



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

**“MASTOCITOS Y MACRÓFAGOS COMO  
MARCADORES HISTOLÓGICOS TEMPRANOS EN  
NEFROPATÍA LÚPICA”**

**TESIS PRESENTADA PARA CUMPLIR CON LOS REQUISITOS DE TITULACIÓN DE LA  
SUBESPECIALIDAD EN:**

**REUMATOLOGÍA**

**ALUMNA: MARYSOL LENDECHY VELÁZQUEZ**

**TUTORA: DRA. JUANITA ROMERO DÍAZ**

**MÉXICO, D.F JULIO-AGOSTO 2014**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Dr. Sergio Ponce de León Rosales**  
**Director de Enseñanza**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador**  
**Zubirán”**

**Dr. Jorge Alcocer Varela**  
  
**Jefe de Departamento de Inmunología y Reumatología del**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador**  
**Zubirán”**

**Dra. Juanita Romero Díaz**  
  
**Tutora de Tesis**  
  
**Departamento de Inmunología y Reumatología del**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador**  
**Zubirán”**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi abuela y a mi padre por haberme permitido mirar un camino diferente a pesar de lo complejo y absurdo que pareciera, por siempre tener sus brazos y oídos abiertos a mí, y por enseñarme a amar.

A Uri por acompañarme en este proceso cambiante y hostil.

A mi mamá, hermana y sobrino por alegrarme los días y siempre tener una sonrisa.

A Bombón y a Kifu por siempre acompañarme en el dolor.

A la Dra. Juanita Romero por haberme apoyado en este trabajo, por estar dispuesta a ayudar a los residentes y a los pacientes.

A la Dra. Norma Uribe por ser un ejemplo de perseverancia, honestidad y disponibilidad.



## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. MARCO TEÓRICO	
II.I Historia de la biopsia renal en nefropatía lúpica.....	6
II.II. Nefropatía lúpica	
a) Presentación clínica.....	9
b) Mecanismo de daño.....	10
II.III Mastocitos	
a) Generalidades.....	14
b) Mecanismo de daño.....	15
c) Papel en enfermedades inflamatorias y autoinmunes.....	17
d) Mastocitos, Lupus Eritematoso Generalizado y nefropatía lúpica.....	19
e) Mastocitos en inflamación renal y fibrosis.....	20
f) Identificación histológica de mastocitos.....	22
II.IV. Macrófagos	
a) Generalidades.....	22
b) Papel en enfermedades inflamatorias y autoinmunes.....	26
c) Macrófagos, Lupus Eritematoso Generalizado y nefropatía lúpica.....	27
d) Macrófagos en inflamación renal y fibrosis.....	32
e) Identificación histológica de macrófagos.....	34
III. JUSTIFICACIÓN.....	35
IV. OBJETIVOS.....	36
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
V.I Diseño del estudio.....	37
V.II Tamaño muestral.....	37
V.III Población de estudio.....	37
V.IV Descripción de procedimientos.....	37
V.V Análisis y métodos estadísticos de los datos.....	38
VI. RESULTADOS.....	40
VII. DISCUSIÓN.....	49
VIII.CONCLUSIONES.....	50
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	52

## I. INTRODUCCIÓN

La nefropatía es una de las manifestaciones más comunes, presentándose en el 50-60% de los pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG).

En el grupo GLADEL (Grupo Latinoamericano para el estudio de Lupus), el 51.7% de los pacientes desarrollaron nefropatía lúpica. En esta cohorte, el 58.3% de los lúpicos mestizos, 58.3% de los afrolatinoamericanos y 43.6% de los blancos desarrollaron nefropatía lúpica en algún momento de su evolución<sup>29</sup>.

La sobrevida renal se estima entre el 83 y 92% a 5 años y del 74 al 84% a 10 años<sup>22</sup>.

Aproximadamente del 5 al 15% de los pacientes desarrollan enfermedad renal crónica terminal a 10 años que junto con las infecciones y la enfermedad cardiovascular, son las principales causas de mortalidad en los pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado. La muerte asociada a enfermedad renal ha sido reportada en un 5 a 10%<sup>22</sup>.

En la actualidad se han identificado como factores de mal pronóstico a largo plazo en nefropatía proliferativa : niveles basales elevados de proteinuria y creatinina, *raza hispanoamericana*, la presencia de hipertensión arterial sistémica, niveles altos de actividad y cronicidad, así como hipocomplementemia y niveles elevados de antiDNA de doble cadena (Anti-DNA dc)<sup>22,29</sup>.

Histológicamente, los depósitos subendoteliales son el predictor más fuerte de mal pronóstico, ya que la persistencia en la presencia de la cantidad de depósitos subendoteliales correlaciona con el deterioro de la función renal.

La fibrosis túbulointersticial es la vía final común que lleva a enfermedad renal crónica terminal. La severidad de la inflamación túbulointersticial y fibrosis han sido considerados un determinante crucial a largo plazo para daño renal tanto en humanos como en glomerulonefritis experimental<sup>16</sup>.

Hasta la fecha no se ha estudiado el papel que juega la inmunidad innata en el pronóstico renal, no así la inmunidad humoral a través de la formación de complejos inmunes y de autoanticuerpos.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.I Historia de la biopsia renal

La introducción de la biopsia renal en 1950, la aplicación de inmunofluorescencia y técnicas de microscopía electrónica en 1960, así como el mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos por los que existe daño renal mediado por inmunocomplejos ha permitido reconocer y clasificar los diversos patrones de daño renal en LEG<sup>41</sup>.

Fue en 1964 cuando se reconocieron tres tipos diferentes de daño glomerular: Glomerulonefritis (GMN) proliferativa focal y segmentaria, GMN proliferativa difusa y la GMN membranosa. Para 1970 se identificaron los otros dos patrones restantes: GMN mesangial tipo I y tipo II<sup>41</sup>.

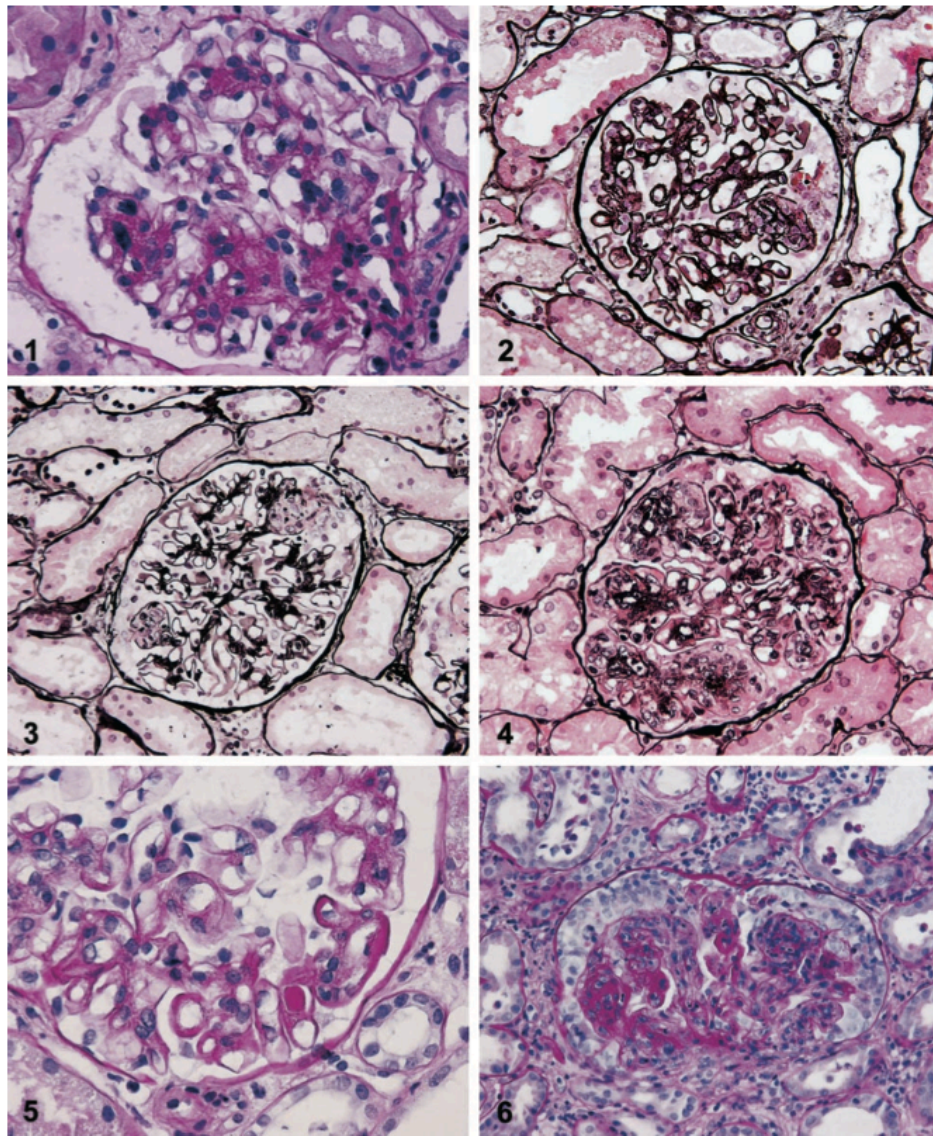
La primera clasificación reconocida por la OMS fue en 1974, formulada por Pirani y Pollak en Nueva York. Ya se incluían las cinco formas de GMN, sin embargo no se agregó a la descripción histopatológica la afección túbulointersticial o vascular, específicamente se describían las lesiones glomerulares<sup>41</sup>.

Desde 1974, la clasificación ha sufrido modificaciones y las más importantes fueron las de 1982 y 1995. La clasificación histopatológica vigente es la del 2003, la cual fue aprobada por la ISN/RPS( International Society on Nephrologist/ Renal Pathology Society). En la cual como se podrá observar que además de incluirse el tipo de afección glomerular (Tabla 1), se estratifica a la actividad y a la cronicidad tanto en glomérulo como en túbulointersticio (Tabla 2), teniendo como puntaje máximo de actividad 24 y de cronicidad 12. En la Figura 1 se muestran los cambios glomerulares por microscopía de luz.

**Tabla 1. Clasificación de nefropatía lúpica de 2003 por ISN/RPS<sup>41</sup>**

Clase de GMN	Descripción
I	Nefropatía lúpica mínima mesangial
II	Nefropatía lúpica mesangial proliferativa
III	Nefropatía lúpica focal III (A): Lesiones activas III (A/C): Lesiones activas y crónicas III (C) : Lesiones crónicas
IV	Nefropatía lúpica difusa segmentaria (IV-S) o global (IV-G) IV (A): Lesiones activas IV (A/C): Lesiones activas y crónicas IV (C): Lesiones crónicas
V	Nefropatía lúpica membranosa
VI	Nefropatía lúpica esclerosante ( > 90% de esclerosis glomerular)

Difusa: lesión que envuelve más del 50% de los glomérulos. Focal: lesión que envuelve a menos del 50% de los glomérulos. Global: Lesión que envuelve más del 50% del penacho glomerular. Segmentaria: Lesión que envuelve menos del 50% del penacho glomerular.



**Figura 1.** Recuadro 1 nefropatía clase II con microfotografía de luz que muestra un glomérulo con hiper celularidad mesangial mínima ( PAS). Recuadro 2: nefropatía clase III por microfotografía de luz se observa un glomérulo con hiper celularidad endocapilar segmentaria, hiper celularidad mesangial, engrosamiento de la pared capilar y necrosis segmentaria de capilares ( Metenamina de plata). Recuadro 3: Nefropatía clase III: microfotografía de luz que muestra un glomérulo con necrosis capilar segmentaria y lesión vascular ( Metenamina de plata). Recuadro 4: Nefropatía clase IV-G (A): Glomérulo con afectación global , hiper celularidad mesangial y endocapilar, así como expansión de matriz, infiltración leucocitaria ( Metenamina de plata). Recuadro 5: Nefropatía lúpica IV-S (A): Hiper celularidad endocapilar, asas de alambre y trombos hialinos (PAS). Recuadro 6: Nefropatía lúpica clase IV-G (A/C): proliferación endoy extracapilar, asas de alambre, infiltración leucocitaria, cuerpos apoptóticos, necrosis capilar, expansión mesangial con hiper celularidad y expansión de matriz (PAS)

**Tabla 2. Grado de actividad y cronicidad en nefropatía lúpica<sup>41</sup>**

	<b>Actividad</b>	<b>Cronicidad</b>
<b>Lesiones glomerulares</b>	Proliferación celular <b>0-3</b> Necrosis/Cariorraxis <b>(0-3) x2</b> Trombos hialinos <b>(0-3) x2</b> Medias lunas celulares <b>0-3</b> Infiltración leucocitaria <b>0-3</b>	Glomérulos escleróticos <b>0-3</b> Medias lunas fibrosas <b>0-3</b>
<b>Lesiones tubulointersticiales</b>	Infiltración mononuclear <b>0-3</b>	Fibrosis intersticial <b>0-3</b> Atrofia tubular <b>0-3</b>

Como podemos observar la infiltración leucocitaria forma parte de la actividad de la enfermedad, pero específicamente de la infiltración por los monocitos, dejando a un lado a una subpoblación de leucocitos que han mostrado tener un papel muy importante en otras enfermedades renales como lo son los macrófagos y los mastocitos; de los cuales hablaremos ampliamente.

La biopsia renal es esencial para determinar el tipo de afección renal, ya que esta significativamente influencia el manejo del paciente. La mayoría de los pacientes con Lupus, manifiesta alguna anormalidad en la biopsia renal, bien sea por microscopía de luz, inmunofluorescencia o microscopía electrónica<sup>41</sup>.

Según la American College of Rheumatology(ACR)<sup>7</sup>, sugiere como definición de caso de glomerulonefritis lúpica a las manifestaciones clínicas y de laboratorio siguientes: proteinuria persistente >500 mg/día o mayor a 3+ por tira reactiva y/o cilindros( hemáticos, granulares, tubulares o mixtos). En este mismo contexto la ACR, ha sugerido intercambiar una relación proteinuria/creatinuria de una muestra aislada mayor a 0.5 pudiendo ya ser sustituida por la recolección de orina de 24 horas; ahora el sedimento activo se define como más de 5 eritrocitos por campo, más de 5 leucocitos por campo en ausencia de infección y son substituidos por los cilindros. Sin embargo el criterio óptimo es una biopsia renal compatible con glomerulonefritis lúpica.

La mesa de trabajo de las guías realizadas por la ACR **recomiendan** que todos los pacientes con evidencia clínica de nefropatía lúpica activa, previamente no tratados, se les deberá realizar biopsia renal; a menos que exista una contraindicación y que las lesiones glomerulares deberán

ser clasificadas de acuerdo a la clasificación vigente del 2003. Además de todo lo anterior, se deberá evaluar la actividad y cronicidad, así como los cambios tubulares y vasculares.

