



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**

“Asociación de los Niveles urinarios de TWEAK con hallazgos histológicos y marcadores de lesión endotelial (VEGF/ VCAM-1) y túbulo intersticial (TGF β) en pacientes con nefritis lúpica”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA

FABIOLA REYES MARTINEZ

TUTOR:

DR.RAFael VALDEZ ORTIZ

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD DE MEXICO

ABRIL 2018



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.

Tutor: DR. RAFAEL VALDEZ ORTIZ

COMITÉ

DRA. LUCIA MONSERRAT PEREZ NAVARRO

DRA. VIRGILIA SOTO ABRAHAM

ÍNDICE

I.	Introducción	
1.	Epidemiología de nefritis lúpica.....	9
2.	Abordaje diagnóstico de pacientes con nefritis lúpica.....	9
3.	Clasificación histológica.....	10
4.	Patogénesis de lupus eritematoso sistémico.....	11
5.	Biomarcadores en nefritis lúpica.....	13
6.	TWEAK y riñón.....	15
6.1.	Expresión de TWEAK a nivel renal.....	17
6.2.	TWEAK y lupus.....	18
II.	Pregunta de investigación	20
III.	Planteamiento del problema	20
IV.	Justificación	21
V.	Hipótesis	21
VI.	Objetivo general y específicos	22
VII.	Metodología	22
1.	Tipo y diseño de estudio.....	22
2.	Población y tamaño de la muestra.....	23
2.1	Criterios de inclusión.....	23
2.2	Criterios de exclusión.....	23
2.3	Criterios de eliminación.....	23
3.	Variables dependientes e independientes.....	24
VIII.	Procedimiento	27
IX.	Análisis estadístico	27
X.	Aspectos éticos y de bioseguridad	28
XI.	Resultados	29

1. Características bioquímicas e histológicas de acuerdo a la clasificación de la ISN/RSP.	29
1.1 ¿Existen diferencias en los niveles urinarios de TWEAK de acuerdo a la clase histológica?.....	30
1.2 Comparación entre clases histológicas.....	30
2. Marcadores tisulares de acuerdo a la clasificación de la ISN/RSP.....	30
2.1 Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF).....	30
2.2 Molécula de Adhesión Vascular (VCAM).....	31
2.3 Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β).....	31
3. Correlación de parámetros bioquímicos de actividad por LES con niveles urinarios de TWEAK.....	32
4. Correlación de los hallazgos histológicos con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.....	32
5. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.....	33
6. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK con los hallazgos histológicos de nefritis lúpica.	34
XII. Discusión.....	47
XIII. Conclusiones.....	53
XIV. Bibliografía.....	55

ABREVIATURAS

AGP Glicoproteína ácida
AngII Angiotensina II
Anti ANA Anticuerpos antinucleares
Anti DNA Anticuerpos anti ácido desoxirribonucleico
Anti Sm Anticuerpos anti smith
ARNm Ácido ribonucleico mensajero
ERC Enfermedad renal crónica
g gramo
IFN interferón
ISN/RSP Sociedad internacional de nefrología / Real sociedad de Patología
LES Lupus Eritematoso Sistémico
MAPK Proteínas de cinasas activada por mitógenos
MCP Proteína quimioatrayente de monocitos
MHC Complejo mayor de histocompatibilidad
min minuto
miRNA microRNA
ml mililitro
NGAL Gelatinasa de neutrofilos asociada a lipocalina
NFkB Factor nuclear kappa B
NLRP
Pg picogramo
TF Transferrina
TGF-β factor de crecimiento transformante Beta
TLR Receptor similar a Toll
TNF Factor de necrosis tumoral
TWEAK Factor similar a necrosis tumoral débil inductor de apoptosis
VEGF Factor de crecimiento vascular endotelial
VCAM Molécula de adhesión vascular

TABLAS Y FIGURAS

Tablas Antecedentes

Tabla 1. Quimiocinas y citocinas implicadas en la patogénesis de LES.....	12
Tabla 2. Marcadores en LES.....	14
Tabla 3. Definición conceptual y operacional de variables.....	25

Figuras antecedentes

Figura 1. Mecanismo de acción de TWEAK-Fn14 a nivel renal.....	16
Figura 2. Cálculo de tamaño de la muestra	24

Tablas Resultados

Tabla 1. Características Demográficas histológicas y parámetros bioquímicos.....	36
Tabla 2. Marcadores a nivel tisular.....	38
Tabla 3. Correlación de los hallazgos histológicos con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.....	44
Tabla 4. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK (≥ 4.91) con marcadores de lesión endotelial, tubulointersticial y hallazgos histológicos.....	45
Tabla 5. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK (≥ 7.95) con marcadores de lesión endotelial, tubulointersticial y hallazgos histológicos.....	46

Figuras Resultados

Figura 1. Niveles urinarios de TWEAK de acuerdo a la clase Histologica.....	35
Figura 2. Análisis post Hoc (U Mann Whitney).....	40
Figura 3. Expresión de marcadores tisulares.....	41
Figura 4. Correlación de niveles urinarios de TWEAK con parámetros bioquímicos.....	43

RESUMEN

Introducción: La afección renal del lupus eritematoso sistémico (LES) es una complicación grave y común con impacto directo en la sobrevida del paciente. Se caracteriza por tener curso variable con presencia de remisión y recaídas por lo que se requiere un seguimiento constante con implicaciones en la sobrevida y modificaciones constantes del tratamiento. Actualmente se ha propuesto que el TWEAK es un biomarcador sensible y específico en la evaluación de nefritis lúpica en pacientes con LES sin embargo no se ha establecido asociación con los hallazgos histológicos y el depósito de marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.

Metodología: Estudio transversal, analítico y comparativo. En el que se determinó el grado de asociación entre los niveles urinarios de TWEAK con los hallazgos histológicos y marcadores de lesión endotelial (VEFG y VCAM-1) y tubulointersticial (TFG β), en pacientes con nefritis lúpica que no han recibido tratamiento inmunosupresor previo. Nuestro objetivo fue evaluar el grado de asociación entre los niveles urinarios de TWEAK y los marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial así como con los hallazgos histológicos de pacientes con nefritis lúpica.

Resultados: Se evaluaron un total de 36 pacientes, con edad promedio de 30.86 ± 9.59 años, el 83.3% (30) de los sujetos de estudio fue del género femenino. Se observó predominio de la clase histológica IV+V (41.6%), en los que se identificó mayor frecuencia de requerimiento de terapia de reemplazo de la función renal (26.7%). En los hallazgos histológicos, 63.8% presentó índice de cronicidad bajo (< 6 puntos), el índice de actividad fue en el 50% >12 puntos. Los niveles urinarios de TWEAK de acuerdo con la clase histológica no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Los parámetros bioquímicos no se correlacionaron con los niveles urinarios de TWEAK. En 72.2% de los pacientes se observó depósito de VEGF a nivel glomerular \geq a 50% y a nivel arteriolar, el 77.8% de los pacientes presentaron depósitos \geq 50% de VEGF.

Con relación a VCAM, el 69.4% presentó depósito < 25% a nivel glomerular. Se identificó correlación significativa ($r=0.425$, $p=0.0012$) entre los depósitos de VEGF con el índice de actividad; mientras tanto los niveles de VCAM a nivel glomerular presentaron una correlación alta y

positiva con el grado de FIAT ($r=0.826$, $p=0.00$) y con el índice de cronicidad ($r=0.659$, $p=0.00$). En tanto, los niveles de TGF β , presentaron una correlación débil con el grado de fibrosis intersticial y atrofia tubular sin diferencias estadísticamente significativas ($r=0.238$, $p=0.162$). El modelo de regresión logística identificó una asociación entre los niveles urinarios de TWEAK con el índice de actividad y los depósitos de VEGF arteriolar con una OR 4.18 y 11.298 ($p=0.223$ y $p=0.120$) y un tamaño del efecto (d cohen) de 0.786 y 1.33 respectivamente.

Conclusiones: Los niveles urinarios TWEAK representa un biomarcador sensible y específico en la evaluación de nefritis lúpica en pacientes con LES, sin embargo, no hay diferencias con respecto a la clase histológica; pero sí asociación con el índice de actividad y VEGF (de acuerdo con el tamaño del efecto). Consideramos que TWEAK podría constituir un adecuado biomarcador en la evaluación inicial y de seguimiento de los pacientes con NL; mientras que, el depósito de moléculas de lesión endotelial debería de evaluarse en diferentes etapas de la evolución de los pacientes para considerar si existe una posible relación entre el depósito de estos con la evolución y el pronóstico de la NL. Es relevante evaluar el desenlace de los pacientes y establecer si los marcadores evaluados tienen impacto en el pronóstico de los pacientes.

I. Marco teórico

1. Epidemiología de nefritis lúpica

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por pérdida de la tolerancia dirigida contra antígenos del núcleo, linfoproliferación, producción policlonal de auto anticuerpos, formación de complejos inmunes e inflamación multiorgánica de tejidos. (1) Es una enfermedad autoinmune compleja cuya incidencia y prevalencia varía sustancialmente de acuerdo al género, raza y estatus socioeconómico. (2)

La epidemiología con respecto a lupus eritematoso sistémico ha cambiado considerablemente; en el pasado se estimaba una prevalencia de LES en EU en un rango entre 24-105 casos por cada 100,000 habitantes (3, 4) y una incidencia entre 2.2 a 5.6 por cada 100,000 habitantes, a pesar de las variaciones en estas estimaciones, la proporción es consistentemente mayor en mujeres que en hombres; así como en afroamericanos respecto a pacientes de raza blanca. De igual manera, la prevalencia en población hispana y asiática se ha incrementado considerablemente en los últimos años. (5,6)

Estudios previos sugieren que la nefritis lúpica es una de las manifestaciones más severas del LES, se presenta más comúnmente en las minorías raciales y étnicas. Se estima que entre el 50-60% de pacientes pueden desarrollar nefritis lúpica durante los primeros diez años a partir del diagnóstico de LES; siendo mayor la prevalencia en afroamericanos (40-69%), hispanos (36-61%) y en mujeres (91.3%). (7)

La prevalencia de ERC en pacientes con NL es común, debido a que las actuales terapias que inducen la remisión completa logran este objetivo en tan solo el 50% de los casos. (8)

2. Abordaje diagnóstico de los pacientes con nefritis lúpica

La presencia de nefropatía lúpica debe considerarse en aquellos pacientes con alteración en la función renal, proteinuria, hipertensión y/o sedimento urinario activo (hematuria con presencia de

eritrocitos dismórficos, leucocituria, cilindros eritrocitarios). Otros parámetros que deben de considerarse al evaluar la actividad renal por lupus son los niveles de auto anticuerpos y niveles de complemento séricos, sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de estos parámetros para el diagnóstico de actividad de nefritis lúpica son bajos (sensibilidad 49-79% y especificidad 51-74%) para ser considerados como un adecuado biomarcador de actividad renal por lupus. (9)

Por lo tanto, ante la ausencia de un biomarcador específico, la biopsia renal, a pesar de ser un estudio invasivo, se considera el estándar de oro para evaluar el daño renal y la actividad de la enfermedad. (10)

3. Clasificación histológica

Los hallazgos histológicos que proporcionan las bases para las recomendaciones del tratamiento de la nefritis lúpica se divide en 6 clases:

1. Clase I. Nefritis lúpica mesangial mínima
2. Clase II. Nefritis lúpica proliferativa mesangial
3. Clase III. Nefritis lúpica focal
4. Clase IV. Nefritis lúpica difusa
5. Clase V. Nefritis lúpica membranosa
6. Clase VI. Nefritis lúpica con esclerosis

Para el caso de la NL clase III y IV, se deben de aplicar evaluaciones de actividad y cronicidad. Las lesiones activas, se dividen en dos grupos y se cuantifican en un rango de puntaje que va del 0 a 3, con máximo de 24 puntos. Mientras que las lesiones crónicas se califican con puntajes que van del 0 a 3 puntos con un máximo de 12 puntos y se dividen en lesiones glomerulares y túbulo-intersticiales (11). De forma específica, los pacientes con NL clase III (nefritis lúpica focal) y clase IV (nefritis lúpica difusa), se diferencian por el porcentaje de glomérulos afectados; mientras que en la clase III son menos del 50% de glomérulos afectados, en la clase IV sus valores son mayores del 50%. Otra diferencia entre los pacientes con clase III y IV está asociada con un curso clínico diferente entre ambas. Mientras que los pacientes con nefropatía lúpica clase IV se caracteriza por

presentar hematuria microscópica, proteinuria en rangos nefróticos y deterioro progresivo de la función renal, los pacientes con clase III muestran una presentación y evolución clínica menos agresiva. (12) A pesar de lo anterior en todas las clases de NL la resolución de la proteinuria es considerada como el predictor de sobrevida renal más importante, empleándose los siguientes criterios para definir actividad y remisión clínica (13):

1) **Remisión completa:** retorno a la creatinina basal previa más disminución en el índice de proteinuria/creatinina urinaria a 500 mg/g o 50 mg/mmol.

2) **Respuesta parcial:** estabilización ($\pm 25\%$), o mejoría en la creatinina sérica, pero sin regresar a lo normal, con un decremento mayor del 50% en el índice de proteinuria/creatinina urinaria.

De manera adicional se debe complementar la evaluación con otros biomarcadores serológicos como son la normalización de los niveles de complemento y la negativización de los anticuerpos anti DNA, ANA (anti-nucleares) y anticuerpos anti-SM (anti-Smith).

4. Patogénesis de LES

LES, es una enfermedad con pérdida de la auto-tolerancia en la cual están implicados procesos genéticos y epigenéticos. Dentro de los aspectos genéticos se observa que el locus que predispone para LES incluyen MHC-clase II (HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DQ6), MHC-clase III (C4A null gene), y otros extra MHC locus que involucran complejos inmunes, vías de señalización, apoptosis, señalización de los receptores tipo Toll y la expresión de interferón tipo I. (14) En tanto las alteraciones en la regulación epigenética incluyen citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metilación de DNA (DNA metiltransferasa) modificaciones de histonas (acetil/deacetiltransferasa); de igual manera se ha demostrado la participación de la regulación postranscripcional de mRNAs. (15) (ver Tabla 1).

