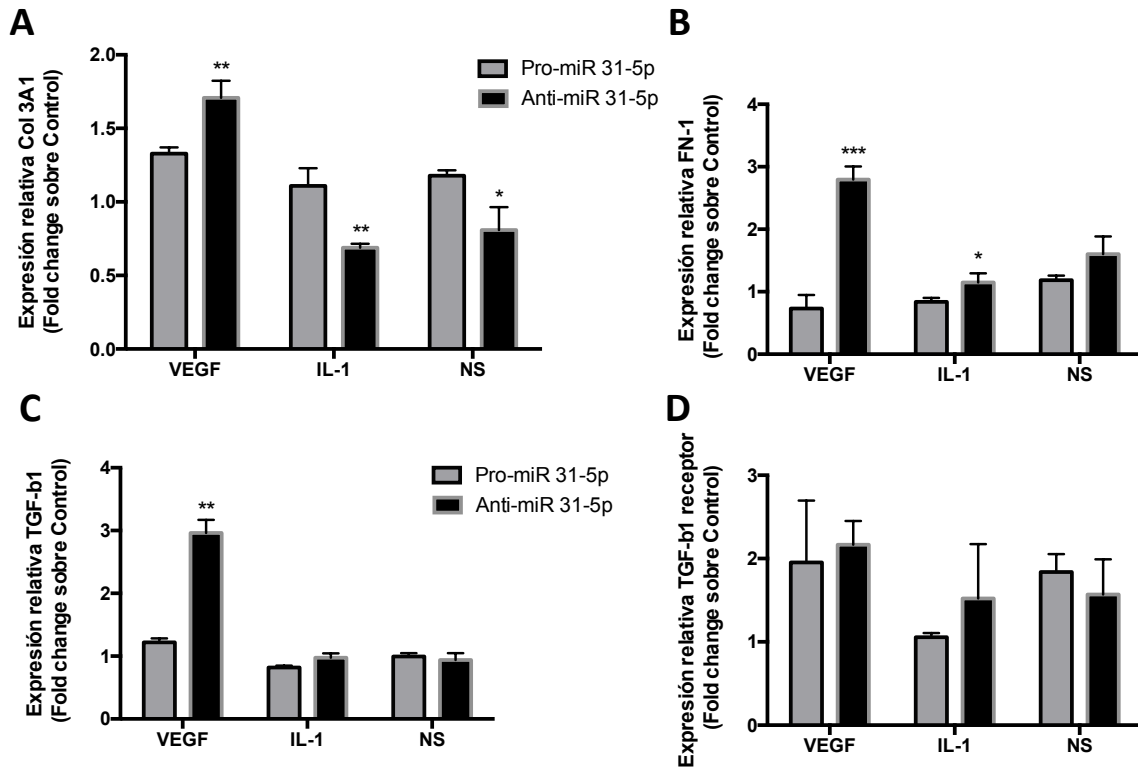


Gráfico 36. Niveles de transcripción génica para los genes de (A) Col3A1, (B) FN-1, (C) TGF- β 1 y (D) receptor TGF- β , en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-31-5p*, bajo distintas condiciones (VEGF, IL-1 α y NS) sobre células endoteliales glomerulares renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerando la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

c. Efecto del *miR-107* en fibrosis

A nivel de las CEGRH, solamente nos centramos en la sobreexpresión del *miR-107* ya que como se ha comentado en el apartado 7.15.1, la transfección para inhibir este miRNA no fue eficaz. Así, la determinación de los niveles de ColA31, FN-1 y TGF β -1 mostró como la estimulación con *miR-107* bajo la condición NS ocasionaba un bloqueo en la expresión de Col3A1 (tasa de cambio de -2.44) mientras que en la condición VEGF conllevaba el bloqueo en la expresión FN-1 y TGF β -1 (tasa de cambio de -1.97 y -1.59, respectivamente; Gráfico 37B y C).

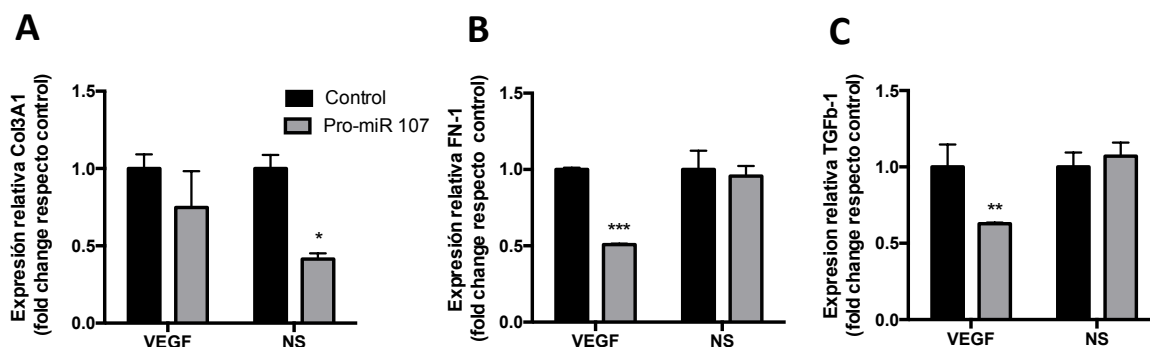


Gráfico 37. Niveles de transcripción génica para los genes (A) Col3A1, (B) FN-1 y (C) TGFβ-1 en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-107*, bajo distintas condiciones (VEGF y NS) sobre células endoteliales glomerulares humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

2. Efecto de los miRNAs a estudio a nivel de los procesos inflamatorios

Los leucocitos reclutados en los lugares de inflamación renal son guiados por la presencia de citoquinas y quimioquinas producidas por las células residentes a nivel renal entre las que se incluyen las células endoteliales glomerulares, además de podocitos, tubulares y mesangiales (267). Una vez reclutados estos acceden al tejido renal mediante una migración transendotelial (268).

a. Efecto proinflamatorio del *miR-135b-5p*:

En relación al proceso de inflamación se estudió la expresión génica a través del análisis del RNAm para los genes NF-κβ, IL-6, VCAM-1 y TNF-α. De este modo, el bloqueo del *miR-135b-5p* endógeno conllevó la sobreexpresión de los niveles de NF-κβ bajo estimulación con VEGF y NS (tasa de cambio de 1.69 y 3.60; Gráfico 38A), la sobreexpresión de IL-6 bajo las condiciones VEGF e IL-1α (tasa de cambio de 3.82 y 2.89; Gráfico 38B) y la sobreexpresión de VCAM-1 bajo las condiciones VEGF e IL-1α (tasa de cambio de 6.81 y 15.59; Gráfico 38C).

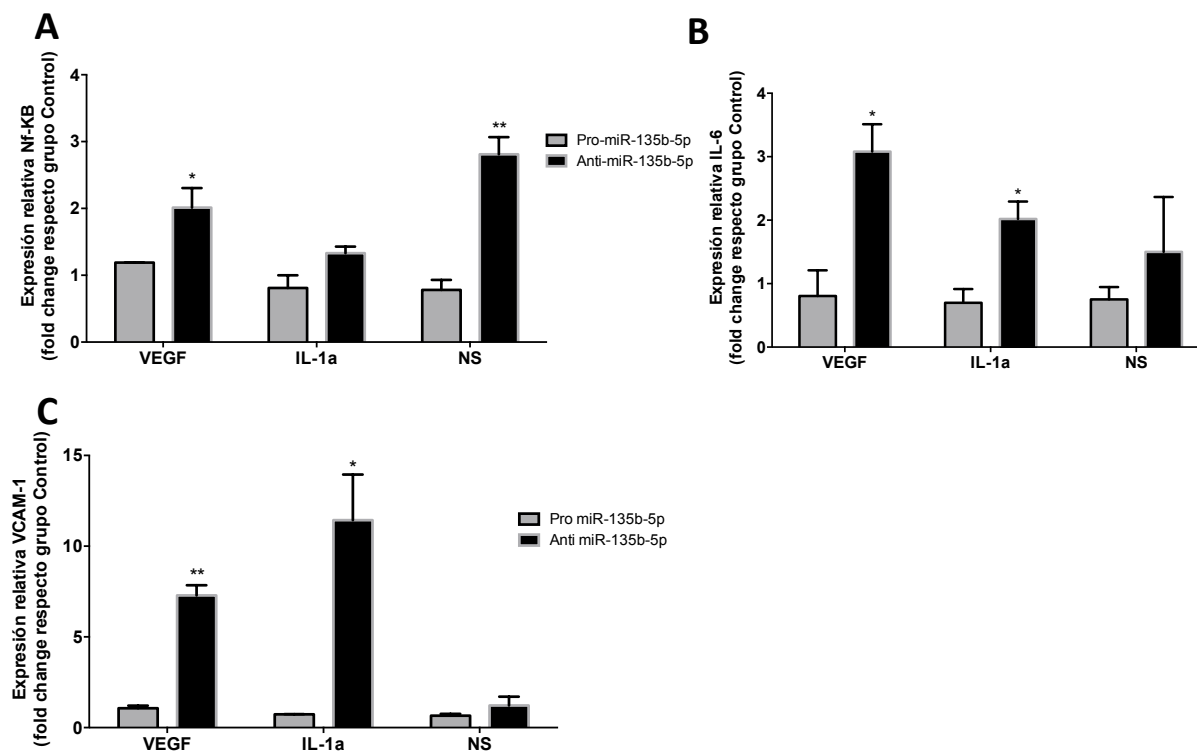


Gráfico 38. Niveles de transcripción génica para los genes de (A) Nf- κ B, (B) IL-6 y (C) VCAM-1, en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-135b-5p*, bajo distintas condiciones (VEGF, IL-1 α y NS) sobre células endoteliales glomerulares renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; * < 0.001).**

b. Efecto proinflamatorio del *miR-31-5p*:

En relación al *miR-31-5p*, sólo pudo apreciarse una discreta inhibición en la expresión génica de Nf- κ B bajo la condición NS tras el bloqueo del miRNA (tasa de cambio de -2.23; Gráfico 39A). En el caso de IL-6, el bloqueo del *miR-31-5p* mostró una sobreexpresión marcada bajo las condiciones de estimulación VEGF, IL-1 y NS (tasa de cambio de 3.53, 6.29 y 1.23, respectivamente; Gráfico 39B). Finalmente, a nivel de VCAM-1 el bloqueo del miR condicionó una sobreexpresión de este RNAm bajo la condición VEGF (tasa de cambio de 3.32) con opuesto resultado en la condición NS (tasa de cambio de -6.52; Gráfico 39C).

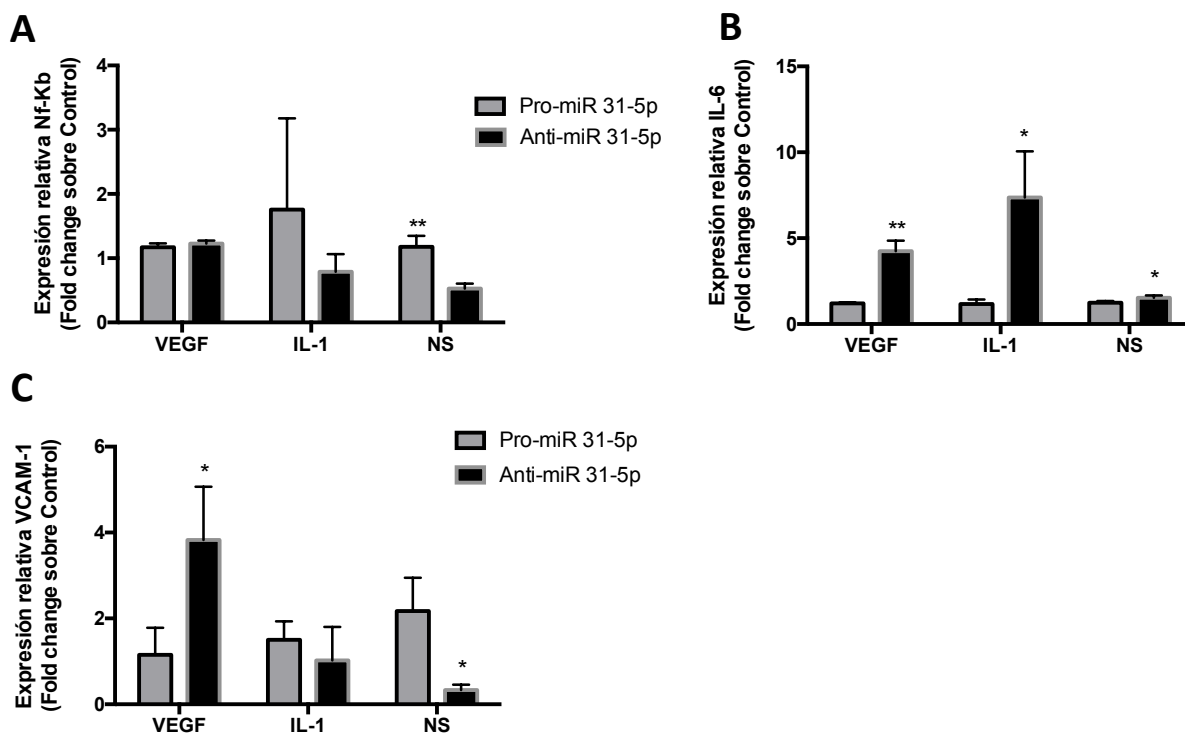


Gráfico 39. Niveles de transcripción génica para los genes de (A) Nf- $\kappa\beta$, (B) IL-6 y (C) VCAM-1, en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-31-5p*, bajo distintas condiciones (VEGF, IL-1 α y NS) sobre células endoteliales glomerulares renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

c. Efecto proinflamatorio del *miR-107*:

Cuando se evaluaron los niveles de expresión de Nf- $\kappa\beta$ pudo observarse una supresión en su expresión tras la sobreexpresión del *miR-107*, bajo la condición VEGF (tasa de cambio de -6.89; Gráfico 40A), sin diferencias en la condición NS. A nivel de la expresión de IL-6 se apreció en la condición estimulada con VEGF una disminución en la expresión del RNAm para esta citoquina (tasa de cambio de -2.70; Gráfico 40B). Finalmente, la expresión de VCAM-1 no presentó variaciones significativas en relación a la sobreexpresión del *miR-107* (Gráfico 40C).

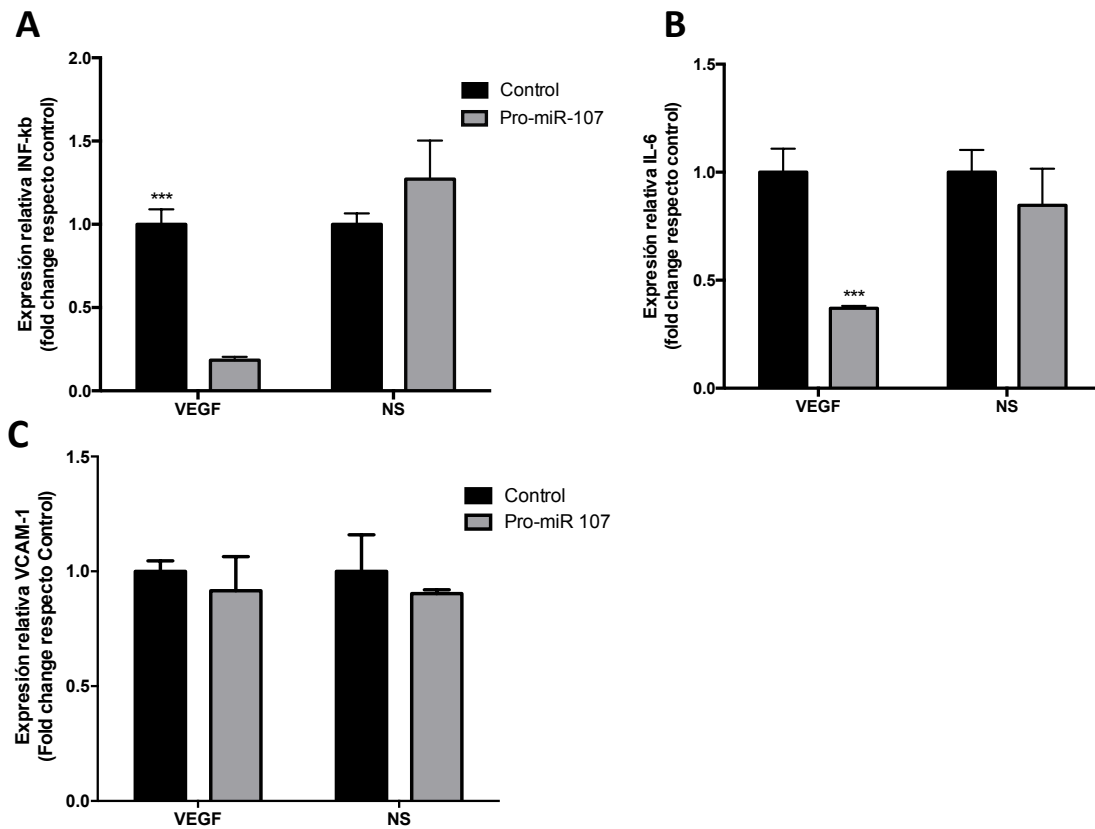


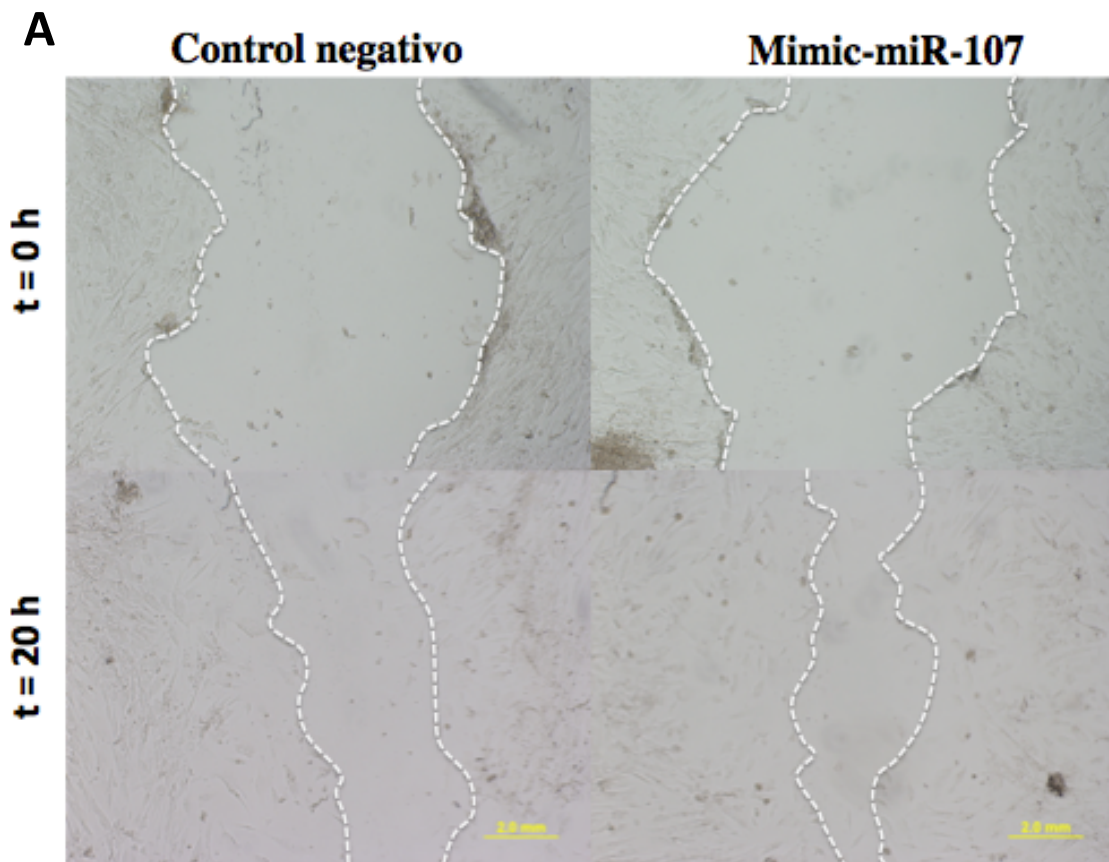
Gráfico 40. Niveles de transcripción génica para los genes de (A) $\text{Nf-}\kappa\beta$, (B) IL-6 y (C) VCAM-1, en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-107*, bajo distintas condiciones (VEGF, IL-1 α y NS) sobre células endoteliales glomerulares renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

3. Efecto de los miRNAs a estudio a nivel de los procesos de migración celular y angiogénesis

La determinación de la habilidad celular en cuanto a migración se realizó mediante la técnica del "wound healing assay". Se plantaron 1×10^5 células en placas de 30mm de diámetro practicándose mediante la punta de pipeta estéril de 200 μL una herida incisa de 1mm de ancho para romper la confluencia adquirida de forma previa. Este proceso se llevo a cabo tras comprobar una grado de confluencia celular del 80%. De forma inicial las células fueron transfectadas con mimic-miR o scr-miR y posteriormente, a las 24h, estimuladas con VEGF o no estimuladas. El movimiento de las células sobre el área de

incisión en las distintas condiciones fue examinado y fotografiado en distintos momentos (2, 4, 6, 8, 20, 24 y 32h) usando un microscopia óptico. La distancia entre los bordes de los márgenes de incisión se estimó, mediante el cálculo del índice de confluencia, de forma sucesiva para evaluar la movilidad celular. Todos los estudios se realizaron por triplicado calculando la mediana para las comparaciones posteriores.