Las indicaciones actuales para toma de biopsia renal en pacientes con Lupus según la ACR son las siguientes:

1. Incremento en la creatinina sin causa explicable ( sepsis, hipovolemia o medicamentos)
2. Proteinuria mayor a 1 g en orina de 24 horas o relación proteinuria/creatinuria mayor a 1.
3. Combinación de los siguientes en al menos dos ocasiones en un periodo de tiempo corto y sin otra causa identificable:
  - A) Proteinuria > 0.5 g/24 horas y hematuria (>5 eritrocitos PC)
  - B) Proteinuria > 0.5 g/24 horas y cilindros celulares

Según las guías de la EULAR<sup>2</sup>( European League of Rheumatology) debemos de tener un umbral bajo para considerar la realización de una biopsia renal, debido a la alta morbilidad asociada a esta manifestación. La indicación específica para estas guías es la 3 de la ACR.

## **II.II Nefropatía lúpica.**

### **a) Presentación clínica**

La presentación clínica de la glomerulonefritis no siempre predice los cambios histopatológicos. Esta aseveración es particularmente cierta para aquellos pacientes que están bajo tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad.

En el caso de la GMN I y II se presentan generalmente con proteinurias leves ( < 1g/día) con hematuria, pero sin cilindros.

Los pacientes que tienen GMN proliferativas ( III y IV) se presentan con hipertensión, sedimento urinario con cilindros hemáticos, con grados variables de proteinuria, niveles bajos de C3 y anti-DNA dc en títulos altos.

En el caso de la GMN V tienen proteinuria en rangos nefróticos y sedimentos activos, además de niveles de C3 normales y cuando el antiDNA dc es presente, lo está en títulos bajos.

Con lo previamente conocido en relación al comportamiento clínico de cada una de las variedades histopatológicas, el clínico actualmente tiene la capacidad de identificar el tipo de GMN presente;

poniéndolo en una gran ventaja para el inicio del tratamiento de forma oportuna, incluso sin biopsia renal.

Sin embargo, esto no es del todo cierto ya que la nefropatía lúpica no sólo se presenta como la glomerulonefritis reconocida por la OMS y por la ISN/RNP. Además de la afección propiamente glomerular, la afección renal se puede manifestar por nefritis intersticial, afección tubular, microangiopatía trombótica, vasculitis, arterioesclerosis y vasculopatía lúpica o secundaria a otras comorbilidades. Estos patrones de daño renal en los pacientes con lupus pueden parecerse mucho en la presentación clínica y no ser glomerulonefritis lúpica.

### **Nefropatía lúpica.**

#### **b) Mecanismos de daño tisular**

Mucho de lo que actualmente conocemos acerca de la patogenia de la nefritis lúpica es derivada de estudios en modelos murinos, con confirmación posible en humanos. Estos estudios utilizan modelos multigénicos de Lupus (MRL/lpr, NZB/NZW y NZM) y algunos mutados para genes (Knock-outs para DNAsa, Nrf2 y FC $\gamma$  R). Estos modelos comparten características de enfermedades en humanos tales como anticuerpos anti-DNA<sub>dc</sub> y nefritis proliferativa, pero difieren en sus citocinas renales, perfil de quimiocinas, infiltración celular y actividad y cronicidad de la enfermedad<sup>27</sup>.

#### **b1) Autoanticuerpos y depósito de inmunocomplejos en el riñón**

La presencia de autoanticuerpos es un requisito para el desarrollo de nefritis lúpica. Los anticuerpos contra el DNA de doble cadena (antiDNA<sub>dc</sub>) y los anticuerpos antinucleosomas; son los que más estrechamente se encuentran implicados en el desarrollo de glomerulonefritis lúpica. Los antiDNA<sub>dc</sub> se depositan como complejos inmunes. Cuando los anticuerpos anti-C1q se encuentran con los antiDNA<sub>dc</sub>, el desarrollo de la enfermedad renal se ve acelerada<sup>27</sup>.

Existen tres mecanismos propuestos para la formación de complejos inmunes glomerulares: 1) Depósito de inmunocomplejos preformados 2) Unión de autoanticuerpos a antígenos glomerulares *in situ* tales como laminina, anexina II o heparina y 3) anticuerpos antiDNA<sub>dc</sub>/ cromatina se unen a los nucleosomas/DNA presentes en la matriz glomerular<sup>27</sup>.

## **b2) El complemento**

El complemento tiene un rol dual en Lupus. El depósito de proteínas del complemento en el glomérulo es un punto clave para el inicio de la glomerulonefritis lúpica. Existe fuerte evidencia que la activación del complemento es deletérea en la nefropatía lúpica<sup>27</sup>.

Los individuos deficientes en los componentes C1, C2 y C4 tienen una alta prevalencia de Lupus debido a alteración en el aclaramiento de inmunocomplejos, y de cuerpos apoptóticos llevando a la pérdida de la tolerancia<sup>27</sup>.

Estudios recientes sugieren que la vía alterna del complemento es un factor importante para el daño mediado por el complemento en nefritis. Bloquear la vía alterna ya sea genéticamente o farmacológicamente lleva a disminución importante de la severidad en la nefropatía tal como se ha demostrado en modelos murinos<sup>27</sup>.

Eliminar el factor inhibidor natural del complemento, el factor H, lleva a la aceleración de enfermedad renal similar al Lupus. La inhibición farmacológica de la vía alterativa es efectiva en los modelos murinos MRL/lpr y NZM cogénico<sup>27</sup>.

El complemento puede también jugar un papel importante en el daño tubular en Lupus. El desarrollo de proteinuria lleva a desecho de los componentes del complemento en la orina. El C3 es activado en la orina vía pH y urea, resultando en la formación de complejo de ataque a la membrana en el lado epitelial de las células tubulares; resultando en un desenfrenado daño tubular.

## **b3) Receptores Fc $\gamma$ y receptores tipo Toll (TLR)**

Otro de los mecanismos por los cuales los inmunocomplejos pueden llevar al daño tisular es mediante la activación de Fc $\gamma$ Rs, mediante la unión de Fc de Inmunoglobulinas por la expresión de Fc $\gamma$ R en las células. En modelos murinos Knock out específicamente para Fc $\gamma$ R puede llevar a la atenuación o disminución de la enfermedad<sup>27</sup>.

El Fc $\gamma$ R pudiera ser importante en la asociación a los TLR en mediar la inflamación renal inducida por inmunocomplejos. Como se ha podido observar, los inmunocomplejos que contienen antiDNA<sub>dc</sub> pueden activar las células residentes del riñón vía coseñalización de la activación de



Fc $\gamma$ R vía autoanticuerpos y activación de TLR9 ó 7. La inhibición de TLR 7/9 es efectiva en el tratamiento de modelos murinos de Lupus, a nivel de autoinmunidad sistémica o bloqueando específicamente el daño en el tejido renal<sup>27</sup>.

#### **b4) Citocinas y quimiocinas**

La producción de citocinas y quimiocinas en el glomérulo durante la nefropatía lúpica precede a la infiltración y proteinuria. Las citocinas dependientes de Th1 se encuentran predominantemente en los riñones de pacientes con nefropatía lúpica. Dentro de estas citocinas se incluyen IL-12, IL-18 e INF  $\gamma$ .

Niveles elevados de IL-12, IL-18 e INF  $\gamma$  se han demostrado en pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado al compararlos con controles sanos y específicamente con pacientes con nefropatía lúpica y Lupus Eritematoso Generalizado sin nefropatía. Niveles de IL-12 en orina correlacionan con el inicio y severidad de la nefritis. El mayor mecanismo de daño renal por IL-18 e IL-12 es probablemente a través de la regulación de INF  $\gamma$ <sup>27</sup>.

Las quimiocinas contribuyen al daño renal reclutando células inflamatorias al riñón. Las quimiocinas proinflamatorias y los factores de crecimiento incluyen a MCP1, CCL2, CCL4, CCL5, factor estimulante de macrófagos y CXCL10, se han demostrado regulado a la alta en riñones de ratones propensos a desarrollar glomerulonefritis lúpica previo a la proteinuria y al daño renal. Su expresión a sido seguida por infiltración mononuclear e incremento en la expresión de sus respectivos receptores.

#### **b5)Factores de transcripción**

Los traductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) son parte de la familia de los JAK/STAT.

STAT1 cuando se activa, se une a secuencias de INF $\gamma$  en los promotores de genes inducibles por IFN e inducen la activación de STAT1 en las células mesangiales de ratones MRL/Lpr. La expresión de niveles de STAT1 se encuentra presente en riñones de ratones con nefritis lúpica con expresión predominante en el glomérulo.

STAT 4 se ha identificado como un gen de riesgo de Lupus. Un polimorfismo identificado en STAT4 se ha asociado a antiDNAdc y a nefritis lúpica severa en humanos<sup>27</sup>.

## **b6) Intermediarios reactivos del daño tisular**

Múltiples estudios han utilizado inhibidores competitivos de iNOS( sintasa de óxido nítrico inducible) y estos sugieren que iNOS es patogénico en modelos murinos de Lupus. Al inhibir la actividad de iNOS en ratones MRL/lpr, antes del inicio de la enfermedad, con el análogo no específico de la arginina reduce la formación de 3-nitrotirosina en el riñón, parcialmente restaurando la actividad de la catalasa renal, inhibiendo la proliferación celular y la necrosis en el glomérulo.

En pacientes con Lupus los marcadores sistémicos de sobreproducción de óxido nítrico se encuentran elevados. Aquellos pacientes con glomerulonefritis lúpica tienen los niveles más elevados al compararlos con pacientes con Lupus sin glomerulonefritis. Esta observación abre la hipótesis de que las lesiones proliferativas renales son fuente de producción de óxido nítrico. Estudios han demostrado esto mediante biopsias renales con expresión de iNOS en el glomérulo; estos hallazgos particularmente presentes en células mesangiales, células glomerulares epiteliales y células infiltrativas inflamatorias<sup>27</sup>.

## **b7) Células de la respuesta inmune**

Posterior a la formación o depósito de inmunocomplejos en el riñón, las interacciones con las células residentes y las células inflamatorias promueven daño tisular.

Citocinas locales, quimiocinas y moléculas de adhesión llevan a un influxo de células inflamatorias y producción de citocinas proinflamatorias, dando como resultado final inflamación renal, daño tisular y fibrosis.

Linfocitos T: Activan y ayudan a promover la producción de anticuerpos nefritogénicos por los linfocitos B, reclutamiento de macrófagos y células dendríticas, así como producción de citocinas proinflamatorias.

Linfocitos B: tienen una variedad de funciones, en primer lugar la producción de autoanticuerpos que pueden causar daño renal por disrupción de las funciones celulares, citotoxicidad mediada por interacciones con el complemento y liberación de mediadores inflamatorios.

Neutrófilos, macrófagos y células dendríticas presentes en nefropatía lúpica son contribuyentes importantes para el daño.

A continuación ahondaremos a cerca de dos células de la respuesta inmune innata: **mastocitos** y **macrófagos**, que son parte de nuestro trabajo de investigación.

### **II.III Mastocitos**

#### **a) Generalidades**

Los mastocitos son células derivadas de progenitores hematopoyéticos CD34+, y circulan en la sangre en su forma inmadura. Sólo después de haber establecido su residencia en un tejido en particular, completan su diferenciación y maduración. Sin embargo en condiciones normales no existen mastocitos circulantes<sup>3,32</sup>.

Son considerados primera línea de defensa en contra de infecciones debido a la prevalencia en tejidos tales como piel, intestino, tracto respiratorio y urinario los cuales forman las barreras entre lo propio y el ambiente. Su localización anatómica les permite contribuir a una multitud de eventos patológicos y protectores incluyendo la angiogénesis, exacerbación de inflamación y curación de heridas<sup>3,32</sup>.

Los mastocitos son capaces de influenciar una amplia variedad de eventos fisiológicos, siendo estos activados por estímulos inmunes o no inmunes.

La activación de los mastocitos se lleva a cabo mediante dos mecanismos<sup>32,40</sup>.

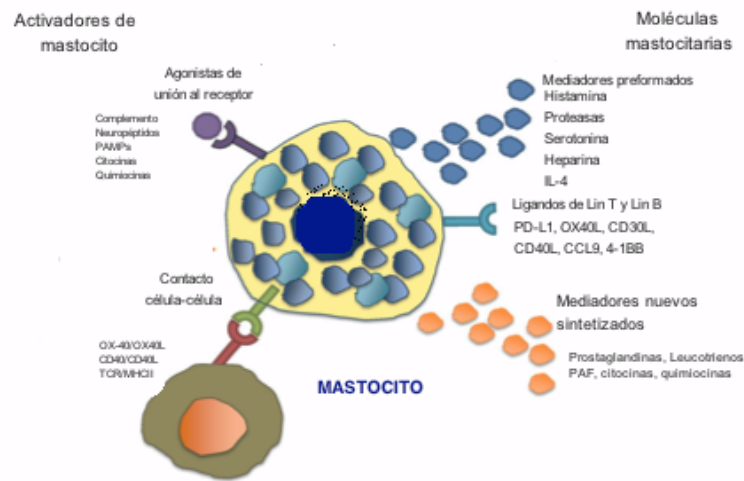
1. Por el entrecruzamiento de las moléculas  $Fc\epsilon$ , lo que sucede mediante la unión de antígenos multivalentes a las moléculas de IgE fijadas a la célula.
2. A través del complemento y de los receptores tipo toll (TLR)

La función de hipersensibilidad se ve mediada por  $Fc\epsilon RI$  (receptor de alta afinidad de la IgE). Los mastocitos residentes de tejido son la población con mayor expresión de  $Fc\epsilon RI$ .

Estas células del sistema inmune, tienen su mayor papel posterior a que el Linfocito T responde a un alérgeno, generando consecuentemente una respuesta Th2 y producción de IL-4. La IL-4 posteriormente estimula un cambio de isotipo del linfocito B a IgE. Los anticuerpos alérgeno-específicos IgE se unen al receptor de alta afinidad IgE ( $Fc\epsilon RI$ ), mecanismo por el cual al mastocito se encuentra listo para la degranulación y la activación para el encuentro subsecuente con el antígeno. Esta activación dependiente de IgE es utilizada por las reacciones de hipersensibilidad<sup>3,32,33,40</sup>.

Estas células también son activadas por componentes del complemento, neuropéptidos y hormonas que participan en las respuestas al estrés, así como por bacterias y virus a través de los TLR, resultando en un incremento en la expresión de moléculas de superficie celular que pueden modular la función de los linfocitos T y de las células dendríticas.

Los mastocitos se encuentran caracterizados por la presencia de numerosos gránulos en su citoplasma que contienen una plétora de mediadores proinflamatorios preformados que son liberados posteriormente a su activación. De todos ellos, la histamina es la más reconocida y dentro de otros mediadores se incluyen: leucotrienos(LTB4), prostaglandinas (PGE2 y PGD2), proteasas( triptasa) y algunas citocinas( FNT $\alpha$  e IL-4). Figura 2



**Figura 2**

La función principal de éstas, es participar en las reacciones de hipersensibilidad inmediata y de alergia, junto con los basófilos y eosinófilos.