Otros aspectos involucrados en la patogénesis son defectos de la membrana celular (bajo contenido de fosfatidil-serina), baja actividad enzimática (baja actividad sérica de DNAasa 1), señalización aberrante de células T, exceso de estrés oxidativo secundario a disfunción mitocondrial. Todas estas alteraciones pueden incrementar la apoptosis celular; además que, la

depuración de células necróticas se observa alterada en pacientes con lupus probablemente secundario a bajos niveles de complemento y de niveles de proteínas C reactiva. Como resultado del incremento en la liberación de células necróticas y el retraso en la depuración, se producen neoepitopes o actúan como patrón molecular, asociado con el riesgo para estimular de manera intracelular inflamomas TLRs y NLRP-3; de manera subsecuente, se favorece la producción de citocinas proinflamatorias IL-1b, IL-6, IL-8, IL-17, TNF-a e interferón tipo I por parte de la respuesta innata del sistema inmune. (16)

Tabla 1. Quimiocinas y citocinas implicadas en la patogénesis de LES

Citocina/Quimiocinas	Anormalidad	Alteración asociada
IFN α/β	Niveles elevados en suero y líquido cefalorraquídeo	Manifestaciones en SNC, hematológicas, fiebre.
Quimiocinas inducidas por IFN <ul style="list-style-type: none"> • MCP-1 (CCL2) • RANTES (CCL5) • MIP-3B (CCL19) • IP-109 (CxCL10) • SIGLEC-1 • CxCL1 • CXCL16 	Niveles elevados en suero y/ u orina, incremento expresión genética	Actividad de la enfermedad/ recaída Nefritis lúpica LES Neuropsiquiátrico Hipocomplementemia Auto anticuerpos (anti DNAds, anti U1 RNP, ro, Sm)
IFN γ	Niveles séricos elevados	¿Actividad de la enfermedad?
IL-17	Niveles séricos elevados	¿Actividad de la enfermedad?
IL-6	Niveles séricos y urinarios elevados	Actividad de la enfermedad; niveles de anti DNAds, bajos niveles de C3 y C4, nefritis lúpica.
IL-10	Niveles séricos elevados	Actividad de la enfermedad; niveles de anti DNAds, bajos niveles de C3 y C4
IL-12	Niveles séricos/aumentados	Nefritis lúpica (niveles elevados en orina/séricos)
IL-15	Niveles séricos elevados	Patogénesis de la enfermedad
IL-21	Niveles séricos elevados	¿Actividad de la enfermedad/patogénesis de la enfermedad?
IL-2	Disminución de los niveles séricos	¿Patogénesis de la enfermedad?
IL-1	Niveles séricos elevados	Actividad de la enfermedad
Antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra)	Disminución de los niveles séricos	Nefritis lúpica
BAFF (BLys)	Niveles séricos elevados	Actividad de la enfermedad
TNF α	Niveles séricos elevados	Actividad de la enfermedad: correlación con niveles séricos de IFN α

5. Biomarcadores en nefritis lúpica

El LES puede afectar cualquier tejido u órgano, sin embargo, no todos los órganos son afectados de manera simultánea y las manifestaciones en órganos específicos no son similares en diferentes pacientes. Las manifestaciones órgano específicas pueden tener variaciones en la presentación clínica a lo largo del tiempo. La heterogeneidad en la presentación clínica del LES demanda la presencia de biomarcadores que puedan diferenciar, determinar, monitorizar, estratificar o predecir la actividad órgano-específica.

La afección renal es una de las manifestaciones más comunes del LES y condiciona un incremento significativo de la morbimortalidad. Se presenta en 25-50% de los pacientes adultos y hasta en 80% de la población pediátrica, la progresión a ERC es elevada; hasta en un 25-40%. (17)

El contar con métodos que permitan detectar nefritis lúpica favorecería tratamiento oportuno el cual puede prevenir daño renal irreversible y la progresión a ERC. Los esfuerzos actuales están enfocados en la identificación de biomarcadores más sensibles y específicos para el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad renal con el objetivo de optimizar el tratamiento, distinguir entre la inflamación activa de las lesiones crónicas, con lo cual se pretende evitar el uso repetido de la biopsia renal y sus potenciales complicaciones en el seguimiento de los pacientes.

Tanto a nivel plasmático como en orina, se han evaluado el uso de biomarcadores para nefritis lúpica, sin embargo, debido a la fisiopatología de la enfermedad, los cambios biológicos encontrados a nivel plasmático pueden no reflejar lesión o afección local por lupus eritematoso sistémico; la actividad renal pudiera no tener implicaciones biológicas a nivel sistémico que puedan determinarse con biomarcadores plasmáticos. (Tabla 2)

Por este motivo, la búsqueda de biomarcadores a nivel urinario puede representar un escenario que demuestre los cambios patológicos e inflamatorios de manera local.

Dentro de los biomarcadores evaluados encontramos a la proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1); *Rovin y colaboradores*, observaron que los niveles urinarios de MCP-1, son un indicador sensible de afección renal, con niveles hasta 73% más elevado en pacientes con

actividad renal comparado con pacientes sin actividad renal. Además los niveles urinarios de MCP-1 no se correlacionan con actividad extrarenal; sin embargo, se observa que existe elevación en los niveles incluso 2-4 meses previo a la actividad renal de manera que los niveles urinarios de MCP-1 pudieran constituir un biomarcador temprano en la evaluación de pacientes con nefritis lúpica. (18)

Otra de las moléculas que cobra potencial importancia en el diagnóstico de nefritis lúpica es la gelatinasa de neutrofilos asociada a lipocalina; una glicoproteína cuya función es regular el transporte celular de hierro, apoptosis y diferenciación tisular. De manera normal los niveles de NGAL son bajos y su regulación se van a la alza en situación de isquemia, inflamación e infección. (19) En pacientes con nefritis lúpica *Brunner y colaboradores*, observaron que los niveles urinarios de NGAL fueron significativamente más elevados en comparación con pacientes sin actividad renal, además demostraron una asociación con los puntajes relacionados con actividad renal y no con actividad extrarenal. (20)

Tabla 2. Marcadores en nefritis lúpica (NL)

Marcadores tradicionales
Biopsia renal Niveles de C3/C4 séricos Niveles de Anti DNAds Cuantificación de proteinuria Sedimento urinario
Moléculas candidatas a biomarcadores (plasma, sangre periférica, riñón)
Anticuerpos anti-C1q (sérico) Fragmento C4d del complemento (biopsia renal) Fragmento C4 d complemento (sangre periférica, unida a eritrocitos)
Moléculas potenciales candidatas a biomarcadores (proteínas urinarias)
Proteína quimioatrayente de neutrófilos (MCP-1) Gelatinasa de neutrofilos asociada a lipocalina (NGAL) Factor similar a necrosis tumoral débil inductor de apoptosis (TWEAK) Transferrina (TF) Glicoproteína acida α -1 (AGP; AAG) Ceruloplasmina Hepcidina TGF- β

Entre otros biomarcadores que han sido evaluados se encuentran los anticuerpos C1q séricos, los cuales se asocian con un peor pronóstico y respuesta al tratamiento; -la expresión de C4d en tejido renal o sérico , los niveles de transferrina , las cifras de glicoproteína ácida alfa-1 , la ceruloplasmina y la hepcidina) con resultados prometedores y en vías de confirmación.

6. TWEAK y riñón

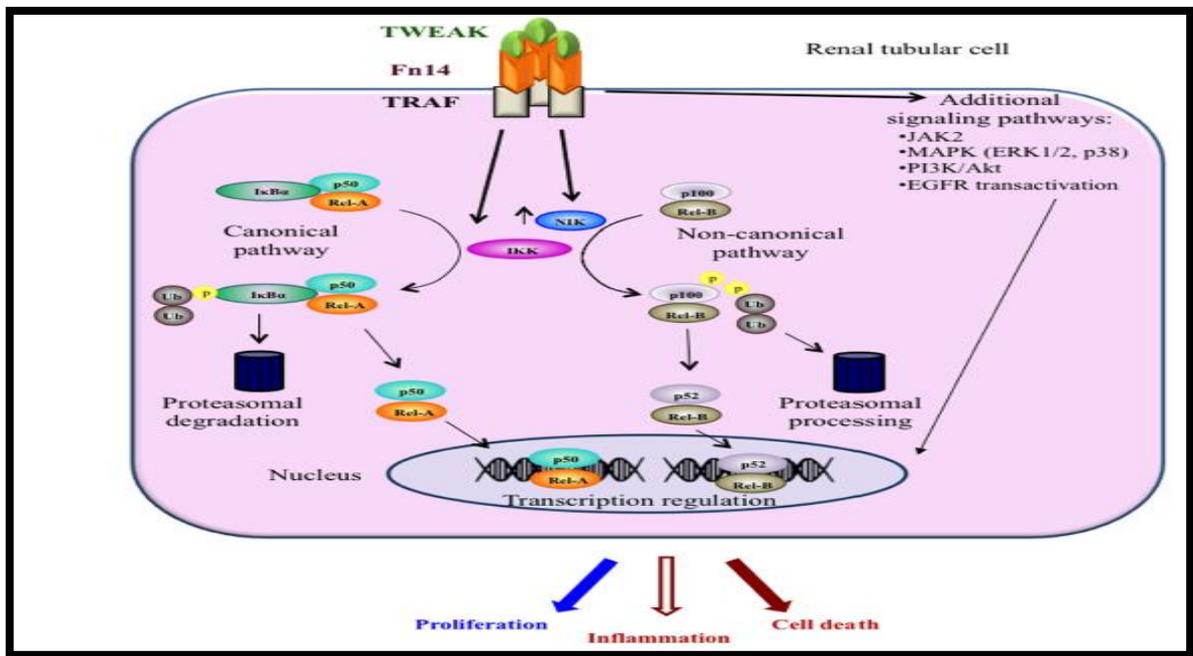
El Factor similar a necrosis tumoral débil inductor de apoptosis (TWEAK), es una citocina multifuncional miembro de la superfamilia de citocinas del factor de necrosis tumoral que se activa al unirse al receptor Fn-14 (Fn14, TWEAK receptor, TNFRSF12A, CD266); proteína miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral. (21)

El TWEAK, es una citocina que fue identificada de manera inicial en 1997. Las interacciones TWEAK-Fn14 pueden inducir inflamación, así como regulación a la alza de un número de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión en diversos tejidos. (22) El TWEAK y su receptor codifican para una glicoproteína transmembrana de 249 aminoácidos. La porción carboxiterminal extracelular posee un dominio homólogo al del factor de necrosis tumoral (TNF) que participa en la auto-trimerización y unión al receptor; posee además 2 sitios de anclaje de furina. (23)

El TWEAK se expresa ampliamente a nivel renal; tanto en células residentes como en los leucocitos infiltrantes. (24) El procesamiento proteolítico del TWEAK anclado a la membrana genera la citocina soluble (156 aminoácidos). El dominio aminoterminal citoplasmático tiene un sitio potencial de fosforilación y un sitio de reconocimiento de furina. (25) (Figura 1) De manera normal en tejido sano la expresión del Fn14 es baja; sin embargo, los niveles incrementan en respuesta a estrés o lesión. (26) A nivel renal se observa expresión del Fn14 en células tubulares, mesangiales y podocitos; Además, se observa que las células que infiltran a nivel renal como macrófagos, pueden expresar Fn14. (27,28) El gen del FN14 codifica para una proteína transmembrana de 129 aminoácidos que mediante un procesamiento se convierte en una proteína Madura de 102 aminoácidos. El dominio extracelular (53 aminoácidos) contiene dominios ricos en cisteína necesarios para la unión del TWEAK. (29,30) A diferencia de los otros receptores miembros de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral el dominio intracelular del FN-14 (29

aminoácidos) carece del dominio de apoptosis; a pesar de lo anterior, contiene sitios de unión al receptor de factor de necrosis tumoral. El TWEAK regula procesos con relevancia fisiopatológica en lesión renal como muerte celular, proliferación, diferenciación, migración, inflamación, neoangiogenesis y regeneración tisular. Estos procesos biológicos se desencadenan al unirse a su receptor (Fn14) condicionando el reclutamiento de TRAF2 y TRAF 5 y la activación de vías de señalización. Posteriormente, las vías de señalización que se activan por la unión de TWEAK/Fn14 dependerán del tipo de célula y el microambiente. (31,33)

Figura 1. Mecanismo de acción de TWEAK-Fn14 a nivel renal.