El resultado mostró que la sobreexpresión del *miR-107* condicionaba un incremento del grado de migración celular tanto en la condición NS como bajo la estimulación con VEGF de forma estadísticamente significativa en comparación al grupo celular control. Los cambios en dicha migración se empezaron a objetivar de forma significativa a las 6h respecto al grupo control ($p = 0.013$), siendo más marcadas bajo la estimulación VEGF con diferencias que alcanzaron el 17% a las 20h de evolución, respecto al grupo NS que resultaron del 9% (Figura 16).



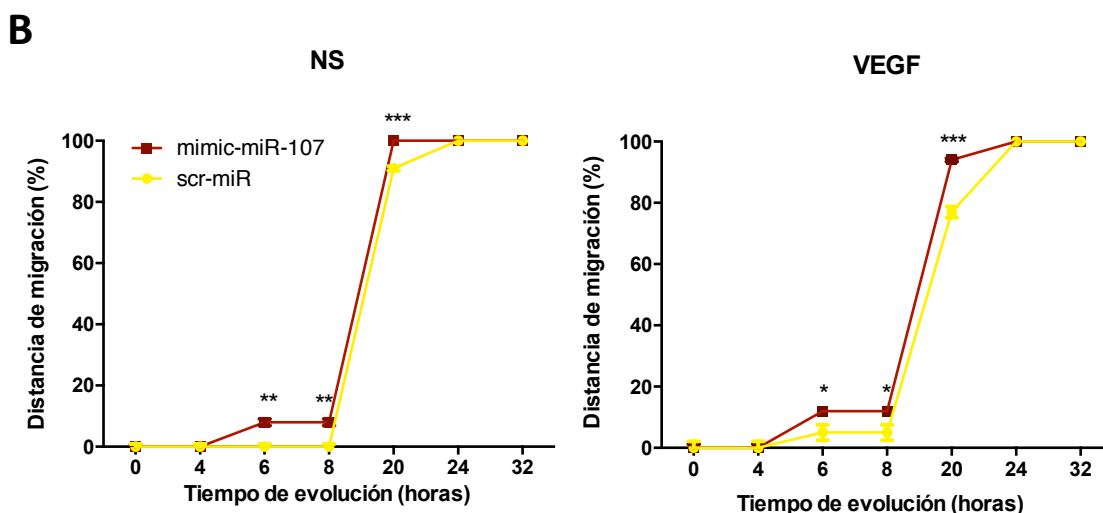


Figura 16. (A) Imágenes evolutivas del proceso de migración de las cultivos celulares de CEGRH en el ensayo de "wound healing", tomadas directamente tras el "scratching" (t=0h) y tras 20 horas (t=20h) de estimulación con VEGF y bajo la condición scr-miR y mimic-miR-107. Las imágenes han sido tomadas a 20x. (B) Representación gráfica de la evolución en el proceso de confluencia bajo estimulación con VEGF o ausencia de la misma (NS) ante presencia de miR-107 o control negativo (scr-miR). Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

En el caso del *miR-135b-5p* y del *miR-31-5p* no se apreciaron diferencias en el grado de migración celular en ninguna de las condiciones a estudio.

a. Efecto del *miR-107* sobre la angiogénesis y los procesos de migración celular

Dado que estudios previos han sugerido que el *miR-107* es un regulador de la migración celular y angiogénesis en las células tumorales (269,270), y ante los resultados obtenidos en el estudio previo de migración celular, quisimos investigar las vías de acción a nivel de CEGRH. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) está ampliamente aceptado como el factor primario en la inducción de la angiogénesis (271).

Muchas de las acciones biológicas adscritas al VEGF tiene lugar a través de la cascada de señalización fosfoinosítide 3-kinasa (PI3k)-Akt (272).

Para estudiar más detalladamente este papel del *miR-107* se decidió valorar el grado de expresión de los receptores para el VEGF, observando un incremento significativo de la expresión de VEGFR-1, tras la sobreexpresión del *miR-107* y bajo estimulación con VEGF (tasa de cambio de 2.93; Gráfico 41A), así como de VEGFR-2 en todas las condiciones (tasa de cambio de 3.41 y 1.94, respectivamente; Gráfico 41B).

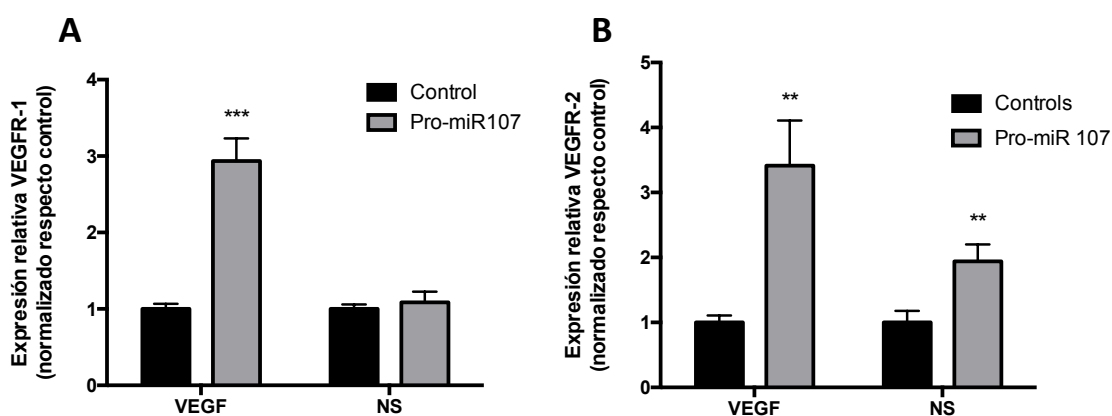


Gráfico 41. Niveles de transcripción génica para los genes del (A) receptor 1 del VEGF y (B) receptor 2 del VEGF en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-107*, bajo distintas condiciones (VEGF y NS) sobre células endoteliales glomerulares humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; * < 0.001).**

Además, se decidió valorar la respuesta de la vía PI3k-Akt, observando un incremento en los niveles de RNAm para PI3k y Akt-1 tras la sobreexpresión del *miR-107* bajo la condición de estimulación con VEGF (tasa de cambio de 3.47 y 4.14, respectivamente; Gráfico 42).

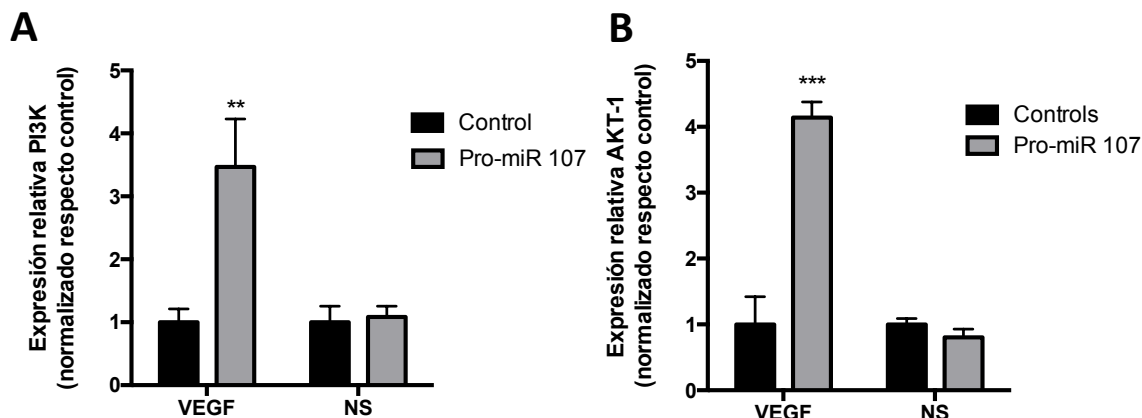
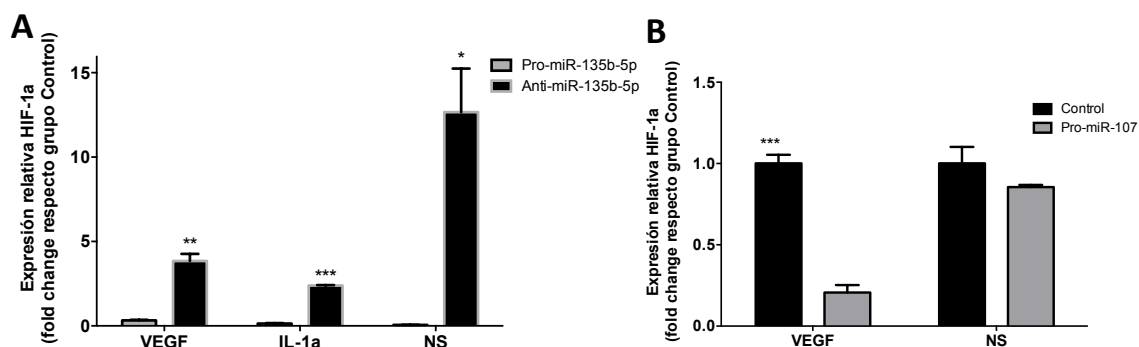


Gráfico 42. Niveles de transcripción génica para los genes del (A) PI3k y (B) Akt-1 en función de presencia o ausencia de estimulación del *miR-107*, bajo distintas condiciones (VEGF y NS) sobre células endoteliales glomerulares humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

4. Otros efecto de los miRNAs a estudio: HIF-1 α

En el caso de la estirpe de CEGRH también pudo apreciarse de forma global una supresión en la expresión del HIF-1 α tras la sobreexpresión del *miR-135b-5p* y del *miR-31-5p*, bajo estimulación con VEGF, IL-1 α y NS (tasa de cambio de -11.95, -17.19, -253.09 y -7.62, -2.76, -4.94, respectivamente; Gráfico 43A y C). En el caso del *miR-107*, solo se apreciaron diferencias bajo la condición VEGF (tasa de cambio de -4.84; Gráfico 43B).



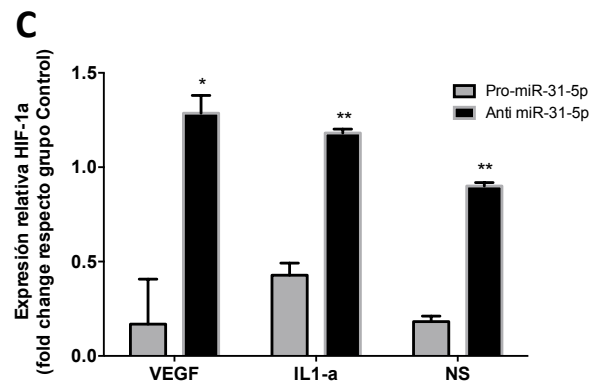


Gráfico 43. Niveles de transcripción génica para el gen HIF-1 α en función de la modulación de la expresión del (A) *miR-135b-5p*, (B) *miR-107* y (C) *miR-31-5p* bajo distintas condiciones (VEGF, IL-1 α y NS) sobre células endoteliales glomerulares renales humanas. Los análisis comparativos se han llevado a cabo mediante el test de t-student considerándose la significancia con un valor de $p < 0.05$ (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001).

7. DISCUSIÓN

Los miRNAs desempeñan un papel importante en la regulación de la función biológica y patológica renal (273). Los miRNAs circulantes y los miRNA libres urinarios han sido evaluados para su aplicación diagnóstica y terapéutica en la patología renal en el lupus (274). Sin embargo, los miRNAs libres en los fluidos corporales se ven afectados por la hidrólisis enzimática y, por lo tanto, podrían no reflejar con precisión los cambios patológicos. El exosoma es un nuevo modo identificado de comunicación intercelular. Los miRNAs transportados en exosomas pueden retener información sobre la actividad biológica, y se encuentran protegidos de la destrucción enzimática en las vías urinarias por lo que su análisis es más valioso que el de los miRNAs libres.

Este estudio es el primer trabajo que ensaya la tecnología de microarrays LNA como método de cribado comparando muestras de pacientes en el momento del brote y evolutivamente para identificar un perfil de expresión génica diferencial a nivel del contenido de miRNAs exosomales en la orina de los pacientes con NL en función de su respuesta al tratamiento.

Los estudios realizados hasta la fecha han demostrado un posible papel de los miRNAs exosomales urinarios como biomarcadores en la progresión hacia la cronicidad en la NL y como marcador de actividad de la misma. De esta manera se ha descrito la expresión de *miR-29c* en exosomas urinarios como un marcador no invasivo de progresión temprana de la fibrosis en pacientes con NL (243). En lo que se refiere a marcadores de actividad, *Redon et al.* identificaron niveles altos de expresión génica de *miR-302*, *miR-335* y *miR-146a* en exosomas urinarios de pacientes con nefritis activa, siendo el *miR-146a* el mayor discriminador entre los pacientes con NL y los controles sanos (275). Nuestro trabajo es el primero en el que se realiza una detección de miRNA en exosomas urinarios de pacientes con NL en diferentes puntos temporales, correlacionando estos resultados con la respuesta clínica.

Tras un estudio de cribado y de validación entre diferentes comparaciones hemos identificado un perfil de sobreexpresión de miRNAs en exosomas urinarios en pacientes con NL tipo III/IV respondedores al tratamiento distinto al de los no respondedores, tanto en el momento de la biopsia

renal como en el seguimiento. Los pacientes respondedores expresaron un aumento de los niveles de expresión génica del *miR-135b-5p*, el *miR-31-5p* y el *miR-107* a nivel de los exosomas urinarios.

A diferencia de los resultados a nivel urinario, el estudio de estos miRNAs a nivel sérico no permitió discriminar entre los grupos de respuesta al tratamiento ni en el momento inicial del brote ni evolutivamente, considerándose pues poco probable que los hallazgos diferenciales en la orina fueran el simple reflejo de los niveles séricos fruto de filtración renal de los exosomas séricos a causa a la lesión de la membrana basal glomerular.

El análisis de curvas ROC fue capaz de mostrar que los 3 miRNAs elegidos presentan una buena capacidad para discriminar entre los grupos a estudio (R vs NR) en el momento del brote, con niveles de sensibilidad de hasta el 77.8% y de especificidad del 70% en el mejor perfil obtenido, correspondiente al *miR-135b-5p*. En el caso del *miR-107* estos resultaron del 72.7% y 66.7% respectivamente y del 63.2% y 61.9% para el *miR-31-5p*. Comparado con otros biomarcadores de respuesta, el *miR-135-5p* ha mostrado un mejor perfil discriminatorio que incluso biomarcadores tradicionales como el complemento (C3), la proteinuria o el filtrado glomerular. Así, nuestro grupo ha demostrado previamente que la ratio FE NGAL/FE proteinuria, el nivel de complemento C3 y los niveles de anti-DNA (<15 UI/mL) presentaban unos niveles de sensibilidad de 61%, 100% y 20%, respectivamente y una especificidad de 78%, 18% y 78% respectivamente (187).

Evolutivamente los niveles persistieron elevados de forma mantenida, así como la capacidad discriminativa entre las cohortes R y NR siendo los valores de sensibilidad y especificidad para el *miR-135b-5p*, *miR-107* y *miR-31-5p* de 81% y 79%, 66.7% y 70% y 77.3% y 61.1%, respectivamente.

Estos resultados no se pueden de momento extrapolar a pacientes con otras formas de NL, ya que en el estudio sólo se incluyeron pacientes con glomerulonefritis proliferativa.

Cuando se intentó correlacionar los niveles de expresión de los miRNAs a estudio con características analíticas destacó una correlación inversa del *miR-135b-5p* con los niveles de

proteinuria en el momento del brote, más marcado al analizar sólo el grupo R ($r = -0.600$, $p = 0.009$; Gráfico 19). Al analizar los parámetros histológicos comprendidos en los índices de actividad y cronicidad, el *miR-31-5p* mostró una correlación negativa con el índice de actividad más marcada al analizar el grupo R ($r = -0.873$). También pudo apreciarse al analizar este grupo (R) que los niveles de este *miR-31-5p* mostraban una correlación positiva con el grado a atrofia tubular ($r = 0.693$). Finalmente, el *miR-107* mostró al analizar el grupo NR una correlación positiva con la inflamación intersticial ($r = 0.682$) no presente al analizar la cohorte completa.

Como siguiente paso se realizó un análisis comparativo con una cohorte de individuos sanos. De este modo, se observó que los niveles de expresión de *miR-31-5p* fueron más elevados en el grupo de control sano tanto en el momento del brote como en el post-brote comparado con los dos grupos de nefritis a estudio, R y NR (Gráfico 17A). Estudios previos ya describen la reducción de los niveles del *miR-31* en los pacientes con LES respecto a población sana, sugiriendo un importante rol de este miRNA como factor regulador involucrado en las vías de señalización anormales en las células T lúpidas y correlacionándolo con el control de la citoquina IL-2, regulador homeostático sobre las células T_{reg} (276–278). Además, IL-2 es de vital importancia para el mantenimiento de la población de células T_{reg} necesarias para la preservación de homeostasia inmune y la autotolerancia (279,280). Así, durante años se ha descrito esta IL-2, interleuquina clave para el mantenimiento de la inmunotolerancia (281), deficiente en los pacientes con LES especialmente durante períodos de mayor actividad de la enfermedad (281,282). Es decir, esta ausencia de *miR-31* en los pacientes con LES no permitiría una completa activación de las células T y T_{reg} favoreciendo así la autorreactividad. El comportamiento del *miR-107* en la cohorte sana, no obstante, mostró un patrón distinto, presentando en el momento del brote sólo diferencias con el grupo NR, diferencias que tienden a perderse de forma evolutiva. A su vez, en el momento del post-brote pudo apreciarse, si bien no de forma estadísticamente significativa ($p = 0.064$), una tendencia diferencial respecto al grupo R, presentando este último valores de expresión mayores respecto a esta cohorte de sujetos sanos (Gráfico 17B). Los niveles de *miR-107* se han descrito sobreexpresados a nivel del plasma en los pacientes con LES afectos de NL tipo IV en comparación a un grupo control sano, sugiriendo

un efecto del *miR-107* en la disrupción de la interacción intercelular debido a la deficiencia de E-cadherina y conduciendo a la liberación de células desde el epitelio renal al torrente sanguíneo con la sobreestimulación subsiguiente de células T (283). Finalmente, y en relación al *miR-135b-5p* se observa un rango de expresión de la cohorte de sujetos sanos intermedio entre el grupo R y el grupo NR, es decir, una reducción de expresión en el grupo de control sano en comparación con el grupo R tanto en el momento del brote como en el post-brote, y un aumento de esta respecto al grupo NR tanto en el brote como evolutivamente (Gráfico 17C). A diferencia de los anteriores este miRNA no ha sido descrito hasta la fecha en relación al LES.

Para evaluar el comportamiento de los miRNAs a estudio en otras enfermedades renales, se incluyó en el estudio una cohorte de una variedad de enfermedades renales, mayoritariamente con predominio de afectación glomerular. Al comparar con la cohorte de glomerulonefritis médica no lúpica, pudo observarse que tanto el *miR-31-5p* como el *miR-107* mostraban en esta nueva cohorte niveles de expresión muy superiores a los hallados en las cohortes previas (Gráfico 18A y B). Contrariamente, en el caso del *miR-135b-5p* los resultados mostraron supresión de los niveles respecto a las demás cohortes siendo las diferencias significativas solo en relación al grupo R y a la cohorte sana (Gráfico 18C).

Estos miRNAs han sido previamente descritos en patología renal y alguno de ellos en el LES, como ya se ha comentado anteriormente, u otras enfermedades autoinmunes. El *miR-31* parece tener un papel importante en la nefropatía diabética, describiéndose una asociación entre la reducción de sus niveles plasmáticos y la progresión de esta, a través del paso de micro- a macroalbuminuria, además de correlacionarse negativamente con el índice albúmina-creatinina (284). En relación con la NL, se ha descrito una reducción de sus niveles plasmático en los pacientes con afectación renal respecto a controles sanos, correlacionándose de forma inversa con el grado de actividad, medido por el índice SLEDAI y la proteinuria (278), así como en PBMC con niveles de supresión respecto a controles sanos de más de 6 veces (285).