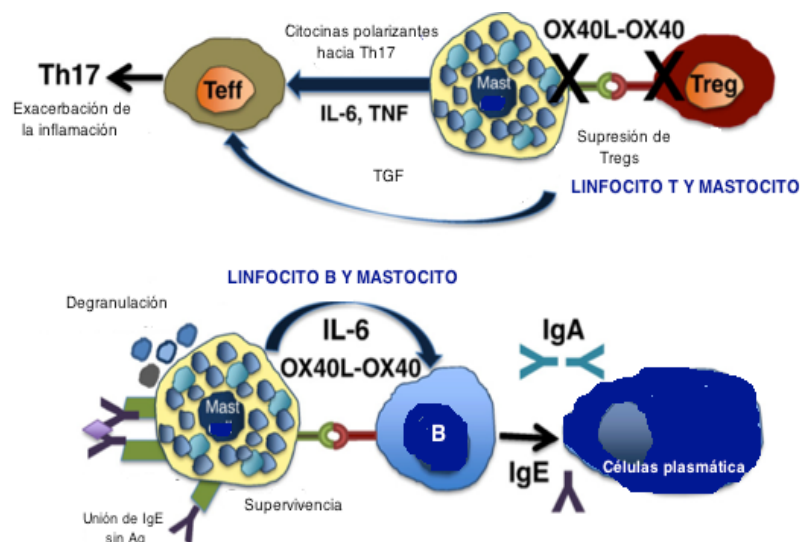
**b) Mecanismos de daño de los mastocitos**

**Interacciones con mastocitos y Tregs ( Linfocitos T reguladores)**

Anatómicamente los mastocitos y las Tregs se encuentran en estrecha proximidad en los órganos linfáticos secundarios, por lo tanto no es sorprendente que sus interacciones resulten en efectos funcionales<sup>39</sup>.

El eje OX40-OX40L es tal vez el determinante molecular más fuertemente definido en la interacción Tregs-mastocitos. Siendo la expresión constitutiva de OX40L en los mastocitos y de OX40 en las Tregs. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que las Tregs son capaces de regular a la baja la expresión FcεRI e inhibir la degranulación dependiente de FcεRI. Al contrario, los mastocitos pueden revertir la supresión de las Teff (efectoras) a través de las Tregs y disminuir la susceptibilidad de las Teff a la supresión de las Tregs<sup>40</sup>.

Los mastocitos también pueden suprimir las funciones de las Tregs por un mecanismo independiente de OX40L-OX40. La degranulación de los mastocitos disparada por IgE y antígenos lleva a la pérdida transitoria de regulación de las Tregs resultando en alteración en la tolerancia periférica, existe evidencia clara que la histamina es responsable de este efecto (**Figura 3**)



**Figura 3**

### Interacciones con mastocitos y plasticidad Th17-Tregs

Bajo ciertos estímulos, los mastocitos expresan IL-6, IL-21, IL-23 y TGFβ que regulan la diferenciación de las Tregs a un fenotipo Th17. Estos efectos se han visto principalmente en tumores donde los mastocitos productores de IL-6 contribuyen a la diferenciación hacia Th17 perpetuando la inflamación. (**Figura 3**)

## **Mastocitos y linfocitos B**

Los mastocitos expresan un número elevado de moléculas moduladoras de linfocitos B, tales como receptores de Ig sugiriendo una conexión íntima entre estos dos tipos de células. La IgE monomérica unida a Fc $\epsilon$ RI sin antígeno promueve la supervivencia y cebamiento de los mastocitos. Además de Fc $\epsilon$ RI, los mastocitos de modelos murinos y humanos expresan receptores IgG Fc $\gamma$ RII y III. Cuando estos se encuentran con el antígeno, se potencia la degranulación de los mastocitos. Fc $\gamma$ RII y III son importantes en enfermedades autoinmunes clasificadas como del tipo II y III, dentro de las cuales se incluye al Lupus Eritematoso Generalizado, Artritis Reumatoide y pénfigo vulgar. Niveles bajos de mastocitos son efectivos en promover la supervivencia del linfocito B y de la proliferación *in vitro*. Los mastocitos también promueven la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas CD138+ y en selección de secreción de IgA. Todos estos efectos son dependientes de Il-6 derivado de mastocitos y la expresión de CD40/CD40L en los linfocitos B y mastocitos, respectivamente<sup>40</sup>. **(Figura 3)**

### **c)Papel de los mastocitos en enfermedades inflamatorias y autoinmunes**

El papel central de los mastocitos en asma, alergia, hipersensibilidad y reacciones anafilácticas ha sido el más ampliamente estudiado y por lo tanto no ahondaremos en ello.

Los mecanismo específicos por los cuales los mastocitos tienen un papel en la autoinmunidad, no está del todo entendido. Sin embargo como se mencionó en los párrafos anteriores, las investigaciones previas parecen mostrar que las alteraciones en las interacciones del mastocito con otros componentes de la inmunidad humoral o celular, son las causantes del desarrollo de autoinmunidad y enfermedad autoinmune. A continuación hablaremos de las enfermedades en las cuales se ha encontrado un papel importante a los mastocitos<sup>40</sup>.

### **Enfermedades autoinmunes tipo II**

Las enfermedades correspondientes a este grupo en las cuales se ha encontrado papel importante de los mastocitos son dos: Enfermedad de Graves ( particularmente oftalmopatía tiroidea) y pénfigo vulgar.

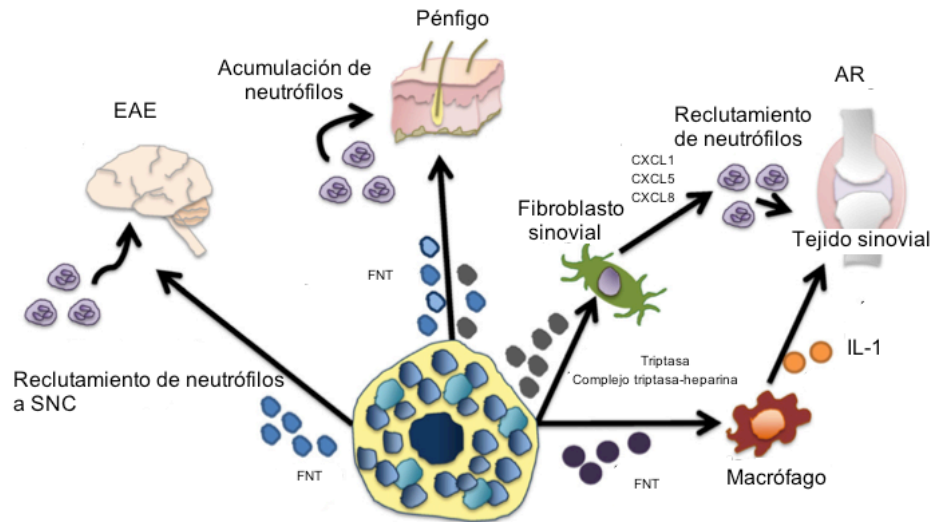
### **Enfermedades autoinmunes tipo III**

Las enfermedades correspondientes a este grupo se incluyen: Artritis reumatoide y Lupus Eritematoso Generalizado, de este último ahondaremos más adelante.

En Artritis reumatoide , existe evidencia de que citocinas y proteasas producidas por los mastocitos, notablemente FNT, IL-1 $\beta$ , IL-17 y triptasa están íntimamente envueltas. Incluso actualmente se sabe que la mayor fuente de IL-17 en sinovia humana es de mastocitos. La triptasa derivada de mastocitos expresada dentro de la sinovia puede formar complejos con heparina y actuar como RASf para regular a la alta quimiotaxis de neutrófilos, sugiriendo un rol indirecto de reclutamiento de neutrófilos<sup>36</sup>. Además de lo anterior, la activación del receptor activador de proteasas mediado por la activación de triptasa en las células sinoviales, incrementa la permeabilidad vascular y la inflamación en la articulación y puede inhibir la apoptosis mediada por Fas contribuyendo a hiperplasia de fibroblastos y daño articular.

### **Enfermedades autoinmunes tipo IV**

En los últimos años ha existido suficiente cuerpo de evidencia que indica un papel importante de los mastocitos en la encefalomiелitis autoinmune (modelo murino para esclerosis múltiple). Los mastocitos residen en el sistema nervioso central próximos a los nervios y vasos sanguíneos. En encefalomiелitis autoinmune aguda el porcentaje de mastocitos degranulados incrementa con el inicio de los síntomas. Una correlación entre los números de mastocitos y susceptibilidad a la enfermedad en varios modelos murinos existe. La primer prueba de este fenómeno fue en el 2000 mediante el modelo murino deficiente en mastocitos *c-kit* *W/W<sup>v</sup>*, experimentó un retraso en la enfermedad y disminución de la severidad de la misma. En la esclerosis múltiple este fenómeno se ve apoyado por niveles elevados de triptasa en el líquido cefalorraquídeo.



**Figura 4**

Otras patologías a las que se ha asociado son : Diabetes mellitus 1, Guillain-Barré y Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

El predominante sentido alrededor de los mastocitos es que facilitan el desarrollo de respuestas inmunes e inflamación a diversos niveles, y esta inflamación puede ser fibrogénica.

#### **d) Mastocitos , Lupus Eritematoso Generalizado y Nefritis lúpica**

El rol de los mastocitos en Lupus es poco claro. Previamente Hiromura y col<sup>9</sup>. mostraron en biopsias de humanos, que existían infiltrados de mastocitos en glomerulonefritis lúpica ( específicamente en túbulointersticio). Estos estudios fueron corroborados por modelos murinos *Lyn<sup>-/-</sup>*, los cuales desarrollaron inflamación similar a Lupus y mostraron hiperrespuesta mastocitaria. En 2004 Lin<sup>20</sup> y col. Indujeron nefritis lúpica mediante la administración de pristano en un modelo murino deficiente de mastocitos ( *W/W<sup>v</sup>* ) y en un modelo murino silvestre ( no Knock out); en ambos modelos se desarrolló hipergamaglobulinemia, glomerulonefritis lúpica y proteinuria. Este autor concluye que los mastocitos no son requeridos para el desarrollo de glomerulonefritis mediada por anticuerpos. Posterior a este estudio realizado por Lin, no se ha corroborado o demostrado en modelos deficientes de mastocitos si este hallazgo se repitió.

Para 2005 Ravinal y col<sup>31</sup>. publicaron un estudio donde se analizó la infiltración de los mastocitos ( mediante triptasa) en 69 pacientes con glomerulonefritis lúpica, encontrando que su presencia era inexistente en el glomérulo y que en los pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresiva el número era poco y que en pacientes con GMN crónica era alto, lo cual sugiere su papel más



importante en daño crónico(fibrosis) que en agudo( infiltración leucocitaria). En este mismo estudio se encontró una correlación positiva entre la infiltración leucocitaria y la creatinina.

Actualmente no existen modelos murinos o en humanos en los que se haya podido evaluar el papel de los **mastocitos en el túbulointersticio** en etapas tempranas de la nefropatía lúpica.

#### **e) Mastocitos en inflamación renal y fibrosis**

Los mastocitos infrecuentemente se encuentran en el riñón sano, su presencia incrementa significativamente en el escenario de enfermedad renal crónica<sup>11,13,16,32</sup>.

La extensión y la severidad de la fibrosis intersticial y atrofia tubular son los marcadores histológicos más poderosos en glomerulonefritis crónica para el pronóstico a largo plazo<sup>11,13,16,32</sup>.

La inflamación intersticial y la fibrosis se llevan a cabo por una secuencia de eventos que requieren la interacción de leucocitos que infiltran el túbulointersticio. Los eventos más tempranos en este proceso envuelven el reclutamiento leucocitario(incluyendo mastocitos) y la transición epitelio-mesénquima formando fibroblastos. Los estímulos profibróticos incluyen factores de crecimiento clave, dentro de los que se incluyen a: TGF- $\beta$  y factor de crecimiento de fibroblastos, también citocinas inflamatorias y quimiocinas facilitan el reclutamiento y activación leucocitario.

Las células epiteliales tubulares juegan un papel importante en el proceso y en la liberación de enzimas proteolíticas, incluyendo metaloproteasas de matriz, las cuales median el daño fibrogénico.

Los mastocitos elaboran citocinas, quimiocinas y leucotrienos reclutando y activando leucocitos. La degranulación de los mastocitos además, lleva a la liberación de histamina, heparina y citocinas ( particularmente IL-4 y FNT- $\alpha$ , los cuales influyen la función de los fibroblastos)<sup>13</sup>.

La liberación de TGF- $\beta$  ,MMP-9 y una variedad de proteasas, principalmente triptasa y quimasa contribuyen a la fibrinogénesis progresiva. Se cree entonces que las proteasas liberadas por los mastocitos pueden contribuir al remodelamiento y a la fibrosis<sup>32</sup>.

Las proteasas que juegan el papel más importante en el proceso antes señalado son la triptasa, la cual es el factor profibrogénico por excelencia que estimula la síntesis de colágena II por fibroblastos e induce quimiotaxis en los fibroblastos, y la quimasa que libera TGF- $\beta$ . La histamina y la heparina controlan la proliferación de los fibroblastos y estimulan la síntesis de colágeno *in vitro*.

Existen múltiples estudios que muestran que la cantidad de mastocitos en riñones sanos es nula ( 1.6 células/mm<sup>2</sup>) y están localizados en el intersticio. Mientras que en riñones con enfermedad renal crónica independientemente de la etiología; la presencia de mastocitos es muy importante, como se muestra a continuación: nefropatía membranosa<sup>9</sup> (mediana 27.1 células/mm<sup>2</sup>), nefropatía diabética<sup>34</sup> (mediana 21.7 células/mm<sup>2</sup>), rechazo crónico de injerto renal<sup>9</sup> (27.1 células/mm<sup>2</sup>) , toxicidad por ciclosporina<sup>9</sup> (mediana 10.6 células/mm<sup>2</sup>), nefropatía por reflujo vesicoureteral <sup>38</sup> , nefropatía por IgA<sup>5, 17</sup>(21.3±17.7células/mm<sup>2</sup>), asociada a ANCA (18.5±21.1 células/mm<sup>2</sup>)<sup>9</sup>.

En la nefropatía por IgA, Kurusu y col<sup>17</sup>., además de mostrar que los mastocitos estaban presentes en áreas fibróticas, los encontraron en las áreas no fibróticas y fueron factor pronóstico con respecto a la función renal .

La presencia de mastocitos en el riñón se correlaciona cuantitativamente con la fibrosis, como lo demostraron Danilewickz y col<sup>4</sup>. en 42 especímenes de biopsias de GMN mesangiocapilar idiopática tipo I mediante microscopía electrónica, de luz e IFI.