A nivel tubular TWEAK induce proliferación la cual es mediada por las vías ERK1/2, p38 MAPK, P3-cinasa/Akt y NFκB Este efecto proliferativo quiescente es modulado por el microambiente de las células y el incremento de factores inflamatorios séricos inflamatorios tales como CXCL16, TNF α e interferón- γ que favorecen la expresión de Fn14. (34-36)

Por otro lado, TWEAK por sí solo, no promueve apoptosis; ésta es mediada en coestimulación por agentes presentes en el microambiente como TNF α e interferón- γ (37). La apoptosis inducida por TWEAK/TNF α /interferón- γ condiciona el reclutamiento de vías de apoptosis mitocondrial. La

combinación de citocinas acelera el proceso de muerte celular. La inhibición de caspasas previene fallas en la apoptosis inducida; pero incrementa la muerte celular total a través de vías de necrosis dependiente de especies reactivas del oxígeno. (38) TWEAK activa proteínas de cinasa activadas por mitogenos (MAPK) como ERK1/2, MAP p38, fosfoinositide 2 cinasa/Akt, JAK2 cinasa; mediado tanto por la vía clásica como por la no clásica. (39,40) Con ello, TWEAK induce la expresión de citosinas inflamatorias como MCP-1, IL-16, RANTES y CXCL 16 y regula a la baja la expresión de Klotho. (41,42)

A nivel mesangial, TWEAK induce la expresión de mediadores inflamatorios dependiente de NFκB; entre los cuales encontramos MCP-1, RANTES, CXCL10 y CXCL1; promueve la proliferación mesangial. EL TWEAK por sí solo, no induce muerte celular a nivel mesangial; pero la combinación de TWEAK e interferón incrementa la apoptosis (43)

Los podocitos forman de igual manera parte del blanco de la vía de señalización TWEAK; induce respuesta proinflamatoria vía activación de la señalización dependiente de NFκB. (44)

6.1 Expresión de TWEAK a nivel renal

La expresión de TWEAK y su receptor Fn14 a nivel glomerular parece estar relacionada con la clase histológica y el índice de actividad; *Jianxin Lu y colaboradores.*, evaluaron en 113 pacientes con NL con biopsias renales seriadas, la expresión de *RNAm* de TWEAK, FN14, IP-10 y CXCR3; se identificó que la expresión glomerular de Fn14 disminuye cuando la clase histológica cambia de una clase proliferativa o mixta a nefropatía membranosa ($p = 0.016$); de manera contraria, se observó que existía un incremento en la expresión cuando la clase histológica cambia de glomerulopatía membranosa a proliferativa o mixta ($p = 0.0006$), mientras que la expresión tubulointerstitial de TWEAK disminuyó cuando existe cambio de glomerulopatía membranosa a proliferativa ($p = 0.004$). Además el índice de actividad histológica se correlaciono de manera significativa con la expresión glomerular de Fn14 ($r = 0.421$, $p < 0.0001$) y la expresión tubulointerstitial de TWEAK ($r = 0.413$, $p < 0.0001$). (45) Basado en lo anterior, recientemente ha surgido el interés de definir nuevos biomarcadores para evaluar la actividad de la enfermedad. En

los últimos años la evidencia científica muestra que el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK) se expresa en altos niveles en modelos animales de nefritis lúpica.

6.2 TWEAK y Lupus

El TWEAK promueve daño renal y progresión en estadios tempranos y tardíos; la respuesta de las células renales al TWEAK es mediado por la expresión de Fn-14 en células endoteliales, mesangiales y podocitos quienes en respuesta liberan moléculas proinflamatorias: MPC1, IL-10, MIP 1 α , ICAM1, VCAM-1. TWEAK/Fn14 a nivel endotelial promueve la supervivencia, proliferación y angiogénesis mediado por VEGF (vascular endothelial growth factor) y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule -1). A nivel tubulointersticial conduce a fibrosis y apoptosis mediada por IFN γ (interferón γ) y TGF β (transforming growth factor beta). (46)

Actualmente se ha propuesto que el TWEAK facilita la reparación fisiológica de los tejidos y su regeneración después de una lesión aguda, pero en el contexto de enfermedades crónicas inflamatorias, la expresión disregulada de TWEAK es patogénica, por lo que también podría considerarse como factor pronóstico de respuesta al tratamiento médico. Mientras que en pacientes con LES, TWEAK correlaciona de manera significativa con la actividad renal de la enfermedad. (47)

La asociación de los marcadores de lesión endotelial y los hallazgos histológicos solo se han podido corroborar en modelos animales de nefritis lúpica; en el estudio publicado por *Kimihiko N. y colaboradores*, mostraron que la expresión de RNAm de VCAM-1 a nivel tisular se encuentra más elevada ante la presencia de mayor proliferación endotelial. (48)

En un estudio multicéntrico en el que se evaluaron los niveles urinarios de TWEAK como biomarcador de nefritis lúpica, observando que sus niveles se encuentran significativamente más elevados en pacientes con nefritis lúpica respecto a pacientes con otras enfermedades autoinmunes y pacientes sanos ($p=0.039$), además, de que los niveles urinarios elevados de TWEAK predicen actividad renal en pacientes con LES con RR 7.36 (IC 95%= 2.25-24.7, $p=0.001$);

concluyendo que los niveles urinarios de TWEAK constituyen un mejor marcador para distinguir la actividad renal en pacientes con LES que los anticuerpos anti DNA y niveles de complemento. (49) Con base en los estudios previos, nuestro grupo evaluó el desempeño de los niveles urinarios de TWEAK como biomarcador de nefritis lúpica en pacientes incidentes de NL y sin tratamiento inmunosupresor previo. En este trabajo se evaluaron 44 pacientes, divididos en 4 grupos: 1) pacientes con nefritis lúpica, 2) lupus sin actividad renal, 3) otras glomerulopatías y 4) controles sanos; observamos que los pacientes con nefritis lúpica presentan niveles urinarios de TWEAK más elevados con respecto a los otros grupos con diferencia estadísticamente significativas; empleado el punto de corte de 4.91 pg/mg/Cr se detectó sensibilidad de 81% y especificidad de 75% con área debajo de la curva de .87; consideramos que los niveles urinarios de TWEAK pueden distinguir adecuadamente la presencia de nefritis en pacientes con lupus eritematoso sistémico.(50)

Por todo lo anterior, se tienen interrogantes aún por definir como son: 1) ¿es diferente la expresión de TWEAK de acuerdo con la clase histológica de NL?; y 2) ¿cuál es la asociación clínica entre los niveles urinarios de TWEAK con los marcadores histológicos de lesión endotelial, lesión túbulo intersticial de pacientes con NL? Por este motivo se desarrolló el presente proyecto de investigación en la que tratamos de profundizar el conocimiento de TWEAK como un potencial biomarcador urinario de actividad renal por lupus, además de definir los niveles urinarios de TWEAK con la expresión histológica de marcadores de lesión endotelial como VEFG y VCAM-1, y los marcadores de lesión tubulointersticial como el TGF β .

II. Pregunta de investigación

¿Cuál es el grado de asociación entre los niveles urinarios de TWEAK con marcadores de lesión endotelial, tubulointersticial y hallazgos histológicos en pacientes con nefritis lúpica?

III. Planteamiento del problema

La afección renal del lupus eritematoso sistémico es una complicación grave y común con impacto directo en la sobrevida del paciente. La NL se caracteriza por presentar un curso variable con presencia de remisión y recaídas por lo que se requiere un seguimiento constante con modificaciones constantes en el tratamiento y seguimiento estrecho. Esta heterogeneidad en la presentación clínica de la NL demanda la presencia de biomarcadores que puedan diferenciar, determinar, monitorizar, estratificar o predecir la actividad órgano-específica. La evaluación de la actividad de NL está basada en aspectos clínicos, parámetros bioquímicos y marcadores inmunológicos, sin embargo, es la biopsia renal el estándar de oro para evaluar el daño renal y el grado de actividad de la enfermedad. La biopsia renal, pese a ser un procedimiento invasivo con potenciales complicaciones, es considerado todavía el estándar de oro en la evaluación de la actividad lúpica renal. Por este motivo, es necesaria la búsqueda de potenciales biomarcadores sensibles y específicos, que nos permitan definir la actividad lúpica renal de forma menos costosa e invasiva respecto a la biopsia renal. Se ha evaluado la utilidad de la determinación de los niveles urinarios de TWEAK como biomarcador para definir actividad renal por lupus, sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el grado de asociación entre los niveles urinarios de TWEAK con los hallazgos histológicos, de igual manera se desconoce si los niveles urinarios de TWEAK pueden modificarse respecto con las clases histológicas de NL. Por otro lado, a pesar de que la vía de señalización del TWEAK-Fn14, en nefritis lúpica se encuentra sobre expresada en todas las células implicadas en la patogénesis, la expresión de los niveles urinarios de TWEAK con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial únicamente ha sido evaluada en modelos animales y no en pacientes con NL. Por todo lo anterior, consideramos necesario evaluar la utilidad de los niveles urinarios de TWEAK como biomarcador en nefritis lúpica así como identificar si existe un punto de corte en los niveles urinarios que se asocie con los hallazgos histológicos y las

moléculas implicadas en lesión endotelial y tubulointersticial como parte de la evaluación inicial, seguimiento o factor pronóstico en pacientes con nefritis lúpica.

IV. Justificación

La prevalencia de ERC en pacientes con LES es común, debido a que con las actuales terapias que inducen la remisión completa se alcanza este objetivo en tan solo el 50% de los casos. (7) La presencia de nefropatía lúpica debe considerarse en aquellos pacientes con alteración en la función renal, proteinuria, hipertensión y/o sedimento urinario activo (hematuria con presencia de eritrocitos dismórficos, leucocituria, cilindros eritrocitarios). Otros parámetros que deben considerarse al evaluar la actividad renal por lupus son los niveles de auto anticuerpos y niveles de complemento séricos, sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de estos en relación a la actividad de nefritis lúpica son bajas (sensibilidad 49-79% y especificidad 51-74%) para ser considerados como adecuados biomarcadores de actividad renal por lupus.

Considerando los riesgos inherentes a la biopsia renal se han planteado evaluar el desempeño de otros biomarcadores que pudieran constituirse como auxiliares en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con nefritis lúpica. Recientemente nuestro grupo publicó un estudio que demostró que los niveles urinarios de TWEAK pueden distinguir adecuadamente la presencia de nefritis lúpica con una sensibilidad del 81% y una especificidad del 75%, desempeño superior al de los marcadores convencionales utilizados hasta ahora.

V. Hipótesis

Si la vía de señalización TWEAK /Fn 14 se sobreexpresa en pacientes con nefritis lúpica y regula la liberación de VEGF, VCAM-1 y TFG β , entonces, los pacientes con nefropatía lúpica mostrarán asociación de los niveles TWEAKu (≥ 4.91 pg/mg/cr), con lesiones proliferativas endoteliales (>1) y con el marcaje inmunohistoquímico de VEGF y VCAM-1 ($>50\%$); y además, una asociación de niveles TWEAKu (≥ 4.91 pg/mg/cr) con fibrosis tubulointersticial ($>15\%$) y con expresión de TFG β ($>$ al 50%).

VI. Objetivos

General

Evaluar el grado de asociación entre los niveles urinarios de TWEAK y marcadores de lesión endotelial (VEGF y VCAM-1) y tubulointersticial (TFG β), así como con los hallazgos histológicos de pacientes con nefritis lúpica

Específicos

1. Cuantificar los parámetros bioquímicos de los indicadores de afección renal por LES: proteinuria, creatinina sérica, creatinina urinaria, niveles de complemento sérico.
2. Determinar si existen diferencias en las concentraciones urinarias de TWEAK de acuerdo a la clase histológica de nefritis lúpica.
3. Evaluar la expresión histológica por inmunohistoquímica de los marcadores de lesión endotelial VEGF y VCAM-1 en tejido renal de pacientes con NL.
4. Correlacionar los marcadores de lesión endotelial con los niveles urinarios de TWEAK
5. Correlacionar los niveles de TWEAK urinario con los parámetros bioquímicos de indicadores de afección renal por lupus.
6. Evaluar la expresión histológica por inmunohistoquímica de TGF beta en tejido renal de pacientes con NL.
7. Correlacionar la expresión de TGF beta con los niveles urinarios de TWEAK.

VII. Metodología

1. Tipo y diseño del estudio

Estudio transversal, analítico y comparativo. En el que se determinó el grado de asociación y fuerza de asociación entre los niveles urinarios de TWEAK con la expresión histológica de

marcadores de lesión endotelial (VEFG y VCAM-1) y tubulointersticial (TFG β) en pacientes con nefritis lúpica clases histológicas III, IV, V y combinaciones de la clasificación de la ISN/RSP (International Society of Nephrology/ Real Society of Pathology) demostrada por biopsia renal percutánea y que no hayan recibido tratamiento inmunosupresor previo.

2. Población y tamaño de la muestra

2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes con nefritis lúpica demostrada por biopsia renal (III, IV y V, así como combinaciones de acuerdo a la ISN/RSP)
- Mayores de 18 años
- Nefritis lúpica no tratada

2.2 Criterios de exclusión

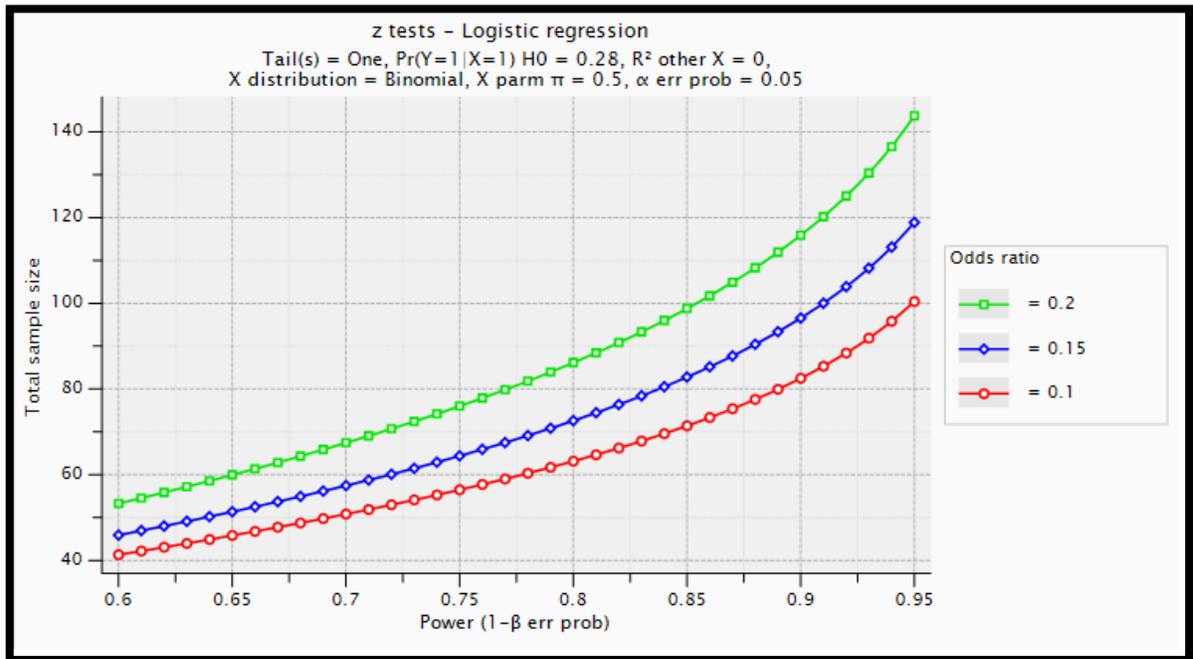
- Pacientes que cursen con IVU
- Enfermedades autoinmunes asociadas
- Enfermedades neoplásicas asociadas

2.3 Criterios de eliminación

- Tejido renal insuficiente para la definición de NL o para realizar las tinciones de inmunohistoquímica
- Muestra de orina contaminada

La selección de pacientes se realizó a conveniencia teniendo en cuenta la baja incidencia de pacientes sin tratamiento farmacológico previo. Se realizó cálculo de tamaño de la muestra para regresión logística con distribución binomial mediante el programa estadístico G power considerando el tamaño del efecto del estudio previo con d cohen de .52, OR 2.56. Se observa un tamaño total de 124 pacientes con poder estadístico de 80% y significancia de 95%.

