



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DIFERENCIADORES DE ACTIVIDAD RENAL Y MICROANGIOPATÍA
TROMBÓTICA EN PACIENTES CON NEFRITIS LÚPICA ACTIVA

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN NEFROLOGÍA

PRESENTA

DR. ISMAEL ANTONIO GÓMEZ RUIZ

TUTOR DE TESIS:

DR. y M.C. JUAN MANUEL MEJIA-VILET

CO-TUTOR DE TESIS:

Q.C. Y DR.SC. CARLOS ALBERTO NUÑEZ ÁLVAREZ
DR. Y DR.SC. LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO

CIUDAD DE MÉXICO

JULIO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”
BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DIFERENCIADORES DE ACTIVIDAD RENAL Y MICROANGIOPATÍA
TROMBÓTICA EN PACIENTES CON NEFROPATÍA LÚPICA

DR. SERGIO PONCE DE LEON ROSALES

Director de Enseñanza

DR. RICARDO CORREA ROTTER

Profesor Titular del Curso de Nefrología

DR. JUAN MANUEL MEJIA-VILET

Tutor de tesis

Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSSIS) 2017-2 otorgado a Juan Manuel Mejía Vilet con registro de propuesta 289663.

Contenido

I MARCO TEÓRICO	5
II DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	12
III JUSTIFICACIÓN	13
IV OBJETIVO PRIMARIO	13
V OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	14
VI HIPÓTESIS.....	14
VII METODOLOGÍA.....	14
VIII RESULTADOS	21
IX DISCUSIÓN	33
X CONCLUSION	37
XI BIBLIOGRAFÍA.....	38
XII ANEXOS.....	45
Anexo 1 Consentimiento informado.....	45

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DIFERENCIADORES DE ACTIVIDAD RENAL Y MICROANGIOPATÍA TROMBÓTICA EN PACIENTES CON NEFRITIS LÚPICA ACTIVA

1 MARCO TEÓRICO

Introducción

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad multisistémica que afecta mujeres y hombres jóvenes, condicionando gran morbilidad y aumento de mortalidad hasta 2 a 5 veces en comparación con la población general¹. Aproximadamente 60% de los pacientes con LEG desarrollan actividad de la enfermedad a nivel renal². La afectación renal es el principal determinante de aumento de mortalidad, con tasas de mortalidad estandarizadas de 7.9 para pacientes con actividad renal y hasta 63.1 en aquellos que progresan a enfermedad renal crónica terminal³.

El tratamiento de la nefropatía lúpica modifica la progresión a etapas terminales de enfermedad renal y la mortalidad. Antes del uso generalizado de esteroides, la mortalidad de la nefropatía lúpica era de 83% a 5 años. El uso de los esteroides y posteriormente de la ciclofosfamida aumentó la supervivencia a 5 años hasta 45% y 80% respectivamente⁴. Desafortunadamente, en la última década el tratamiento de la nefropatía lúpica se ha estancado, cuando aún 10 a 20% de los pacientes progresan a etapas terminales de enfermedad renal⁵. En México, el seguimiento de la cohorte de pacientes con nefropatía lúpica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), la cual incluye aproximadamente 500 pacientes, ha mostrado una tasa de progresión a enfermedad renal crónica terminal de 18% a 5 años.

Este estancamiento en el pronóstico de la enfermedad renal en pacientes con LEG contrasta con la proliferación del desarrollo de fármacos biológicos dirigidos contra diversos blancos en el sistema inmune. En los últimos 10 años de investigación en el área, la mayoría de los ensayos

clínicos han mostrado resultados negativos⁶. Como ejemplos se pueden mencionar fármacos como rituximab (anti-CD20)⁷, abatacept (CTLA4-Ig)⁸, ocrelizumab (anti- CD20)⁹, sirukumab (anti-IL6)¹⁰, tabalamumab (anti-BAFF)¹¹, belimumab (anti-BLyS)¹², BIIB023 (anti-TWEAK)¹³, entre otros. Entre las hipótesis que se han generado para explicar los múltiples fallos de los ensayos clínicos destacan: a) el diseño de los ensayos clínicos, b) la utilización de variados criterios clínicos de respuesta y c) la posibilidad de que las moléculas “blanco” de los diversos fármacos participen en distintas fases en la fisiopatología de la nefropatía lúpica. En respaldo a este último, por ejemplo, en el ensayo clínico de sirukumab (anticuerpo contra interleucina-6) se encontró que no todos los pacientes tratados tenían niveles elevados de interleucina-6 en sangre, por tanto, la inhibición de esta molécula no tuvo mayor efecto en el curso de la enfermedad de estos pacientes¹⁴. Por otro lado, en el ensayo LUNAR de rituximab, el subanálisis de aquellos pacientes en quienes se logró una supresión adecuada de células B CD20+ sugirió que el fármaco pudo ser efectivo en dicho subgrupo de pacientes⁷.