En el caso del *miR-107* se ha descrito también su presencia a nivel de otras enfermedades autoinmunes, pues se han observado niveles séricos significativamente elevados en pacientes afectados de enfermedad de Crohn respecto a población sana (286), así como en el caso de los pacientes afectados de NL tipo IV en comparación con un grupo de control sano (283). Además, estudios *in vitro* han mostrado como la supresión del *miR-107* colabora en la preservación de la morfología renal normal, inhibiendo la apoptosis de las células tubulares y la pérdida de E-cadherina, con la consiguiente reducción de las cifras de creatinina séricas en ratones con lesión renal aguda de etiología séptica (287).

En lo referente al *miR-135b-5p*, existen dos trabajos a nivel renal que destacan la presencia de este. Por un lado, se ha descrito en la nefropatía-IgA, con niveles suprimidos en exosomas urinario respecto a controles sanos (288), en línea a lo observado en nuestros resultados donde el grupo NR presenta unos niveles de expresión inferiores a los controles sanos. Por otro lado, su papel también ha estado descrito en modelos *in vitro* de podocitopatía, así como en muestras de tejido renal de pacientes con glomerulosclerosis focal y segmentaria en las que se aprecia un incremento de los niveles de *miR-135b in situ* a nivel glomerular, sugiriendo este miRNA como un potencial marcador de lesión podocitaria. Los autores indican que la lesión podocitaria probablemente estaría mediada por la acción del *miR-135a/135b* a través de la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, mediada por la inhibición de este miRNA sobre el GSK-3 β (289). La sobreexpresión del *miR-135b-5p* en el grupo R de pacientes afectados de NL sugeriría que este miRNA actuaría como represor de vías de inflamación y fibrosis renal.

Los resultados de los estudios de hibridación *in situ* mostraron resultados similares a los obtenidos en el estudio urinario, con una expresión incrementada del *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* en el tejido renal del grupo R en comparación al grupo NR. De dichos resultados cabe destacar una expresión mayoritariamente localizada a nivel de las células tubulares renales. En el caso de *miR-135b-5p* también se observó una ligera expresión nivel glomerular no presente en el caso de los otros miRNAs estudiados. La disminución en la expresión de estos miRNAs a nivel tubular en los

NR se descartó que fuera debido a daño o atrofia tubular ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas a nivel histológico en la afectación tubular o en el índice de cronicidad entre los respondedores y no respondedores en la biopsia inicial.

Para interpretar esta sobreexpresión a nivel tubular realizamos estudios *in vitro* con la intención de determinar si este grupo celular, el tubular, correspondía al principal productor de exosomas urinarios, o por el contrario, al mayor receptor de los mismos. En el estudio de producción exosomal, la estimulación mediante varias citoquinas mostró que era precisamente la estirpe de células epiteliales tubulares renales la que sobreexpresaban de forma significativas estos tres miRNAs a estudio en comparación con los otros grupos celulares estudiados (CMRH y CEGRH), sugiriendo que las diferencias apreciadas en la hibridación *in situ* en el grupo R podría ser debido a una producción incrementada de estos miRNAs por parte de las propias células tubulares. La relevancia de las células epiteliales tubulares en la secreción de exosomas en la orina ya ha sido previamente descrita (290). La señalización exosomal a través del lumen de la nefrona renal parece ser la única vía de comunicación intercelular dado que los exosomas plasmáticos no pueden atravesar la membrana de filtración glomerular siendo por lo tanto los exosomas originados exclusivamente en el lumen urinario de las células epiteliales el único mecanismo de comunicación intra-nefrona (227,290).

Concomitantemente se llevaron a cabo estudios de captación exosomal mediante el marcaje con fluorocromo de los exosomas urinarios procedentes de pacientes con LES tanto del grupo de R como NR para determinar las células receptoras. En estos estudios *in vitro* se pudo apreciar un aumento significativo de la internalización de los exosomas provenientes del grupo R por parte de las células mesangiales y endoteliales glomerulares de forma precoz, respecto a los exosomas pertenecientes al grupo NR (intensidad de fluorescencia del 55% vs. 5% y 85% vs. 15% a las 3h; Figura 10A y C). En cuanto a las células renales tubulares epiteliales, los exosomas urinarios de ambos grupos mostraron similar capacidad de internalización siendo ésta muy elevada en todo momento (85 vs. 73% a les 3h, 91 vs. 86% a les 6h y 95 vs. 98% a les 18h; Figura 10B). Todo ello sugeriría un papel claramente diferencial ejercido por los exosomas procedentes del grupo de

pacientes respondedores sobre la estirpe de células mesangiales y endoteliales glomerulares, lo que podría condicionar una respuesta celular esencial sobre el tejido renal en términos de pronóstico. La ausencia de diferencia en cuanto a captación exosomal (cercana al ~100% en ambos casos de exosomas) por parte de la estirpe celular tubular situaría este grupo como secundario en cuanto al mecanismo efector del establecimiento de la lesión renal. En resumen, nuestra hipótesis parecería indicar que la producción de exosomas sería fruto predominante de la acción de las células tubulares, mientras que cuando nos fijamos en las posibles células receptoras para estos miRNAs, la captación diferencial incrementada de exosomas provenientes del grupo R, de forma precoz por parte de las células endoteliales glomerulares y de forma mantenida por parte de las células mesangiales señalaría estas estirpes como principales dianas otorgándoles un papel destacado en los mecanismos de respuesta y reparación renal. Además, los exosomas de pacientes con NL parecerían ir totalmente dirigidos a las diferentes líneas celulares de la nefrona renal, pues los exosomas provenientes de sujetos sanos no mostraron interacciones significativas con las distintas estirpes estudiadas. Sólo se apreció una mínima internalización por parte de las células mesangiales a las 18h de incubación (Figura 11).

La mayoría de los estudios en NL se han focalizado en la lesión glomerular, no obstante, las escala basadas en ítems de afectación glomerulares no han demostrado ser unos buenos predictores de evolución adversa resultando en muchas ocasiones incapaces de identificar a los pacientes de alto riesgo de evolución a insuficiencia renal crónica. Actualmente existe una evidencia creciente que señala la afectación túbulo-intersticial como mejor predictor de evolución a insuficiencia renal que los índices clásicos basados en la simple afectación glomerular (259,291–293). Dado esto, y ante la inevitable pregunta de si las diferencias apreciadas podrían deberse en parte a una menor producción exosomal por parte de las células tubulares se decidió cuantificar los exosomas urinarios presentes en la orina de los pacientes analizados. Los resultados mostraron una tendencia a una mayor concentración exosomal a nivel de la orina de los pacientes correspondientes al grupo NR respecto al grupo R (Gráfico 22), pero esta diferencia no fue significativa ($p = 0.078$), probablemente en relación con el bajo número de pacientes incluidos en el análisis. Esto, sumado a

los resultados previos, sugeriría o bien la existencia de una retroalimentación positiva hacia las células tubulares en caso de mal evolución en un intento de incrementar la presencia de señales favorecedores de una buena respuesta, en este caso, los miRNAs a estudio contenidos en los exosomas, debido a una menor capacidad de internalización exosomal respecto al grupo R. Por otro lado, podría también darse una mayor detección de exosomas en orina, debido precisamente a que esta menor capacidad de internalización conduciría a una mayor pérdida de estos a través de la orina, siendo mayor pues su detección.

Para evaluar el papel de estos miRNAs en la nefritis lúpica y su posible efecto reparador se realizaron estudios *in vitro* usando CEGRH y CMRH, y focalizando el estudio principalmente en los procesos de proliferación, apoptosis, así como distintas vías de acción de relevancia patogénica a nivel de la patología renal como es el caso de la fibrosis, la inflamación y la angiogénesis.

A nivel de la modulación de la proliferación celular sólo el *miR-135b-5p* demostró tener un cierto efecto sobre las CMRH, condicionando su sobreexpresión una reducción del índice de proliferación bajo la estimulación con IL-1 β , INF- α e IL-1 α (tasa de cambio de -1.74, -1.63, -1.61, respectivamente) respecto a la supresión de este miRNA (Gráfica 24C). No se apreciaron diferencias significativas en el caso del *miR-31-5p* y *miR-107* ni a nivel de las CEGRH ni de las CMRH. Múltiples estudios han aportado recientemente resultados afines respecto al papel del *miR-135b-5p* en la modulación de la proliferación celular a nivel de múltiples tejidos tumorales (294–296), describiéndose inhibición de la proliferación tumoral. No obstante, la expresión de este *miR-135b-5p* también ha demostrado el efecto contrario. A nivel del tejido vascular humano no tumoral, se ha podido observar como la presencia de éste miRNA actuaba estimulando la proliferación, a nivel tanto de las células endoteliales como de las células musculares lisas vasculares (297). Hasta la fecha no existen estudios que describan su efecto sobre la proliferación de los distintos tipos celulares a nivel renal. Los niveles elevados en el grupo R podrían contribuir a la recuperación renal reduciendo la proliferación mesangial.

En cuanto a la apoptosis, ninguno de los miRNAs mostró resultados significativos, considerándose pues su papel escaso o nulo a nivel de la apoptosis de los grupos celulares renales estudiados. En el caso del *miR-107*, los resultados difieren de los descritos a nivel oncológico, donde se ha reportado un papel de este *miR-107* como supresor de la proliferación tumoral, invasión y metastatización (298), principalmente a través de la inhibición de la vía de la β -catenina, otorgándole un efecto en la promoción de la apoptosis (299), y señalándose sus niveles como un posible factor pronóstico ante ciertos tipos tumorales (300).

En cuanto a un posible papel en el desarrollo de fibrosis, el *miR-31-5p* es el que demostró una acción más significativa en la modulación de esta. Así, en el caso de las CMRH la supresión del *miR-31-5p* endógeno produjo un marcado incremento en la producción de proteínas de matriz extracelular, de forma especialmente relevante para la FN-1, con resultados opuestos para la expresión de TGB- β 1 y su receptor (Gráfico 27), sugiriendo un papel en la fibrosis no TGB- β dependiente. En el caso de las CEGRH sólo la condición estimulada con VEGF puso en evidencia un aumento de la producción de proteínas de matriz extracelular ante supresión del *miR-31-5p*, pero en este caso con incremento de la expresión de TGB- β 1 (Gráfico 36). A nivel de la literatura, la relación del *miR-31-5p* con el desarrollo de fibrosis es contradictoria. Por un lado, este miRNA se ha relacionado con una progresión de la fibrosis en múltiples tejidos como el tejido hepático, pulmonar o cutáneo, principalmente a través de su actuación como supresor de la expresión del FIH, condicionando un aumento secundario de los niveles de HIF-1 α así como de constituyentes de la matriz extracelular como sería el caso de la fibronectina y colágeno I y III (301–303). Por el otro lado, también se han descrito efectos protectores en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática correlacionando de forma inversa los niveles séricos de este con el grado de evolución de la fibrosis (304). Por lo tanto, los resultados publicados sugieren que este mismo miRNAs podría presentar efectos divergentes en función del microambiente en el que actuara. En nuestro estudio, la expresión elevada en el grupo de remisión sugeriría un papel antifibrótico. En el caso del *miR-135b-5p* los resultados mostraron de forma global, tanto en relación a la estirpe celular CMRH como CEGRH, un efecto discreto a nivel de la fibrosis. Se observaron discretos aumentos en la

producción de FN-1, a nivel de CMRH (Gráfico 26B), y TGF- β 1, a nivel de CEGRH (Gráfica 35C), tras la supresión del *miR-135b-5p* endógeno en la condición INF- α e IL-1 α y en la condición VEGF, respectivamente. Previos estudios han descrito que el *miR-135b* podría tener un papel en la producción de colágeno y formación de matriz extracelular por parte de los fibroblastos a través de la disminución de los niveles de STAT-6 y GATA-3, y de la fibrosis mediada por esta vía (305). Como ocurre con el *miR-31-5p*, la expresión génica de 3.58 y 7.37 veces superior en el grupo R respecto al NR en el momento del brote y postbrote, respectivamente (Gráfico 13E), sugeriría una menor respuesta fibrótica en el grupo R. El claro aumento de expresión de este miRNA en el grupo R respecto a los demás grupos de comparación tanto en el momento del brote como postbrote (Gráfico 17C), señalan el valor que este puede presentar como marcador de buen pronóstico y de reversibilidad de la lesión al establecer un perfil de resistencia a la fibrosis. Finalmente, la expresión del *miR-107* mostró escasos cambios en cuanto a la modulación de las vías de fibrosis, con un sutil incremento en la expresión de FN-1 en la condición IL-1 β , ante la sobreexpresión de *miR-107* a nivel de CMRH. En cuanto a las CEGRH pudo apreciarse como la condición estimulada con VEGF mostraba la supresión de los niveles de FN-1 i TGB- β 1 ante sobreexpresión de *miR-107* y reducción de la expresión de Col3A1 en la situación NS, sin diferencias bajo la condición con VEGF.

En relación a un posible papel de estos miRNAs en la modulación de la respuesta inflamatoria se observó a nivel de las CMRH un incremento de las citoquinas inflamatorias, IL-6 e IL-8 (Gráfico 29), así como de las quimioquinas CXCL1, en la condición IL-1 β e IL-1 α (Gráfico 30A), y CCL3 (Gráfico 30C), tras la supresión del *miR-135b-5p* endógeno. Por otro lado, a nivel de las CEGRH también pudo observarse como la supresión de este *miR-135b-5p* condicionaba también un incremento global en la expresión de los genes para IL-6, NF- κ β y VCAM-1 (Gráfico 38). Lo que en nuestro estudio la sobreexpresión de este miR estaría relacionado con un efecto antiinflamatorio. Esta relación del *miR-135b-5p* con la inflamación ha sido descrita previamente en otras enfermedades autoinmunes, como el caso de la AR. A diferencia de nuestro estudio, en la AR los niveles tisulares sinoviales de este miRNA se correlacionaron positivamente con los niveles de

inflamación (306). Esta correlación entre inflamación y el *miR-135b-5p*, se ha intentado explicar a través de la acción inflamatoria mediada por IL-1/receptor IL-1 (IL-1R) en distintos modelos (307,308). Se ha descrito una relación bidireccional, así mientras la activación del IL-1R condicionaría el incremento en los niveles de *miR-135b*, este actuaría a su vez de señal contra-reguladora frenando la activación de este receptor (308). Además de su ya descrita capacidad moduladora de la fibrosis, STAT-6 y GATA-3 son moduladores de los linfocitos T helper 2 (Th-2) y por tanto se le también confiere cierta acción inmunomoduladora (309). De forma opuesta, el *miR-135b* también parece ejercer un papel antiinflamatorio a través de su actividad sobre la Caspasa-1 e IL-1 β durante la fase post-aguda de la inflamación mediante la cual intentaría controlar la progresión de esta evitando la deriva hacia una fase de cronicidad (308). La acción inhibitoria de este miR sobre la caspasa-1 impediría la propagación de la cascada inflamatoria IL-1R (308).

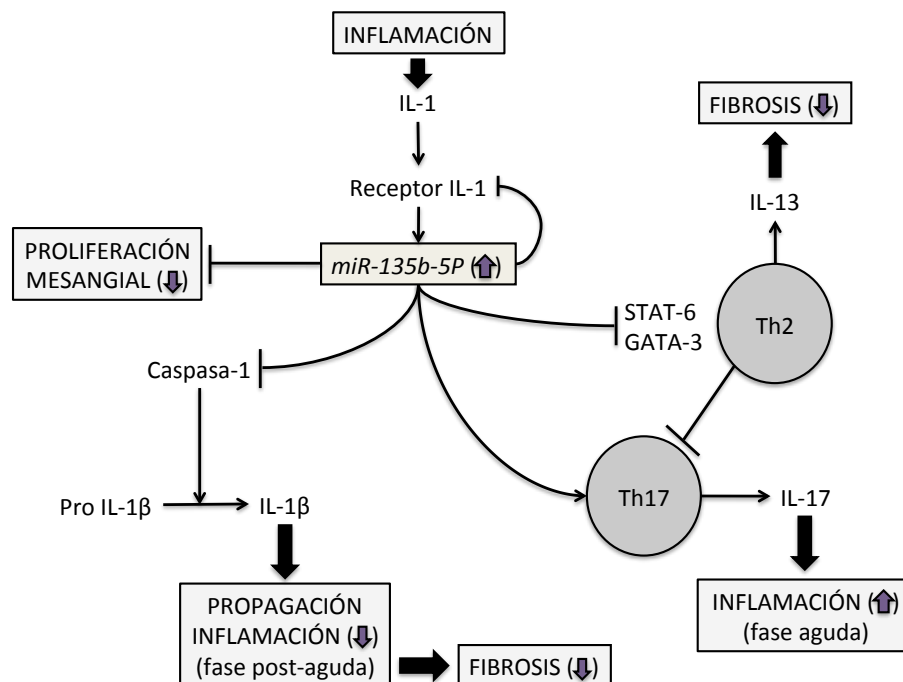


Figura 17. Potenciales vías de acción del *miR-135b-5p* en los procesos de inflamación, fibrosis e inmunomodulación. La flecha morada indicaría la dirección del cambio esperada en los pacientes pertenecientes al grupo R, en los que predomina una sobreexpresión del *miR-135b-5p*.

En resumen, podría parecer que el *miR-135b* actuaría como molécula de respuesta inflamatoria en fases iniciales de la lesión pero que su presencia a la larga actuaría como mecanismo de control de esta inflamación inhibiendo su perpetuación a través de, por un lado, el bloqueo IL-1R, y por el otro, la falta de activación de la Caspasa-1 e IL-1 β , evitando el mantenimiento de la respuesta inflamatoria y disminuyendo secundariamente el riesgo de fibrosis tisular. En nuestro estudio, los niveles elevados de *miR-135b-5p* en el grupo R podrían contribuir pues a un efecto predominantemente antiinflamatorio (Figura 17).

A nivel de la modulación de la respuesta inflamatoria, el *miR-31-5p* también presentó una respuesta relevante. En el caso de las CMRH, la supresión de este condicionó un incremento en la expresión de las citoquinas IL-6 e IL-8 y de la quimioquinas CXCL-1 y CCL3. A nivel de las CEGRH, y en la misma línea, la supresión de este condicionó el incremento de la citoquina IL-6 y de la expresión de VCAM-1. Estos resultados están en línea con los descritos en la nefropatía diabética en la que se ha observado una correlación negativa entre los niveles séricos de *miR-31* y la presencia de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α y moléculas de adhesión como ICAM-1, sugiriendo un empeoramiento de la respuesta inflamatoria a medida que los niveles de este miRNA decrecen, en parte mediada por una mayor interacción leucocito-endotelio (284). En este estudio, los niveles *miR-31* se observaron solamente suprimidos en los pacientes con nefropatía, no así en aquellos con retinopatía, equiparándose al estadio de la afectación renal, pues el grado de supresión era mayor en aquellos pacientes con macroalbuminuria respecto a aquellos con microalbuminuria (284). Además, son otros los trabajos que demuestran la relación de este miRNA con moléculas de adhesión. Así, se ha descrito el *miR-31* como regulador negativo en la expresión de moléculas de adhesión inducidas por TNF, como E-selectina y ICAM-1, reduciendo la capacidad de adherencia de los neutrófilos a nivel de las células endoteliales humanas (310), evento concordante con lo esperable en nuestros resultados. Por lo tanto, parecería que la supresión de los niveles de *miR-31-5p* en los pacientes con LES, más marcada en el grupo NR (Gráfico 17A) justificaría una mayor interacción leucocito-célula endotelial mediada por el incremento del número de moléculas de adhesión en aquellos pacientes con peor pronóstico. La correlación entre ciertas moléculas de

adhesión y reclutamiento de células inflamatorias y el grado de actividad del LES, especialmente la NL, ya ha sido descrita con anterioridad (224,311). De este modo los niveles de VCAM-1 tanto séricos como urinarios se han descrito elevados en los pacientes con LES, de forma más pronunciada los casos de NL, correlacionándose con los parámetros e índices de actividad de la misma (224,311). También cabe destacar la relevante interacción de *miR-31* y las células T en la patogenia del LES. Como anteriormente se ha referido, a nivel de los linfocitos T de pacientes con LES se ha descrito supresión de los niveles de éste miRNA comparado con controles sanos, atribuyéndole un papel en la regulación de la anormal producción de IL-2 propia de las células T lúpicas (276). El *miR-31* presentaría un importante rol en los procesos de activación de las células T, pues este actuaría como regulador de la expresión del supresor de la quinasa del ras 2 (KSR2), mejorando la producción de IL-2 durante este proceso de activación T (312). Además, el *miR-31* también modularía la expresión de IL-2 a través de la represión en la translación de RhoA (276), el cual a su vez actúa inhibiendo la transcripción de IL-2 mediante la interferencia en la actividad del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT) (313). Por otro lado, cabe destacar que IL-2 es junto a INF- γ , una de las principales citoquinas de las células Th-1, promotoras de la inmunidad celular, mientras que IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, provienen de las células Th-2 mediando una respuesta humoral a través de la producción de Ac (314). Por lo tanto, no es de extrañar la existencia de un predominio de actividad Th-2 en el LES, habiéndose descrito correlación entre el grado de severidad de la enfermedad y un mayor firma Th-2, medida por el ratio IL-10/INF- γ (315). Además, previamente ya se ha destacado la importancia de IL-2 en el mantenimiento de la población de células T_{reg} necesarias para la preservación de homeostasia inmune y la autotolerancia (279,280). Todo ello, señalaría este defecto en la producción de *miR-31*, y su repercusión a nivel de la producción de IL-2 y secundariamente de una menor respuesta Th-1 y T_{reg}, como los grandes factores de la respuesta inmunológica aberrante apreciada en los pacientes con LES (Figura 18).