Figura 2. Calculo de tamaño de la muestra



3. Variables

Variable Dependiente

- Niveles urinarios de TWEAK

Variables Independientes

- Depósito de VCAM-1, VEGF, TGF-β
- Hallazgos histológicos
- Concentraciones séricas de creatinina, urea y albumina.
- Proteinuria en orina de 24 horas.

Tabla 3. Definición conceptual y operacional de variables

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERATIVA	INDICADOR	TIPO DE VARIABLE	PRUEBA ESTADÍSTICA
PROTEINURIA	Cantidad de proteínas en orina de 24 hrs expresado en miligramos/decilitro	Cuantificación en miligramos /decilitro de proteínas en orina de 24 hrs	Mg/dl	Cuantitativa continua	Kruskal Wallis
INDICE DE ACTIVIDAD EN LA BIOPSIA RENAL	Las lesiones activas se clasifican en dos: <ul style="list-style-type: none"> • Glomerulares. • Túbulo-intersticiales: 	Lesiones glomerulares: hipercelularidad endocapilar con o sin infiltración leucocitaria y disminución de las luces capilares, cariorrexis y necrosis fibrinoide, semilunas celulares, trombos hialinos infiltración leucocitaria glomerular o rotura de la membrana basal glomerular Tubulointersticiales: infiltración de células mononucleares.	Puntos LES activo: mayor a 9 puntos.	Cuantitativa continua Índice de Actividad <12 puntos IA ≥ 12 puntos Índice Cronicidad <6 puntos IA ≥6 puntos FIAT < 15% FIAT ≥15%	Kruskal Wallis / Regresión logística
CLASIFICACION HISTOLOGICA	Caracterización de acuerdo a la clasificación de la ISN/RSP	Clase I: mesangial mínima Clase II: proliferativa mesangial Clase III: nefritis lúpica proliferativa focal Clase IV: nefritis lúpica proliferativa difusa. Clase V: membranosa Clase VI: esclerosada	Porcentaje de proliferación mesangial, endocapilar, esclerosis y cambios sugestivos de glomerulopatía membranosa	Cualitativa ordinal	Kruskal Wallis

NIVELES URINARIOS DE TWEAK	Se determinara cuantitativamente mediante ELISA	Puntaje expresado en pg/ mg de creatinina urinaria	Pg/mg de creatinina	Cuantitativa continua	Kruskal Wallis / Regresión logística
DEPOSITO DE VEGF	Evaluación de la expresión a nivel histológico expresado en porcentaje	Porcentaje en inmunohistoquímica: 0, 25, 50, 75 y 100%	Porcentaje	Cualitativa ordinal	Kruskal Wallis/ Regresión logística
DEPOSITO DE VCAM-1	Evaluación de la expresión a nivel histológico expresado en porcentaje	Porcentaje en inmunohistoquímica: 0, 25, 50, 75 y 100%	Porcentaje	Cualitativa ordinal	Kruskal Wallis / Regresión logística
DEPOSITO DE TGF-B	Evaluación de la expresión a nivel histológico expresado en porcentaje	Porcentaje en inmunohistoquímica: 0, 25, 50, 75 y 100%	Porcentaje	Cualitativa ordinal	Kruskal Wallis / Regresión logística
DEPOSITO DE TWEAK	Evaluación de la expresión a nivel histológico expresado en porcentaje	Porcentaje en inmunohistoquímica: 0, 25, 50, 75 y 100%	Porcentaje	Cualitativa ordinal	Kruskal Wallis / Regresión logística

VIII.- Procedimiento

1.- Se evaluaron pacientes que cumplieron criterios de lupus eritematosos sistémico y características clínicas de nefritis lúpica no tratada previamente de acuerdo con laboratorios recientes que orienten al diagnóstico (proteinuria, niveles de complemento, creatinina, urea, examen general de orina) y programados a biopsia renal percutánea.

2.- En las 24 horas cercanas al procedimiento (biopsia renal) se tomó una muestra de orina de 10 ml, la cual fue centrifugada a 3000 rpm, para posteriormente separarla del sedimento urinario. La muestra restante se congeló a - 20 grados centígrados, cuando se tuvo el total de las muestras del estudio, fueron descongeladas a temperatura ambiente y se determinó los niveles urinarios de TWEAK mediante una prueba de ELISA cuantitativo por espectrofotometría de luz (450 nm).

3. El tejido obtenido fue parafinado y posteriormente analizado y evaluado con tinciones de PAS, Masson, Plata, hematoxilina y eosina para clasificar las lesiones renales de acuerdo a la clasificación ISN/RPS. Otra parte del tejido renal parafinado se reservó en para determinación de VCAM-1, VEGF, TGF β y TWEAK en porcentaje por inmunohistoquímica.

4. El análisis de la expresión de los marcadores de lesión endotelial y tubulointerstitial se realizó de forma semiquantitativa y posteriormente se realizó un análisis de asociación y fuerza de asociación con los niveles urinarios de TWEAK

IX. Análisis estadístico

Se realizó análisis descriptivo para conocer las características generales de los grupos de estudio, mediante la estimación de medidas de tendencia central y de dispersión (medias \pm DE, promedios y frecuencias). Se realizó estadística no paramétrica por la distribución de pacientes por grupo: Kruskal Wallis y prueba exacta de Fisher de acuerdo a la variable para la comparación de los valores promedios obtenidos por los grupos de estudio, considerando un IC 95% y un valor p como significativa ≤ 0.05 .

Posterior al análisis de Kruskal Wallis se realizó contraste post hoc mediante U Mann Whitney entre clase III vs clase IV, clase III vs clase III+V, clase IV vs clase IV+V, clase III vs clase V, clase IV vs clase V. Se realizó análisis de regresión logística, para determinar el grado de asociación entre las variables independientes y la variable dependiente, considerando un IC 95 % y un valor p como significativa ≤ 0.05 .

X. Aspectos éticos y de bioseguridad: El presente estudio se consideró de bajo riesgo para el paciente ya que únicamente se requiere la toma de muestras de orina a los pacientes en los que se haya corroborado nefritis lúpica (clase III, IV, V y combinaciones) mediante biopsia renal. El resto de intervenciones como son la toma de muestras de sangre para evaluar el perfil inmunológico y la biopsia renal se consideran dentro de los estudios necesarios para el manejo clínico de pacientes con lupus eritematoso sistémico.

XI. Resultados

1. Características bioquímicas e histológicas

Inicialmente se evaluaron 39 pacientes, tres de los cuales fueron eliminados del estudio por no contar con tejido suficiente para el análisis de los marcadores tisulares, con una n final de 36 sujetos. La edad promedio fue 30.86 ± 9.5 años, el 83.3% (30 pacientes) fueron mujeres. El 41.6% (15 pacientes) fue identificado con NL clase IV+V, de los cuales el 26.7% (4 pacientes) tuvo requerimiento de terapia de reemplazo de la función renal. En la tabla 1 se presentan las características demográficas, parámetros bioquímicos y características histológicas de la población de acuerdo a la clase de la ISN/RSP. Se identificó que el 63.8% (23 pacientes) de la población, presentó un índice de cronicidad < 6 puntos, con diferencia significativa entre las clase histológica ($p=0.043$). Específicamente, la clase histológica IV presentó un índice de cronicidad >6 puntos en el 66.6% de los casos. Respecto al índices de actividad 50% de la población registró un índice de actividad mayor de 12 puntos, con diferencias estadísticas entre las clases histológicas ($p=0.014$); siendo la clase histológica IV la que presentó una mayor frecuencia (75%) de actividad mayor de 12 puntos. Con relación a la fibrosis intersticial grado 1 y 2, se observó una frecuencia de 41.7% y 38.9% respectivamente de todas las muestras analizadas, sin diferencias significativas por clase histológica ($p=0.158$).

Al analizar los parámetros bioquímicos, de acuerdo a la clase histológica, se identificó que la clase histológica IV presentaba los niveles de urea más elevados (urea 149 ± 66.7 mg/dL) con respecto a los otros grupos con diferencias estadística significativa ($p= 0.012$). La media de creatinina para los sujetos de estudio fue de 3.12 ± 3.3 mg/dL, siendo la clase IV la que presentó los niveles más elevados de creatinina (4.21 ± 3.56 mg/dL), sin diferencias significativas ($p=0.08$). Mientras que la media de albúmina fue 1.97 ± 0.76 g/dL; la clase histológica III+V presentó los niveles de albúmina más bajos con respecto a los otras clases histológicas, sin evidenciar diferencias significativas ($p=0.075$). La proteinuria promedio fue 4844 ± 4152 mg/24 horas, con mayores cifras en la clase histológica IV+V 7651 ± 4367 mg/ 24 horas, con diferencias significativas entre clases ($p=0.014$).

Dentro de los parámetros inmunológicos, se observó un consumo de C3 y C4 (45.58 ± 22.9 y 9.12 ± 6.44 respectivamente), con un mayor consumo de C3 en la clase histológica III +V y de la fracción C4 en la clase histológica III (C3: 33.4 ± 15.4 y C4: 6.09 ± 4.43) sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1).

1.1 ¿Existen diferencias en los niveles urinarios de TWEAK de acuerdo a la clase histológica?

En la población total observamos niveles urinarios de TWEAK de 10.81 ± 7.5 , los niveles más elevados se encuentran en la clase histológica III + V (13.9 ± 10.9), seguidos de la clase histológica III (12.8 ± 8.3), sin embargo no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0.888$). (Figura 1)

1.2 Comparación entre clases histológicas

Se realizó análisis post hoc con prueba U de Mann Whitney en los que se compararon los grupos de la siguiente manera: clase III vs clase IV, clase III vs clase III + V, clase IV vs clase IV+ V, clase III vs clase V, clase IV vs clase V y clase III+ V vs clase IV + V. Los resultados de las diferencias de medias de los parámetros bioquímicos e histológicos los observamos en la figura 2.

2. Marcadores tisulares de acuerdo a la clasificación de la ISN/RSP

2.1. Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

La tabla 2, Figura 3A, presenta la expresión de los marcadores tisulares VCAM-A (VCAM-arteriolar), 3B VCAM-G (VCAM-glomerular) 3C VEGF-A (VEFG-arteriolar), y 3D VEGF-G (VEGF-glomerular) de acuerdo a la clase histológica. A nivel del endotelio glomerular el 72.2% (26) de los pacientes presentaron depósito $\geq 50\%$ de VEGF; el depósito moderado a difuso a nivel glomerular se identificó en el 100% de los pacientes con clase histológica IV, el 80% con clase histológica IV+V, mientras que la clase histológica V, no presentó depósito de VEGF a nivel endotelial glomerular ($p=0.011$). A nivel arteriolar, el 52.8% (19) de las muestras tenían depósito de moderado a difuso de VEGF-A; en el 77.8% (19) de las biopsias con clase histológica III se

identificó depósito de VEGF entre 0-25% (sin depósito - depósito leve), a diferencia de la clase histológica IV en la que se observa que el 50% (6) de las muestras presentaban depósito $\geq 50\%$, en la clase histológica IV+V el 73.4% (11) presentó depósito a nivel arteriolar de moderado a difuso. En la clase histológica V, no se observa depósito de VEGF a nivel arteriolar, sin que se identificarán diferencias estadísticamente significativas ($p=0.254$).

2.2 Molécula de Adhesión Vascular (VCAM)

El 69.4% (25) de las muestras analizadas presentaron depósito de VCAM entre 0-25% (sin depósito – depósito leve) en las células endoteliales glomerulares; la clase histológica III en 66.7% (6) de los pacientes presentó depósito $\leq 25\%$ (sin depósito-depósito leve), de manera similar la combinación de clase histológica III+V presentó en el 100% depósito de 25%. En la clase histológica IV se identificó en el 75% depósito $\geq 50\%$ a nivel glomerular, a diferencia de la clase histológica IV+V en las que solamente el 20% presentó depósito $\geq 50\%$; en la clase histológica V no se detectó depósito VCAM a nivel glomerular, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p=0.094$).