La fisiopatología de la nefropatía lúpica incluye una primera fase en que el daño inflamatorio mediado por el depósito y la producción local de complejos inmunes excede un umbral y desencadena la activación de vías proinflamatorias. En la fase inicial recientemente se ha demostrado un papel predominante de la inmunidad innata con participación de células como neutrófilos y macrófagos¹⁵. Esto es posiblemente seguido de la liberación de interferón alfa (IFN- α) por las células plasmacitoides^{16,17}, el cual estimula a su vez la producción de células presentadoras de antígenos, promoviendo la diferenciación de células B autoreactivas hacia células plasmáticas e incrementando la producción de linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 de memoria¹⁸.

Todos estos eventos ocurren tanto sistémicamente como localmente en el tejido renal. Las biopsias renal de pacientes con nefropatía lúpica frecuentemente tienen agregados de linfocitos T y B, y ocasionalmente incluso pueden observarse centros germinales en el compartimento tubulointersticial¹⁸. En el tejido renal, el depósitos de complejos inmunes activan el sistema del complemento al tiempo que los linfocitos T cooperadores (“helper”) producen citocinas que perpetúan el daño por complemento y macrófagos.

Por tanto, es razonable pensar en la fisiopatología de la nefropatía lúpica como un proceso inflamatorio que ocurre paralelamente en un paciente con un nivel basal de autoinmunidad en quien se activan inmunológicos los cuales una vez rebasado un umbral, desencadenan un episodio

inflamatorio renal. Siendo así, el efecto de los fármacos biológicos puede maximizarse al ser utilizados en la fase más apropiada de acuerdo a su mecanismo de acción.

Actualmente, el único mecanismo potencial para identificar la fase inflamatoria en que se encuentra un paciente, así como los mecanismos involucrados, es mediante el análisis histopatológico de la biopsia renal, incluyendo las nuevas técnicas de expresión de mRNA (transcriptómicas) o proteínas (proteómicas) en el tejido renal.

El enfoque tradicional de la búsqueda de biomarcadores en nefropatía lúpica se ha basado en moléculas que diferencien entre pacientes con actividad renal y aquellos sin actividad renal¹⁹. Sin embargo, la identificación de moléculas diferencialmente expresadas en diversas vías inflamatorias ofrece su potencial aplicación no sólo para distinguir entre pacientes activos a nivel renal de aquellos inactivos, sino la identificación de cuáles vías inflamatorias se encuentran activas y por tanto, potencialmente también pudieran influenciar la decisión terapéutica. Dado que los biomarcadores en suero no han logrado reflejar del todo el grado de inflamación renal^{20,21}, la búsqueda de biomarcadores simultáneamente en orina y sangre potencialmente reflejará más fielmente la inflamación renal.

El Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán desarrolló un estudio en colaboración con la Universidad Estatal de Ohio en el cual se identificó el perfil transcriptómico en tejido renal de pacientes con nefropatía lúpica en 2 momentos de actividad: a) en un primer episodio sin tratamiento de inducción previo para nefropatía lúpica y b) en un segundo episodio (recaída o “flare”) encontrándose bajo tratamiento de mantenimiento con inmunosupresores. Los resultados sugieren la expresión de genes involucrados en diversas vías inflamatorias, incluyendo: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas plasmacitoides, interferón alfa y vía del complemento. A partir de estas vías, mediante el uso de gráficas de volcán, se seleccionaron los mRNA mayormente expresados en comparación con pacientes normales en base al número de veces de cambio (“fold change”) y significancia estadística²².

Para este estudio se seleccionó como punto de partida el estudio de las vías del complemento dado que un gran número de genes expresados se concentraron en estas vías. Adicionalmente, el subgrupo de pacientes en quienes además de la inflamación renal secundaria a LEG se identifican datos de microangiopatía trombótica es posiblemente diferenciable mediante el estudio de las

vías de activación del complemento. Adicionalmente, se seleccionó la molécula CD163 soluble (sCD163), un marcador en estudio en enfermedades glomerulares con participación de macrófagos como vasculitis sistémicas²³ cuya presencia en la orina ha sido previamente demostrada en pacientes con nefropatía lúpica²⁴.