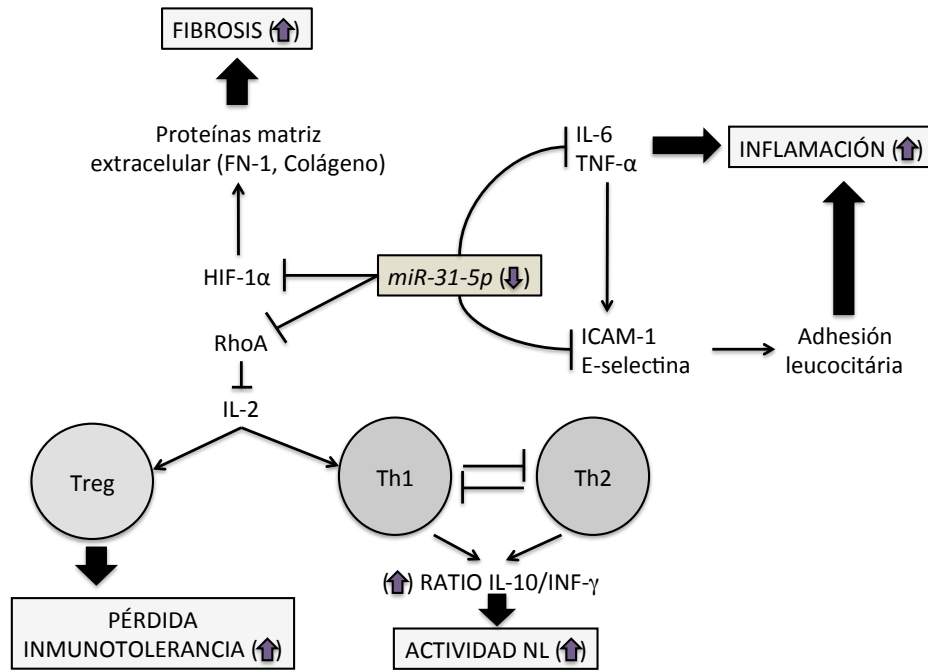


Figura 18. Potenciales vías de acción del *miR-31-5p* en los procesos de inflamación, fibrosis e inmunomodulación. La flecha morada indicaría la dirección del cambio esperada en los pacientes pertenecientes al grupo NR, en los que predomina una supresión marcada en los niveles de expresión del *miR-31-5p*, tanto respecto al grupo R como, de forma aún más marcada, al grupo control sano.

En lo referente al efecto del *miR-107*, la sobreexpresión de este miRNA a nivel de las CMRH condicionó una reducción de la expresión de IL-6 bajo la condición IL-1 α , de IL-8 bajo la condición INF- α e IL-1 α , de CXCL1 bajo la condición IL-1 α y de CCL2 bajo todas las condiciones (Gráfico 33). A nivel de las CEGRH pudo observarse como la sobreexpresión de *miR-107* condicionaba una reducción en los niveles de Nf- $\kappa\beta$ e IL-6 bajo la condición VEGF (Gráfico 40). Estudios previos describen la relación del *miR-107* con moléculas implicadas en el control del ciclo celular, la adhesión y reclutamiento celular y la diferenciación celular T, como sería el caso de CDK-6, Dicer-1 y HIF1- α (316–318). Se ha descrito CDK-6 como una diana del *miR-107*, así la reducción de los niveles de este conduciría al incremento de CDK-6 molécula promotora de la adhesión de macrófagos (316). También el Dicer-1 se ha establecido como diana del *miR-107*, bloqueando su expresión (317). Algunos trabajos destacan la importancia de Dicer, RNasa III encargada de la generación de miRNAs funcionales, en la biogénesis de los miRNAs y en el

control de la función de las células T_{reg} y la autoimmunidad (319–321). Nuestros resultados sugieren un papel anti-inflamatorio de este miRNA en el grupo R. En esta línea resulta lo apreciado en el trasplante renal donde se ha descrito la contribución que este miR podría tener en el rechazo humoral, relacionándose la supresión de este a nivel de células B con el aumento en la producción de Ac y de mayor rechazo humoral (322).

El *miR-107* se halla ampliamente descrito y expresado en células endoteliales humanas (323), pero su papel en el control de la angiogénesis no se halla del todo esclarecido con resultados contradictorios. Por un lado, algunos estudios parecen señalar ciertos efectos antiangiogénicos, mediante la regulación del crecimiento y senescencia celular, a través de la modulación de la vía PTEN/PI3K/AKT/mTOR (324,325). Contrariamente, otros estudios sugieren que la sobreexpresión del *miR-107* conduciría, bajo condiciones de hipoxia, precisamente a una sobreexpresión de VEGF, favoreciendo la formación tubular y la densidad vascular, es decir, incrementando la angiogénesis, con la consiguiente reducción de la lesión por isquemia tisular (326). Además, la correcta activación del eje de señalización PI3k/Akt, se considera determinante en la regulación de pasos cruciales de la angiogénesis como sería el caso de la supervivencia de las células endoteliales, la migración y la formación de túbulos (327). En nuestro caso, con la sobreexpresión del *miR-107* en las CEGRH vimos un aumento significativo de expresión del receptor de VEGFR1/VEGFR2 (Gráfico 41) y también de los genes PI3k/Akt (Gráfico 42). El eje VEGF también ha sido relacionado con la patogénesis del LES (328,329) y la NL (222). Ya en modelos murinos de NL se ha observado como el bloqueo de la actividad del receptor 2 de VEGF conduce a un empeoramiento de la función renal y a una mayor mortalidad (330), indicando la importancia que una correcta expresión de VEGF y sus receptores a nivel intrarenal condiciona para la supervivencia renal. Estos resultados orientarían a que el mal pronóstico del grupo NR estaría en parte relacionado con la alteración de los procesos de angiogénesis mediada por una menor expresión del *miR-107* y del sistema PI3K/Akt y VEGF. No obstante, cuando realizamos el experimento de “wound healing”, si bien, si se apreció un claro aumento en la capacidad de migración en las CEGRH tras la sobreexpresión del *miR-107*, este solo resultó ser de pequeña

magnitud (17% a las 20h) (Figura 16). Por lo tanto, si bien la sobreexpresión del *miR-107* observada en los exosomas urinarios de los pacientes del grupo R puede tener un pequeño efecto en la angiogénesis o migración a nivel de las CEGRH, consideramos que dada la magnitud de los resultados observados en el análisis de "wound healing" este efecto no sería el factor determinante sobre la principal vía de recuperación renal en los pacientes con NL.

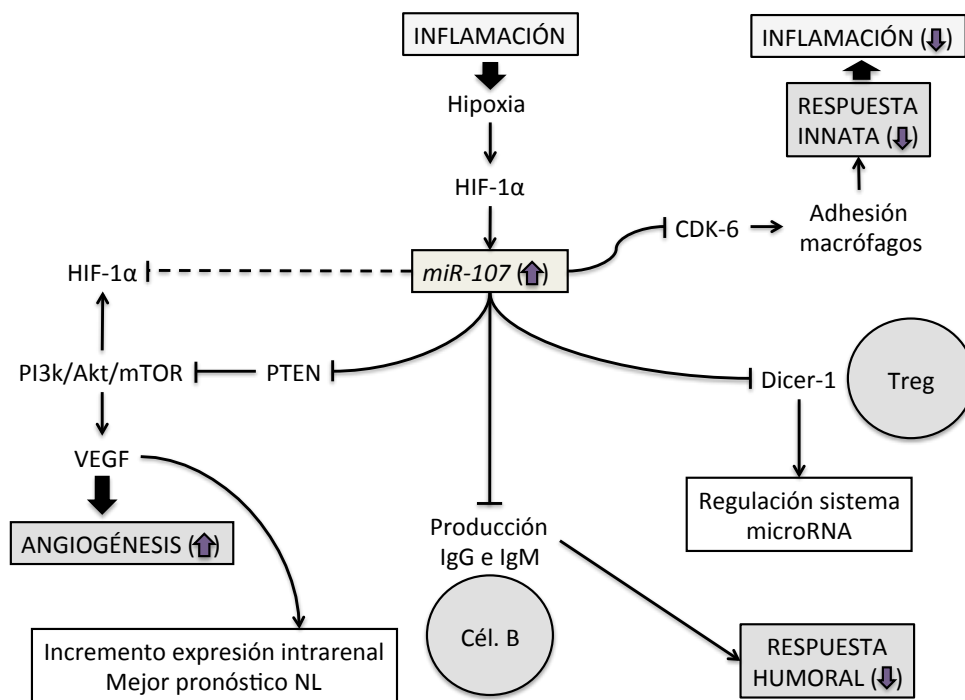


Figura 19. Potenciales vías de acción del *miR-107* en los procesos de inflamación, fibrosis e inmunomodulación. La flecha morada indicaría la dirección del cambio esperada en los pacientes pertenecientes al grupo NR, en los que predomina una supresión marcada en los niveles de expresión del *miR-31-5p*, tanto respecto al grupo R como, de forma aún más marcada, al grupo control sano.

Para identificar las dianas del mecanismo de acción de los miRNAs se realizó además un "pathway analysis" o análisis de vía. Dado que todos los miRNAs se encontraban sobreexpresados en el grupo R, hipotetizamos que podrían tener dianas comunes. El "pathway analysis" o análisis de vía de los 3 miRNAs a estudio, puso en evidencia la existencia de múltiples dianas comunes. De las 9 dianas identificadas en el estudio e involucradas en la regulación del sistema inmune, la regulación de procesos celulares (hemostasia celular, supervivencia y apoptosis) o transducción de señales

(Tabla 17), 4 de ellas, la quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK-1), el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α), el factor de transcripción FoxO1 (*Forkhead box protein 1*) y el factor 4 Kruppel-like (KLF-4) han sido ya descritos en el campo de la NL (331–333) (Figura 20).

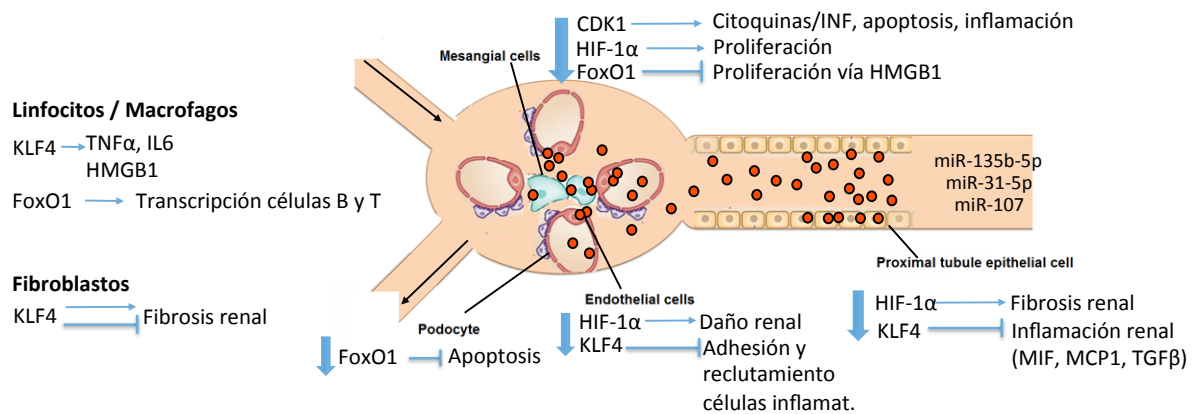


Figura 20. Principales mecanismos implicados en la respuesta biológica ante un brote de actividad de NL modulados por la acción de los miRNAs a estudio según el "pathway analysis" o análisis de vía.

Entre estas dianas, debe destacarse que el HIF- 1α resultó común en los tres miRNAs a estudio (Figura 13) y por ello, esta fue la diana que evaluamos en los estudios posteriores. La sobreexpresión de los 3 diferentes miRNAs de forma individual produjo una reducción significativa de los niveles de expresión del HIF- 1α , que fue más significativa con el *miR-135b-5p*. Estos resultados sugieren que uno de las mayores dianas de estos miRNAs es HIF- 1α , y que a través de su inhibición se podrían explicar la mayoría de los efectos observados *in vitro*.

HIF- 1α ha sido descrito como un jugador importante para el desarrollo de la enfermedad renal. La familia de factores inducibles por hipoxia (HIF) son moduladores centrales de las respuestas celulares ante situaciones de baja concentración de oxígeno, que actúan a través de la regulación de varios genes con importantes funciones en la fisiología renal y en los procesos fisiopatológicos, incluido el metabolismo energético, la regulación vasomotora, el metabolismo matricial y los procesos angiogénicos y de apoptosis/supervivencia celular, permitiendo una adaptación de las

células y tejidos a entornos pobres en oxígeno (334,335). El HIF-1 es un heterodímero con dos subunidades: HIF-1 α , inducible ante niveles bajos de oxígeno, y HIF-1 β , expresada de forma constitutiva (334,335). El rol de HIF-1 α en la enfermedad renal crónica resulta controvertido. Mientras que por un lado se le atribuye un papel protector a través de la promoción de adaptación celular a la hipoxia (336), por otro parecería que este podría exacerbar la fibrosis renal a través de la promoción en la expresión de genes profibrogénicos y la estimulación de los procesos de transición epitelio-mesenquimales (337), promoviendo la glomeruloesclerosis y contribuyendo al daño glomerular (338–340). En relación a la NL, los niveles de HIF-1 α se ha descrito altamente expresado a nivel glomerular, correlacionándose con el IA, el SLEDAI, la proteinuria y la densidad celular glomerular, y a nivel túbulo-intersticial, correlacionándose con el IA (341). También se le ha otorgado un papel en la estimulación de la proliferación de las células mesangiales y la inhibición de su apoptosis, a través de la regulación de las ciclinas (341). Además, y como posible reflejo del grado de sobreexpresión túbulo-intersticial, los niveles urinarios de HIF-1 α han sido asociados con el grado de disfunción renal así como con los cambios histológicos de cronicidad (342). Así pues, su supresión a nivel de las células mesangiales podría contribuir a la protección renal a través de la inhibición de la proliferación mesangial así como la disminución del riesgo de progresión a glomeruloesclerosis, presentándose como una posible estrategia terapéutica (Figura 21).

El microambiente en las zonas lesionadas o inflamadas se caracterizan por bajas concentraciones de oxígeno (343), por ello las células del sistema inmune deben disponer de las capacidades para adaptarse a dichas condiciones manteniendo su actividad efectora. Además del efecto sobre la proliferación celular y la fibrosis, se ha sugerido que HIF-1 α tiene un impacto en esta regulación inmunológica. De este modo, HIF-1 α se ha implicado en la activación y regulación tanto de la respuesta inmune innata (344) como de la adaptativa (345,346), altamente implicadas en los procesos de autoinmunidad, es decir, en la respuesta ante la exacerbación de la NL. A nivel de la inmunidad innata, defectos de HIF-1 α condicionan alteraciones a nivel de la agregabilidad, la movilidad, la invasividad de las células mieloides en áreas inflamadas pobres en oxígeno (344). A

nivel de la respuesta adaptativa, HIF-1 α se ha implicado en el correcto desarrollo, maduración y diferenciación de los linfocitos B, relacionando su defecto con la aparición de poblaciones favorecedores de autoinmunidad (345). A nivel de las células T, HIF-1 α presentaría un papel en la protección ante la activación de la muerte celular programada en situaciones de hipoxemia (347). Además, este se ha implicado en la regulación de la activación y diferenciación T, destacándose un importante papel en la regulación del balance Th17/T_{reg}, mediante la promoción de la diferenciación Th17 y la supresión de los genes T_{reg} (348). Las células Th17, secretoras de IL-17, se han asociado ampliamente con la patogenia de las enfermedades autoinmunes (349). De este modo, los niveles de Th17 se han correlacionado con la actividad de la enfermedad lúpica, medida por el SLEDAI, así como con ciertos parámetros histológicos como el índice de actividad, en el caso de la NL (350,351). Concomitantemente, HIF-1 α actuaría inhibiendo la diferenciación T_{reg} mediante la degradación de la proteína Foxp3 (348). El papel de las células T_{reg} en el mantenimiento de la homeostasia del sistema inmune y la prevención de la autoinmunidad ya ha sido reflejada con anterioridad. Modelos murinos de NL, en ratones MRL/lpr, han demostrado como el silenciamiento del HIF-1 α , como lo observado a nivel del grupo R, mejoraría la progresión del LES y especialmente de su afectación renal (352). Los autores del estudio previo sugieren precisamente la afectación en la producción de IL-17 por parte de las células Th17 como el principal mecanismo de control de la enfermedad, con la posterior reducción de los depósitos renales de IC, la formación de autoAc y la activación del complemento, siendo estos resultados más harmónicos con lo observado en nuestros estudios *in vitro*.

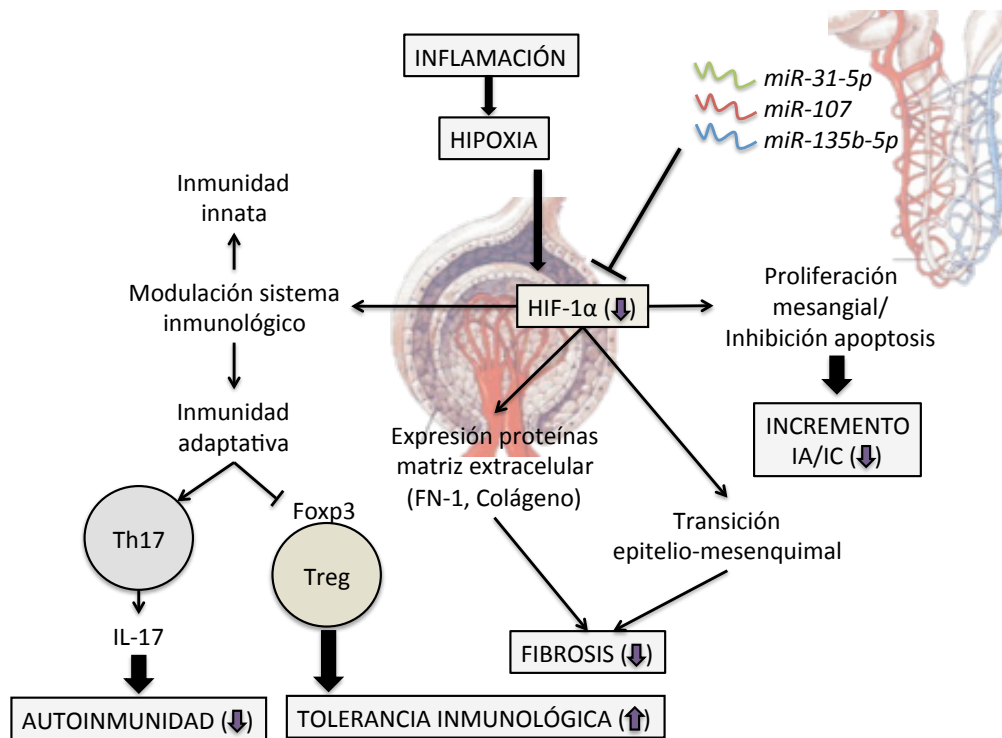


Figura 11. Potenciales vías de acción del HIF-1 α en los procesos de inflamación, fibrosis e inmunomodulación. La flecha morada indicaría la dirección del cambio esperada en los pacientes pertenecientes al grupo R, en los que predomina la acción de los 3 miRNAs de interés, respecto al grupo NR en los que destaca su supresión. IA = Índice actividad; IC = Índice cronicidad.