Hirumura et al<sup>9</sup>. estudiaron biopsias de glomerulopatías primarias y secundarias, dentro de las que se incluyeron 15 biopsias de pacientes con nefritis lúpica; demostraron que existía la presencia de mastocitos (12.9± 15.5 células/mm<sup>2</sup>) y que correlacionaba el número de éstos con la creatinina obtenida al momento de la biopsia (r=0.59, p=0.0001) , así como con la intensidad de daño túbulointersticial medido por infiltración leucocitaria(r=0.72,p=<0.0001).

Los mastocitos se encuentran en el túbulo-intersticio del riñón asociado con fibrosis progresiva y falla renal. Dentro de las patologías donde se ha encontrado lo anterior son: enfermedad renal poliquística del adulto ,amiloidosis, nefropatía diabética, nefropatía por IgA<sup>5</sup>, vasculitis sistémicas, toxicidad por inhibidores de calcineurina y rechazo renal.

La intensidad y extensión de daño tubulointersticial es uno de los predictores más fuertes para disminución progresiva de la función renal.

Con todo lo anterior podemos concluir que la presencia de mastocitos en el riñón correlaciona cuantitativamente con la fibrosis, con la disminución progresiva de la tasa de filtrado glomerular y con un pobre pronóstico para la función renal. Sin embargo no parece correlacionar con la proteinuria <sup>6</sup>

#### **f) Identificación histológica de los mastocitos**

Uno de los marcadores más utilizados para identificar a los mastocitos es el azul de toluidina, que reconoce mucopolisacáridos y glucosaminoglucanos, componentes de los gránulos de los mastocitos.

Otra forma de identificar a los mastocitos es mediante la triptasa, el cual es el elemento más abundante en los mastocitos humanos. La triptasa es una proteasa de serina tetramérica con un peso molecular de 134 kD, se compone de 4 monómeros de 32 a 34 kD. Su presencia se encuentra exclusivamente restringida a mastocitos<sup>16</sup>.

Los marcadores de superficie fueron inicialmente descritos por Heneberg, siendo positivas para CD34, Receptor de alta afinidad de IgE, CD25, CD117(c-kit), CD23 y CD203c (para la mayor parte de las poblaciones de mastocitos).

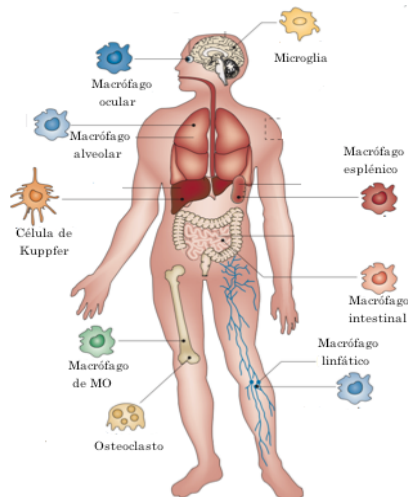
### **II. IV Macrófagos**

#### **a) Generalidades**

Los macrófagos(MΦs) son células efectoras derivadas de los monocitos que se encuentran en la circulación sistémica. Su expansión en los tejidos puede deberse a : proliferación local de células residentes o infiltración desde la circulación; esto depende del estímulo al que son sometidos.

En el riñón existen relativamente pocos macrófagos residentes, y se sabe que los macrófagos de diferentes sitios anatómicos difieren en función, presumiblemente debido a respuestas adaptativas al microambiente<sup>41</sup>.

Los macrófagos residentes de tejidos, toman su nombre dependiendo el sitio donde residan: células de Kuppfer( hígado), macrófagos alveolares (pulmón),microglia( SNC) y osteoclasto( hueso). **Figura 5**



**Figura 5**

Son muchas las funciones que realizan los macrófagos <sup>21,41</sup>:

1. Secreción de citocinas para proteger al huésped.
2. Sirven como células presentadoras de antígenos que muestran antígenos a los linfocitos T y los activan. Esta función es importante en la fase efectora de las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T.
3. Promueven daño y reparo de tejidos al estimular la angiogénesis, y la síntesis de matriz extracelular rica en colágeno (fibrosis). Esta función es mediada por macrófagos residentes del tejido y por citocinas.

Los macrófagos requieren de varios pasos después de la diferenciación de monocitos a macrófagos para poder ejercer sus efectos fisiológicos y fisiopatogénicos, son los siguientes:

- a) Activación
- b) Programación

Hablaremos a continuación de la activación, el paso más importante después de la diferenciación de monocitos a macrófagos para que puedan tener sus propiedades efectoras.

La **activación** de los macrófagos es el elemento clave para iniciar una respuesta inmune eficiente o bien para el reparo de tejido o de la regeneración del mismo. Una amplia variedad de estímulos tales como:

- a) Los patrones de reconocimiento asociados a patógenos (PAMPs) pueden activar a los macrófagos a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) dentro de los cuales se incluyen a los receptores tipo Toll (TLR). Los PAMPs incluyen ligandos naturales de los microbios tales como polisacáridos, peptidoglicanos.

Además de estos ligandos naturales, diversos PPRs interactúan con ligandos derivados del huésped incluyendo proteínas modificadas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas mitocondriales conocidas como patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs).

- b) Complejos inmunes ( inmunoglobulinas, antígenos, componentes del complemento, pentraxinas) frecuentemente depositados en el glomérulo y receptores activadores de la Fc de inmunoglobulinas ( FcRs), así como receptores del complemento(CRs), tienen también la capacidad de activar a los macrófagos.

La liberación de DAMPs parece jugar un rol central en regular las respuestas de los macrófagos en los tejidos, esto lo hace al activar vías de señalización intracelular dentro de las cuales se incluye a NF $\kappa$ B y proteincinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Todo este proceso da como consecuencia la liberación de una amplia variedad de citocinas proinflamatorias : FNT  $\alpha$ , IL-1 IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, así como quimiocinas proinflamatorias : proteína inflamatoria de macrófagos(MIP), proteína y quimiocina quimiotáctica de monocitos(CXC motif), ligando1 quimioatrayente de neutrófilos(CXCL1).

### **Macrófagos M1 y M2**

Ya activados los macrófagos se diferencian en macrófagos M1 (CAM) y M2 (AAM), esta diferenciación depende del estímulo al que los macrófagos activados sean sometidos <sup>6,8,25</sup>.

En respuesta a todas las señales anteriores, los macrófagos pueden adquirir fenotipos ( **Figuras 6 y 7**):

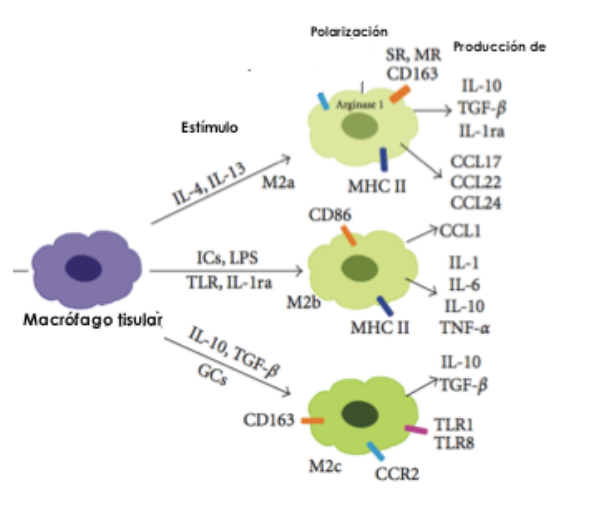
#### **1. Vía de activación clásica (M1/CAM):**

- a) **Estimulación:** TLR e INF $\gamma$ .
- b) Este fenotipo se caracteriza por producir niveles elevados de citocinas proinflamatorias ( IL-6, IL-12,IL-23, IFN  $\gamma$  y FNT  $\alpha$ ) las cuales a su vez elicitan una respuesta de los linfocitos T vírgenes hacia Th1 o Th17 .
- c) Si son estimulados por IFN  $\gamma$  secretan grandes cantidades de IL-12 e IL-23 pero niveles bajos de IL-10.
- d) Cuando los macrófagos producen IL-12 promueven la diferenciación a Th1, la cual a su vez promueve la fagocitosis. En cambio si los macrófagos secretan IL-23, estos generarán expansión hacia Th17, los cuales pueden secretar niveles elevados de IL-17 y pueden contribuir a patologías autoinmunes.
- e) Los macrófagos además secretan grandes cantidades de sintasa inducible por óxido nítrico (iNOS; NOS2) para promover metabolismo de arginina a óxido nítrico y citrulina

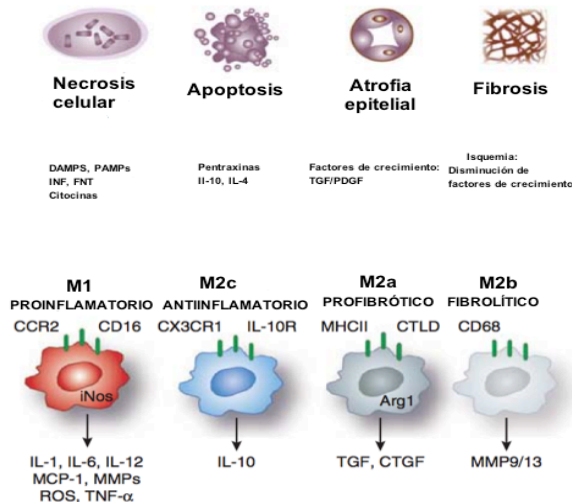
f) **Funciones:** Los macrófagos activados M1 comprometen funciones efectoras con un fenotipo **inflamatorio**. Contribuyen a la actividad tumoricida y microbicida.

2. **Vía de activación alternativa (M2/AAM):** Esta vía puede adquirir dentro del fenotipo, subtipos diferentes dependiendo del estímulo al que sea sometido (**Figura 6**);

- a) *M2a* responde al estímulo de *IL-4* e *IL-13*,
- b) *M2b* responde al estímulo de agonistas de *TLR/IL-1R* y
- c) *M2c* responde al estímulo de *IL-10* así como *TGF β* y suprime las respuestas inmunes al remodelamiento tisular.
- d) Cuando los macrófagos producen *IL-10* pueden promover la producción de *IL-4* e *IL-13* por las *Th2*.
- e) Los macrófagos *M2* inducen arginasa tipo 1, la cual metaboliza arginina a ornitina y poliaminas, las cuales son precursoras de la síntesis de colégena y la proliferación celular.
- f) **Función:** Este fenotipo se caracteriza por la contención de parásitos y promoción de remodelamiento tisular, así como progresión tumoral y funciones inmunoregulatoras. Se muestra a continuación la función por fenotipo (**Figura 7**) *M2a* promueve la atrofia tubular; *M2b* promueve la fibrosis y *M2c* promueve apoptosis.



**Figura 6<sup>8</sup>.** Se muestran los estímulos que permiten la polarización del macrófago tisular hacia los diferentes fenotipos y la producción de citocinas y quimiocinas ya adquirido cada fenotipo.

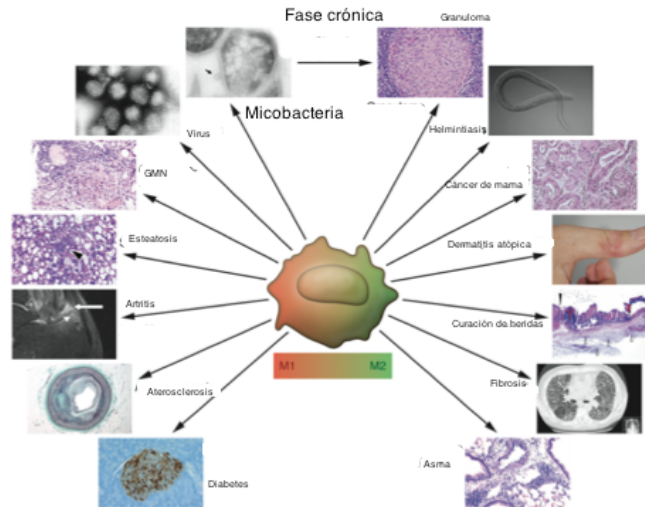


**Figura 7<sup>12</sup>.** Se puede mostrar en la parte superior las funciones de los macrófagos ya polarizados y los mediadores (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento) por los cuales generan reparo o daño así como cada uno de los fenotipos.

## b) Papel de los macrófagos en enfermedades autoinmunes e inflamatorias

Ya hemos visto que dependiendo de la polarización hacia M1 o M2 los macrófagos, estos tienen diferentes mecanismos proinflamatorios o anti-inflamatorios (**Figura 8**). Las enfermedades relacionadas con M1 son: micobacteriosis en fase aguda, virus, glomerulonefritis, esteatosis, artritis, aterosclerosis y Diabetes; así bien las enfermedades relacionadas a M2 son: micobacteriosis crónica, helmintiasis, cáncer de mama, dermatitis atópica, fibrosis y asma<sup>37</sup>.

Múltiples estudios *in vivo* han demostrado que el fenotipo de un macrófago activado puede cambiar con el tiempo, por ejemplo durante la progresión tumoral, el fenotipo de los macrófagos cambia de M1 a M2. En contraste a lo que sucede en obesidad que cambian de M2 a M1. Esto se ha intentado explicar en modelos *in vitro*, en donde se ha encontrado que los macrófagos ya diferenciados se pueden desdiferenciar y diferenciar a un fenotipo diferente dependiendo del estímulo al cual sea sometido. Esto significa que, los macrófagos pudieran repolarizarse en respuesta a cambios locales en el microambiente.



**Figura 8**

**c) Macrófagos, Lupus Eritematoso Generalizado y Nefritis Lúpica**

La mayor parte de los estudios con respecto a la fisiopatología del Lupus se han enfocado en la inmunidad adaptativa, sobre todo en anomalías en el Linfocito T y B. Este paradigma ha cambiado gracias a estudios recientes en el campo de la inmunidad innata. Actualmente se ha reconocido que los componentes de la inmunidad innata cuyo papel más importante es el reconocimiento de patógenos, juegan un papel importante en el reconocimiento de autoantígenos en Lupus.

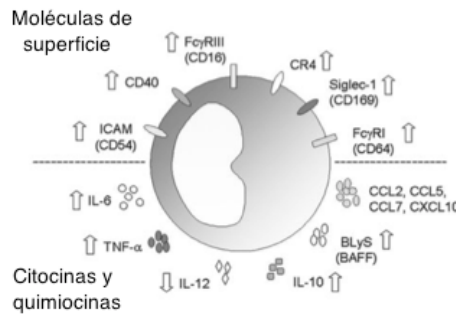
A continuación explicaremos brevemente el papel que juegan los macrófagos en el Lupus por varios de sus mecanismos.

**Expresión aberrante de los marcadores de superficie en los monocitos**

Las moléculas de superficie de los monocitos, le confieren habilidad para reconocer al ambiente y responder a estímulos exógenos y endógenos<sup>19</sup>.