Con respecto al depósito de VCAM a nivel arteriolar observamos que el 87.5% tiene un depósito entre 0-25%; la clase histológica III presenta en 77.8% depósito menor o igual a 25% (sin depósito-depósito leve); observamos que el 100% de los pacientes con clase histológica III+V presenta depósito menor o igual a 100%, la clase histológica IV en 87.5% no se identificó depósito a nivel arteriolar, la combinación de clase histológica IV +V en 13.4% presentó depósito $\geq 50\%$ a nivel arteriolar. La clase histológica no proliferativa en 100% no presentó depósito de VCAM a nivel arteriolar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas $p=0.777$. (Tabla 2, figura 3B)

2.3 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El 71.7 % de los pacientes (26 pacientes) presentó depósito de TGF- β $\geq 50\%$ (depósito moderado-difuso); la clase histológica IV, es en la que se observa el mayor depósito a nivel del infiltrado inflamatorio, observando que el 100% de las muestras tiene depósito $\geq 50\%$ sin encontrar

diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.362$); seguido de la clase histológica III, que presenta en un 77.7% depósito $\geq 50\%$, en la combinación de clases histológicas el 62.5% de los pacientes con clase histológica III+V presentaron depósito $\geq 50\%$ a nivel del infiltrado inflamatorio y el 73.3% de la clase histológica IV + V presentó depósito $\geq 50\%$. La clase histológica V en 50% (1 paciente) tuvo depósito $\geq 50\%$; no observamos diferencias estadísticamente significativas entre las clases. (Tabla 2, Figura 3E)

3. Correlación de parámetros bioquímicos de actividad por LES con niveles urinarios de TWEAK.

Al realizar la correlación de Pearson entre los niveles urinarios de TWEAK y la concentración sérica de urea y creatinina no se identificó correlación significativa. (Figura 4A)

Con respecto a los marcadores inmunológicos, los niveles urinarios de TWEAK presentaron correlación negativa débil con los niveles de C3, sin significancia estadística ($r=-0.248$, $p= 0.145$), con los niveles de C4 se observa correlación negativa muy baja con significancia estadística ($r=-0.114$, $p=0.0395$). (Figura 4B)

En relación a proteinuria y albumina sérica, los niveles urinarios de TWEAK se correlacionaron débilmente con los niveles de proteinuria, así como con la albumina sérica ($r= 0.221$, $p= 0.195$, $r=-0.222$, $p=0.194$, respectivamente) sin significancia estadística. (Figura 4C)

4. Correlación de los hallazgos histológicos con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.

Se realizó correlación de los hallazgos histológicos con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial mediante Tau-b Kendall, por el tipo de variables y las características de la distribución de la muestra; el índice de actividad presentó correlación moderada con significancia estadística ($r=0.425$, $p=0.012$) con los niveles de VEGF a nivel glomerular; mientras que el depósito de VEGF a nivel arteriolar tuvo correlación débil con el índice de actividad sin significancia estadística ($r=0.139$, $p=0.386$). Los niveles de VCAM a nivel arteriolar y glomerular no correlacionaron con el índice de actividad ($r=0.009$, $p=0.959$ y $r=0.076$, $p=0.669$, respectivamente).

Se observa que los niveles de TGF β no presentaron correlación significativa el índice de actividad ($r=0.094$, $p=0.552$). Con respecto al índice de cronicidad y los niveles de VCAM a nivel glomerular, se identificó una correlación fuerte con significancia estadística ($r=0.659$, $p=0.00$); mientras que con los niveles arteriolares de VCAM correlacionaron débilmente sin significancia estadística ($r=0.209$, $p=0.236$), no se observó correlación de los niveles de VEGF a nivel arteriolar ni glomerular con el índice de cronicidad ($r= 0.185$, $p= 0.294$, $r=0.015$, $p= 0.932$ respectivamente). Los niveles de TGF- β a nivel del infiltrado inflamatorio presentaron una muy débil correlación con el índice de cronicidad sin significancia estadística ($r=0 .104$, $p= 0.560$).

El grado de fibrosis intersticial y atrofia tubular presentaron una correlación fuerte ($r=0.826$, $p=0.00$) con los niveles glomerulares de VCAM, mientras que con los niveles arteriolares se detectó una correlacionan modera, sin significancia estadística ($r=0.413$, $p=0.12$), y con el deposito glomerular de VEGF correlación baja ($r=0.201$, $p=0.240$), no se observó correlación de los niveles arteriolares de VEGF con el IFTA ($r=-0.129$, $p=0.216$). Los niveles de TGF- β a nivel de infiltrado inflamatorio correlacionaron débilmente con el grado de FIAT, ($r= 0.238$, $p=0.162$). (Tabla 3)

5. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.

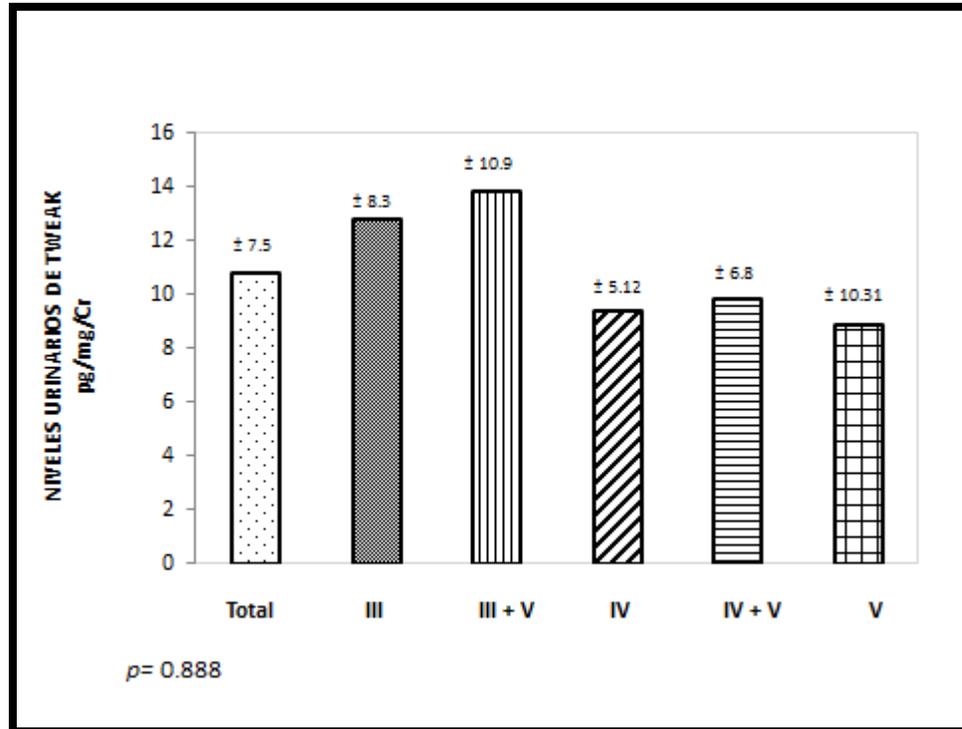
Se realizó regresión logística con la finalidad de identificar la fuerza de asociación entre los niveles urinarios de TWEAK y los marcadores de lesión endotelial considerando dos puntos de corte, (≥ 4.91 con base en los resultados de la población general y ≥ 7.95 para el género femenino).

Al emplear el punto de corte $\geq 4,91$, se observó que el factor de crecimiento vascular endotelial a nivel arteriolar presentaba un OR de 11.298, (IC95% **0.533 - 239.65**, $p= 0.120$). Se observa que los niveles de TGF- β mayor o igual al 50% a nivel del infiltrado inflamatorio tienen una OR de 1.778 (IC 95% **0.306 - 10.324**, $p=0.521$). No se observa asociación de los niveles urinarios de TWEAK con el resto de marcadores a nivel tisular (Tabla 4) En relación a los niveles urinarios de TWEAK con punto de corte ≥ 7.95 observamos que el VEGF a nivel arteriolar tiene un OR de 2.672 (IC 95% 0.358-19.965, $p=0.338$). Con respecto al VCAM a nivel glomerular observamos una OR de 1.319 (IC 95% 0.093-18.802, $p=0.838$). (Tabla 5)

6. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK con hallazgos histológicos de nefritis lúpica.

En relación a los hallazgos histológicos realizamos regresión logística con los dos puntos de corte previamente establecidos, se evaluó el índice de cronicidad en dos parámetros pacientes con <6 puntos y ≥ 6 puntos, el índice de actividad se dividió en <12 puntos y ≥ 12 puntos, con respecto a la fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA) se ordenó >15% y $\geq 15\%$. Se observó que el índice de cronicidad, índice de actividad, el grado de fibrosis intersticial y atrofia tubular con los niveles urinarios de TWEAK 4.91 y de ≥ 7.95 , no presentaron asociación significativa. (Tabla 4 y 5)

Figura 1. Niveles urinarios de TWEAK de acuerdo a la clase Histologica



Parámetro	Total n= 36 (%)	Clase III n= 9 (%)	Clase III+ V n= 2 (%)	Clase IV n= 8 (%)	Clase IV + V n= 15 (%)	Clase V n= 2 (%)	P
CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS							
Edad	30.861 ± 9.5	31.6 ± 10.51	3.15 ± 13.6	31.8 ± 10.5	29.5 ± 9.08	39 ± 12.72	0.702
Género (%)							
Masculino	6 (16.7)	1 (11.1)	0 (0)	1 (12.5)	4 (26.7)	--	0.820
Femenino	30 (83.3)	8 (88.9)	4 (100)	7 (87.5)	11 (73.3)	2 (100)	
TRFR* (%)							
Si	12 (33.3)	2 (22.8)	--	6 (75)	4 (26.7)	--	0.074
No	24 (66.7)	7 (77.8)	2 (100)	2 (25)	11 (73.3)	2 (100)	
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS							
Índice de cronicidad							
• < 6 puntos	23 (63.8)	5 (62.5)	4 (100)	2 (25)	11 (73.3)	No aplica	0.043
• > 6 puntos	11 (30.5)	3 (37.5)	0 (0)	6 (75)	4 (26.6)		
Índice de actividad							
• <12 puntos	16 (44.4)	6 (75)	4 (100)	1 (25)	5 (33.3)	No aplica	0.014
• >12 puntos	18 (50)	2 (25)	0 (0)	7 (75)	10 (66.6)		
FIAT							
• GRADO 0	6 (16.7)	2 (22.2)	2 (50)	--	2 (13.3)	1 (50)	0.158
• GRADO 1	15 (41.7)	2 (22.2)	2 (50)	2 (25)	10 (66.7)	1 (50)	
• GRADO 2	14 (38.9)	5 (55.6)	-	6 (75)	2 (13.3)	--	
• GRADO 3	1 (2.8)	--	-	-	1 (6.7)	--	
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS							
Urea mg/dl	92.04 ± 68.3	66.8 ± 55.3	50.4 ± 68.03	155 ± 65.4	90.2 ± 62.1	42.8 ± 10.74	0.012

Creatinina mg/dl	3.12 ± 3.3	3.0 ± 3.6	1.3 ± 1.5	4.54 ± 3.6	3.079 ± 3.23	.75 ± .49	0.08
Albúmina g/dL	1.97 ± .76	2.3 ± .77	1.1 ± .33	2.39 ± .47	1.73 ± .74	1.83 ± 1.27	0.075
Proteinuria mg/24 hrs	4844 ± 4152	1601 ± 1248	4529 ± 4293	3823 ± 2724	7651 ± 4367	2462 ± 2599	0.014
Niveles de C3	45.5 ± 22.9	42.7 ± 22.4	33.4 ± 15.7	41.08 ± 13.17	48.8 ± 28.5	64.1 ± 11.03	0.482
Niveles de C4	9.1 ± 6.4	6.09 ± 4.43	8.2 ± 5.4	8.4 ± 4.6	10 ± 7.38	19.5 ± 4.95	0.212
FIAT: fibrosis intersticial y atrofia tubular.							
TRFR: terapia de reemplazo de la función renal.							

Tabla 1. Características Demográficas histológicas y parámetros bioquímicos

Tabla 2. Marcadores a nivel tisular

Marcadores tisulares	Total n= 33	Clase III n= 9	Clase III+V n=2	Clase IV n= 8	Clase IV + V n=15	Clase V n= 2	<i>p</i>
VCAM-A							
<50	86%	77.8%	100%	87.5%	86.6%	100%	0.777
≥50	13.9%	22.2%	0	12.5%	13.4%	0%	
VCAM-G							
<50	69.4%	67.7	0	37.5	80	100	0.094
≥50	30.6%	33.2	100	62.5	20	0	
VEGF-A							
<50	47.3	66.64	50	50	26.6	100	0.097
≥50	52.7	33.3	50	50	73.4	0	

VEGF-G							
<50	47.3	33.2	100	0	20	100	0.011
≥50	52.7	66.7	0	100	80	0	
TGF- β							
<50	27.7	22.2	37.5	0	26.7	50	0.362
≥50	72.3	77.8	62.5	100	73.3	50	

Figura 2. Análisis post Hoc (U Mann Whitney)