C3d y C4d urinarios como marcadores de nefropatía lúpica activa

De acuerdo a varios estudios, hasta el 50% de los pacientes que se considera cursan con LEG y nefropatía lúpica (NL) clínicamente activa, tienen niveles séricos de C3 en rangos normales²⁵. Por el lado contrario el consumo de C3 y C4 séricos no refleja con exactitud su consumo por actividad renal nueva o persistente, como se observa en pacientes con niveles de complemento sérico crónicamente bajos o en aquellos con deficiencias de complemento determinadas genéticamente. Los productos de degradación de C3, C4 y otros componentes del complemento son específicos del proceso de su activación, y su aparición es una evidencia indiscutible de la activación del complemento por actividad de LEG²⁵⁻²⁹.

Un estudio clásico realizado hace más de 20 años por Manzi y colaboradores³⁰, comparó la utilidad de la determinación de diversos productos de degradación de cada una de las vías del complemento (C4d para evaluar la vía clásica/vía de las lectinas, Bb para la vía alternativa y C5b-9 soluble (para la vía común) en comparación con las determinaciones convencionales de C3 y C4 séricos para distinguir y/o predecir la presencia de actividad clínica en pacientes con LEG. Simultáneamente, los autores intentaron determinar el valor de corte de C3d (producto de degradación de C3) en orina para distinguir de forma temprana a los pacientes con NL activa de aquellos que no presentaban actividad renal, mediante la técnica de Western blot. Al correlacionar con las escalas de actividad de LEG (SLEDAI, SLAM), los fragmentos C4d y Bb séricos fueron más sensibles para detectar predecir actividad lúpica que los niveles séricos de sC5b-9, C3 y C4. Además, en los pacientes quienes contaban con biopsia renal (n=6), la presencia de C3d en orina fue mejor para distinguir la presencia de NL activa que los niveles séricos de C3, C4, Bb, sC5b-9 y anticuerpos contra DNA de doble cadena ($p = 0.02$). Estos resultados observados en este pequeño estudio sugieren que la excreción urinaria aumentada de productos de degradación del complemento como C3d, podría reflejar la activación de esta vía y directamente la lesión renal mediada por complemento. Con la excepción de este pequeño estudio, este potencial uso del

fragmento C3d como biomarcador de NL activa y otras glomerulopatías, ha recibido poca atención³¹.

Existen varias potenciales teorías que explicarían esta la excreción elevada del fragmento C3d del complemento en la orina de pacientes con nefritis lúpica activa y otras glomerulopatías³²⁻³⁵:

- a) Por producción excesiva en plasma: como se ha observado en múltiples entidades proteinúricas
- b) Por disminución de la reabsorción tubular: la molécula de C3d es relativamente pequeña, 35 kDa, por lo que en condiciones normales se filtraría fácilmente por la orina y al igual que otras proteínas de bajo peso molecular se reabsorbería por las células tubulares proximales. Al sobrepasarse esta reabsorción tubular tras un incremento en su producción, la excreción urinaria de C3d podría aumentar, en particular en pacientes con predominio de daño túbulointersticial
- c) Por aumento de la permeabilidad glomerular: mediante el aumento de la permeabilidad glomerular, contrario al C3d, C3 tiene un alto peso molecular (195 kDa) y solo se filtrará a la orina de pacientes con enfermedades glomerulares cuya permeabilidad glomerular está aumentada. Los niveles urinarios de sus productos de degradación (incluyendo C3d) se encontrarían igualmente elevados.
- d) Producción local: alternativamente, C3 y C3d podrían producirse a nivel tubular. La expresión del gen C3 se ha observado tanto en las células epiteliales glomerulares como en las células tubulares [referencia].
- e) Activación local: finalmente, la activación local incrementada de C3 puede ocurrir a través de la amidación de C3 generando a su vez los productos de su fragmentación.

CD163 soluble y nefropatía lúpica

Los macrófagos han sido implicados en la patogénesis de varias nefropatías. De acuerdo a su papel en la respuesta inmune, los macrófagos pueden clasificarse como : a) M1 o promotores de inflamación glomerular y b) M2 o inmunorreguladores, los cuales participan en la etapa de reparación de las enfermedades glomerulares³⁶. La distinción de estos fenotipos de macrófagos (M1 o M2) no siempre es fáciles y podría existir un continuo entre los fenotipos M1 y M2, dado

por un microambiente dinámico dependiente del estado inflamatorio, principalmente mediado por citocinas.³⁷

La molécula CD163 es una proteína transmembrana tipo I perteneciente a la superfamilia del receptor neutralizador tipo B rico en cisteína, que actúa como un receptor del complejo hemoglobina-haptoglobina. CD163 es un marcador de superficie expresado exclusivamente por macrófagos tipo M2, los cuales como se mencionó previamente, se acumulan durante la fase de recuperación de la inflamación aguda. Esta molécula se libera activamente de la membrana celular de los macrófagos mediante metaloproteinasas en respuesta a ciertos estímulos inflamatorios, difundándose a los tejidos inflamados o entrando a la circulación en su forma soluble (sCD163)³⁸.