De forma previa, la relación entre el *miR-135b* y los mecanismos de respuesta a la hipoxemia ya ha sido descrita a través precisamente de su relación con la vía de HIF-1 α (353), con resultados contradictorios. Por un lado, el *miR-135b* ha demostrado suprimir el factor inhibidor del HIF-1 α (FIH) en células endoteliales lo cual conduciría a un incremento de los niveles de HIF-1 α , protegiendo el microambiente de esta hipoxia a través de la promoción de la angiogénesis (354). Por contra, y en relación a lo apreciado en nuestro estudio, otros trabajos realizados tanto a nivel de células endoteliales humanas como en tejido tumoral muestran reducción de los niveles de HIF-1 α tras la sobreexpresión de *miR-135b* (353,355). Como en el caso del *miR-135b*, también se ha descrito la relación del *miR-31-5p* con esta vía, principalmente a través de su actuación como supresor de la expresión del FIH, relacionándose este *miR-31* de forma estrecha con las vías de la fibrosis. Como se ha referido con anterioridad la activación de HIF-1 α , secundaria a la inhibición del FIH, se ha vinculado a la promoción de la fibrosis mediante la formación de componentes de

matriz extracelular (301–303). Como en el caso del *miR-135b-5p*, esto parecería opuesto a lo observado en los estudios *in vitro*, no obstante, también se han descrito los efectos contrarios. De este modo se ha otorgado al *miR-31* efectos protectores en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática correlacionando de forma inversa los niveles séricos con el grado de evolución de esta fibrosis, y apreciándose suprimidos en relación a los controles sanos (304), totalmente equiparable a lo observado en nuestro caso, con mayor grado de supresión en el subgrupo de NL con peor pronóstico. Finalmente, el *miR-107* también se ha relacionado con la vía del HIF-1 α . Mientras que algunos autores sugieren que la sobreexpresión del *miR-107*, a nivel de tejido gástrico tumoral, se halla promovida por el HIF-1 α (356), otros trabajos describen la relación inversa actuando el *miR-107* como principal regulador de la expresión del HIF-1 α (357), mediante su supresión (358). Por contra otros trabajos no son capaces de describir relación entre *miR-107* y HIF-1 α , pero sí con la subunidad β , bloqueando su expresión (318,359).

En resumen, el *miR-135b-5p*, el *miR-107* y el *miR-31-5p* se han identificado como biomarcadores de respuesta en paciente con nefritis lúpica tipo proliferativa. Además, los estudios *in vitro* sugieren un papel en la activación de las vías de reparación mediante una disminución de la proliferación mesangial, la ligera modulación sobre las vías del VEGF por parte del *miR-107*, un papel antifibrótico en el caso del *miR-31-5p* y una modulación de la inflamación con reducción de citoquinas inflamatorias y de moléculas de adhesión tanto por parte de las células mesangiales como las endoteliales, explicando parte de estos resultados por su modulación sobre la vía del HIF-1 α .

8. CONCLUSIONES

Tras el análisis de cribado y la posterior fase validación se han identificado un total de ocho miRNAs exosomales urinarios con patrón de expresión diferencial entre los grupos a estudio de los cuales se eligieron tres expresados en exceso en pacientes con buena respuesta al tratamiento, señalándose estos como potenciales biomarcadores en la predicción de la recuperación renal.

Mediante el análisis de curva ROC se demostró el mejor punto de corte para diferenciar el subgrupo de pacientes con escasa respuesta al tratamiento en el momento del brote, de este modo:

- Niveles de miR-135b-5p < 0.0884 mostraron una sensibilidad y especificidad del 78 y 72% y un VPP y VPN del 70 y 79% respectivamente para identificar aquel subgrupo de pacientes con escasa respuesta al tratamiento estándar.
- Niveles de miR-107 < 0.7915 mostraron una sensibilidad y especificidad del 67 y 63% y un VPP y VPN del 67 y 73% respectivamente para identificar aquel subgrupo de pacientes con escasa respuesta al tratamiento estándar.
- Niveles de miR-31-5p < 0.0829 mostraron una sensibilidad y especificidad del 63 y 62% y un VPP y VPN del 60 y 65% respectivamente para identificar aquel subgrupo de pacientes con escasa respuesta al tratamiento estándar.

Además, el estudio comparativo con las cohortes sana y de nefropatía médica no lúpica, así como la comparativa con los niveles séricos permitió recalcar su valor como marcadores pronóstico en la NL.

El análisis in vitro permitió un acercamiento a las funciones biológicas que estos miRNAs podrían llevar a cabo sobre el tejido renal en un intento de entender más la patogenia de la enfermedad.

Finalmente, y considerando conjuntamente todos los estudios realizados fue posible la extracción de las siguientes conclusiones:

1. Los niveles de *miR-135b-5p*, *miR-31-5p* y *miR-107* son capaces de predecir la respuesta al tratamiento en el momento del brote y evolutivamente en los pacientes afectados de NL, de forma específica.
2. Los resultados de la hibridación *in situ*, mostraron un incremento en la expresión de estos miRNAs a nivel predominantemente de las células tubulares, constatándose estas como las mayores productoras de exosomas enriquecidos con los miRNA a estudio y no siendo la cuantía de los exosomas urinarios producidos por estas el factor modulador de la respuesta.
3. Los exosomas del grupo de pacientes NR presentan un enlentecimiento en la capacidad de internalización por parte de las células endoteliales glomerulares y mesangiales renales humanas, indicando estas como unos de los principales componentes en la respuesta efectora clave en términos pronósticos.
4. De forma global pudo apreciarse un papel de estos miRNAs en la modulación de la respuesta inflamatoria, con reducción de los niveles de citoquinas y quimioquinas, una débil modulación sobre la angiogénesis, así como cierto efecto antifibrosante.
5. HIF-1 α fue identificado como diana común de estos 3 miRNAs, ocasionando la presencia de estos una supresión a nivel de la expresión de esta vía, considerando clave en la patogenia de la NL.

10. IMPLICACIONES

En la actualidad la biopsia renal continua siendo la técnica "gold estándar" para el diagnóstico de la NL, no obstante el uso de biomarcadores no cruentos de actividad y predicción de evolución debe introducirse e instaurarse paulatinamente como metodología estándar para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, sustituyendo los métodos actuales invasivos. Si bien aún lejos de plantearse como fiel sustituto del análisis histológico, las implicaciones del presente trabajo en el futuro de la práctica clínica en el campo del LES podrían destacarse en los siguientes puntos:

- Los miRNAs exosomales urinarios son una gran fuente de biomarcadores, procedentes del órgano diana en el caso de la NL, y por lo tanto representando instantáneamente parte del microambiente renal.
- El presente trabajo ha permitido mediante estudios de cribado y validación identificar el *miR-31-5p*, *miR-107* y *miR-135b-5p* como marcadores pronóstico en los pacientes con NL.
- El papel protagonista de estos miRNAs en la modulación de la respuesta evolutiva de la NL permite el estudio profundizado de las vías biológicas implicadas en la patogenia de la NL.
- El papel protagonista de estos miRNAs en la modulación de la respuesta evolutiva de la NL permite el planteamiento y evaluación de su uso con finalidad terapéutica.

10. POTENCIALES INVESTIGACIONES FUTURAS DERIVADAS

Del presente trabajo de investigación, se extraen los resultados ya destacados, no siendo esta su mayor aportación, pues lo importante de todo trabajo más allá de unos resultados favorables o rotundamente faltos de relevancia, es su capacidad de acercarnos a una comprensión más clara y nítida de una realidad cognoscible. Las potenciales líneas de investigación que se derivan del presente estudio son:

- El análisis más profundo de los miRNAs validados pero no estudiados.
- A nivel de los miRNAs elegidos, es necesario realizar ensayos clínicos que permitan validar los resultados a nivel poblacional con cohortes mayores de pacientes afectados de NL.
- La ambiciosa simplificación del estudio de una patología médica a nivel de una única línea celular probablemente sea excesiva, por lo que deberían realizarse estudios mediante cocultivos multilínea para valorar las implicaciones de la modulación estos miRNAs tanto de forma única como conjunta, así como mediante el uso de organoides.
- Es necesario el estudio en modelos animales permitiendo una evaluación aún más global del efecto de la modulación de estos miRNAs a nivel renal en su conjunto.
- Finalmente, se abre la posibilidad de plantear el uso de los exosomas, como mecanismos de transporte y liberación de agentes terapéuticos, así como de valorar el uso de los miRNAs con finalidades terapéuticas.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Danila MI, Pons-Estel GJ, Zhang J, Vilá LM, Reveille JD, Alarcón GS. Renal damage is the most important predictor of mortality within the damage index: Data from LUMINA LXIV, a multiethnic US cohort. *Rheumatology*. 2009;48(5):542–5.
2. Anders HJ, Weening JJ. Kidney disease in lupus is not always “lupus nephritis.” *Arthritis Res Ther*. 2013;15(2):2–3.
3. Patel M, Clarke AM, Bruce IN, Symmons DPM. The prevalence and incidence of biopsy-proven lupus nephritis in the UK: Evidence of an ethnic gradient. *Arthritis Rheum*. 2006;54(9):2963–9.
4. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Lupus nephritis: Pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus*. 2010;19(5):557–74.
5. Bastian H, Roseman J, McGwin Jr G, Alarco G, Friedman A, Fessler B, et al. Systemic Lupus Erythematosus in Three Ethnic Groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. *Lupus*. 2002;11:152–60.
6. Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. Demographic differences in the development of lupus nephritis: A retrospective analysis. *Am J Med*. 2002;112(9):726–9.
7. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England: Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum*. 1995;38(4):551–8.
8. Burgos PI, McGwin G, Pons-Estel GJ, Reveille JD, Alarcón GS, Vilá LM. US patients of hispanic and African ancestry develop lupus nephritis early in the disease course: Data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LXXIV). *Ann Rheum Dis*. 2011;70(2):393–4.
9. Contreras G, Lenz O, Pardo V, Borja E, Cely C, Iqbal K, et al. Outcomes in African Americans and Hispanics with lupus nephritis. *Kidney Int*. 2006;69(10):1846–51.
10. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361:1570–83.
11. Gullstrand B, Mårtensson U, Sturfelt G, Bengtsson AA, Truedsson L. Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(2):303–11.
12. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: Signals for a good meal. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):964–74.
13. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390(6658):350–1.
14. Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp*. 2010;58(5):355–64.
15. Gaipf US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun*. 2007;28(2–3):114–21.

16. Baumann I, Kolowos W, Voll RE, Manger B, Gaipf U, Neuhuber WL, et al. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46(1):191–201.
17. Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 2009;227:75–86.
18. Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev.* 2008;223:271–83.
19. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* 2002;416(6881):603–7.
20. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005;202(8):1131–9.
21. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I Interferons (A/B) in Immunity and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2005;23(1):307–35.
22. Rönnblom L, Alm G V. Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):68–75.
23. Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H, et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus.* 2000;9(9):664–71.
24. Zikherman J, Parameswaran R, Weiss A. Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature.* 2012;489(7414):160–4.
25. Zoja C, Corna D, Rottoli D, Zanchi C, Abbate M, Remuzzi G. Imatinib ameliorates renal disease and survival in murine lupus autoimmune disease. *Kidney Int.* 2006;70(1):97–103.
26. Vallin H, Perers A, Alm G V, Rönnblom L. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1999;163(11):6306–13.
27. Båve U, Vallin H, Alm G V., Rönnblom L. Activation of natural interferon- α producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines. *J Autoimmun.* 2001;17(1):71–80.
28. Jego G, Palucka AK, Blanck J-PJ, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 2003;19(2):225–34.
29. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, Lavie F, Lazure T, Ba N, et al. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary

- gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):1–9.
30. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(5):2610–5.
 31. Guiducci C, Gong M, Xu Z, Gill M, Chaussabel D, Meeker T, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature.* 2010;465(7300):937–41.
 32. Boor PPC, Metselaar HJ, Mancham S, Tilanus HW, Kusters JG, Kwekkeboom J. Prednisolone suppresses the function and promotes apoptosis of plasmacytoid dendritic cells. *Am J Transplant.* 2006;6(10):2332–41.
 33. Cooper GS, Miller FW, Pandey JP, Al CET. The Role of Genetic Factors in Autoimmune Disease : Implications for Environmental Research. *Environmental Health Perspective.* 1999;107(10):693–700.
 34. Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson L, Norris JM, et al. Epidemiology of Environmental Exposures and Human Autoimmune Diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun.* 2012;39(4):259–71.
 35. Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M, et al. Cigarette Smoking and the Risk of Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):849–57.
 36. Ekblom-Kullberg S, Kautiainen H, Alha P, Leirisalo-Repo M, Julkunen H. Smoking and the risk of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2013;32(8):1219–22.
 37. Caza T, Oaks Z, Perl A. Interplay of infections, autoimmunity, and immunosuppression in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol.* 2014;33(4):330–63.
 38. McClain MT, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Harley JB, James JA. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med.* 2005;11(1):85–9.
 39. Hanlon P, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):R3.
 40. Bijl M, Kallenberg CG. Ultraviolet light and cutaneous lupus. *Lupus.* 2006;15:724–7.
 41. Caricchio R, McPhie L, Cohen PL. Ultraviolet B Radiation-Induced Cell Death: Critical Role of Ultraviolet Dose in Inflammation and Lupus Autoantigen Redistribution. *J Immunol.* 2003;171(11):5778–86.
 42. Scheinbart L, Johnson M, Gross L, Edelstein S, Richardson B. Procainamide inhibits DNA methyltransferase in a human T cell line. *J Rheumatol.* 1991;18(4):530–4.
 43. Lu Q, Wu A, Richardson BC. Demethylation of the Same Promoter Sequence Increases CD70

- Expression in Lupus T Cells and T Cells Treated with Lupus-Inducing Drugs. *J Immunol.* 2005;174(10):6212–9.
44. Zhu LJ, Yang X, Yu XQ. Anti-TNF- α therapies in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:1–8.
45. Izui S, Lambert PH, Miescher PA. Failure to detect circulating DNA--anti-DNA complexes by four radioimmunological methods in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1977;30(3):384–92.
46. Rekvig OP, Thiyagarajan D, Pedersen HL, Horvei KD, Seredkina N. Future Perspectives on Pathogenesis of Lupus Nephritis: Facts, Problems, and Potential Causal Therapy Modalities. *Am J Pathol.* 2016;186(11):2772–82.
47. Berden JHM, Licht R, Van Bruggen MCJ, Tax WJM. Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1999;8(3):299–306.
48. Raz E, Brezis M, Rosenmann E, Eilat D. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol.* 1989;142(9):3076–82.
49. Haramoto T, Makino H, Ikeda S, Wieslander J, Ota Z. Ultrastructural localization of the three major basement membrane components--type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan and laminin--in human membranous glomerulonephritis. *Am J Nephrol.* 1994;14(1):30–6.
50. Bernstein KA, Valerio RD, Lefkowitz JB. Glomerular binding activity in MRL lpr serum consists of antibodies that bind to a DNA/histone/type IV collagen complex. *J Immunol.* 1995;154(5):2424–33.
51. Yung S, Cheung KF, Zhang Q, Chan TM. Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1912–27.
52. Deocharan B, Qing X, Lichauco J, Putterman C. α -actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic antiDNA antibodies. *J Immunol.* 2002;168(6):3072–8.
53. Fenton K, Fisman S, Hedberg A, Seredkina N, Fenton C, Mortensen ES, et al. Anti-dsDNA antibodies promote initiation, and acquired loss of renal dnase1 promotes progression of lupus nephritis in autoimmune (NZBxNZW)F1 Mice. *PLoS One.* 2009;4(12):e8474.
54. Tojo T, Friou G. Lupus nephritis: Varying complement-fixing properties of immunoglobulin G antibodies to antigens of cell nuclei. *Science.* 1968;161(5):904–6.
55. Niederer H a, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KGC. Fc γ RIIB, Fc γ RIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183:69–88.
56. Truedsson L, Bengtsson AA, Sturfelt G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2007;40(8):560–6.
57. Bao L, Quigg RJ. Complement in Lupus Nephritis: The Good, the Bad, and the Unknown. *Semin*

- Nephrol. 2007;27(1):69–80.
58. Macedo ACL, Isaac L. Systemic lupus erythematosus and deficiencies of early components of the complement classical pathway. *Front Immunol.* 2016;7:55.
59. Thurman JM, Tchepeleva SN, Haas M, Panzer S, Boackle SA, Glogowska MJ, et al. Complement alternative pathway activation in the autologous phase of nephrotoxic serum nephritis. *AJP Ren Physiol.* 2012;302(12):F1529–36.
60. Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A, Matis LA. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8563–8.
61. Elliott MK, Jarmi T, Ruiz P, Xu Y, Holers VM, Gilkeson GS. Effects of complement factor D deficiency on the renal disease of MRL/lpr mice. *Kidney Int.* 2004;65(1):129–38.
62. Watanabe H, Garnier G, Circolo a, Wetsel R a, Ruiz P, Holers VM, et al. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice genetically deficient in the alternative complement pathway factor B. *J Immunol.* 2000;164(2):786–94.
63. Sekine H, Hsieh Kinser TT, Qiao F, Martinez E, Paulling E, Ruiz P, et al. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 2011;63(4):1076–85.
64. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):580–92.
65. Davies KA, Robson MG, Peters AM, Norsworthy P, Nash JT, Walport MJ. Defective Fc-dependent processing of immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46(4):1028–38.
66. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, et al. Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood.* 1999;94(12):4220–32.
67. Martin DA, Elkon KB. Autoantibodies make a U-turn: the toll hypothesis for autoantibody specificity. *J Exp Med.* 2005;202(11):1465–9.
68. Rahman AH, Eisenberg RA. The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol.* 2006;28(2):131–43.
69. Apostolidis SA, Crispín JC, Tsokos GC. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus.* 2011;20(2):120–4.
70. Dean G, Anand A, Blofeld A, Isenberg D, Lydyard P. Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4. *Lupus.* 2002;11(8):501–7.
71. Foster MH. T Cells and B Cells in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol.* 2007;27(1):47–58.

72. Tew JG, DiLosa RM, Burton GF, Kosco MH, Kupp LI, Masuda A, et al. Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol Rev.* 1992;126:99–112.
73. Cassese G, Lindenau S, De Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G, et al. Inflamed kidneys of NZB/W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(9):2726–32.
74. Knight JS, Kaplan MJ. Lupus neutrophils: “NET” gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(5):441–50.
75. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011;3(73):73ra19.
76. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tyden H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. *J Immunol.* 2012;188(7):3522–31.
77. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(21):9813–8.
78. Yang N, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Li Y, Ye R, Atkins RC, et al. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1998;54(1):143–51.
79. Peterson KS, Huang J, Zhu J, Agati VD, Liu X, Miller N, et al. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest.* 2004;113(12):1722–33.
80. Frosch M, Vogl T, Waldherr R, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J. Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):198–206.
81. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Rémy P, Mignon F, Méry JP, et al. Predictive power of the second renal biopsy in lupus nephritis: Significance of macrophages. *Kidney Int.* 2001;59(1):304–16.
82. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Tomkiewicz E, Remy P, Mignon F, et al. A new morphologic index for the evaluation of renal biopsies in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2000;58(3):1160–73.
83. Nowling TK, Gilkenson GS. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(6):250.
84. Border W, Okuda S, Languino L, Sporn M, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor b1. *Nature.* 1990;346:371–4.
85. Floege J, Eitner F, Alpers CE. A New Look at Platelet-Derived Growth Factor in Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(1):12–23.