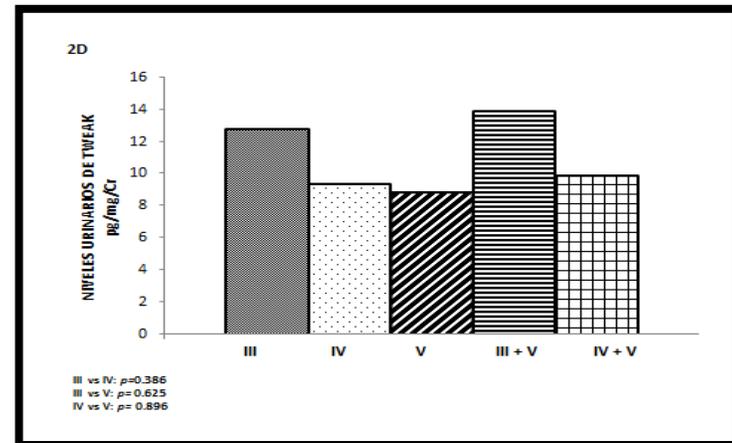
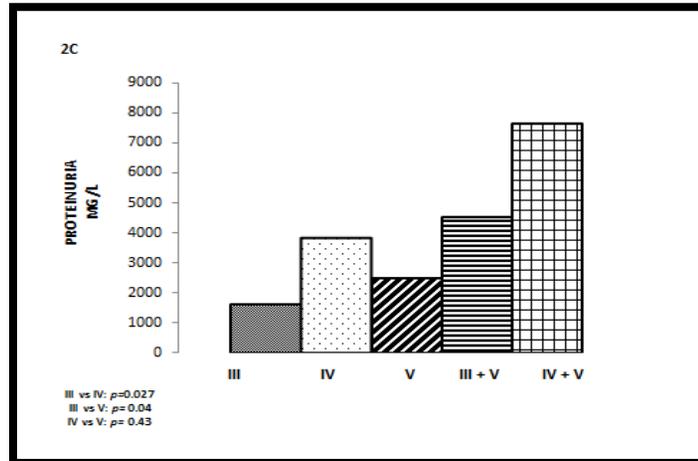
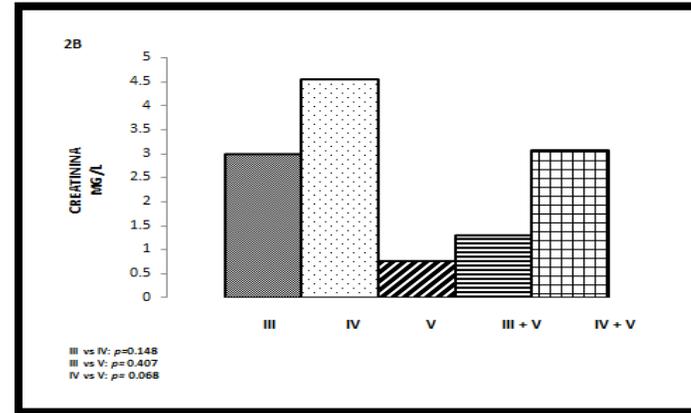
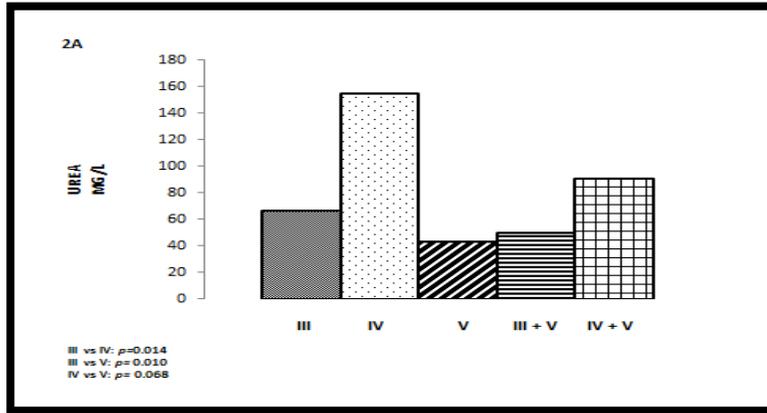
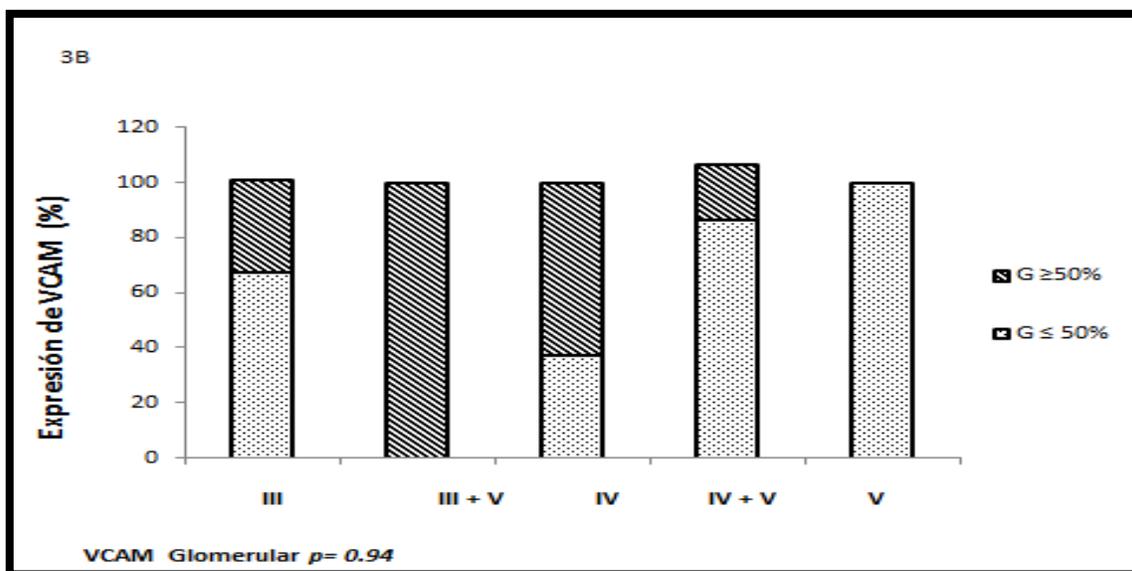
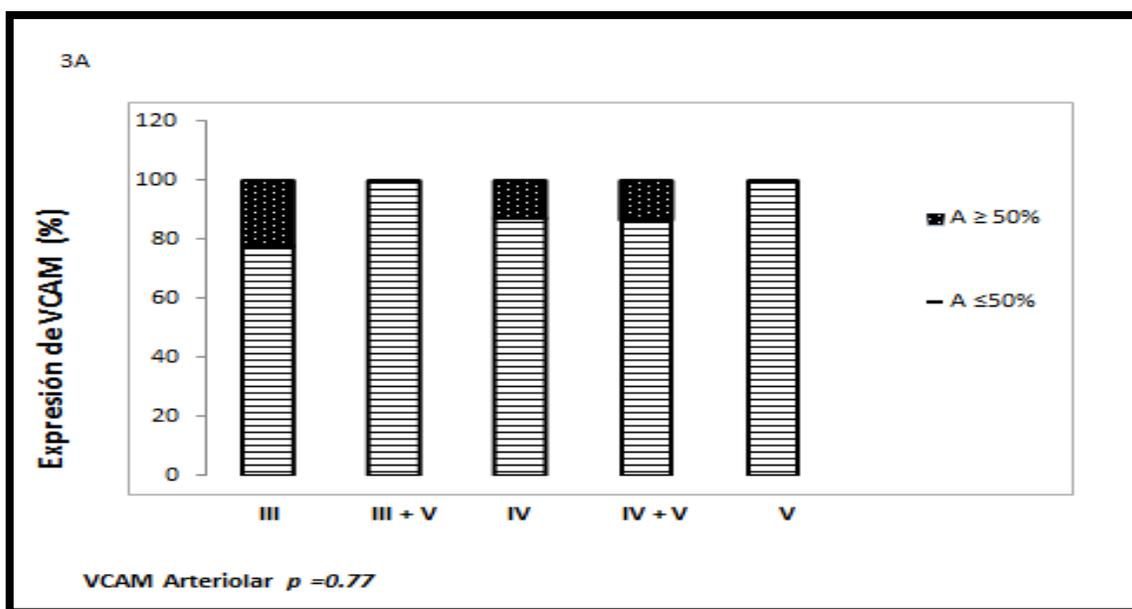


Figura 3. Expresión de marcadores tisulares



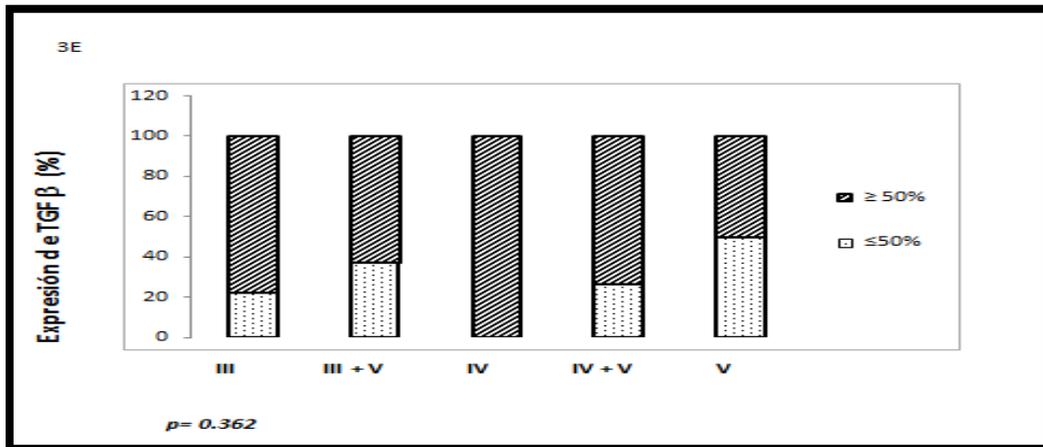
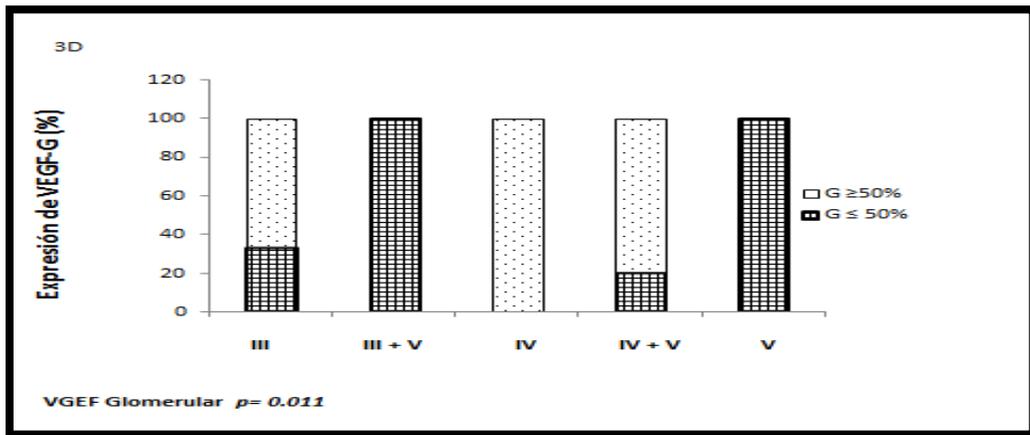
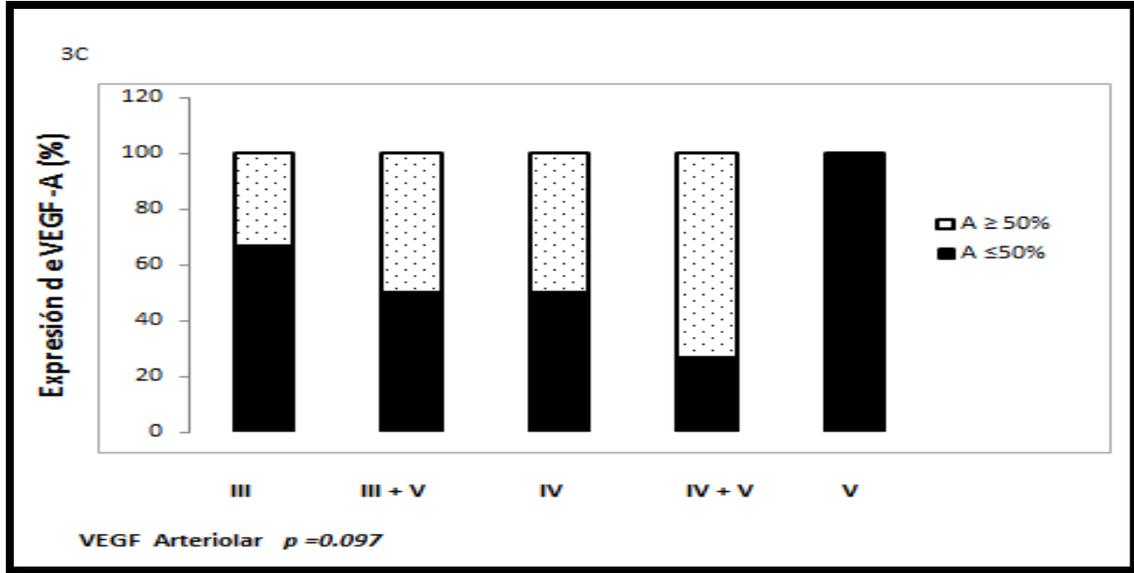
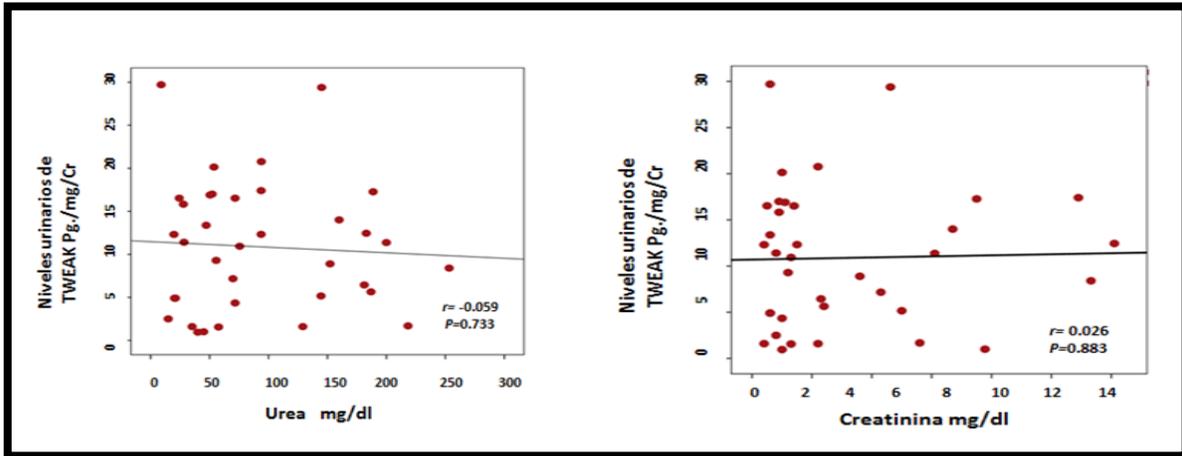
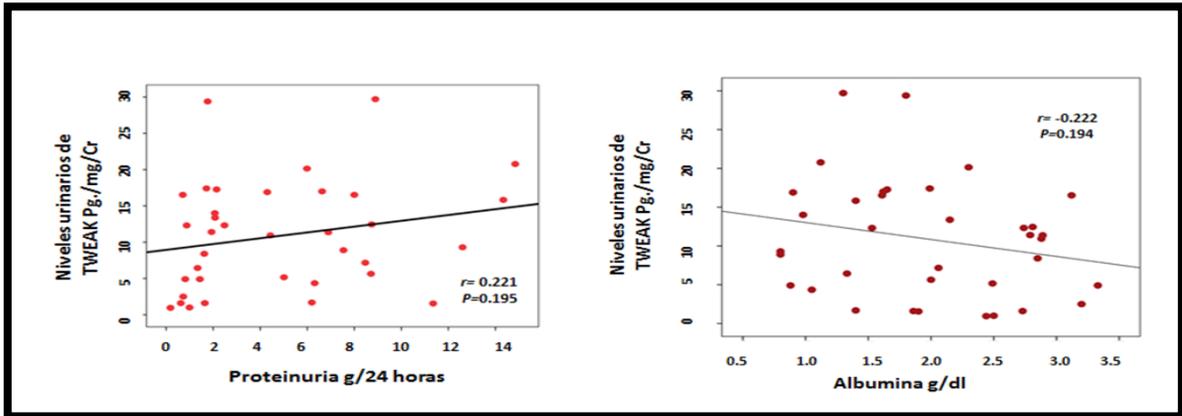