En Lupus, una serie de expresiones aberrantes promueven la inadecuada respuesta de los monocitos a los estímulos como se ve en la figura 9

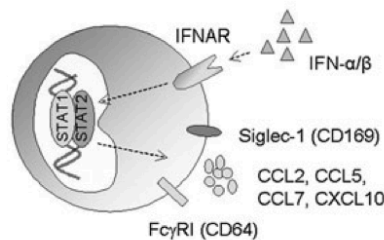




**Figura 9.** Se puede observar las moléculas de superficie, citocinas y quimiocinas que se encuentran a la alta en los monocitos de los pacientes con Lupus, tales como Fc $\gamma$ RIII, CD40, CD64 y BLYS, IL-10, IL-6, FNT, CCL2, CCL5, CCL7 y a la baja IL-12. Todo esto sugiere un ambiente altamente inflamatorio, lo cual es característico de dicha enfermedad. Esta sobreexpresión por lo tanto lleva a pérdida de la homeostasia con consecuente formación excesiva de autoanticuerpos y enfermedad.

Como se pudo observar en la figura previa, los Fc $\gamma$ R están expresados a la alta, lo cual tendrá efectos deletéreos en el desarrollo de la enfermedad. Estos receptores contribuyen a la fagocitosis, citólisis, degranulación e inducción de citocinas inflamatorias y por mucho son una de las moléculas de superficie con mayor disregulación en Lupus<sup>19</sup>.

Uno de los mecanismos propuestos para la sobreexpresión de Fc $\gamma$ RI en los monocitos, es la sobreproducción de IFN tipo I en los pacientes con Lupus ( alteración intrínseca en aproximadamente el 90% de los pacientes y que es conocida como firma del IFN). Figura 10



**Figura 10**

Los resultados de las interacciones con complejos inmunes( los cuales son abundantemente producidos en Lupus), se determina por el balance entre la función inhibitoria o activadora de los Fc $\gamma$ Rs en la superficie celular de la célula presentadora del antígeno ( en esta caso el monocito).

La delección de la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc, un componente esencial de activación de Fc $\gamma$ Rs es suficiente para inhibir el desarrollo de glomerulonefritis en ratones propensos (Clynes 1998). La ausencia de Fc $\gamma$ RIIb induce la producción de autoanticuerpos y acelera la enfermedad en modelos

murinos ( Bolland 2002). En humanos se han encontrado polimorfismos de Fc $\gamma$ RIII, una copia baja predispone a Lupus, mientras que una copia alta protege contra Lupus (Aitman 2006).

El receptor activador Fc $\gamma$ RI(CD64) se encuentra sobreexpresado en monocitos de pacientes con Lupus y aún en niveles más elevados en pacientes con enfermedad renal (Hepburn 2004, Li 2004).

Con respecto a estas moléculas de superficie, podemos concluir que su sobreexpresión aumenta la respuesta inflamatoria en Lupus, y que los niveles más elevados correlacionan con enfermedad renal.

### **Anormalidades en la producción de citocinas**

La activación aberrante de sistema adaptativo inmune en Lupus se ve aumentado por la disregulación de citocinas. Los monocitos y macrófagos son la mayor fuente de producción de interleucinas, los cuales pueden promover la activación de la autorreactividad de linfocitos T y B<sup>19</sup>.

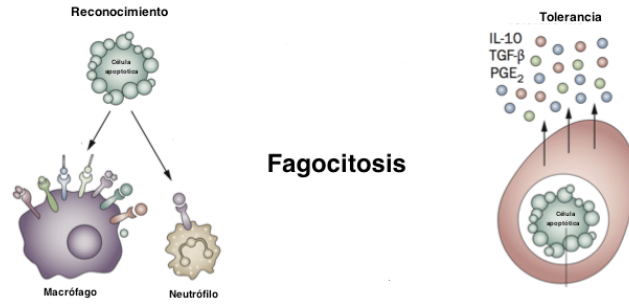
Los monocitos son una fuente importante de IL-6, IL-10 y BLYS( estimulador de linfocitos B).

### **Defectos en la fagocitosis y el aclaramiento celular**

La capacidad fagocítica de los monocitos y macrófagos es esencial para la defensa contra patógenos y el aclaramiento de cuerpos apoptóticos. Después de la activación del sistema inmune a través de la detección de los PAMPs, los monocitos periféricos y los macrófagos residentes de tejido migran al sitio de infección e inician la fagocitosis a través de diversos mecanismos<sup>24,30</sup>.

Las células apoptóticas y las células necróticas son removidas mediante fagocitosis. Durante la necrosis, el contenido de la célula muerta se libera y subsecuentemente se echa a andar una respuesta inflamatoria a través de los sensores innatos, tales como TLR y componentes del inflamasoma. Posterior a este proceso los restos de las células apoptóticas normalmente no activan respuesta inflamatoria porque los receptores responsables por esta captura por los macrófagos esta enlazada por vías de señalización antiinflamatorias<sup>24</sup>.

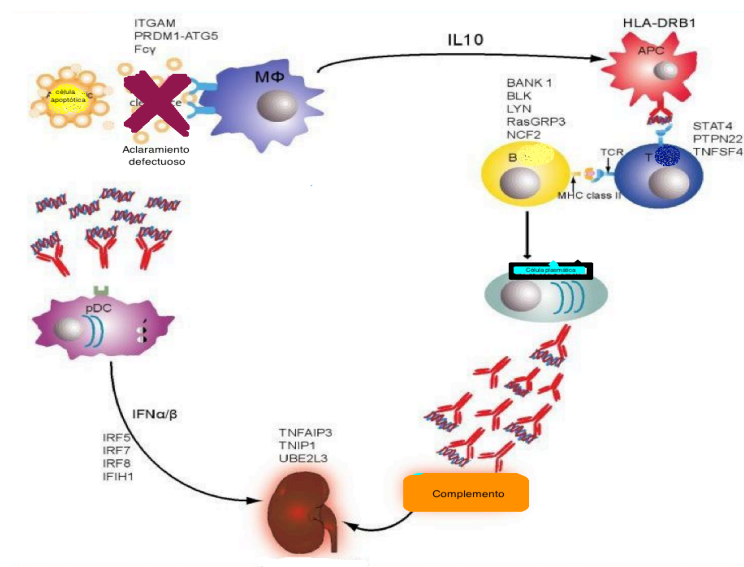
El reconocimiento de células apoptóticas a través del receptor de fosfatidilserina en los macrófagos, inhibe la producción de mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, FNT $\alpha$ , leucotrieno C4 y Tromboxano B2 (**Figura 11**).



**Figura 11.** En esta figura se muestran los tres pasos para el aclaramiento de las células apoptóticas. El primero es el reconocimiento de la célula por receptores de superficie expresados en los macrófagos y neutrófilos, el segundo paso es la externalización de la fosfatidilserina lo cual conlleva a la ativación de moléculas de señalización para el rearreglo del citoesqueleto e internalización de la célula apoptótica, y el último paso es la tolerancia, en la cual se genera un ambiente con gran producción de citocinas anti-inflamatorias.

Se ha demostrado que en Lupus existe un aclaramiento inefectivo de cuerpos apoptóticos (Herrman et al). El defecto del aclaramiento se ha intentado explicar por el gasto de inflamación crónica y la frecuencia incrementada de apoptosis (Ren et al 2003). Este hallazgo aún no se ha comprobado si es debido a un fenómeno secundario a la enfermedad o a la hipocomplementemia y la presencia de autoanticuerpos<sup>24</sup>.

Uno de los fenómenos que pudiera explicar la deficiencia en el aclaramiento es la disminución en la expresión de CD34 en la superficie del monocito, lo que conlleva a deficiencia en la internalización de los cuerpos apoptóticos (**Figura 12**)



**Figura 12.** Se muestra cómo en Lupus existe una alteración en el aclaramiento del complemento, lo cual conlleva a la gran producción de citocinas proinflamatorias y consecuentemente a la activación de otras células de la inmunidad innata y componentes de la inmunidad adaptativa humoral, con la activación de Linfocitos T y B, así como el cambio de isotipo de las células plasmáticas a inmunoglobulinas y a reconocimiento de cuerpos apoptóticos por estas, formando inmunocomplejos que como mecanismo final generarán daño a órgano.

## Subtipo de macrófagos

Los M1, M2a y M2c parecen no jugar un papel importante en el Lupus Eritematoso Generalizado, esto en base a múltiples estudios donde se ha demostrado que el patrón de citocinas circulantes en sangre periférica es casi dependiente de los M2b<sup>19,45</sup> (**Figura 13**).

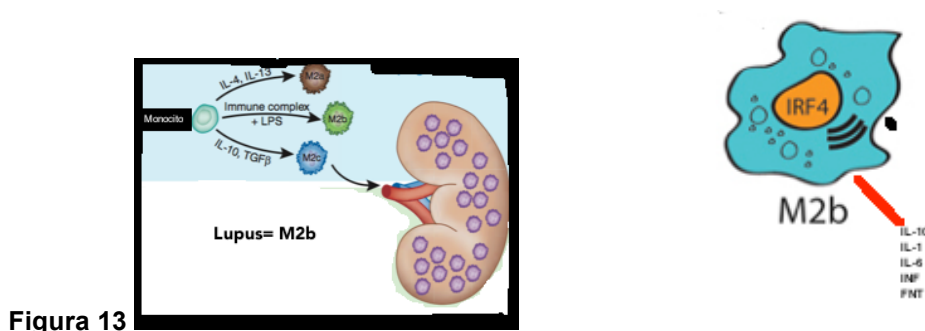
Los M2b son considerados un subtipo de macrófagos reguladores de la inmunidad que se asocia al Lupus Eritematoso Generalizado y son activados por complejos inmunes. En un modelo murino de Lupus inducido, Zhang y col<sup>44</sup> mostraron que el incremento en la señalización de Notch1 causaba la diferenciación de los M2b. La señalización de Notch1 a su vez causa un fenotipo similar a Lupus (Lupus-like).

Hagiwara y col encontraron en suero de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado niveles elevados de IL-10/ INF $\gamma$  lo cual podría ser resultado directo de la activación de los M2b<sup>19,45</sup>.

El excedente de complejos inmunes no fagocitados que ocurre en Lupus son inductores de macrófagos M2b.

Los M2b se sabe que producen factores inflamatorios no específicos que se encuentran elevados en sangre periférica de macrófagos de pacientes con LEG<sup>19,45</sup>.

Uno de los trabajos más importantes es el realizado por Schiffer y col<sup>35</sup> el cual mostró que en modelos murinos de nefritis lúpica, los subtipos de macrófagos, para los M2b han mostrado correlacionar directamente con recaída y remisión; y mostró escasez de M1 en enfermedad activa. Otro dato interesante es que se mostró que la topografía de los macrófagos es preferentemente en el túbulointersticio y en menor cantidad en el glomérulo.



Estos estudios sugieren que el fenotipo característico de macrófagos en Lupus tanto en sangre periférica como en riñón es M2b.

#### **d) Macrófagos en inflamación renal y fibrosis**

En 1972, Shigamatsu identificó macrófagos en glomerulos inflamados por microscopía electrónica en pacientes con glomerulonefritis focal y necrosante. Estas observaciones fueron confirmadas por el grupo de Atkin y subsecuentemente por muchos otros mediante anticuerpos monoclonales<sup>21,43</sup>.

El infiltrado por macrófagos en el parénquima renal en todos los tipos de daño renal, y su número correlaciona con la intensidad de la inflamación. Esto se ha asumido debido a que los macrófagos pueden inducir daño tisular en estudios experimentales sobre todo en aquéllos donde se inyectan macrófagos derivados de monocitos por vía intravenosa.

En el riñón los macrófagos se reclutan rápidamente si existe daño, siendo preferentemente macrófagos M1.

En la actualidad no queda duda que los macrófagos tienen un efecto profibrótico en respuesta a inflamación crónica o daño repetitivo. Son múltiples los mecanismos por los cuales los macrófagos causan fibrosis. Se explican a continuación:

- a) Producción de arginasa puede directamente promover fibrosis mediante la hidrozilación de arginina a ornitina la cual puede ser usada para generar glutamato de poliaminas y prolina los cuales son necesarios para la síntesis de colágeno.
- b) IL-13 generada por macrófagos directamente estimulan miofibroblastos y a su vez generando una matriz de colágena.

Los macrófagos se han encontrado en diversas patologías renales, sin embargo existe aún debate de cómo los macrófagos son activados en el riñón.

Múltiples estudios en modelos murinos de nefritis nefrotóxica y de GMN antimembrana basal glomerular han mostrado que los macrófagos son efectores secundarios regulados por los linfocitos CD4+ ,que reaccionan frente a anticuerpos en el glomérulo. Se cree que este tipo de activación de macrófagos dirigida por linfocitos T de los macrófagos tienen lugar en señales

paracrinas por  $INF\gamma$ , IL-12, IL-17 y otras señales dependientes de Th1. Mientras que este mecanismo de activación de macrófagos en el riñón juega un papel importante en algunas patologías renales, es improbable que sea el mayor mecanismo por el que los macrófagos se activan en el riñón debido a que existe poca evidencia de daño mediado por inmunidad celular, sobre todo en la glomerulonefritis lúpica y la glomerulonefritis mediada por ANCA; la excepción a ello son la glomerulonefritis antimembrana basal glomerular y el síndrome de Good-Pasture<sup>15</sup>.

Muchas patologías autoinmunes del riñón son mediadas por inmunocomplejos, en estas patologías el glomérulo es el objetivo de daño. En el glomérulo los anticuerpos son atrapados por la vasculatura y el penacho, es así como los macrófagos realizan una función fisiológica que es fagocitosis de los inmunocomplejos( como lo comentamos en una parte anterior del trabajo). Esta función innata es complicada y envuelve proteínas de la inmunidad innata, receptores y vías de señalización, con muchos sistemas en juego para impedir la activación de leucocitos mieloides , incluyendo pentraxinas y proteínas del complemento.

Sin embargo este sistema es abolido y como consecuencia se consume complemento , liberación de citocinas proinflamatorias todo lo cual contribuye al daño tisular, activación de la cascada de la coagulación y reclutamiento de leucocitos con pérdida de la función glomerular.

Además de enfermedades autoinmunes, muchas otras patologías han mostrado desarrollar infiltración de macrófagos en el glomérulo y el intersticio. La nefropatía diabética, nefritis intersticial aguda, enfermedad renal crónica de cualquier etiología, necrosis tubular aguda han mostrado reclutamiento importante de macrófagos. En estas patologías que no se activan por inmunocomplejos, el mecanismo por el cual se reclutan los macrófagos es diferente; una posibilidad es que las asesinas naturales (NK) reclutadas en sitios de daño liberen  $INF\gamma$  y a su vez recluten macrófagos M1, CXCL1 recluta y activa macrófagos en el parénquima renal<sup>15</sup>.

**e) Identificación histológica de macrófagos**

Como se muestra a continuación, existen una serie de marcadores de superficie que permiten la identificación de macrófagos, dentro de los cuales se incluyen: quimiocinas, citocinas y moléculas expresadas adicionalmente<sup>18</sup>.