86. Kitamura M, Sütö TS. TGF- β and glomerulonephritis: Anti-inflammatory versus prosclerotic actions. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(4):669–79.
87. Matsuda M, Shikata K, Makino H, Sugimoto H, Ota K, Akiyama K, et al. Gene expression of pdgf and pdgf receptor in various forms of glomerulonephritis. *Am J Nephrol*. 1997;17(1):25–31.
88. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 1997;4(9):1725.
89. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677–86.
90. Hartman EAR, van Royen-Kerkhof A, Jacobs JWG, Welsing PMJ, Fritsch-Stork RDE. Performance of the 2012 Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria versus the 1997 American College of Rheumatology classification criteria in adult and juvenile systemic lupus erythematosus. A systematic review and meta-an. *Autoimmun Rev*. 2018;17(3):316–22.
91. Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(2):413–24.
92. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(5):825–35.
93. Balow JE. Clinical presentation and monitoring of lupus nephritis. *Lupus*. 2005;14(1):25–30.
94. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing Kidney Function — Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate. *N Engl J Med*. 2006;354:2473–83.
95. Jafar TH, Chaturvedi N, Gul A, Khan AQ, Schmid CH, Levey AS. Ethnic differences and determinants of proteinuria among South Asian subgroups in Pakistan. *Kidney Int*. 2003;64(4):1437–44.
96. Jones C, McQuillan G, Kusek J, Eberhardt M, Herman W, Coresh J, et al. Serum creatinine levels in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*. 1998;32(6):992–9.
97. Stevens LA, Levey AS. Measurement of kidney function. *Med Clin North Am*. 2005;89(3):457–73.
98. Ricker DM, Hebert LA, Rohde R, Sedmak DD, Lewis EJ, Clough JD. Serum C3 Levels Are Diagnostically More Sensitive and Specific for Systemic Lupus Erythematosus Activity Than Are Serum C4 Levels. *Am J Kidney Dis*. 1991;18(6):678–85.
99. Birmingham D, Irshaid F, Nagaraja N, Zou X, Tsao B, Wu H, et al. The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare. *Lupus*. 2010;19(11):1272–80.
100. Lloyd W, Schur P. Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). *Med (Baltimore)*. 1981;60(3):208–17.

101. Esdaile J, Joseph L, Abrahamowicz M, Li Y, Danoff D, Clarke A. Routine immunologic tests in systemic lupus erythematosus: is there a need for more studies? *J Rheumatol*. 1996;23(11):1891–6.
102. Valentijn R, Overhagen H Van, Hazevoet H, Hermans J, Cats A, Daha M, et al. The value of complement and immune complex determinations in monitoring disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1985;28(8):904–13.
103. Hay FC, Nineham LJ, Roitt IM. Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase C1q. *Clin Exp Immunol*. 1976;24(3):396–400.
104. Siegert C, Daha M, Westedt ML, van der Voort E, Breedveld F. IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1991;18(2):230–4.
105. Marto N, Bertolaccini ML, Calabuig E, Hughes V, Khamashta A. Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and positive predictive value in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(3):444–8.
106. Nydegger UE, Lambert PH, Gerber H, Miescher PA. Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. Quantitation by binding to radiolabeled C1q. *J Clin Invest*. 1974;54(2):297–309.
107. Orbai A, Truedsson L, Sturfelt G, Nived O, Fang H, Alarcón G S, et al. Anti-C1q Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus*. 2015;24(1):42–9.
108. Nived O, Hallengren CS, Alm P, Jönsen A, Sturfelt G, Bengtsson AA. An observational study of outcome in SLE patients with biopsy-verified glomerulonephritis between 1986 and 2004 in a defined area of Southern Sweden: The clinical utility of the ACR renal response criteria and predictors for renal outcome. *Scand J Rheumatol*. 2013;42(5):383–9.
109. Mannik M, Wener MH. Deposition of antibodies to the collagen-like region of C1q in renal glomeruli of patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 1997;40(8):1504–11.
110. Coremans IEM, Spronk PE, Bootsma H, Daha MR, Van der Voort EAM, Kater L, et al. Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis*. 1995;26(4):595–601.
111. Siegert CEH, Daha MR, Tseng CMES, Coremans IEM, Van Es LA, Breedveld FC, et al. Predictive value of IgG autoantibodies against C 1 q for nephritis in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1993;52:851-856
112. Grootsholten C, C Dieker JW, McGrath FD, Roos A, W M Derksen RH, van der Vlag J, et al. A prospective study of anti-chromatin and anti-C1q autoantibodies in patients with proliferative lupus nephritis treated with cyclophosphamide pulses or azathioprine/methylprednisolone. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:693–6.

113. Ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CGM. Measurement of increases in anti-double-stranded dna antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1990;33(5):634–43.
114. Isenberg DA. Autoantibodies: Markers of Disease or Pathogenic? *Ann N Y Acad Sci.* 1997;823(1):256–62.
115. Pincus T, Schur PH, Rose JA, Decker JL, Talal N. Measurement of Serum DNA-Binding Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 1969;281(13):701–5.
116. Heidenreich U, Mayer G, Herold M, Klotz W, Stempffl Al-Jazrawi K, Lhotta K. Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis. *Lupus.* 2009;18(14):1276–80.
117. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone M V, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 2003; 349(16):1526-33.
118. Petri M, Genovese M, Engle E, Hochberg M. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus A prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 1987;34(8):937–44.
119. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Joseph L, MacKenzie T, Li Y, Danoff D. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus: Why some tests fail. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):370–8.
120. Swaak AJG, Groenwold J, Aarden LA, Stadius Van Eps LW, Feltkamp TEW. Prognostic value of anti-dsDNA in SLE. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1982; 41:388-395.
121. Fernando MMA, Isenberg DA. How to monitor SLE in routine clinical practice. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(4):524–7.
122. Tron F, Bach J-F. Relationships between antibodies to native DNA and glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* 1977;28:416-432.
123. Okamura M, Kanayama Y, Tadanao Takeda K, Inoue T, Okamura Y Kanayama K Amastu N Negoro S Kohda T Takeda JM. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann ofthe Rheum Dis.* 1993;52:14–20.
124. Hill G, Hinglais N, Tron P, et al. Systemic lupus erythematosus. Morphologic correlation with immunologic and clinical data at the time of biopsy. *Am J Med.* 1978;64:61–79.
125. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Mackenzie T, Hayslett JP, Kashgarian M. The Time-Dependence of Long-Term Prediction in Lupus Nephritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37(3):359–68.
126. MacGowan JR, Ellis S, Griffiths M, Isenberg DA. Retrospective analysis of outcome in a cohort of patients with lupus nephritis treated between 1977 and 1999. *Rheumatology.* 2002;41(9):981–7.

127. Hebert LA, Dillon JJ, Middendorf DF, Peter JB, Lewis EJ. Relationship Between Appearance of Urinary Red Blood Cell/White Blood Cell Casts and the Onset of Renal Relapse in Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(3):432–8.
128. Rasoulpour M, Banco L, Laut JM, Burke GS. Inability Community-Based Laboratories to Identify Pathological Casts in Urine Samples. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2015;150:1201-1204.
129. Bargman JM. Why are rheumatologists treating lupus nephritis? *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007;3(6):296–7.
130. Liang MH, Schur PH, Fortin P, St.Clair EW, Balow JE, Costenbader K, et al. The American college of rheumatology response criteria for proliferative and membranous renal disease in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):421–32.
131. Rahman P, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Significance of isolated hematuria and isolated pyuria in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2001;10(6):418–23.
132. Appenzeller S, Clark A, Pineau C, Vasilevsky M, Bernatsky S. Isolated pyuria in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010;19(7):793–6.
133. Montero N, José Soler M, José Pascual M, Barrios C, Márquez E, Rodríguez E, et al. Correlación entre el cociente proteína/creatinina en orina esporádica y las proteínas en orina de 24 horas. *Nefrología.* 2012;32(4):494–501.
134. Ginsberg J, Chang B, Matarese R, Garella S. Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. *N Engl J Med.* 1983;309(25):1543–6.
135. Schwab SJ, Christensen RL, Dougherty K, Klahr S. Quantitation of proteinuria by the use of protein-creatinine ratios in single urine samples. *Arch Intern Med.* 1987;147:943–4.
136. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:S1-266.
137. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26(1):S33-50.
138. Lueng YY, Szeto CC, Tam LS, Lam CWK, Li EK, Wong CK, et al. Urine protein-to-creatinine ratio is a reliable measure of proteinuria in lupus nephritis. *J Rheumatol.* 2004;31(8):1557–9.
139. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JHM, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(11):1771–82.
140. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res.* 2012;64(6):797–808.

141. Herrera GA. The value of electron microscopy in the diagnosis and clinical management of lupus nephritis. *Ultrastruct Pathol.* 1999;23(2):63–77.
142. Hiramatsu N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, et al. Revised classification of lupus nephritis is valuable in predicting renal outcome with an indication of the proportion of glomeruli affected by chronic lesions. *Rheumatology.* 2008;47(5):702–7.
143. Najafi CC, Korbet SM, Lewis EJ, Schwartz MM, Reichlin M, Evans J. Significance of histologic patterns of glomerular injury upon long-term prognosis in severe lupus glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2001;59(6):2156–63.
144. Schwartz MM, Bernstein J, Hill GS, Holley K, Phillips EA, Lewis EJ, et al. Predictive value of renal pathology in diffuse proliferative lupus glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1989;36(5):891–6.
145. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM. Diffuse proliferative lupus nephritis: Identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int.* 1984;25(4):689–95.
146. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TA, Kullick ME, Klippel JH, et al. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. *Am J Med.* 1983;75(3):382–91.
147. McCluskey R. Lupus nephritis. *Kidney Pathology Decennial 1966–1975.* 1975. p. 435–50.
148. Churg J, Sobin L. *Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease.* Tokyo, Igaku-Shoin. 1982.
149. Weening JJ, D VD, Schwartz MM, Seshan S V, Alpers CE, Appel G B, et al. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(1):241–50.
150. Grootscholten C, Bajema IM, Florquin S, Steenbergen EJ, Peutz-Kootstra CJ, Goldschmeding R, et al. Interobserver agreement of scoring of histopathological characteristics and classification of lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(1):223–30.
151. Corwin HL, Schwartz MM, Lewis EJ. The importance of sample size in the interpretation of the renal biopsy. *Am J Nephrol.* 1988;8(2):85–9.
152. Nossent H, Berden J, Swaak T. Renal immunofluorescence and the prediction of renal outcome in patients with proliferative lupus nephritis. *Lupus.* 2000;9(7):504–10.
153. Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Isenberg D, Jayne D, et al. Mycophenolate Mofetil versus Cyclophosphamide for Induction Treatment of Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(5):1103–12.
154. Houssiau FA, Vasconcelos C, D’Cruz D, Sebastiani GD, De Ramon Garrido E, Danieli MG, et al. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: The Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(8):2121–31.
155. Houssiau FA, Vasconcelos C, D’Cruz D, Sebastiani GD, De Ramon Garrido E, Danieli MG, et al.

- The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):61–4.
156. Rathi M, Goyal A, Jaryal A, Sharma A, Gupta PK, Ramachandran R, et al. Comparison of low-dose intravenous cyclophosphamide with oral mycophenolate mofetil in the treatment of lupus nephritis. *Kidney Int.* 2016;89(1):235–42.
157. Chan T-M, Tse K-C, Tang C S-O, Mok M-Y, Li F-K. Long-Term Study of Mycophenolate Mofetil as Continuous Induction and Maintenance Treatment for Diffuse Proliferative Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(4):1076–84.
158. Dooley MA, Hogan S, Jennette C, Falk R. Cyclophosphamide therapy for lupus nephritis: Poor renal survival in black Americans. *Kidney Int.* 1997;51(4):1188–95.
159. Isenberg D, Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Jayne D, et al. Influence of race/ethnicity on response to lupus nephritis treatment: the ALMS study. *Rheumatology.* 2010;49(1):128–40.
160. Dooley MA, Jayne D, Ginzler EM, Isenberg D, Olsen NJ, Wofsy D, et al. Mycophenolate versus Azathioprine as Maintenance Therapy for Lupus Nephritis. *N Engl J Med.* 2011;365(20):1886–95.
161. Moroni G, Doria A, Mosca M, Alberighi ODC, Ferraccioli G, Todesco S, et al. A randomized pilot trial comparing cyclosporine and azathioprine for maintenance therapy in diffuse lupus nephritis over four years. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(5):925–32.
162. Radhakrishnan J, Moutzouris DA, Ginzler EM, Solomons N, Siempos II, Appel GB. Mycophenolate mofetil and intravenous cyclophosphamide are similar as induction therapy for class V lupus nephritis. *Kidney Int.* 2010;77(2):152–60.
163. Fessler BJ, Alarcón GS, McGwin G, Roseman J, Bastian HM, Friedman AW, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. *Arthritis Rheum.* 2005;52(5):1473–80.
164. Tsakonas E, Joseph L, Esdaile JM, Choquette D, Sénécal JL, Cividino A, et al. A long-term study of hydroxychloroquine withdrawal on exacerbations in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1998;7(2):80–5.
165. Costenbader KH, Desai A, Alarcón GS, Hiraki LT, Shaykevich T, Brookhart MA, et al. Trends in the incidence, demographics, and outcomes of end-stage renal disease due to lupus nephritis in the US from 1995 to 2006. *Arthritis Rheum.* 2011;63(6):1681–8.
166. Merrell M, Shulman LE. Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. *J Chronic Dis.* 1955;1(1):12–32.
167. Hanly JG, O’Keeffe AG, Su L, Urowitz MB, Romero-Diaz J, Gordon C, et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: Results from an international inception cohort study. *Rheumatology.* 2016;55(2):252–62.

168. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: A comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(5):299–308.
169. Somers EC, Marder W, Cagnoli P, Lewis EE, DeGuire P, Gordon C, et al. Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: The Michigan lupus epidemiology and surveillance program. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(2):369–78.
170. Contreras G, Mattiazzi A, Guerra G, Ortega LM, Tozman EC, Li H, et al. Recurrence of Lupus Nephritis after Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(7):1200–7.
171. Burgos PI, Perkins EL, Pons-Estel GJ, Kendrick SA, Liu JM, Kendrick WT, et al. Risk factors and impact of recurrent lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus undergoing renal transplantation: Data from a single US institution. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2757–66.
172. Moroni G, Tantardini F, Gallelli B, Quaglini S, Banfi G, Poli F, et al. The long-term prognosis of renal transplantation in patients with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(5):903–11.
173. Esdaile J, Joseph L, MacKenzie T, Kashgarian M, Hayslett J. The benefit of early treatment with immunosuppressive agents in lupus nephritis. *J Rheumatol*. 1994;21(11):2046–51.
174. Moroni G, Radice A, Giammarresi G, Quaglini S, Gallelli B, Leoni A, et al. Are laboratory tests useful for monitoring the activity of lupus nephritis? A 6-year prospective study in a cohort of 228 patients with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(2):234–7.
175. Marks SD, Williams SJ, Tullus K, Sebire NJ. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 is predictive of poor renal prognosis in paediatric lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(11):3521–6.
176. Murali NS, Ackerman AW, Croatt AJ, Cheng J, Grande JP, Sutor SL, et al. Renal upregulation of HO-1 reduces albumin-driven MCP-1 production: implications for chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(2):F837–44.
177. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney International*. 1996;49(3):761–7..
178. Rovin BH. Urine Chemokines as Biomarkers of Human Systemic Lupus Erythematosus Activity. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(2):467–73.
179. Singh RG, Usha, Rathore SS, Behura SK, Singh NK. Urinary MCP-1 as diagnostic and prognostic marker in patients with lupus nephritis flare. *Lupus*. 2012;21(11):1214–8.
180. Abujam B, Cheekatla SS, Aggarwal A. Urinary CXCL-10/IP-10 and MCP-1 as markers to assess activity of lupus nephritis. *Lupus*. 2013;22(6):614–23.
181. Hinze CH, Suzuki M, Klein-gitelman M, Passo MH, Singer NG, Haines KA, et al. Neutrophil

- gelatinase-associated lipocalin anticipates the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2772–81.
182. Nguyen MT, Ross GF, Dent CL, Devarajan P. Early prediction of acute renal injury using urinary proteomics. *Am J Nephrol.* 2005;25(4):318–26.
183. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet.* 2005;365(9466):1231–8.
184. Mishra J, Qing MA, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(10):2534–43.
185. Brunner HI, Mueller M, Rutherford C, Passo MH, Witte D, Grom A, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2577–84.
186. Pitashny M, Schwartz N, Qing X, Hojaili B, Aranow C, Mackay M, et al. Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1894–903.
187. Torres-Salido MT, Cortes-Hernandez J, Vidal X, Pedrosa A, Vilardell-Tarres M, Ordi-Ros J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(9):1740–9.
188. Campbell S, Burkly LC, Gao H-X, Berman JW, Su L, Browning B, et al. Proinflammatory Effects of Tweak/Fn14 Interactions in Glomerular Mesangial Cells. *J Immunol.* 2006;176(3):1889–98.
189. Chicheportiche Y, Chicheportiche R, Sizing I, Thompson J, Benjamin CB, Ambrose C, et al. Proinflammatory activity of TWEAK on human dermal fibroblasts and synoviocytes: Blocking and enhancing effects of anti-TWEAK monoclonal antibodies. *Arthritis Res.* 2002;4(2):126–33.
190. Schwartz N, Su L, Burkly LC, Mackay M, Aranow C, Kollaros M, et al. Urinary TWEAK and the activity of lupus nephritis. *J Autoimmun.* 2006;27(4):242–50.
191. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly LC, Collins CE, Blanco I, Su L, et al. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: A multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):R143.
192. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(6):1906–10.
193. Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int.* 2008;74(6):799–807.
194. Zhang X, Nagaraja HN, Nadasdy T, Song H, McKinley A, Prosek J, et al. A composite urine biomarker reflects interstitial inflammation in lupus nephritis kidney biopsies. *Kidney Int.*

- 2012;81(4):401–6.
195. Group KDIGO (KDIGO) CW. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):1–150.
196. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Okada M, Okumura F, Yamanouchi M, et al. Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am J Pathol.* 2004;165(4):1243–55.
197. Nielsen SE, Sugaya T, Hovind P, Baba T, Parving H-H, Rossing P. Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Predicts Progression to Nephropathy in Type 1 Diabetic Patients. 2010;33(6):1320–4.
198. Panduru NM, Forsblom C, Saraheimo M, Thorn L, Bierhaus A, Humpert PM, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(7):2077–83.
199. Zhang X, Nagaraja HN, Nadasdy T, Song H, McKinley A, Prosek J, et al. A composite urine biomarker reflects interstitial inflammation in lupus nephritis kidney biopsies. *Kidney Int.* 2012;81(4):401–6.
200. Brunner HI, Gulati G, Klein-gitelman MS, Rouster-stevens KA, Tucker L, Ardoin SP, et al. Urine biomarkers of chronic kidney damage and renal functional decline in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Pediatric Nephrology;* 2019;34(1):117–28
201. Abulaban KM, Song H, Zhang X, Kimmel PL, Kusek JW, Nelson RG, et al. Predicting decline of kidney function in lupus nephritis using urine biomarkers. *Lupus.* 2016;25(9):1012–8.
202. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10212–6.
203. Sestin CA, Yin X, Esmon CT, Buyon JP, Clancy RM. Shedding of endothelial protein C receptor contributes to vasculopathy and renal injury in lupus: In vivo and in vitro evidence. *Kidney Int.* 2005;68(1):110–20.
204. Izmirly PM, Barisoni L, Buyon JP, Kim MY, Rivera TL, Schwartzman JS, et al. Expression of endothelial protein C receptor in cortical peritubular capillaries associates with a poor clinical response in lupus nephritis. *Rheumatology.* 2009;48(5):513–9.
205. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6(4):345–52.
206. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+CD25high T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2007;178(4):2579–88.
207. Lyssuk EY, Torgashina A V, Soloviev SK, Nasonov EL, Bykovskaia SN. Reduced number and

- function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:113–9.
208. Wang G, Lai FM-M, Tam L-S, Li EK-M, Kwan BC-H, Chow K-M, et al. Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis- relation with disease activity and treatment response. *Rheumatology.* 2009;48(7):755–60.
209. Hsieh C, Chang A, Brandt D, Guttikonda R, Utset TO, Clark MR. Predicting outcomes of lupus nephritis with tubulointerstitial inflammation and scarring. *Arthritis Care Res.* 2011;63(6):865–74.
210. Ichimura T, Bonventre J V, Bailly V, Wei H, Hession C A, Cate RL, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is Up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.* 1998;273(7):4135–42.
211. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *AJP Ren Physiol.* 2004;286(3):552F–563.
212. Nozaki Y, Kinoshita K, Yano T, Shiga T, Hino S, Niki K, et al. Estimation of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 2014;23(8):769-77.
213. Ding Y, Nie LM, Pang Y, Wu WJ, Tan Y, Yu F, et al. Composite urinary biomarkers to predict pathological tubulointerstitial lesions in lupus nephritis. *Lupus.* 2018;27(11):1778-89.
214. Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Suzuki M, Petri M, Kiani AN, et al. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2687–97.
215. Elsayed M, Elhefnawy KA, Qassem AA, Amr GE. Urinary Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) As a Marker for Lupus Nephritis Activity. *Int J Sci Res.* 2013;4(2):1615–9.
216. Rovere P, Peri G, Fazzini F, Bottazzi B, Doni A, Bondanza A, et al. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood.* 2000;96(13):4300–6.
217. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: From C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol.* 2008;28(1):1–13.
218. Pang Y, Tan Y, Li Y, Zhang J, Guo Y, Guo Z, et al. Pentraxin 3 Is Closely Associated With Tubulointerstitial Injury in Lupus Nephritis: A Large Multicenter Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(3):e2520.
219. Gatto M, Ghirardello A, Luisetto R, Bassi N, Fedrigo M, Valente M, et al. Immunization with pentraxin 3 (PTX3) leads to anti-PTX3 antibody production and delayed lupus-like nephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Autoimmun.* 2016;74:208–16.
220. Yuan M, Tan Y, Pang Y, Li YZ, Song Y, Yu F, et al. Anti-pentraxin 3 auto-antibodies might be

- protective in lupus nephritis: A large cohort study. *Ren Fail.* 2017;39(1):465–73.
221. Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, et al. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol.* 2005;205(4):435–42.
222. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: A noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2006;69(4):747–53.
223. El-Gohary A, Hegazy A, Abbas M, Kamel N, Nasef SI. Serum and Urinary Interferon-Gamma-Inducible Protein 10 in Lupus Nephritis. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(6):1135–8.
224. Singh S, Wu T, Vanarsa K, Mahajan T, Bing H, Zhou J, et al. Urine VCAM1 is a Good Indicator of Renal Pathology “Activity Index” in Lupus Nephritis. *Clin Immunol.* 2010;135(0):S81.
225. Mok CC, Soliman S, Ho LY, Mohamed FA, Mohamed FI, Mohan C. Urinary angiostatin, CXCL4 and VCAM-1 as biomarkers of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):6.
226. Soliman S, Mohamed FA, Ismail FM, Stanley S, Saxena R, Mohan C. Urine angiostatin and VCAM-1 surpass conventional metrics in predicting elevated renal pathology activity indices in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis.* 2017;20(11):1714–27.
227. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(36):13368–73.
228. Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernås M, et al. Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLoS One.* 2010;5(12):e15353.
229. Février B, Raposo G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(4):415–21.
230. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee J, Lotvall J. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654–U672.
231. Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Punescu TG, Da Silva N, et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* 2010;78(2):191–9.
232. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(1):13–21.
233. Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology.* 2012;56(5):1946–57.