Figura 4. Correlación de niveles urinarios de TWEAK con parámetros bioquímicos

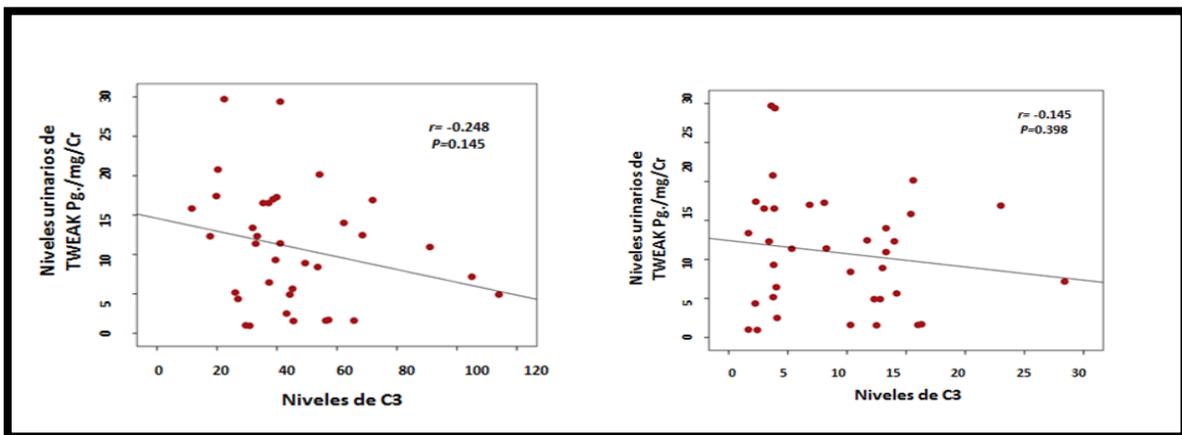
4A



4B



4C



4A. Urea y creatinina, 4B. Niveles de C3 y C4, 4C. Proteinuria y albúmina.

Tabla 3. Correlación de los hallazgos histológicos con marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.

ÍNDICE DE ACTIVIDAD		
Parámetro	Valor de r	Valor de p
VCAM-A	0.009	0.959
VCAM-G	0.076	0.669
VEGF-A	0.139	0.386
VEGF-G	0.425	0.012
TGF-β	.094	.552
ÍNDICE DE CRONICIDAD		
VCAM-A	0.209	0.236
VCAM-G	0.659	0.000
VEGF-A	-0.185	0.0294
VEGF-G	0.015	0.932
TGF-β	.104	0.560
FIAT		
VCAM-A	0.413	0.012
VCAM-G	0.826	0.000

VEGF-A	-0.129	0.216
VEGF-G	.201	0.240
TGF-β	.238	0.162

Tabla 4. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK (>4.91) con marcadores de lesión endotelial, tubulointersticial y hallazgos histológicos.

Parámetro	OR	<i>D cohen</i>	<i>p</i>
Índice de cronicidad	.312 (0.020- 4.9)	-0.64	0.410
Índice de actividad	4.1 (0.41 - 41.7)	0.77	0.223
FIAT	1.2 (0.07 - 20.4)	0.10	0.879
VEGF-A	11.2 (0.5 - 239)	1.3	0.120
VEGF-G	.04 (0.04 - 32.0)	-1.77	0.097
VCAM- A	.09 (0.00 - 1.81)	-1.32	0.117
VCAM-G	1.1 (0.04 - 32.0)	0.052	0.938
TGF-β	1.7 (0.3 - 10.3)	0.29	0.521

Tabla 5. Asociación de los niveles urinarios de TWEAK (>7.91) con marcadores de lesión endotelial, tubulointersticial y hallazgos histológicos.

Parámetro	OR (IC 95%)	D cohen	p
Índice de cronicidad	1.86 (0.18 - 19.0)	0.34	0.598
Índice de actividad	2.71 (0.42- 17.4)	0.54	0.292
FIAT	0.59 (0.05 - 3.37)	-0.29	0.669
VEGF-A	2.67 (0.35 - 19.9)	0.54	0.338
VEGF-G	0.22 (0.02 - 2.3)	-0.83	0.216
VCAM- A	0.95 (0.14 - 6.3)	-0.02	0.958
VCAM-G	1.31 (0.09 - 18.8)	0.14	0.838
TGF-β	0.93 (0.21 - 4.16)	-0.03	0.932

XII. Discusión

La nefritis lúpica es una complicación grave y frecuente en pacientes con LES; disminuye de manera considerable la sobrevida hasta en 88 % a 10 años del diagnóstico. (3)

Debido a la ausencia de biomarcadores específicos en nefritis lúpica surge el interés por la búsqueda de potenciales moléculas relacionados con la actividad de la enfermedad. Con base en la fisiopatología de la nefritis lúpica se ha intentado evaluar el desempeño de posibles biomarcadores.

En modelos animales se ha identificado que el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK) es expresado en altos niveles (24) y se encuentra involucrado en proliferación mesangial, proliferación endotelial, atrofia y fibrosis tubulointersticial en pacientes con LES. (31)

En estudios previos en los que se ha evaluado los niveles urinarios de TWEAK como biomarcador de Nefritis lúpica, se ha reportado adecuado desempeño de la prueba. (48) En un estudio multicéntrico en el cual se evaluaron los niveles urinarios de TWEAK como biomarcador de nefritis lúpica (49), se observan niveles significativamente más elevados en pacientes con nefritis lúpica respecto a pacientes con otras enfermedades autoinmunes y pacientes sanos ($p=0.039$); de manera similar a lo reportado por Schwartz y cols. Observamos que los niveles urinarios de TWEAK se encuentran elevados en pacientes con nefritis lúpica en comparación con pacientes con LES sin actividad renal con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$); los grupos de comparación no incluyen pacientes con afecciones glomerulares, sin bien las enfermedades que evalúan pudieran tener involucro renal no se refleja en los parámetros de laboratorio y no hay evidencia histológica que lo refleje.

En un estudio realizado en población China, en el que se evaluó los niveles urinarios de TWEAK como marcador de actividad en nefritis lúpica en 46 pacientes con LES (12 sin actividad renal y 34 con actividad renal); se observaron los niveles urinarios significativamente más elevados en pacientes con nefritis lúpica activa (51). Con base en estos estudios podemos concluir que aún se

desconoce la posible participación de TWEAK como biomarcador urinario en otras glomerulopatías y los resultados hasta ahora se limitan a pacientes con nefropatía lúpica en poblaciones muy específicas (población asiática, nefritis lúpica no catalogada como grave) cuyos valores pudieran estar modificados por uso de esquema de inmunosupresor establecido.

En un estudio piloto realizado por nuestro grupo de trabajo evaluamos los niveles urinarios de TWEAK en 44 pacientes y (11 pacientes con lupus eritematoso sistémico sin actividad renal, pacientes con otras glomerulopatías y 11 controles sanos) observamos que los niveles urinarios de TWEAK pueden distinguir adecuadamente entre pacientes con LES la presencia de nefritis lúpica con sensibilidad del 81 % y especificidad 75% (50); sin embargo por el reducido tamaño de la muestra y la ausencia de todas las clases histológicas no pudimos establecer correlación entre el índice de actividad y los niveles urinarios de TWEAK ni definir si existe un punto de corte de los niveles urinarios de TWEAK de acuerdo a la clase histológica.

Si bien hasta el momento los niveles urinarios de TWEAK han demostrado tener un adecuado desempeño en el diagnóstico de nefritis lúpica no se ha establecido si existe asociación con los hallazgos histológicos, marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial; se desconoce la expresión de estos marcadores en pacientes con nefritis lúpica sin tratamiento farmacológico previo y el patrón de expresión a nivel tisular de TWEAK así como la correlación que existe con los niveles urinarios objetivos planteados en el presente estudio.

En un estudio previo realizado por Avihingsanon y colaboradores se evaluó la expresión de VEGF en pacientes con nefritis lúpica como un factor pronóstico; se observa que los pacientes con nefritis lúpica tienen depósito débil de VEGF a diferencia de los controles sanos, se estable que los niveles de mRNA de VEGF se correlaciona de manera negativa con la proliferación endocapilar (52) a diferencia de este estudio, nosotros observamos que los pacientes con clase histológica IV y IV + V tienen mayor depósito de VEGF a nivel glomerular y arteriolar , los niveles de VEGF a nivel glomerular se correlacionan moderadamente y de manera positiva con el índice de actividad con diferencias estadísticamente significativas; lo que implica probablemente que la vía de señalización en la que se expresan otros antígenos en la superficie glomerular favoreciendo la disminución en la síntesis de VEGF podría estar relacionada con el tiempo de evolución y la respuesta a

inmunosupresores así como la severidad de la enfermedad, a diferencia del estudio previo, tenemos un predominio de la clase histológica IV+V, mayores índices de actividad y un comportamiento más severo de la enfermedad, con creatinina promedio de 3.12 mg/dl y requerimiento de TRFR en 33.3%.

Con respecto a los niveles de VCAM en estudios previos se ha observado que los niveles urinarios de VCAM se correlacionan de manera positiva con el índice de actividad con diferencias significativas y negativamente con el índice de cronicidad (53) de manera similar se observa que los niveles de séricos de VCAM se encuentran elevados en pacientes con actividad renal por LES (54), sin embargo no se ha establecido correlación con la expresión a nivel tisular; en nuestro estudio observamos que el 69.4% de los pacientes tiene depósito menor al 50% a nivel glomerular y 86% de los pacientes tiene depósito menor al 50% a nivel arteriolar; a diferencia de lo reportado previamente evidenciamos que los niveles de VCAM se correlacionan altamente ($r= 0.65$) y de manera positiva con el índice de cronicidad y correlación muy alta y positiva ($r=0.82$) con el grado de fibrosis intersticial y atrofia tubular con diferencias estadísticamente significativas; esto puede estar en relación con el incremento en el número de macrófagos y su papel en el desarrollo de fibrosis a nivel renal; a nivel urinario podría corresponder a incremento en el número de macrófagos secundario a pérdida de la integridad de la membrana y a nivel sérico puede estar en relación con lesión a nivel de las células endoteliales y no necesariamente derivar de la actividad renal. Este hallazgo histológico puede constituir un marcador pronóstico en pacientes con nefritis lúpica y el posible desarrollo de opciones terapéuticas con impacto en la disminución en el grado de fibrosis cuyo impacto estará reflejado en la sobrevida renal y disminución en la necesidad de terapia de reemplazo de la función renal.

La evaluación de los niveles de VEGF y VCAM a nivel tisular en el abordaje inicial de pacientes con nefritis lúpica puede estar en relación con fines pronósticos y terapéuticos; si bien es necesario establecer un seguimiento de los pacientes y evaluar el desenlace de acuerdo a estos marcadores; el estar correlacionados de manera positiva con los índices de actividad y cronicidad representan una evaluación útil y con impacto en la sobrevida renal. Con respecto a los niveles de VEGF es

importante destacar que probablemente el grado de depósito a nivel tisular puede estar en relación con el tiempo de evolución y la gravedad de la enfermedad, sería de utilidad establecer el punto en tiempo en el cual los niveles de VEGF se correlacionan con lesiones vasculares (Microangiopatía trombotica) y la presencia de semilunas cuya presencia está en relación con pobre pronóstico, de igual manera evaluar la presencia de comorbilidades que estén en relación con la disminución de este factor y el desarrollo de este tipo de lesiones (síndrome anticuerpos anti fosfolípidos, vasculitis asociada). (55, 56).

Con respecto a los niveles de TGF- β a nivel tisular, observamos que el depósito se localiza a nivel del infiltrado inflamatorio y no propiamente a nivel de lesiones fibróticas o con predominio de colágena, ni en las lesiones esclerosadas; el mayor depósito se encuentra en pacientes con clase histológica IV misma que tiene el mayor grado de fibrosis, se evidenció correlación débil con el grado de FIAT y muy débil con el índice de cronicidad sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($r=0.238$, $p= 0.162$ y $r=0.104$, $p= 0.560$ respectivamente). Los cambios fibróticos, la atrofia tubular y la progresiva fibrosis intersticial son la vía común final de la falla renal, sin embargo la fisiopatología de esta vía mediada por TGF- β está representada por cuatro fases arbitrarias dependientes del tiempo de evolución; en una primera fase existe activación celular tubular y perivascular con activación de células mononucleares, liberación de moléculas proinflamatorias, la segunda fase es mediada por la producción de moléculas pro-fibrogénicas como TGF- β 1, Ang II, PDGF, seguida de la fase en la cual la incrementa la producción de matriz extracelular y disminuye su degradación como resultado en la última fase existe una disminución progresiva en el número de nefronas intactas y pérdida de la función (57), consideramos que en los pacientes evaluados el tiempo de evolución así como el bajo grado de fibrosis en la población total es uno de los factores por los cuales el depósito de TGF- β se observa a nivel del infiltrado inflamatorio y no se evidencia diferencias con respecto al grado de fibrosis, se observa correlación débil sin diferencias significativas que puede estar en relación con el tiempo de evolución, sin embargo es necesario evaluar si el nivel de depósito a nivel del infiltrado inflamatorio tiene implicaciones en el pronóstico de los pacientes y la respuesta terapéutica.