Se piensa que la forma soluble de CD163 puede tener actividad antiinflamatoria y funcionar como un marcador útil de la activación de los macrófagos en múltiples enfermedades inflamatorias, como la nefropatía lúpica. De acuerdo a algunos estudios, la infiltración glomerular por parte de los macrófagos, pareciera jugar un papel relevante en la patogénesis de NL [referencia]. Por tanto, la identificación del fenotipo predominante de estos macrófagos y de las proteínas urinarias derivadas de ellos, podría proporcionar información útil sobre la presencia o no de NL activa.

Un estudio previo publicado por Endo y colaboradores²⁴, incluyó la determinación de sCD163 en sangre, orina y tejido renal en una serie de 74 pacientes japoneses con diversos grados de inflamación por nefropatía lúpica. Se encontró que los niveles urinarios de sCD163 podrían funcionar como biomarcador de inflamación glomerular dependiente de macrófagos en fases activas de nefropatía lúpica proliferativa. Para un punto de corte de 3.93ng/mg de creatinina, este marcador mostró un área bajo la curva ROC de 0.825, sensibilidad de 83.3% y especificidad de 85.7% para diferenciar nefropatía lúpica activa de pacientes sanos y con otras glomerulopatías como enfermedad de cambios mínimos, glomerulonefritis membranosa idiopática, nefropatía diabética, nefropatía por IgA y vasculitis asociadas a ANCA con actividad renal. Estos resultados se corroboraron con un análisis de microscopía óptica del tejido renal, el cual reveló que el número de macrófagos glomerulares marcados con inmunohistoquímica para CD163 se correlacionó positivamente con la actividad histológica de la NL ($r = 0,635$).

Microangiopatía trombótica y nefropatía lúpica

La microangiopatía trombótica (MAT) se caracteriza por trombocitopenia anemia hemolítica microangiopática y daño orgánico, Patológicamente se distingue por la lesión histológica de arteriolas y capilares, con engrosamiento e inflamación de la pared vascular, desprendimiento de células endoteliales, ensanchamiento subendotelial por acúmulos de proteínas y material de lisis celular, así como por la presencia de trombos plaquetarios que ocluyen las luces vasculares. Con respecto a su patogenia, existe una sobreposición de los mecanismos supuestamente involucrados en los diferentes tipos de MAT, como consecuencia de esto su clasificación es todo un reto³⁸.

Las lesiones observadas en los vasos sanguíneos en el análisis histopatológico de la biopsia renal de pacientes con nefropatía lúpica pueden asociarse negativamente al pronóstico de la enfermedad renal³⁹⁻⁴¹. En particular, las lesiones de MAT se han asociado con las manifestaciones clínicas más severas y la mortalidad más elevada⁴².

La fisiopatogenia de las lesiones de MAT observadas en pacientes con LEG es actualmente desconocida y los resultados de los pocos estudios realizados llegan a ser contrastantes. Por ejemplo, Cohen y cols⁴³ publicaron que la activación de la vía clásica del complemento podría ser un factor crucial en desarrollo de MAT en pacientes con nefritis lúpica. Por el contrario, Song y cols⁴⁴, observaron la participación tanto de la vía clásica como de la vía alternativa en una cohorte de 36 pacientes chinos con nefritis lúpica y MAT, de los cuales 29 tenían exclusivamente involucro renal de la MAT. Los pacientes con niveles más bajos de factor H del complemento, el cual constituye un regulador negativo de la activación de la vía alternativa del complemento, mostraron un peor desenlace renal.

En la actualidad, la MAT en pacientes con nefropatía lúpica puede clasificarse en diversos grupos de acuerdo al resultado observado en los estudios de escrutinio, los cuales incluyen la determinación de anticuerpos antifosfolípidos (aFL), la actividad del factor ADAMTS13 y los anticuerpos en contra del factor ADAMTS13. Es así que aquellos pacientes positivos para anticuerpos aFL se clasifican como nefropatía antifosfolípidos, aquellos con actividad baja de ADAMTS13 como púrpura trombocitopénica trombótica asociada a LEG, mientras que aquellos con resultado negativo en ambos exámenes se clasifican como síndrome urémico hemolítico urémico atípico. Otras MAT pueden clasificarse como secundarias en caso de presentar un factor

claramente involucrado como en el caso de la esclerodermia asociada, la hipertensión maligna, el virus de la inmunodeficiencia humana, algunas neoplasias y el uso de ciertos fármacos.