234. De Palma G, Sallustio F, Schena FP. Clinical application of human urinary extracellular vesicles in kidney and urologic diseases. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).pii.E1043.
235. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics.* 2007;8:166.
236. Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DGN, Antoine DJ, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology.* 2011;54(5):1767–76.
237. Sharkey JW, Antoine DJ, Park BK. Validation of the isolation and quantification of kidney enriched miRNAs for use as biomarkers. *Biomarkers.* 2012;17(3):231–9.
238. Chandrasekaran K, Karolina DS, Sepramaniam S, Armugam A, Wintour EM, Bertram JF, et al. Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease. *Kidney Int.* 2012;81(7):617–27.
239. Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(5):286–94.
240. Van Balkom BWM, Pisitkun T, Verhaar MC, Knepper MA. Exosomes and the kidney: Prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney Int.* 2011;80(11):1138–45.
241. Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, Annaratone L, Pinach S, Grimaldi S, et al. Urinary exosomal MicroRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS One.* 2013;8(11):e73798.
242. Ichii O, Otsuka-Kanazawa S, Horino T, Kimura J, Nakamura T, Matsumoto M, et al. Decreased miR-26a expression correlates with the progression of podocyte injury in autoimmune glomerulonephritis. *PLoS One.* 2014;9(10):e110383.
243. Sole C, Cortes-Hernandez J, Felip ML, Vidal M, Ordi-Ros J. MIR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(9):1488–96.
244. Bethunaickan R, Berthier CC, Zhang W, Eksi R, Li HD, Guan Y, et al. Identification of stage-specific genes associated with lupus nephritis and response to remission induction in (NZB × NZW)F1 and NZM2410 mice. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(8):2246–58.
245. Fattal I, Shental N, Mevorach D, Anaya JM, Livneh A, Langevitz P, et al. An antibody profile of systemic lupus erythematosus detected by antigen microarray. *Immunology.* 2010;130(3):337–43.
246. Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int.* 2009;29(7):749–54.
247. Putta S, Lanting L, Sun G, Lawson G, Kato M, Natarajan R. Inhibiting MicroRNA-192 Ameliorates Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(3):458–69.
248. He J, Wang Y, Lu X, Zhu B, Pei X, Wu J, et al. Micro-vesicles derived from bone marrow stem cells protect the kidney both in vivo and in vitro by microRNA-dependent repairing. *Nephrology.* 2015;20(9):591–600.

249. Mok CC. Biomarkers for lupus nephritis: A critical appraisal. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
250. Li Y, Tucci M, Narain S, Barnes E V., Sobel ES, Segal MS, et al. Urinary biomarkers in lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 2006;5(6):383–8.
251. Manoharan A, Madaio MP. Biomarkers in Lupus Nephritis. *Rheum Dis Clin NA.* 2010;36(1):131–43.
252. Goligorsky MS, Addabbo F, O’Riordan E. Diagnostic Potential of Urine Proteome: A Broken Mirror of Renal Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8):2233–9.
253. Wang G, Szeto CC. Quantification of gene expression in urinary sediment for the study of renal diseases. *Nephrology.* 2007;12(5):494–9.
254. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
255. Gladman D, Ibanez D, Urowitz M. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002;29(2):288–91.
256. Austin H, Muenz L, Joyce K, Antonovych T, Kullick M, Klippel J, et al. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. *Am J Med.* 1983;75(3):382–91.
257. “Renal Disease Subcommittee of the American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Response Criteria.” The American College of Rheumatology response criteria for proliferative and membranous renal disease in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):421–32.
258. Livak K, Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS.* 2001;25:402–8.
259. Ferracioli G, Romano G. Renal interstitial cells, proteinuria and progression of lupus nephritis: new frontiers for old factors. *Lupus.* 2008;17(6): 533-40.
260. Seret G, Le Meur Y, Renaudineau Y, Youinou P. Mesangial cell-specific antibodies are central to the pathogenesis of lupus nephritis. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:570670.
261. Martin J, Eynstone L, Davies M, Steadman R. Induction of metalloproteinases by glomerular mesangial cells stimulated by proteins of the extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(1):88–96.
262. Ma Y, Shi J, Wang F, Li S, Wang J, Zhu C, et al. MiR-130b increases fibrosis of HMC cells by regulating the TGF- β 1 pathway in diabetic nephropathy. *J Cell Biochem.* 2019;120(3):4044–56.
263. Chan TM, Leung JKH, Ho SKN, Yung S. Mesangial cell-binding anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(5):1219–29.
264. Yung S, Tsang RCW, Leung JKH, Chan TM. Increased mesangial cell hyaluronan expression in

- lupus nephritis is mediated by anti-DNA antibody-induced IL-1 β . *Kidney Int.* 2006;69(2):272–80.
265. Satoh M. Endothelial dysfunction as an underlying pathophysiological condition of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2012;16(4):518–21.
266. Liu Y. New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(2):212–22.
267. Hernandez T, Mayadas TN. The changing landscape of renal inflammation. *Trends Mol Med.* 2016;22(2):151–63.
268. Kumar S, Molitoris BA. Renal Endothelial Injury and Microvascular Dysfunction in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol.* 2015;35(1):96–107.
269. Chen L, Li Z yang, Xu S yi, Zhang X jun, Zhang Y, Luo K, et al. Upregulation of miR-107 Inhibits Glioma Angiogenesis and VEGF Expression. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36(1):113–20.
270. Moncini S, Salvi A, Zuccotti P, Viero G, Quattrone A, Barlati S, et al. The role of miR-103 and miR-107 in regulation of CDK5R1 expression and in cellular migration. *PLoS One.* 2011;6(5):e20038.
271. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653–60.
272. Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Bornstein P, Byzova T V. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat Med.* 2005;11(11):1188–96.
273. Ramezani A, Devaney JM, Cohen S, Wing MR, Scott R, Knoblach S, et al. Circulating and urinary microRNA profile in focal segmental glomerulosclerosis: A pilot study. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(4):394–404.
274. Navarro-Quiroz E, Pacheco-Lugo L, Lorenzi H, Díaz-Olmos Y, Almendras L, Rico E, et al. High-throughput sequencing reveals circulating miRNAs as potential biomarkers of kidney damage in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166202.
275. Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R, Redon J. Increased urinary exosomal micrnas in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138618.
276. Fan W, Liang D, Tang Y, Qu B, Cui H, Luo X, et al. Identification of microRNA-31 as a novel regulator contributing to impaired interleukin-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3715–25.
277. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3 + CD25 + CD4 + regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization . *J Exp Med.* 2005;201(5):723–35.
278. Amr KS, Bayoumi FS, Elgengehy FT, Abdallah SO, Ahmed HH, Eissa E. The role of microRNA-31 and microRNA-21 as regulatory biomarkers in the activation of T lymphocytes of Egyptian lupus patients. *Rheumatol Int. Springer Berlin Heidelberg;* 2016;36(11):1617–25.

279. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1142–51.
280. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3 + CD25 + CD4 + regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 2005;201(5):723–35.
281. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL, et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(4):553–4.
282. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2003;21(3):273–6.
283. Navarro-Quiroz E, Pacheco-Lugo L, Navarro-Quiroz R, Lorenzi H, España-Puccini P, Díaz-Olmos Y, et al. Profiling analysis of circulating microRNA in peripheral blood of patients with class IV lupus nephritis. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187973.
284. Li Q, Ran P, Zhang X, Guo X, Yuan Y, Dong T, et al. Downregulation of N-Acetylglucosaminyltransferase GCNT3 by miR-302b-3p Decreases Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Proliferation, Migration and Invasion. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(3):987–1004.
285. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1065–75.
286. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis.* 2012;6(9):900–4.
287. Wang S, Zhang Z, Wang J, Miao H. MiR-107 induces TNF- α secretion in endothelial cells causing tubular cell injury in patients with septic acute kidney injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(1):45–51.
288. Min QH, Chen XM, Zou YQ, Zhang J, Li J, Wang Y, et al. Differential expression of urinary exosomal microRNAs in IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(2):1–9.
289. Yang X, Wang X, Nie F, Liu T, Yu X, Wang H, et al. miR-135 family members mediate podocyte injury through the activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Int J Mol Med.* 2015;36(3):669–77.
290. Gildea JJ, Seaton JE, Victor KG, Reyes CM, Wang DB, Pettigrew AC, et al. Exosomal Transfer From Human Renal Proximal Tubule Cells To Distal Tubule And Collecting Duct Cells. *Clin Biochem.* 2014;47(15):89–94.
291. Tesar V, Hruskova Z. Editorial Understanding Histopathologic Characteristics to Predict Renal Outcomes in Lupus Nephritis. 2017;711–2.
292. Hsieh C, Chang A, Brandt D, Guttikonda R, Utset TO, Clark MR. Predicting Outcomes of Lupus Nephritis With Tubulointerstitial Inflammation and Scarring. 2011;63(6):865–74.

293. Yu F, Haas M, Glasscock R, Zhao M. Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes. *Nature Reviews Nephrology*. 2017;13:483-495.
294. Chen N, Yin D, Lun B, Guo X. LncRNA GAS8-AS1 suppresses papillary thyroid carcinoma cell growth through the miR-135b-5p/CCND2 axis. *Biosci Rep*. 2019;39:1–10.
295. Zhao C-C, Jiao Y, Zhang Y-Y, Ning J, Zhang Y-R, Xu J, et al. Lnc SMAD5-AS1 as ceRNA inhibit proliferation of diffuse large B cell lymphoma via Wnt/ β -catenin pathway by sponging miR-135b-5p to elevate expression of APC. *Cell Death Dis*. 2019;10(4):252-262.
296. Li Z-W, Zhu Y-R, Zhou X-Z, Zhuo B-B, Wang X-D. microRNA-135b expression silences Ppm1e to provoke AMPK activation and inhibit osteoblastoma cell proliferation. *Oncotarget*. 2017;8(16):26424–33.
297. Xu Z, Han Y, Liu J, Jiang F, Hu H, Wang Y, et al. MIR-135b-5p and MIR-499a-3p Promote Cell Proliferation and Migration in Atherosclerosis by Directly Targeting MEF2C. *Sci Rep*. 2015;5(3):1–15.
298. Cheng F, Yang Z, Huang F, Yin L, Yan G, Gong G. microRNA-107 inhibits gastric cancer cell proliferation and metastasis by targeting PI3K/AKT pathway. *Microb Pathog*. 2018;121:110–4.
299. Yu M, Guo D, Cao Z, Xiao L, Wang G. Inhibitory Effect of MicroRNA-107 on Osteosarcoma Malignancy Through Regulation of Wnt/ β -catenin Signaling in Vitro. *Cancer Invest*. 2018;36(3):175–84.
300. Ji Y, Wei Y, Wang J, Ao Q, Gong K, Zuo H. Decreased expression of microRNA-107 predicts poorer prognosis in glioma. *Tumor Biol*. 2015;36(6):4461–6.
301. Wang X, Zhang Y, Jiang BH, Zhang Q, Zhou RP, Zhang L, et al. Study on the role of Hsa-miR-31-5p in hypertrophic scar formation and the mechanism. *Exp Cell Res*. 2017;361(2):201–9.
302. Zhou B, Zuo XX, Li YS, Gao SM, Dai XD, Zhu HL, et al. Integration of microRNA and mRNA expression profiles in the skin of systemic sclerosis patients. *Sci Rep* 2017;7:42899.
303. Hu J, Chen C, Liu Q, Liu B, Song C, Zhu S, et al. The role of the miR-31/FIH1 pathway in TGF- β -induced liver fibrosis. *Clin Sci*. 2015;129(4):305–17.
304. Yang G, Yang L, Wang W, Wang J, Wang J, Xu Z. Discovery and validation of extracellular/circulating microRNAs during idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *Gene*. 2015;562(1):138–44.
305. O'Reilly S, Ciechomska M, Fullard N, Przyborski S, Van Laar JM. IL-13 mediates collagen deposition via STAT6 and microRNA-135b: A role for epigenetics. *Sci Rep*. 2016;6:25066.
306. Liu C, Pan A, Chen X, Tu J, Xia X, Sun L. MiR-5571-3p and miR-135b-5p, derived from analyses of microRNA profile sequencing, correlate with increased disease risk and activity of rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*; 2019; 38(6):1753-1765.

307. Han TS, Voon DCC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, et al. Interleukin 1 Up-regulates MicroRNA 135b to Promote Inflammation-Associated Gastric Carcinogenesis in Mice. *Gastroenterology*. 2019;156(4):1140–1155.e4.
308. Halappanavar S, Nikota J, Wu D, Williams A, Yauk CL, Stampfli M. IL-1 Receptor Regulates microRNA-135b Expression in a Negative Feedback Mechanism during Cigarette Smoke-Induced Inflammation. *J Immunol*. 2013;190(7):3679–86.
309. Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, et al. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(26):6881–92.
310. Suárez Y, Wang C, Manes TD, Pober JS. Cutting Edge: TNF-Induced MicroRNAs Regulate TNF-Induced Expression of E-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 on Human Endothelial Cells: Feedback Control of Inflammation. *J Immunol*. 2010;184(1):21–5.
311. Ikeda Y, Fujimoto T, Ameno M, Shiiki H, Dohi K. Relationship between lupus nephritis activity and the serum level of soluble VCAM-1. *Lupus*. 1998;7(5):347–54.
312. Xue F, Li H, Zhang J, Lu J, Xia Y, Xia Q. MiR-31 regulates interleukin 2 and kinase suppressor of ras 2 during T cell activation. *Genes Immun*. 2013;14(2):127–31.
313. Helms WS, Jeffrey JL, Holmes DA, Townsend MB, Clipstone NA, Su L. Modulation of NFAT-dependent gene expression by the RhoA signaling pathway in T cells. *J Leukoc Biol*. 2007;82(2):361–9.
314. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348–57.
315. Hagiwara E, Gourley MF, Lee S, Klinman DM. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10:interferon- γ -secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum*. 1996;39(3):379–85.
316. Hennessy EJ, Sheedy FJ, Santamaria D, Barbacid M, O'Neill LAJ. Toll-like receptor-4 (TLR4) down-regulates microRNA-107, increasing macrophage adhesion via cyclin-dependent kinase 6. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25531–9.
317. Li X, Zhang Y, Shi Y, Dong G, Liang J, Han Y, et al. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer. *J Cell Mol Med*. 2011;15(9):1887–95.
318. Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, Hruban RH, Karim B, Mendell JT, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(14):6334–9.
319. Chong MMW, Rasmussen JP, Rudensky AY, Littman DR. The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med*. 2008;205(10):2005–17.

320. Liston A, Lu L-F, O'Carroll D, Tarakhovsky A, Rudensky AY. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med.* 2008;205(9):1993–2004.
321. Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'Connor E, Graf D, Cook T, et al. A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med.* 2006;203(11):2519–27.
322. Zhang Z-W, Wang M, Hu J-J, Xu G, Zhang Y, Zhang N. Decreased Expression of MicroRNA-107 in B Lymphocytes of Patients with Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection. *Tohoku J Exp Med.* 2018;246(2):87–96.
323. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res.* 2007;100(8):1164–73.
324. Khor ES, Wong PF. Endothelial replicative senescence delayed by the inhibition of MTORC1 signaling involves MicroRNA-107. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;101:64–73.
325. Zhou J, Wulfkühle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(41):16158–63.
326. Li Y, Mao L, Gao Y, Baral S, Zhou Y, Hu B. MicroRNA-107 contributes to post-stroke angiogenesis by targeting Dicer-1. *Sci Rep.* 2015;5:13316.
327. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res.* 2002;90(12):1243–50.
328. Heshmat NM, El-Kerdany TH. Serum levels of vascular endothelial growth factor in children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007;18(4):346–53.
329. Navarro C, Candia-Zúñiga L, Silveira LH, Ruiz V, Gaxiola M, Avila MC, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2002;11(1):21–4.
330. Watanabe H, Mamelak AJ, Weiss E, Wang B, Freed I, Brice AK, et al. Anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody accelerates renal disease in the NZB/W F1 murine systemic lupus erythematosus model. *Clin Cancer Res.* 2005;11(1):407–9.
331. Wu L, Qin Y, Xia S, Dai M, Han X, Wu Y, et al. Identification of Cyclin-Dependent Kinase 1 as a Novel Regulator of Type I Interferon Signaling in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(5):1222–32.
332. Feng X, Wu C, Yang G, Liu Q, Liu J, Hao J, et al. TLR2 Plays a Critical Role in HMGB1-Induced Glomeruli Cell Proliferation Through the FoxO1 Signaling Pathway in Lupus Nephritis. *J Interf Cytokine Res.* 2016;36(4):258–66.
333. Sung SJ, Ge Y, Dai C, Wang H, Fu SM, Sharma R, et al. Dependence of Glomerulonephritis Induction on Novel Intraglomerular Alternatively Activated Bone Marrow-Derived Macrophages

- and Mac-1 and PD-L1 in Lupus-Prone NZM2328 Mice. *The Journal of Immunology*. 2017;198(7):2589-2601.
334. Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia-a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(3):153–62.
335. Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology*. 2008;24:97–106.
336. Thomas JL, Pham H, Li Y, Hall E, Perkins GA, Ali SS, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α activation improves renal oxygenation and mitochondrial function in early chronic kidney disease. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2017;313(2):F282–90.
337. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3810–20.
338. Baumann B, Hayashida T, Liang X, Schnaper HW. Hypoxia-inducible factor-1 α promotes glomerulosclerosis and regulates COL1A2 expression through interactions with Smad3 Bethany. *Kidney Int*. 2016;90(4):797–808.
339. Kimura K, Iwano M, Higgins DF, Yamaguchi Y, Nakatani K, Harada K, et al. Stable expression of HIF-1 α in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Physiol*. 2008;295(4):F1023–9.
340. Luo R, Zhang W, Zhao C, Zhang Y, Wu H, Jin J, et al. Elevated endothelial HIF-1 α contributes to glomerular injury and promotes hypertensive chronic kidney disease. *Hypertension*. 2015;66(1):75–84.
341. Deng W, Ren Y, Feng X, Yao G, Chen W, Sun Y, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha promotes mesangial cell proliferation in lupus nephritis. *Am J Nephrol*. 2014;40(6):507–15.
342. Ma C, Wei J, Zhan F, Wang R, Fu K, Wan X, et al. Urinary hypoxia-inducible factor-1alpha levels are associated with histologic chronicity changes and renal function in patients with lupus nephritis. *Yonsei Med J*. 2012;53(3):587–92.
343. Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 α and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(9):712–21.
344. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003;112(5):645–57.
345. Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, et al. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2170–4.
346. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, et al. HIF1 α -dependent glycolytic

- pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of T_H 17 and T_{reg} cells. *J Exp Med*. 2011;208(7):1367–76.
347. Makino Y, Nakamura H, Ikeda E, Ohnuma K, Yamauchi K, Yabe Y, et al. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J Immunol*. 2003;171(12):6534–40.
348. Dang E V., Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, et al. Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011;146(5):772–84.
349. Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp*. 2015;63(6):435–49.
350. Chen DY, Chen YM, Wen MC, Hsieh TY, Hung WT, Lan JL. The potential role of Th17 cells and Th17-related cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis. *Lupus*. 2012;21(13):1385–96.
351. Wen Z, Xu L, Xu W, Xiong S. Detection of dynamic frequencies of Th17 cells and their associations with clinical parameters in patients with systemic lupus erythematosus receiving standard therapy. *Clin Rheumatol*. 2014;33(10):1451–8.
352. Zhao W, Wu C, Li LJ, Fan YG, Pan HF, Tao JH, et al. RNAi Silencing of HIF-1 α Ameliorates Lupus Development in MRL/lpr Mice. *Inflammation*; 2018;41(5):1717–30.
353. Yang S, Yin J, Hou X. Inhibition of miR-135b by SP-1 promotes hypoxia-induced vascular endothelial cell injury via HIF-1 α . *Exp Cell Res*. 2018;370(1):31–8.
354. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*. 2014;124(25):3748–57.
355. Zhang L, Sun Z-J, Bian Y, Kulkarni AB. MicroRNA-135b acts as a tumor promoter by targeting the hypoxia-inducible factor pathway in genetically defined mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2013;331(2):230–8.
356. Ayremlou N, Mozdarani H, Mowla SJ, Delavari A. Increased levels of serum and tissue MIR-107 in human gastric cancer: Correlation with tumor hypoxia. *Cancer Biomarkers*. 2015;15(6):851–60.
357. Dolt KS, Mishra MK, Karar J, Baig MA, Ahmed Z, Pasha MAQ. cDNA cloning, gene organization and variant specific expression of HIF-1 α in high altitude yak (*Bos grunniens*). *Gene*. 2007;386(1–2):73–80.
358. Huang YF, Yang CH, Huang CC, Hsu K Sen. Vascular endothelial growth factor-dependent spinogenesis underlies antidepressant-like effects of enriched environment. *J Biol Chem*. 2012;287(49):40938–55.
359. Meng S, Cao JT, Wang LS, Zhou Q, Li YG, Shen CX, et al. MicroRNA 107 partly inhibits endothelial progenitor cells differentiation via HIF-1 β . *PLoS One*. 2012;7(7):e40323.