<b>Subtipo</b>	<b>Citocinas</b>	<b>Quimiocinas</b>	<b>Marcadores fenotípicos</b>	<b>Moléculas expresadas adicionalmente</b>
<b>M1</b>	Negativa: TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ Positiva: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23	Negativa: CXCL9 Positiva: CCL2, CCL5,	Positivo: CD86	Positivo: TLR2, TLR4
<b>M2a</b>	Negativa: IL-10	Negativa: CCL13 Positiva: CCL18	Positivo: CD163, CD206	
<b>M2b</b>	Negativa: IL-10, TNF $\alpha$ Positiva: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10	Negativo: CCL13 Positivo: CCL1, CXCL1	Positivo: CD86	
<b>M2c</b>	Positiva: TGF- $\beta$ , IL-10	Negativo: CXCL9 Positivo: CCL18	Positivo: CD163, CD206	Positivo: CD14, TLR8

Datos obtenidos de Lee y col.

### III. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento no se cuenta con un predictor de fibrosis renal en pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado. Considerando que la nefropatía lúpica es uno de los principales factores de mal pronóstico y de mortalidad temprana, especialmente en poblaciones hispanas y afroamericanas nos obligan a trabajar en la búsqueda de variables predictoras que permitan incidir en las fases tempranas de la enfermedad.

Gran parte de la investigación previa y actual con respecto a la fisiopatología del Lupus se basa en el estudio de la inmunidad adaptativa, dejando de lado a la inmunidad innata considerada en la actualidad un mecanismo deficiente en los pacientes con Lupus, específicamente de los macrófagos y el papel de los mastocitos, hasta ahora no se ha establecido del todo.

Por otro lado, siendo el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán uno de los centros nacionales de referencia para el estudio y tratamiento del Lupus, con uno de los registros más grandes a nivel mundial de pacientes con Lupus (alrededor de 3800 pacientes) nos ofrece la oportunidad de realizar el estudio detallado de estas manifestaciones ya que cuenta con la infraestructura adecuada para ello.



#### **IV. OBJETIVOS**

- a) Caracterizar el grado y subtipo de macrófagos que infiltran el intersticio, evaluando tejido renal de pacientes con inicio reciente de afección renal.
- b) Caracterizar el grado de infiltración intersticial por mastocitos, evaluando tejido renal de pacientes con inicio reciente de afección renal.
- c) Evaluar en una segunda biopsia a 1 año el desarrollo de fibrosis intersticial y correlacionarlos con los datos basales de infiltración por mastocitos y macrófagos.
- d) Correlacionar las características clínicas, y de laboratorio en evaluaciones seriadas con el desarrollo de fibrosis intersticial.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS:**

**V.I) Diseño del estudio:** Esta parte del estudio se reportará como transversal y observacional

**V.II) Tamaño muestral:** Se ha propuesto como un estudio piloto. Para fines de esta tesis, se incluyeron 7 pacientes, pretende que al final del estudio se hayan reclutado al menos 10 pacientes.

### **V.III) Población de estudio:**

#### **a) Criterios de inclusión:**

1. Pacientes con Lupus Eritematosos Generalizado que cumplan  $\geq 4$  de la American College of Rheumatology a las que se les realice biopsia renal.
2. Pacientes con evidencia clínica reciente de actividad renal ( $< 3$  meses)
3. Las biopsias a incluir serán todas aquellas tipo III, IV con o sin componente V (proliferativas difusas y membranosas).

**b) Criterios de exclusión:** Pacientes con: Diabetes, nefropatía por reflujo, trasplantados renales, vasculitis sistémica o a riñón y uso de inhibidores de calcineurina.

**V. IV) Descripción de los procedimientos:** Después de la selección( visita 0), cada paciente tuvo una visita bimensual durante el primer año donde se midió la actividad del LEG ( SLEDAI 2K) y se recabaron una serie de datos clínicos, bioquímicos e inmunológicos que se mencionan a continuación: presión arterial, DNAdc, complemento, tasa de filtrado glomerular medida por MDRD, creatinina sérica, proteinuria de 24 horas, índice proteinuria/creatinuria en orina de 24 horas y/o al azar y sedimento urinario. En cada visita se tomó suero para eventualmente si es necesario medir algún otro marcador. Las biopsias renales percutáneas fueron analizadas por una nefropatóloga, la cual analizó la infiltración túbulointersticial por mastocitos mediante tinción de Z-N. Para el análisis de macrófagos una se utilizó la técnica de inmunohistoquímica doble, y se identificaron los subtipos de la siguiente manera: a)M1: CD86+ IL-23 +, b)M2a: CD163+ TGF $\beta$  -, c) M2b: CD86+ IL23-, d) M2c: CD163+ TGF $\beta$  +. Los resultados tanto para mastocitos como para macrófagos se reportaron en células/ mm<sup>2</sup>. A continuación se describen las técnicas a detalle.

## **Preparación del material de patología**

Se recibieron en fresco biopsias por trucut de parénquima renal que fueron identificadas y seccionadas para estudio de microscopía de luz, Inmunofluorescencia y Microscopía electrónica de transmisión. El material para microscopía de luz, se procesó de manera convencional y se efectuaron cortes que fueron teñidos con PAS, Masson, Plata Metenamina de Jones y HE . En este mismo material, se efectuó tinción de ZN para identificación de mastocitos.

El material para IFI fue congelado y se efectuaron cortes que fueron expuestos a anticuerpos dirigidos en contra de IgG, IgM, IgA, C1q, C3c, albúmina, fibrinógeno, kappa y lambda.

## **Análisis morfométrico para mastocitos**

Se midió el área de cada biopsia y se cuantificó el número de mastocitos mediante tinción de Zhiel-Neelsen con el programa Image-Pro Express 6.3, siendo los datos reportados número de células por mm<sup>2</sup>.

## **Análisis de los macrófagos por inmunohistoquímica doble**

Cortes de 3  $\mu$ , se colocaron en laminillas electrocargadas a 56° por 20 minutos, posteriormente se realizó recuperación antigénica con buffer de citratos (pH 5.6) durante 10 minutos a alta temperatura en olla de presión.

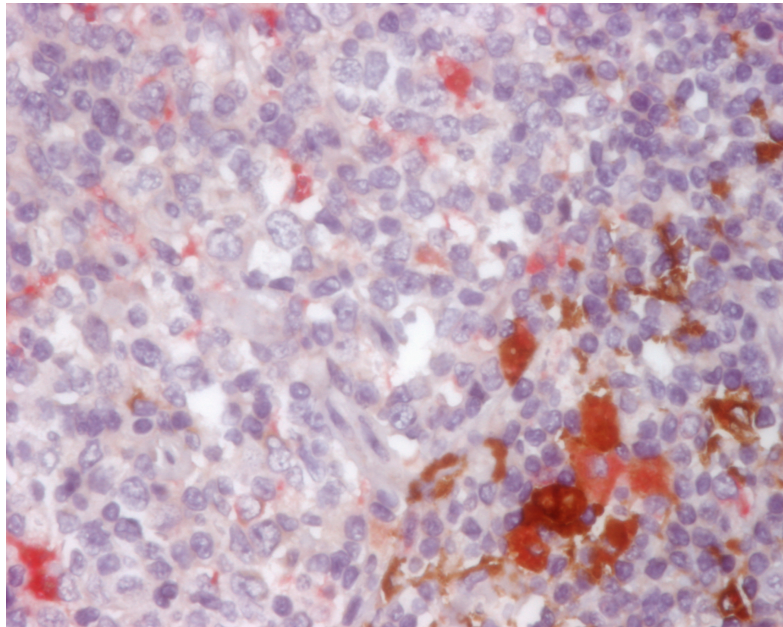
**Primer bloqueo:** Se dejó enfriar y se adicionó el bloqueador universal para peroxidasa endógena marca BIO\_SB( IMMUNODNA BACKGROUND BLOCKER ), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó con buffer de PBS-Tween 20%,(0.05%), y posteriormente se adicionó el anticuerpo 163 (Biocare medical dilución1:20 ), anticuerpo 86 . Se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavaron y adicionó el sustrato de estreptoavidina-peroxidasa (bio-sb MOUSE RABBIT IMMUNODETECTOR BIOTIN LINK), se incubó por 10 min. Se lavó y adicionó el sustrato de avidina- bio-sb( Mouse Rabbit HRP LABEL) se incubó por 10 minutos y posteriormente se lavó y reveló con DAB, se observaron las células de color café en la membrana de las células una vez revelado, se lavó y se inició la segunda marca.

**Segundo bloqueo:** Se bloqueó la fosfatasa alcalina endógena con bloqueador universal BIO-SB ( MOUSE RABBIT IMMUNODETECTOR AP BLOCKER), se lavó y adicionó el CD86, se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos en cámara húmeda, y se adicionó sustrato estreptoavidina-fosfatasa alcalina, se incubó por 10 minutos , se lavó y adicionó el sustrato ( MOUSE RABBIT

amarillo), se incubó por 10 min (Mouse Rabbit AP LABEL rojo), y se reveló con ALK MAGENTA, se observó la presencia de membrana celular de color rosa, una vez revelado se lavó.

Se realizó el contraste con hematoxilina durante 2 minutos, se pasó por agua corriente, se enjuagó perfectamente y dio un baño de agua amoniacal, se dejó secar y pasó directamente a xilol absoluto, se colocó una gota de resina y se montó en un cubreobjeto, se dejó secar y se observó.

En la foto siguiente se muestra el control (tomado de un ganglio) del procedimiento antes descrito para corroborar la adecuada realización de la técnica



**V.V ) Análisis y métodos estadísticos de los datos:** Las variables fueron presentadas como promedios y medianas, según correspondiera. Para realizar en análisis de correlación entre los mactocitos y macrófagos con cada una de las variables, se utilizó correlación de Spearman.

## RESULTADOS:

Se identificaron para el estudio 13 pacientes que clínicamente cumplían con nuestra definición de nefropatía lúpica temprana. Sólo se incluyeron en el estudio a 6 de ellos; el resto de los pacientes se excluyeron por las siguientes circunstancias: 1 por falta de tejido renal para análisis, 1 porque tuvo trombocitopenia que contraindicó la biopsia, 1 tuvo GMN mesangial clase II, 1 tuvo GMN clase III+V pero microangiopatía trombótica y 2 tuvieron GMN clase V pura.

La población total para el análisis fue de 7 pacientes. Del total de pacientes 5 (70%) eran mujeres y 2 eran hombres (30%), el promedio de edad fue de 23.2 años ( 17- 28 años). **Tabla 1**

Todos los pacientes tuvieron Lupus de inicio reciente. La manifestación que más frecuentemente acompañó a la afectación renal fue la artritis en 4 pacientes( 57%), fiebre junto con las manifestaciones mucocutáneas las desarrollaron 3 pacientes ( 42%) y posteriormente la hematológica manifestada por trombocitopenia grave en 2 pacientes (28%). Un paciente ( hombre) tuvo mononeuritis múltiple ( **Tabla 2**).

El tiempo desde el inicio de la nefropatía lúpica clínica hasta la toma de la biopsia fue en promedio de 1.4 meses ( 1-3 meses). Durante este tiempo la mayor parte de los pacientes recibieron tratamiento inmunosupresor variable: la mayor parte de ellos dosis altas de esteroides por la gravedad de las manifestaciones, mofetil micofenolato y uno de nuestras pacientes ingresó al protocolo proveniente de otra institución en la cual recibió rituximab ( **Tabla 4**)

### Los marcadores de actividad del Lupus reportaron lo siguiente ( **Tabla 3**):

- a) El índice de actividad medido por SLEDAI 2K fue en promedio de 23 ( 17-33)
- b) El Anti-DNA<sub>dc</sub> estuvo elevado en 6 pacientes (85%) y negativo en 1 paciente (15%). La mediana fue de 281 UI/ml ( 9.4-1276)
- c) El complemento estuvo anormalmente bajo en 6 pacientes (85%) y normal en 1 paciente(15%). La mediana para el C3 fue de 26.4 mg/dL (23.2-50) y para C4 fue de 8 mg/dL (2-25).

**Características de la actividad renal al momento del diagnóstico (Tabla 3):**

- a) La creatinina estuvo anormal en 5 pacientes (71%) con un promedio de 1.37mg/dL ( 0.7-2.6)
- b) La TFG estuvo disminuida en 6 pacientes(85%) con un promedio de 54.8 mL/m<sup>2</sup> SC ( 22-100), sin embargo ningún paciente requirió de terapia sustitutiva al inicio del estudio.
- c) Proteinuria de 24 horas (g): 5 pacientes ( 71%) tuvieron proteinuria subnefrótica con un promedio de 1.06 g/día ( 1.3-3.2 ) y 2 ( 28%) proteinuria en rangos nefróticos con un promedio 6.15 g/día (5-7.3 )
- d) Índice proteinuria/creatinuria (g/g): Todos los pacientes tuvieron un índice/proteinuria creatinuria elevado con un promedio de 3.85 g/g (1.2-5.6)
- e) Sedimento urinario: Todos los pacientes tuvieron sedimento activo, el 100% presentó cilindros granulosos y 2 ( 28%) cilindros eritrocitarios.