En los modelos de regresión logística planteados para los dos puntos de corte de niveles urinarios de TWEAK observamos que considerando el punto de corte de ≥ 4.91 pg/mg Cr el índice de actividad tiene un RM de 4.18; el índice de actividad está en relación con los niveles urinarios de TWEAK sin embargo no se encuentran diferencias estadísticamente significativas; se decide calcular el tamaño del efecto con base en el resultado del OR obtenido una d de cohen de 0.78 considerando un tamaño del efecto medio, indicando que probablemente la ausencia de diferencias estadísticamente significativas está en relación con el tamaño de la muestra. Hasta el momento no se había establecido asociación mediante un modelo de regresión entre los niveles de TWEAK urinario y el índice de cronicidad y actividad en pacientes con nefritis lúpica, de tal manera que podemos considerar pese a no evidenciar diferencias estadísticamente significativas el tamaño del efecto se considera medio, de tal manera que, los niveles urinarios de TWEAK dependen del índice de actividad de la biopsia renal. Con respecto al índice de cronicidad el tamaño del efecto es de 0.11 por lo que se puede expresar como que los niveles urinarios de TWEAK no dependen del grado de cronicidad de la biopsia renal.

En relación a los niveles de VEGF podemos observar un OR de 11.298 a nivel arteriolar sin embargo sin diferencias estadísticamente significativas, calculamos de igual manera el tamaño del efecto observando una d de cohen de 1.33 que representa un tamaño del efecto grande, lo anterior implica que los niveles urinarios de TWEAK dependen del depósito arteriolar de VEGF; sin embargo el depósito arteriolar de VEGF a nivel arteriolar tiene una correlación muy baja con el índice de actividad de la biopsia renal (sin diferencias significativas estadísticamente) considerando así que es importante establecer el sitio de depósito de estos biomarcadores con fines pronósticos.

El VCAM a nivel glomerular tiene una OR de 1.142 sin diferencias estadísticamente significativas; al calcular el tamaño del efecto observamos que los niveles urinarios de TWEAK no dependen del depósito de VCAM (d cohen=0.074). Los niveles de VCAM tienen correlación con el índice de cronicidad y FIAT por lo que al considerar de acuerdo a los resultados obtenidos que los niveles

urinarios de TWEAK están en relación con el índice de actividad es esperado que no exista asociación entre estos. Los niveles de TGF- β tienen una OR de 1.77, para asociación con los niveles urinarios de TWEAK sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0.521$), al calcular el tamaño del efecto observamos una d de cohen de 0.31 es decir un tamaño pequeño, los niveles urinarios de TWEAK dependen en bajo grado del depósito tisular de TGF- β .

Con respecto al modelo de regresión logística planteado para el punto de corte para mujeres (≥ 7.95) observamos que el índice de actividad tiene un OR de 2.717 sin diferencias significativas, al cálculo del tamaño del efecto observamos que tiene un efecto moderado (d cohen= 0.54) de manera similar al punto de corte para la población total; se observa un tamaño del efecto bajo en relación con el índice de cronicidad. Con respecto a los marcadores de lesión endotelial observamos que el depósito de VEGF a nivel arteriolar tiene una OR de 2.67 correspondiente a una d cohen de .54, es decir los niveles urinarios de TWEAK dependen del depósito de VEGF con un tamaño del efecto moderado, observamos que no existe asociación en relación al depósito de VCAM; de igual manera los niveles de TGF- β no tienen asociación con los niveles urinarios de TWEAK (OR= 0.938, $p=0.932$).

Las limitaciones observadas en el estudio son las siguientes: el número de pacientes en cada grupo no es equitativo, sería importante incrementar el tamaño de la muestra de pacientes con clase histológica V para evaluar el comportamiento de los niveles urinarios de TWEAK así como la asociación con los marcadores de lesión endotelial y tubulointersticial.

Es necesario realizar una evaluación por medio de morfometría para establecer de manera cuantitativa los niveles de los marcadores a nivel tisular.

El comportamiento de los pacientes evaluados difiere en relación a los estudios previos, tienen niveles más elevados de creatinina y urea y un alto porcentaje de requerimiento de TRFR que puede tener impacto en la evaluación de un biomarcador y su validez externa; de igual manera a diferencia de los estudios previos y lo reportado de manera general en el Hospital general de México hay una mayor incidencia de pacientes con nefritis lúpica clase IV+ V factor que modifica

las opciones terapéuticas y el desenlace en la sobrevida renal limitando de igual manera la validez externa de nuestros resultados.

XIII. Conclusiones

La afección renal del lupus eritematoso sistémico es una complicación grave y común con impacto directo en las sobrevida del paciente; se caracteriza por tener curso variable con presencia de remisión y recaídas por lo que se requiere un seguimiento constante con implicaciones en la sobrevida y modificaciones constantes del tratamiento en un estudio piloto previo realizado por nuestro grupo de trabajo observamos que los niveles urinarios de TWEAK pueden distinguir adecuadamente entre pacientes con LES la presencia de nefritis lúpica con sensibilidad del 81 % y especificidad del 75 % superior al desempeño de los marcadores convencionales; éste represento el punto de partida del estudio actual en el cual tratamos de demostrar el grado de asociación de los niveles urinarios de TWEAK con marcadores de lesión endotelial, tubulintersticial y características histológicas; no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles urinarios de TWEAK con respecto a la clase histológica, no evidenciamos correlación con los marcadores bioquímicos de uso convencional en la evaluación de pacientes con nefritis lúpica.

De manera importante observamos que los niveles de VCAM se correlacionan de manera positiva con índice de cronicidad y FIAT pudiendo constituir un marcador pronóstico en la evaluación de los pacientes con NL, observamos que existe correlación moderada del VEGF con el índice de actividad, no observamos diferencias estadísticamente significativas con respecto al modelo de regresión logística planteado; sin embargo al calcular el tamaño del efecto observamos que los niveles urinarios de TWEAK dependen del índice de actividad con un tamaño del efecto moderado y del nivel de depósito de VEGF a nivel arteriolar con un tamaño del efecto alto; podemos considerar entonces que el TWEAK representa un biomacador sensible y específico en la evaluación de nefritis lúpica en pacientes con LES sin embargo no hay diferencias con respecto a la clase histológica; está asociado al índice de actividad y VEGF (de acuerdo al tamaño del efecto) por lo que sería importante incrementar el tamaño de la muestra para poder establecer

diferencias significativas; consideramos el papel del TWEAK puede constituir adecuado biomarcador en la evaluación inicial y de seguimiento de los pacientes, el depósito de moléculas de lesión endotelial debe evaluarse en diferentes etapas de la evolución de los pacientes para considerar si existe relación en el depósito con respecto al tiempo de evolución, es relevante evaluar el desenlace de los pacientes y establecer si los marcadores evaluados tienen impacto en el pronóstico de los pacientes.

XIV. Bibliografia

1. Maciej L, Hans J. the pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24:1357-1366.
2. Tektonidou MG, Dasgupta A, Ward MM. Risk of end-stage renal disease in patients with lupus nephritis, 1970 to 2015: a systematic review and Bayesian meta-analysis [e-pub ahead of print]. *Arthritis Rheumatol.* [http:// dx.doi.org/10.1002/art.39594](http://dx.doi.org/10.1002/art.39594). Accessed February 1, 2016.
3. Lim SS, Bayakly AR, Helmick CG, et al. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002–2004: the Georgia Lupus Registry. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66:357–368.
4. Somers EC, Marder W, Cagnoli P, et al. Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 369–378.
5. Feldman CH, Hiraki LT, Liu J, et al. Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000–2004. *Arthritis Rheum.* 2013; 65:753–763.
6. Paul J. Hoover and Karen H. Costenbader. Insights into the epidemiology and management of lupus nephritis from the US rheumatologist’s perspective. *Kidney International* (2016) 90, 487–492
7. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012; 64:625–39.

8. Hahn B , McMahon M, Wilkinson A, Wallace W, Daikh D, Fitzgerald D, Karpouzas G, Merrill J, Wallace J, Yazdany Y, Grossman D. American College of Rheumatology Guidelines for Screening, Treatment, and Management of Lupus Nephritis. *Arthritis Care Res.* 2012; 64: 797-808.
9. Markowitz GS, D'Agati VD. The ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis: an assessment at 3 years. *Kidney Int* 2007; 71:491–5.
10. Hiramatsu N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, et al. Revised classification of lupus nephritis is valuable in predicting renal outcome with an indication of the proportion of glomeruli affected by chronic lesions. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47:702–7.
11. *Kidney International Supplements* 2012; 2: 221–232.
12. J. A. Winkles, “The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting,” *Nat Rev Drug Discovery*, 2008; 7: 411-425.
13. A.B. Sanz, A. Ortiz, P. Justo et al., “The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation,” *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 695-703.
14. Zhang Z, Zhang R. Epigenetics in autoimmune diseases: pathogenesis and prospects for therapy. *Autoimmun Rev.* 2015;14(10):854–863.
15. Apostolidis S., Lieberman L., Kis-Toth K., Crispin J., Tsokos G. (2011) The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* 31: 769–779.
16. Kwok SK, Lee JY, Park SH, et al. Dysfunctional interferon-alpha production by peripheral plasmacytoid dendritic cells upon Toll-like receptor-9 stimulation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(2):R29.
17. Weinmann-Henke J, Scorletti E, Cavagna L, Schwarting A. Genetics and novel aspects of therapies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2015; 14(11):1005–1018.

18. Rovin B., Song H., Birmingham D., Hebert L., Yu C., Nagaraja H. (2005) Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *J Am Soc Nephrol* 16: 467–473.
19. Rubinstein T., Pitashny M., Levine B., Schwartz N., Schwartzman J., Weinstein E., et al. (2010) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel biomarker for disease activity in lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 49: 960–971.
20. Brunner H., Bennett M., Mina R., Suzuki M., Petri M., Kiani A., et al. (2012) Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 64: 2687–2697.
21. Burkly LC, Michaelson JS, Zheng TS. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev* 2011;244: 99–114
22. Dohi T, Burkly LC. The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory diseases: focus on inflammatory bowel diseases. *J Leukoc Biol* 2012; 92: 265–279.
23. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 411–425
24. Brown SA, Ghosh A, Winkles JA. Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 2010; 285: 17432–17447
25. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 32401–32410
26. He F, Dang W, Saito K et al. Solution structure of the cysteine-rich domain in Fn14, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Protein Sci* 2009; 18: 650–656
27. Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K et al. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 2007; 40: 1–16.

28. Justo P, Sanz AB, Sanchez-Niño MD et al. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int* 2006; 70: 1750–1758.
29. Nakayama M, Kayagaki N, Yamaguchi N et al. Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. *J Exp Med* 2000;192: 1373–1380.
30. Kim SH, Kang YJ, Kim WJ et al. TWEAK can induce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J* 2004; 68: 396–399.
31. Saitoh T, Nakayama M, Nakano H et al. TWEAK Induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J Biol Chem*2003; 278: 36005–36012.
32. Tran NL, McDonough WS, Savitch BA et al. The tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) signaling system regulates glioma cell survival via NFkappaB pathway activation and BCL-XL/BCL-W expression. *J Biol Chem* 2005; 280: 3483–3492
33. Justo P, Sanz AB, Sanchez-Niño MD et al. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int* 2006; 70: 1750–1758
34. Uceró AC, Berzal S, Ocaña-Salceda C et al. A polymeric nanomedicine diminishes inflammatory events in renal tubular cells. *PLoS One* 2013; 8: e51992
35. Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S et al. TWEAK (tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int* 2012; 81: 1098–1107.
36. Gao HX, Campbell SR, Burkly LC et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells. *Cytokine* 2009; 46: 24–35.
37. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC et al. Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med* 2009; 13(9B): 3329–3342
38. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD et al. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 695–703.

39. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC et al. TWEAK Activates the non-canonical NFkappaB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21. *PLoS One* 2010; 5: e8955.
40. Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S et al. TWEAK (tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int* 2012; 81: 1098–1107.
41. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NFk β . *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1315–1325.
42. Campbell S, Burkly LC, Gao HX et al. Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells. *J Immunol* 2006; 176: 1889–1898.
43. Molano A, Lakhani P, Aran A et al. TWEAK Stimulation of kidney resident cells in the pathogenesis of graft versus host induced lupus nephritis. *Immunol Lett* 2009; 125: 119–128.
44. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* 2005; 123: 931–944.
45. Lu J, Szeto CC, Tam LS et al. Relationship of intrarenal gene expression and the histological class of lupus nephritis—a study on repeat renal biopsy. *J Rheumatol* 2012; 39: 1942–1947
46. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* 2005; 123: 931–944.
47. H. X. Gao, S. R. Campbell, L. C. Burkly et al., “TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells,” *Cytokine*. 2009; 46: 24-35.
48. Kimihiko N, Hiroshi F, Hitoshi H, Miho T, Norimasa A, Mitsuko R. Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions: Association with their severity and diversity in lupus models. *Kidney International*, Vol. 65 (2004), pp. 1290–1300.

49. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly L, Collins C, Blanco I, Su L, Hojaili B, Mackay M, Aranow C, Stohl W, Rovin B, Michaelson J, Putterman C. Urinary TWEAK as biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2009; 9:1-10.
50. Reyes F, Pérez M, Rodríguez A, Gutiérrez G, Medina Z, Valdez R. Assessment of urinary TWEAK levels in Mexican patients with untreated lupus nephritis: An exploratory study. *Nefrología.* 2017: 7-27.
51. Zhu X, Tan J, Li J, Xu X, Yuan S, Liu F. Urinary TWEAK Level as a Marker of Lupus Nephritis Activity in 46 Cases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012
52. Avihingsanon Ym Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney international.* 2009:130-1348
53. Sandeep S, Tianfu W, Chun X, Kamala V, Jie H, Tina M, Ho B, Chul A, Xin J, Chaim P, Ramesh S, Chandra M. Urine VCAM-1 as a marker of renal pathology activity index in lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy* 2012, 14:R164
54. Skeoch S, Haque Pemberton P, Bruce I. Cell adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with SLE. *Lupus* 2014, 23, 819–824
55. Shulman K, Tognazzi K et al. expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc nephrol.* 1996; 7:661-666.
56. Kim YG, Suga SI, Kang DH et al. Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovering in experimental thrombotic microangiopathy. *Kidney int* 2000; 58:2390-2399.
57. Loffler I, Wolf G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2014:29:i37-i45.