12. ANEXOS

Criterios clínicos y inmunológicos usados en el sistema de clasificación ACR 1997 para el LES (88)

1. Eritema malar: eritema fijo, plano o alto, sobre las eminencias malares que no suele afectar a los surcos nasolabiales.
2. Eritema discoide: Cambios eritematosos ligeramente elevados con queratosis adyacente, descamación y taponamiento de folículos; en los cambios de largo tiempo pueden aparecer cicatrices atróficas.
3. Fotosensibilidad: erupción cutánea a causa de una reacción insólita a la luz solar, referida por el paciente u observada por el médico.
4. Úlceras bucales: ulceración nasofaríngea, por lo común indolora, observada por un médico.
5. Artritis: artritis no erosiva que afecta a dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor a la palpación, tumefacción o derrame
6. Serositis:
 - Pleuritis: claro antecedente de dolor pleurítico, frote o signos de derrame pleural
 - Pericarditis: comprobada por electrocardiograma, frote o signos de derrame pericárdico
7. Afectación renal:
 - Proteinuria persistente mayor a 0,5 g/día o mayor de 3+ si no se ha cuantificado
 - Cilindros celulares: pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos
8. Afectación neurológica:
 - Convulsiones: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; p. ej., uremia, cetoacidosis, desequilibrio electrolítico
 - Psicosis: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; p. ej., uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico
9. Afectación hematológica:
 - Anemia hemolítica: con reticulocitosis
 - Leucopenia: menos de 4.000/mm³ en dos o en más ocasiones
 - Linfopenia: menos de 1.500/mm³ en dos o más ocasiones
 - Trombocitopenia: menos de 100.000/mm³ en ausencia de fármacos que produzcan esta alteración
10. Alteración inmunológica:
 - Anti-ADN: título anormal de anticuerpos contra ADN nativo, o bien
 - Anti-Sm: presencia de anticuerpos contra antígeno nuclear Sm
 - Hallazgo positivo de anticuerpos antifosfolípidicos (AFL) basado en:
 - Nivel sérico anormal de anticuerpos anticardiolipina IgG o IgM
 - Resultado positivo para anticoagulante lúpico utilizando un método estándar, o
 - Falso positivo en pruebas serológicas de sífilis (VDRL), que persiste por lo menos durante 6 meses y se confirma por pruebas de *Treponema pallidum* o prueba de absorción de anticuerpo treponémico fluorescente (FTA-Abs)
11. Anticuerpos antinucleares: un título anormal de ANA por inmunofluorescencia o análisis equivalente en cualquier momento y en ausencia de medicamentos relacionados con el síndrome de lupus de origen farmacológico

Se clasifica un paciente como LES si cumple 4 o más criterios.

Criterios clínicos y inmunológicos usados en el sistema de clasificación SLICC 2012 para el LES (89)

Criterios clínicos

1. Lupus cutáneo agudo, donde se incluye:
 - a. Rash malar lúpico
 - b. Lupus bulloso
 - c. Variante lúpica de la necrolisis epidérmica tóxica
 - d. Rash maculopapular lúpico
 - e. Rash fotosensible lúpico *en ausencia de dermatomiositis*
 - f. O lupus cutáneo subagudo (*lesiones psoriaformes no induradas y/o policíclicas anulares que se resuelven sin cicatrices, aunque ocasionalmente con dispigmentación postinflamatoria o telangiectasias*)
 2. Lupus cutáneo crónico, donde se incluye:
 - a. Rash clásico discoide.
 - i. Localizado (por encima del cuello)
 - ii. Generalizado (por debajo y encima del cuello)
 - b. Lupus hipertrófico (verrucoso)
 - c. Panniculitis lúpica (lupus profundus)
 - d. Lupus mucoso
 - e. Lupus tumidus
 - f. Chillblain lupus
 - g. Lupus discoide/liquen plano overlap
 3. Ulceras orales o nasofaríngeas *en ausencia de otras causas como vasculitis, enfermedad de Behçet, infecciosa (herpes virus), enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reactiva o comidas ácidas.*
 4. Alopecia no cicatricial *en ausencia de otras causas como alopecia areata, fármacos, ferropenia o alopecia androgénica.*
 5. Sinovitis con afectación ≥ 2 articulaciones caracterizada por inflamación o derrame o dolor en ≥ 2 junto a rigidez matutina de mínimo 30 minutos.
 6. Serositis
 - a. Pleuresía típica durante más de 24h o derrame pleural o roce pleural
 - b. Dolor pericárdico típico durante más de 24h o derrame pericárdico o roce pericárdico o signos electrocardiográficos de pericarditis *en ausencia de otras causas tales como infección, uremia o pericarditis de Dressler.*
 7. Renal
 - a. Ratio proteína/creatinina (o proteinuria 24h) equivalente a 500mg de proteínas/24h o cilindros celulares hemáticos.
 8. Neurológico
 - a. Convulsiones
 - b. Psicosis
 - c. Mononeuritis múltiple *en ausencia de otras causas como vasculitis primarias*
 - d. Mielitis
 - e. Neuropatía periférica o craneal *en ausencia de otras causas como vasculitis primarias, infección o diabetes mellitus*
 - f. Síndrome confusional agudo *en ausencia de otras causas, incluida la tóxico/metabólica, urémica o farmacológica*
 9. Anemia hemolítica
 10. Leucopenia ($<4,000/\text{mm}^3$ en una determinación como mínimo) *en ausencia de otras causas como el síndrome de Felty, fármacos o hipertensión portal* o linfopenia ($<1,000/\text{mm}^3$ en una determinación como mínimo) *en ausencia de otras causas como corticoides, fármacos o infección.*
-

-
11. Trombopenia ($<100,000/\text{mm}^3$ en una determinación como mínimo) *en ausencia de otras causas conocidas como fármacos, hipertensión portal o purpura trombótica trombocitopénica*

Criterios Inmunológicos

1. ANAs por encima del rango del laboratorio de referencia
2. Anti-DNAs por encima del rango del laboratorio de referencia (o > 2 veces el rango de referencia si testado mediante ELISA)
3. Anti-Sm
4. Ac. antifosfolípido positivo determinado mediante:
 - a. Resultado positivo para anticoagulante lúpico
 - b. Resultado RPR falsamente positivo
 - c. Ac anticardiolipina a título medio o alto (IgA, IgG o IgM)
 - d. Resultado positivo para anti- β_2 -glicoproteína I (IgA, IgG o IgM)
5. Descenso del complemento (C3, C4 o CH50)
6. Test de Coombs directo positivo *en ausencia de anemia hemolítica*

Se clasifica un paciente como LES si cumple 4 de los criterios clínicos e inmunológicos, incluyendo al menos un criterio clínico y un criterio inmunológico, O si tiene nefritis comprobada por biopsia compatible con LES y presencia de ANAs o anticuerpos anti-dsDNA.

INDICE DE ACTIVIDAD DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO. SLEDAI
 (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, Bombardier et al, 1992)

Fecha: ___/___/___

NOMBRE:

Puntuación	SLEDAI	Descriptor	Definición
8		Convulsiones	De comienzo reciente. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos.
8		Psicosis	Habilidad alterada para la función diaria debido a alteración grave en la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, asociaciones ilógicas, contenido mental escaso, pensamiento ilógico, raro, desorganizado y comportamiento catatónico. Excluir I. renal y fármacos
8		Sdme orgánico-cerebral	Función mental alterada con falta de orientación, memoria, u otras funciones intelectuales, de comienzo rápido y manifestaciones clínicas fluctuantes. Incluye disminución del nivel de conciencia con capacidad reducida para focalizar, e inhabilidad para mantener la atención en el medio, más, al menos dos de los siguientes: alteración de la percepción, lenguaje incoherente, insomnio o mareo matutino, o actividad psicomotora aumentada o disminuida. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos..
8		Alteraciones visuales	Retinopatía lúpica. Incluye cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos y hemorragias en la coroides, o neuritis óptica. Excluir HTA, infección o fármacos.
8		Alt. Pares craneales	De reciente comienzo, motor o sensitivo.
8		Cefalea lúpica	Grave, persistente; puede ser migrañosa pero no responde a analgésicos narcóticos.
8		AVC	De reciente comienzo. Excluir arteriosclerosis.
8		Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos sensibles, infartos periungueales, hemorragias en astilla o biopsia o angiografía que confirme la vasculitis.
4		Miositis	Debilidad proximal/dolor asociado a elevación de las CPK/aldolasa o EMG sugestivo o miositis comprobada por biopsia.
4		Artritis	Más de dos articulaciones dolorosas y con signos inflamatorios.
4		Cilindros urinarios	Cilindros hemáticos o granulosos.
4		Hematuria	>5 hematíes/c. Excluir litiasis, infección u otras causas.
4		Proteinuria	> 5 g/24 h. De reciente comienzo o aumento de la proteinuria ya conocida en más de 0.5 g/24 h.
4		Piuria	> 5 leucocitos/c. Excluir infección.
2		Exantema nuevo	Comienzo reciente o recurrente. Exantema inflamatorio.
2		Alopecia	De comienzo reciente o recurrente. Pérdida difusa o en placas.
2		Ulceras bucales	De comienzo reciente o recurrente. Ulceras bucales o nasales.
2		Pleuritis	Dolor pleurítico con roce o derrame, o engrosamiento pleural.
2		Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes: roce, derrame, cambios electrocardiográficos o confirmación ecocardiográfica.
2		Complemento	Descenso de CH50, C3, C4 por debajo del límite inferior del laboratorio.
2		Anti DNA	> 25%. Técnica de Farr o por encima del valor habitual del laboratorio.
1		Fiebre	> 38°C. Excluir infección.
1		Trombopenia	< 100.000 plaquetas/mm3.
1		Leucopenia	< 3.000 células/mm3. Excluir fármacos.
PUNTUACION TOTAL		<i>Nota: puntúa en la escala SLEDAI si el descriptor está presente en el día de la visita o 10 días antes.</i>	

Listado de genes por cada placa de 96 pocillos *MiRCURY LNA miRNA focus PCR Urine Exosome Panel*

Nombre microRNA	Orden en la placa (fila)	Orden en la placa (columna)	Posición en el panel	Secuencia diana	LNA PCR primer set, Product No	Tipo de ensayo
hsa-let-7a-5p	1	1	A01	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	YP00205727	GOI
hsa-let-7b-5p	2	9	A02	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	YP00204750	GOI
hsa-let-7d-3p	3	17	A03	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU	YP00205627	GOI
hsa-let-7d-5p	4	25	A04	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	YP00204124	GOI
hsa-let-7e-5p	5	33	A05	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	YP00205711	GOI
hsa-let-7f-5p	6	41	A06	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	YP00204359	GOI
hsa-let-7g-5p	7	49	A07	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	YP00204565	GOI
hsa-let-7i-5p	8	57	A08	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	YP00204394	GOI
hsa-miR-10a-5p	9	65	A09	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	YP00204778	GOI
hsa-miR-10b-5p	10	73	A10	UACCCUGUAGAACGAAUUUGUG	YP00205637	GOI
hsa-miR-15a-5p	11	81	A11	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	YP00204066	GOI
UniSp3 IPC	12	89	A12	0	YP02119288	IPC
hsa-miR-15b-5p	13	2	B01	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	YP00204243	GOI
hsa-miR-16-5p	14	10	B02	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	YP00205702	GOI
hsa-miR-17-5p	15	18	B03	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	YP02119304	GOI
hsa-miR-20a-5p	16	26	B04	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	YP00204292	GOI
hsa-miR-21-5p	17	34	B05	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	YP00204230	GOI
hsa-miR-22-3p	18	42	B06	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	YP00204606	GOI
hsa-miR-22-5p	19	50	B07	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA	YP00204255	GOI
hsa-miR-23a-3p	20	58	B08	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	YP00204772	GOI
hsa-miR-23b-3p	21	66	B09	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	YP00204790	GOI
hsa-miR-24-3p	22	74	B10	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	YP00204260	GOI
hsa-miR-25-3p	23	82	B11	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	YP00204361	GOI
UniSp6 CP	24	90	B12	0	YP00203954	Spike
hsa-miR-26a-5p	25	3	C01	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	YP00206023	GOI
hsa-miR-26b-5p	26	11	C02	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	YP00204172	GOI
hsa-miR-27a-3p	27	19	C03	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	YP00206038	GOI
hsa-miR-27b-	28	27	C04	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	YP00205915	GOI

3p						
hsa-miR-29a-3p	29	35	C05	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	YP00204698	GOI
hsa-miR-29b-3p	30	43	C06	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	YP00204679	GOI
hsa-miR-29c-3p	31	51	C07	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	YP00204729	GOI
hsa-miR-30a-5p	32	59	C08	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	YP00205695	GOI
hsa-miR-30b-5p	33	67	C09	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	YP00204765	GOI
hsa-miR-30c-5p	34	75	C10	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	YP00204783	GOI
hsa-miR-30d-5p	35	83	C11	UGUAAACAUCCCGACUGGAAG	YP00206047	GOI
UniSp3 IPC	36	91	C12	0	YP02119288	IPC
hsa-miR-30e-3p	37	4	D01	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC	YP00204410	GOI
hsa-miR-30e-5p	38	12	D02	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG	YP00204714	GOI
hsa-miR-31-3p	39	20	D03	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU	YP00204079	GOI
hsa-miR-31-5p	40	28	D04	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	YP00204236	GOI
hsa-miR-34a-5p	41	36	D05	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	YP00204486	GOI
hsa-miR-92a-3p	42	44	D06	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	YP00204258	GOI
hsa-miR-93-5p	43	52	D07	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	YP00204715	GOI
hsa-miR-99a-5p	44	60	D08	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	YP00204521	GOI
hsa-miR-99b-5p	45	68	D09	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	YP00205983	GOI
hsa-miR-101-3p	46	76	D10	UACAGUACUGUGAUAACUGAA	YP00204786	GOI
hsa-miR-103a-3p	47	84	D11	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	YP00204063	GOI
UniSp3 IPC	48	92	D12	0	YP02119288	Spike
hsa-miR-106a-5p	49	5	E01	AAAAGUGC UUACAGUGCAGGUAG	YP00204563	GOI
hsa-miR-106b-5p	50	13	E02	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	YP00205884	GOI
hsa-miR-107	51	21	E03	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA	YP00204468	GOI
hsa-miR-125b-5p	52	29	E04	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	YP00205713	GOI
hsa-miR-126-3p	53	37	E05	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	YP00204227	GOI
hsa-miR-128-3p	54	45	E06	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	YP00205995	GOI
hsa-miR-133a-3p	55	53	E07	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	YP00204788	GOI
hsa-miR-135b-5p	56	61	E08	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA	YP00204130	GOI

hsa-miR-141-3p	57	69	E09	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	YP00204504	GOI
hsa-miR-145-5p	58	77	E10	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	YP00204483	GOI
hsa-miR-148a-3p	59	85	E11	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	YP00205867	GOI
hsa-miR-148b-3p	60	93	E12	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	YP00204047	GOI
hsa-miR-149-5p	61	6	F01	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	YP00204321	GOI
hsa-miR-151a-5p	62	14	F02	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	YP00204007	GOI
hsa-miR-181a-5p	63	22	F03	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	YP00206081	GOI
hsa-miR-187-3p	64	30	F04	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	YP00204018	GOI
hsa-miR-191-5p	65	38	F05	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	YP00204306	GOI
hsa-miR-193b-3p	66	46	F06	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	YP00204226	GOI
hsa-miR-195-5p	67	54	F07	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	YP00205869	GOI
hsa-miR-197-3p	68	62	F08	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	YP00204380	GOI
hsa-miR-200a-3p	69	70	F09	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	YP00204707	GOI
hsa-miR-200b-3p	70	78	F10	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA	YP00206071	GOI
hsa-miR-200c-3p	71	86	F11	UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA	YP00204482	GOI
hsa-miR-203a	72	94	F12	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	YP00205914	GOI
hsa-miR-204-5p	73	7	G01	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	YP00206072	GOI
hsa-miR-210-3p	74	15	G02	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	YP00204333	GOI
hsa-miR-221-3p	75	23	G03	AGCUACAUGUCUGCUGGGUUUC	YP00204532	GOI
hsa-miR-222-3p	76	31	G04	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	YP00204551	GOI
hsa-miR-301a-3p	77	39	G05	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGC	YP00205601	GOI
hsa-miR-342-3p	78	47	G06	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	YP00205625	GOI
hsa-miR-365a-3p	79	55	G07	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU	YP00204622	GOI
hsa-miR-375	80	63	G08	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	YP00204362	GOI
hsa-miR-378a-3p	81	71	G09	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	YP00205946	GOI
hsa-miR-423-3p	82	79	G10	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	YP00204488	GOI
hsa-miR-423-5p	83	87	G11	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	YP00205624	GOI
hsa-miR-425-5p	84	95	G12	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	YP00204337	GOI

Anexo 4

hsa-miR-429	85	8	H01	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU	YP00205901	GOI
hsa-miR-500a-5p	86	16	H02	UAAUCCUUGCUACCUGGGUGAGA	YP00204794	GOI
hsa-miR-532-5p	87	24	H03	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	YP00204221	GOI
hsa-miR-574-3p	88	32	H04	CACGCUCAUGCACACACCCACA	YP00206011	GOI
hsa-miR-582-5p	89	40	H05	UUACAGUUGUUCAACCAGUUACU	YP00204254	GOI
hsa-miR-598-3p	90	48	H06	UACGUCAUCGUUGUCAUCGUCA	YP00204320	GOI
hsa-miR-660-5p	91	56	H07	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG	YP00205911	GOI
cel-miR-39-3p CP	92	64	H08	0	YP00203952	Spike
UniSp2 CP	93	72	H09	0	YP00203950	Spike
UniSp4 CP	94	80	H10	0	YP00203953	Spike
UniSp5 CP	95	88	H11	0	YP00203955	Spike
Blank (H20)	96	96	H12	#N/A	Empty	