**Tabla 1. Características demográficas de los pacientes**

Paciente	Género	Edad ( años)	Peso (Kg)	Talla (m)	Superficie corporal (m2 SC)
1	Masculino	24	45	1.60	1.44
2	Femenino	21	122	1.63	2.22
3	Femenino	27	70.5	1.45	1.62
4	Femenino	28	57.6	1.59	1.6
5	Masculino	17	116.5	1.82	2.36
6	Femenino	18	52	1.50	1.46
7	Femenino	28	55	1.63	1.58

**Tabla 2. Manifestaciones clínicas atribuidas al Lupus al inicio del estudio**

Paciente	SNC/SNP	Vasculitis	Artritis	Renal	Mucocutáneo	Serosas	Constitucional	Hematológica
1	Mononeuritis múltiple	-	+	+	-	-	Fiebre, adenopatías y pérdida ponderal	-
2	-	-	-	+	Eritema malar	-	-	Trombocitopenia
3	-	-	-	+	-	-	-	-
4	-	+	+	+	Úlceras orales	-	Fiebre y pérdida ponderal	-
5	-	-	+	+	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	-	-	-
7	-	-	+	+	Eritema malar y úlceras orales	-	Fiebre, pérdida ponderal y adenopatías	Trombocitopenia

**Tabla 3. Marcadores clínicos y serológicos al momento del diagnóstico**

Paciente	SLEDAI 2 K	TAS (mm/Hg)	TAD (mm /Hg)	DNAdc	C3	C4	TFG (ml/min/SC)	Creatinina sérica (mg/dl)	Proteinuria de 24 horas ( gr)	Índice proteinuria/ creatinuria (g/g)	Sedimento urinario
1	17	120	70	21.2	25.8	<8	60	1.1	2.5	2.5	C. Granulosos
2	23	140	90	281	26	<8	22	2.6	2	1.2	C. Granulosos
3	18	130	80	9.4	50	25	30	1.6	7.3	4.1	C. Granulosos
4	33	150	100	819.5	28.4	<8	34	1.4	2.2	2.8	C. Granulosos y eritrocitarios
5	24	140	90	1269	34.9	<8	100	1.3	5	5.6	C. Granulosos
6	21	130	80	250	26.4	2	59	0.9	3.2	4	C. Granulosos
7	25	120	90	1276	23.2	<8	79	0.7	1.3	3.4	C. Granulosos y eritrocitarios

**SLEDAI= Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index**

**Valores de referencia: antiDNAdc < 9.6 UI/mL; C3 87-200 mg/dL; C4 19-52 mg/dL; creatinina sérica 0.6-1.2 mg/dL**

**Tabla 4. Tiempo del inicio de la nefropatía clínicamente a la toma de la biopsia renal**

Paciente	Meses desde el inicio de la nefropatía hasta la toma de la biopsia	Tratamiento inmunosupresor recibido hasta la toma de la biopsia
1	2	Metilprednisolona 3 gramos, Dexametasona 56 mg
2	1	Metilprednisolona 5 gramos, Dexametasona 80 mg
3	1	Prednisona 60 mg por 1 mes
4	3	Prednisona 60 mg y mofetilmicofenolato 2 gramos por 15 días
5	1	Prednisona 70 mg por y mofetil micofenolato 2 gramos por 15 días
6	1	Metilprednisolona 5 gramos, Rituximab 625 mg
7	1	Dexametasona 64 mg

**Resultados histopatológicos ( Tablas 5 y 6):**

- a) Tipo de glomerulonefritis: El 42% fueron GMN IV, 42% fueron GMN III+V y 16% IV+V
- b) Actividad: La mediana fue de 8 (5-13).
- c) Cronicidad: La mediana fue de 2 (0-4).
- d) Infiltrado leucocitario: La mediana fue de 10 % (0-15%).
- e) Fibrosis: La mediana fue de 10 (0-25%). Para fines de este estudio no se incluyeron pacientes que cumplieran con la definición de fibrosis intersticial moderada a severa porque buscamos daño intersticial temprano.
- f) Atrofia: La mediana fue de 10% (0-30%)
- g) Mastocitos: La mediana fue de 2 células/ mm<sup>2</sup> (0.1-5.8). No se observaron mastocitos en los glomérulos. ( **Foto 1** )
- h) Macrófagos en intersticio CD 163+ ( M2a/M2c): La mediana fue de 560 mm<sup>2</sup> ( 116-1684)
- i) Macrófagos en intersticio CD86+ (M1/M2b): La mediana fue de 0.1 mm<sup>2</sup> (0-0.1). (**Fotos 2 y 3**)
- j) Macrófagos en glomérulo CD 163 + ( M2a/M2c): La mediana fue de 39.6macrófagos/ glomérulo (11.6-97.6)
- k) Macrófagos en glomérulo CD86+ (M1/M2b): La mediana fue de 0.3 macrófagos/glomérulo (0-3.6)



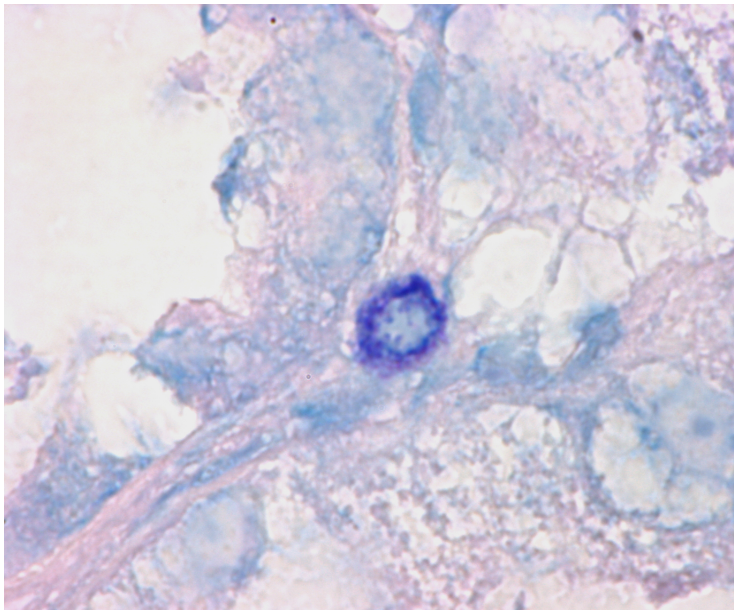
Add: Aunque no el objetivo de este estudio mostrar el papel de los macrófagos y mastocitos en el glomérulo, sin embargo hemos de comentar que ni en los túbulos ni en los glomérulos encontramos mastocitos. Este comportamiento no fue el mismo para los macrófagos, si bien encontramos más macrófagos en el intersticio, también los encontramos en el glomérulo. Para mostrar lo anterior, de cada paciente tomamos una muestra representativa de tres glomérulos por paciente.

**Tabla 5 . Alteraciones morfológicas estudiados en los pacientes con GMN lúpica**

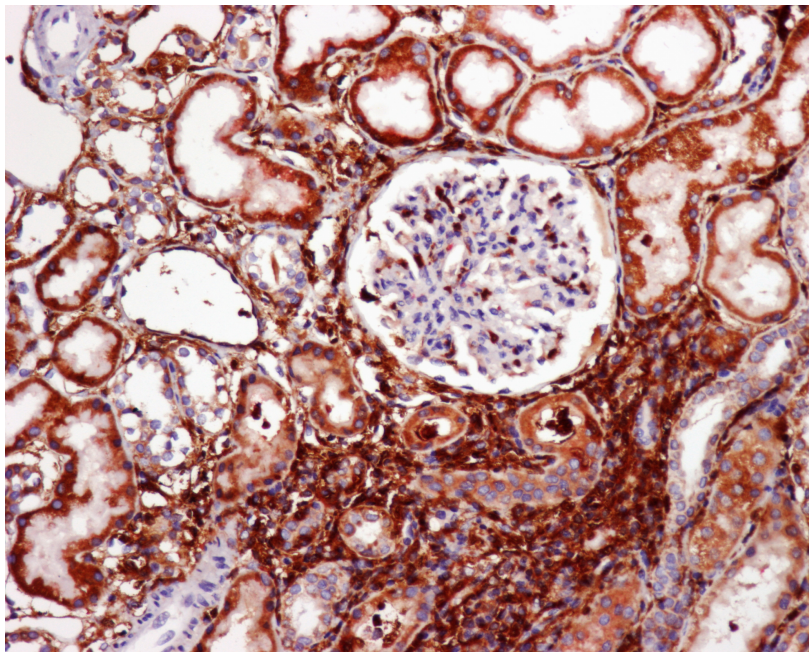
Paciente	Tipo de Glomerulonefritis	Actividad	Cronicidad	Atrofia (%)	Fibrosis (%)	Infiltración leucocitaria (%)
1	III+V	5	3	30	15	15
2	III+V	6	1	10	15	10
3	IV	13	2	10	10	10
4	IV	9	4	25	25	10
5	IV+V	9	0	0	5	5
6	IV	8	3	10	0	5
7	III+V	4	0	0	0	5

**Tabla 6. Resultados de mastocitos y macrófagos en el intersticio y glomérulo**

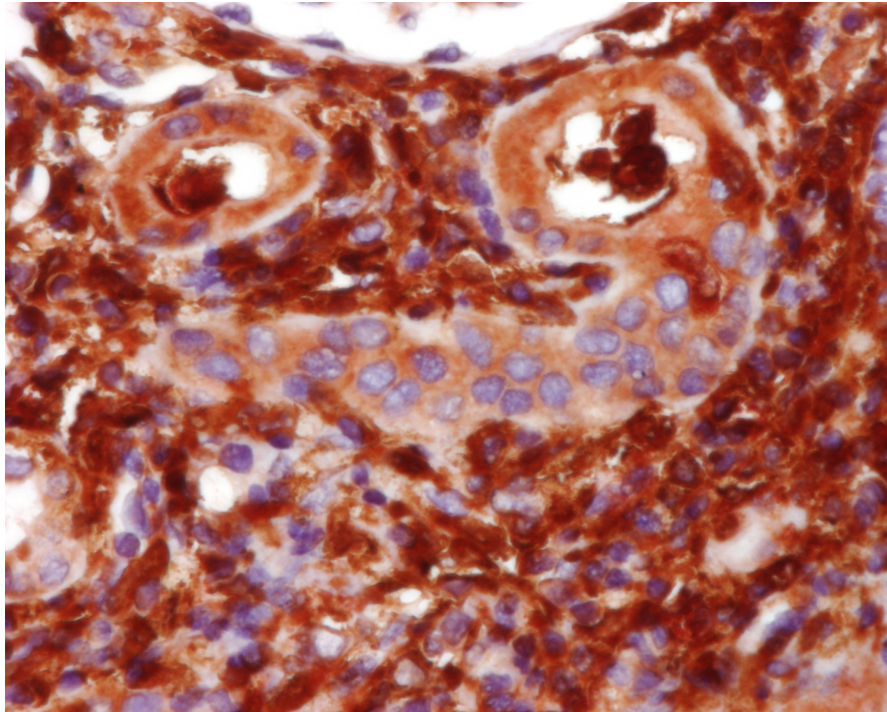
Pacete	Mastocitos (mm <sup>2</sup> )	CD163 + intersticiales (mm <sup>2</sup> )	CD86 + intersticiales (mm <sup>2</sup> )	CD163+ glomerulares (mm <sup>2</sup> )	CD86 + glomerulares (mm <sup>2</sup> )
1	0.7	1684	0.1	51.6	0
2	1	328	0	39.6	0.3
3	2	560	0.1	14	0.3
4	8.1	854	0.1	24.6	2.3
5	4	354	0	97.6	0.3
6	0.75	642	0	50.3	3.6
7	8.35	116	0.1	11.6	1



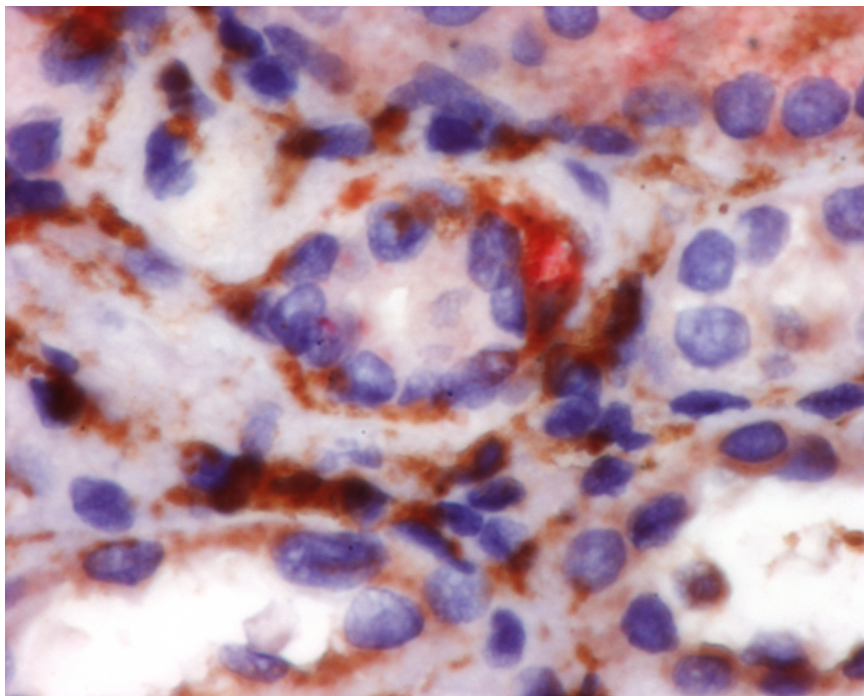
**Foto 1.** Se muestra un mastocito en el intersticio con técnica de Z-N en un aumento 200x.



**Foto 2.** En esta foto 40x podemos observar a los macrófagos CD163 + en café que francamente son los predominantes en el intersticio y en los macrófagos CD86+ en rojo que se encuentran predominantemente intraglomerulares.



**Foto 3.** Se muestra la foto 2 a mayor aumento (60x)



**Foto 4.** Se muestra un macrófago CD86+ en el intersticio, adyacente a un túbulo y múltiples macrófagos CD163+ en el intersticio.

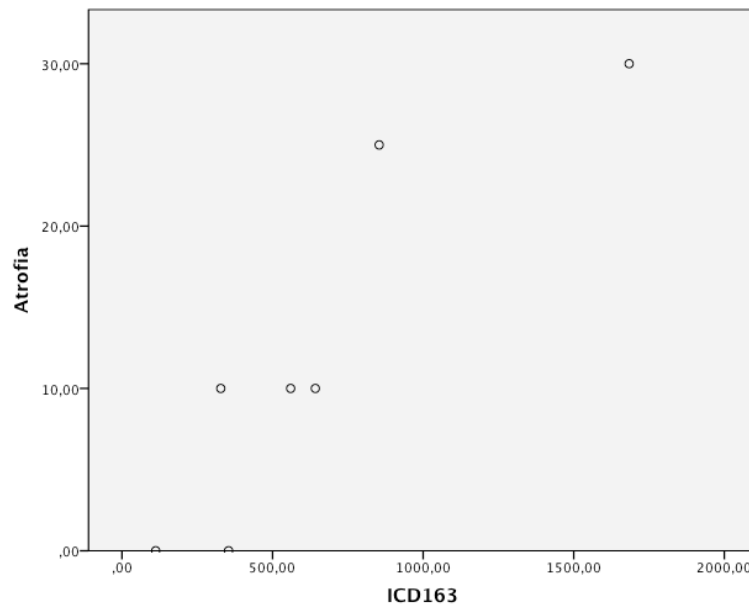
**Correlaciones (Spearman) entre los marcadores clínicos e histopatológicos con los mastocitos, CD163 y C86 intersticiales:**

	<b>Actividad</b>	<b>Cronicidad</b>	<b>Infiltración leucocitaria</b>	<b>Atrofia</b>	<b>Fibrosis</b>	<b>TFG</b>	<b>Creatinina</b>	<b>Proteinuria</b>
<b>Mastocitos</b>	-0.288 (p= 0.531)	0.2 (p=0.667)	-0.34 (p=0.445)	-0.03 (p=0.937)	-0.273 (p=0.554)	0.48 (p=0.268)	-0.786 (p=0.36 )	-0.429 (p= 0.337)
<b>CD163+</b>	0.32 (p=0.478)	<b>0.87</b> <b>(p=0.010)</b>	0.57 (p=0.174)	<b>0.86</b> <b>(p=0.013)</b>	0.49 (p=0.263)	-0.108 (p=0.818)	0 (p=1)	0.35 (p=0.432)
<b>CD86+</b>	0 (p=1)	0.29 (p=0.522 )	0.468 (p=0.290 )	0.378 (p=0.403)	0.294 (p=0.522 )	-0.073 (p= 0.877)	-0.14 (p= -0.758)	-0.14 (p= 0.758)

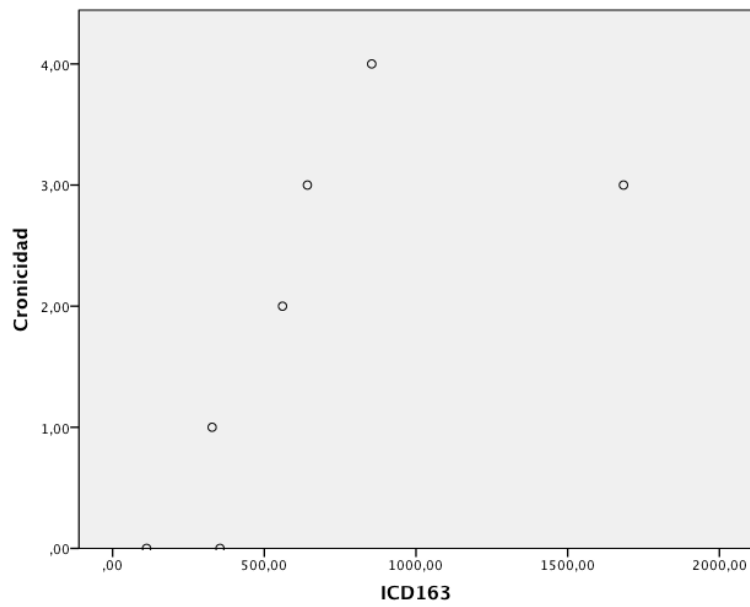
**Correlaciones (Spearman) entre los marcadores clínicos e histopatológicos con los CD163 y CD86 glomerulares:**

	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>AntiDNAdc</b>	<b>Creatinina</b>	<b>Proteinuria</b>	<b>TFG</b>	<b>Actividad</b>	<b>Cronicidad</b>
<b>CD163</b>	0.14 (p=0.76)	-0.40 p= 0.373	-1.07 (p=0.819)	0 (p=1)	0.39 (p=0.383)	0.396 (p=0.379)	-0.036 (p=0.939)	0.05 (p=0.908)
<b>CD86</b>	0.037 (p=0.937)	-0.55 (0.196)	0.33 (p=0.465)	-0.33 (p=0.465)	-0.185 (p=0.691)	-0.037 (p=0.937)	0.22 (p=0.629)	0.26 (p=0.567)

**Correlaciones:** No existió correlación entre mastocitos intersticiales, macrófagos CD86+ en el glomérulo o intersticio con alguna variable clínica, bioquímica o histopatológica. Sin embargo existió correlación entre los macrófagos CD163+ en el intersticio con la cronicidad ( r = 0.87, p= 0.010) y con la atrofia ( r = 0.86, p= 0.013). Se muestran a continuación las tablas de dispersión más representativas.



**r= 0.86 p=0.013**



**r= 0.87 p=0.010**

## DISCUSIÓN:

Este es el primer estudio de nefropatía lúpica temprana en humanos donde se evalúa el papel de la inmunidad innata y específicamente celular en esta enfermedad. Al ser una de las manifestaciones con mayor morbimortalidad sobre todo en raza hispanoamericana, uno de los objetivos del estudio fue identificar si los macrófagos y los mastocitos juegan algún papel importante en el evento “prefibrótico” en el túbulo intersticio.

Con respecto a los mastocitos, hemos encontrado que prácticamente no se encuentran en el túbulo o glomérulo, si no en el intersticio. La cifra que se encontró en el glomérulo medida por  $\text{mm}^2$ , aunque es baja está presente (mediana  $2 \text{ mm}^2$ ); y es bien sabido que no existen mastocitos normalmente en el riñón. Si bien estudios previos como el de Hiromura han demostrado que la cantidad de mastocitos en glomerulonefritis lúpica correlacionó con la infiltración leucocitaria intersticial, fibrosis y creatinina; no sabemos en qué momento de la enfermedad se biopsiaron a los pacientes; lo cual podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo, tal vez los pacientes tenían más fibrosis y por lo tanto mayor cantidad de mastocitos, incluso este autor concluye que el papel más importante que juegan los mastocitos es en la inflamación crónica. En el caso de nuestros pacientes, sólo se incluyeron biopsias que tenían fibrosis leves, esta podría ser una explicación por la cual no tuvimos resultados similares. Como perspectiva a este respecto faltaría valorar en las segundas biopsias renales si estos mastocitos aumentan a la par de la fibrosis y algunos marcadores clínicos.

Por otra parte y muy importante es que la identificación de los mastocitos por Hiromura se realizó mediante triptasa y nosotros lo medimos con una técnica de histoquímica que fue Zhiel-Neelsen, sobre todo con el objetivo de que esta técnica pudiera ser reproducible en cualquier centro.

Con respecto a los macrófagos encontramos que evidentemente predominan en el intersticio (mediana;  $560 \text{ mm}^2$ ), pero también están presentes en el glomérulo (mediana  $39.6/\text{glomérulo}$ ). Evidentemente existieron más macrófagos CD163+ que CD86+, lo cual sugiere en este estudio que los macrófagos son M2a ó M2c y que predominan sobre los M1 ó M2b.

El estudio de Schiffer en modelo murino en el que indujo glomerulonefritis lúpica, los macrófagos se diferenciaron hacia M2b, estos resultados se podrían explicar debido a que los ratones eran sacrificados y biopsiados en etapas más tempranas de la enfermedad renal, por ello el predominio de este subtipo de macrófagos; sin embargo llama la atención la baja prevalencia de M1 a pesar de biopsias renales tan tempranas.



A pesar de que nuestra definición de nefropatía lúpica temprana ( nefropatía clínica < 3 meses) y de biopsias relativamente tempranas, documentamos que en el intersticio existen predominantemente macrófagos CD163+ ( M2a y/o M2c). Lo cual se puede traducir en un momento de reparación de daño en el intersticio ( representado por estos macrófagos que se encargan de fibrosis y apoptosis) a la toma de la biopsia. No es de extrañarnos que no hayamos encontrado macrófagos CD86+ (M1 o M2b) debido a que los M1 hablan de un proceso francamente proinflamatorio agudo y para haberlos encontrado se debió haber tomado la biopsia en etapas tan tempranas como 1 mes al inicio de la inflamación intersticial. Incluso en el estudio de Schiffer donde se sacrificaron a los ratones en etapas tan tempranas de inducción de la nefropatía ( 4-6 semanas) no se encontraron los M1, pero si los M2b.

Una de las debilidades que tiene nuestro estudio es que son pocos pacientes, sin embargo hay que tomar en cuenta que con la finalidad de incluir sólo pacientes con nefropatía temprana se excluyeron a los que tenían recaída renal o que tuvieran mayor tiempo de evolución clínica. A pesar de que nuestros criterios de inclusión con respecto a la temporalidad fueron muy estrictos e incluso el tiempo desde el inicio clínico hasta la toma de la biopsia los resultados histopatológicos muestran que hay un daño importante en el intersticio.

Otra de las debilidades es que no pudimos en esta parte del estudio determinar exactamente las subpoblaciones de macrófagos, así que aún no sabemos si los CD163+ son M2a ó M2c. Esta misma debilidad podría ser un problema para instituciones donde no se tengan laboratorios de inmunohistoquímica diseñados para identificación de estas células por esta técnica.

En esta primer parte del estudio no podemos definir si los mastocitos y macrófagos pudieran servir como marcador histológico temprano de daño túbulointersticial debido a que requerimos de una segunda biopsia para corroborar esta hipótesis; por lo tanto el estudio se limitó a ver el comportamiento de los mastocitos y los diferentes subtipos de macrófagos en nefropatía lúpica temprana (definición clínica arbitraria al no contar con una definición preestablecida).

## **CONCLUSIONES:**

Esta primer parte del estudio es transversal, el fin último es valorar si estos elementos importantes de la inmunidad celular juegan un papel previo al desarrollo de fibrosis y atrofia intersticial.

Lo que podemos concluir hasta este momento es que en el túbulo intersticio de los pacientes con nefropatía lúpica temprana existe una cantidad elevada de macrófagos CD163+ y que estos correlacionan con la atrofia y cronicidad, estas mismas células se encuentran en el glomérulo pero en menor cantidad. Los macrófagos CD86 + se encuentran escasos en el glomérulo.

Con respecto a los mastocitos, en el análisis de datos basales no pudimos corroborar correlación con ningún marcador bioquímico, histológico o clínico en nefropatía lúpica temprana. Sin embargo, acorde con el diseño propuesto, se espera que la segunda biopsia renal permita demostrar el papel de estas células en la progresión de la enfermedad y desarrollo de fibrosis.



## Bibliografía

1. Anders HJ, Ryu M. Renal Microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kid Int* 2011; 80:915-925.
2. Bertias GK, Tektonidou M, Amoura Z 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;0; 1-12.
3. Christy AL, Brown M. The Multitasking Mast Cell: Positive and Negative Roles in the Progression of Autoimmunity. *J Immunol* 2007; 179:2673-2679.
4. Danilewickz M, Danilewickz WM. Quantitative analysis of the interstitial mast cells in idiopathic mesangiocapillary glomerulonephritis type I. *Nefrologia* 2001; 21(3): 253-9.
5. Ehara T, Shigematsu H. Contribution of mast cells to the tubulointerstitial lesions in IgA nephritis. *Kidn Int* 1998;54:1675-1683.
6. Erwig LP, Kluth Dc, Rees AJ. Macrophage heterogeneity in renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1962-1965.
7. Hahn BH, McMahon Ma, Wilkinson A et al. American College of Rheumatology Guidelines for Screening, Treatment, and Management of Lupus Nephritis. *Arthritis Care Res* 2012; 64(6):797-808.
8. Hao NB, Lü MH, Fan YH et al. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clin Dev Immunol* 2012; ID 948098
9. Hiromura K, Kurosawa M, Yano S et al. Tubulointerstitial mast cell infiltration in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1998;32(4):593-9.
10. Hohegger K, Siebenhaar F, Vielhauer V et al. Role of mast cells in experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Eur J Immunol* 2005;35:3074-3082.
11. Holdsworth SR, Summers AS. Role of mast cells in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:2254-2261.
12. Joachim H, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kid Int* 2011;80:915-925.
13. Jones S, Kelley D, Cox A et al. Mast cell infiltration and chemokine expression in progressive renal disease. *Kid Int* 2003;64:906-913.
14. Katsiari C, Liossis Stamatis-Nick, Sfikakis P. The Pathophysiologic Role of Monocytes and Macrophages in Systemic Lupus Erythematosus: A Reappraisal. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39(6):503-514.
15. Kluth D, Erwig Lars-Peter, Rees A. Multiple facets of macrophages in renal injury. *Kid Int* 2004;66:542-547.
16. Kondo S, Kagami S, Kido H et al. Role of Mast Cell Tryptase in Renal Interstitial Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1668-1676.
17. Kurusu A, Suzuki H, Horikoshi S et al. Relationship between mast cells in the tubulointerstitium and prognosis of patients with IgA nephropathy. *Nephron* 2001;89(4):391-7.
18. Lee J, French B, Morgan T et al. The liver is populated by a broad spectrum of markers for macrophages. In alcohol hepatitis the macrophages are M1 and M2. *Exp Mol Path* 2014; 96: 118-125
19. Li Y, Lee P, Reeves WH. Monocyte and Macrophage Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp* 2010;58:355-364.
20. Lin L, Gerth AJ, Peng SL. Susceptibility of mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice to pristane-induced experimental lupus nephritis. *Immunol Lett* 2004; 91: 93-97.
21. Lin Shuei-Long, Duffield J. Macrophages in Kidney injury and Repair. *Acta Nephrologica* 2012;26(2):45-57.
22. Miranda-Hernández D, Cruz-Reyes C, Ángeles U et al. Predictores de respuesta al tratamiento en pacientes con nefritis lúpica. *Reumatol Clin* 2014;10(3):164-169.
23. Miyazawa S, Hotta O, Doi N et al. Role of mast cells in the development of renal fibrosis: Use of mast cell-deficient rats. *Kid Int* 2004;65:2228-2237.

24. Muñoz LE, Lauber K, Schiller et al. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6:280-289.
25. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11: 723- 737.
26. Nikolic-Paterson D, Atkins R. The role of macrophages in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:3-7
27. Nowling TK, Gilkeson GS. Mechanism of tissue injury in lupus nephritis. *Arth Res Ther* 2011;13:250
28. Pinto LF, Castro IL, Duque V et al. Factores de riesgo predictores de falla a la terapia de inducción de nefritis lúpica en una cohorte de pacientes colombianos. *Reumatol Clin* 2014;10(3):147-151.
29. Pons-Estel B, Catoggio L, Cardiel M et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus. *Medicine* 2004;83:1-18.
30. Rahman A, Isenberg DA. Systemic Lupus Erythematosus. *N Eng J Med* 2008;358:929-939.
31. Ravinal RC, Costa Rs, Coimbra TM et al. Mast cells, TGF- $\beta$ 1 and myofibroblast expression in lupus nephritis outcome. *Lupus* 2005;14:814-821.
32. Roberts ISD, Brenchley PEC. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. *J Clin Pathol* 2000;53:858-862.
33. Ryan JJ, Morales JK, Falnga YT et al. Mast Cell Regulation of The Immune Response. *World Allergy Organ* 2009; 2:224-232.
34. Rüger BM, Hasan Q, Greenhill NS et al. Mast cells and type VIII collagen in human diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1996;39(10):1215-1222.
35. Schiffer L, Ramalingham B, Ramanujan M et al. Activated Renal Macrophages Are Markers of Disease Onset and Disease Remission in Lupus Nephritis. *J Immunol* 2008;180:1938-1947.
36. Shin K, Nigrovic P.A, Crish T et al. Mast cells Contribute to Autoimmune Inflammatory Arthritis via Their Tryptase/Heparin Complexes. *J Immunol* 2009;182:647-656.
37. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122: 787-795
38. Solari V, Unemeto K, Plaseczna P et al. Increased expression of mast cells in reflux nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2004;19(2):157-63.
39. Timoshanko J, Kitching R, Semple T et al. A pathogenic Role of Mast Cells in Experimental Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:150-159.
40. Walker ME, Hatfield JK, Brown MA. New insights into the role of mast cells in autoimmunity; Evidence for a common mechanism of action?. *Biochim Biophys Act* 2012; 1822:57-65
41. Wang Y, Harris C.H. Macrophages in Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:21-27.
42. Weening JJ, D'Agati V, Schwatz MM et al. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *Kid Int* 2004; 65:521-530.
43. Yang Niansheng , Isbel Nicole, Nikolic-Paterson D et al. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kid Int* 1998;54:143-151.
44. Zhang W, Xu W, Xiong S. Blockade of Notch1 Signaling Alleviates Murine Lupus via Blunting Macrophage Activation and M2b polarization. *J Immunol* 2010;184: 5465-6478.
45. [http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/Differentiation\\_of\\_M1-\\_or\\_M2-Macrophages\\_from\\_PBMC\\_\\_Monocytes.pdf](http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/Differentiation_of_M1-_or_M2-Macrophages_from_PBMC__Monocytes.pdf)