Retomando lo encontrado por Song y colaboradores en la cohorte china antes mencionada, en la mayoría de los 29 pacientes con nefritis lúpica y MAT coexistente, se podría catalogar a esta última como síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa). El SHUa es un subtipo de SHU en el que los fenómenos de MAT son consecuencia de la pérdida de regulación de la vía alternativa del complemento sobre las superficies celulares de causa genética. El SHUa es una enfermedad poco común que hasta hace poco, pese al tratamiento estándar con plasmaféresis, frecuentemente evolucionaba a la insuficiencia renal crónica terminal, con una elevada mortalidad. En los últimos años, se ha establecido el papel clave que desempeña el sistema del complemento en la inducción de daño endotelial en estos pacientes, mediante la caracterización de múltiples mutaciones y polimorfismos en los genes que codifican determinados factores del complemento⁴⁵. El eculizumab es un anticuerpo monoclonal que inhibe la fracción terminal del complemento bloqueando la formación del complejo de ataque de membrana. Existen estudios en modelos murinos, reportes de caso y series pequeñas de pacientes con nefritis lúpica refractaria y/o microangiopatía trombótica no causada por SAAF que han respondido al tratamiento con este anticuerpo.⁴⁶⁻⁵⁰

2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La incidencia de LEG en población mexicana se ha calculado en 7.6 casos por cada 100 mil habitantes/año y la nefropatía lúpica afecta más del 50% de estos pacientes. El pronóstico de la enfermedad renal asociada a LEG no se ha modificado en las últimas décadas donde aproximadamente 20% de estos pacientes progresan a enfermedad renal crónica terminal en 5 años en el INNSZ.

Aún y cuando se han desarrollado múltiples fármacos con diversos blancos en vías inflamatorias potencialmente involucradas en la fisiopatogenia de la inflamación renal el pronóstico continúa sin modificarse.

Recientemente se ha propuesto que las diversas vías inflamatorias potencialmente involucradas en nefropatía lúpica participan en etapas específicas y por tanto, su bloqueo con fármacos

biológicos pudiera solamente ser efectivo en ciertos momentos del curso clínico de la enfermedad.

Si bien existen múltiples estudios previos de biomarcadores en pacientes con nefropatía lúpica, la mayoría se han enfocado en diferenciar el grupo de pacientes activos de aquellos inactivos independientemente del momento de la enfermedad.

En este estudio, la búsqueda de nuevas moléculas biomarcadoras de actividad renal se enfocó en la identificación simultánea tanto en plasma como en orina en pacientes clasificados en fase inflamatoria activa mediante histopatología renal. Adicionalmente se incluyeron pacientes con manifestaciones vasculares de LEG quienes posiblemente tienen una fisiopatogenia distinta del daño renal y por tanto, son candidatos a un tratamiento distinto.

3 JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de biomarcadores específicos de vías inflamatorias involucradas en la orina y suero de pacientes con LEG y actividad renal potencialmente podría identificar vías fisiopatogénicas individualizadas y orientar las decisiones terapéuticas. Esto pudiera contribuir a mejorar el pronóstico renal y de supervivencia de los pacientes con nefropatía lúpica.

El INNSZ es un centro de referencia a nivel nacional para pacientes con LEG y NL, por lo tanto nuestro departamento cuenta con la población y los recursos necesarios para llevar a cabo este estudio. La definición de nuevos biomarcadores podrá facilitar la selección apropiada de candidatos a tratamiento y del fármaco a utilizar.

4 OBJETIVOS PRIMARIOS

- Identificar la presencia de marcadores de activación de la vía del complemento (C4d, C3d, fragmento Ba, sC5b-C9) en plasma y orina de pacientes con nefropatía lúpica activa.
- Evaluar la capacidad diagnóstica de los marcadores de activación de la vía del complemento para diferenciar entre pacientes con nefropatía lúpica activa, nefropatía lúpica con microangiopatía trombótica asociada, pacientes con nefropatía lúpica inactiva y donadores renales.

- Evaluar la presencia y rendimiento diagnóstico del biomarcador sCD163 en orina de pacientes con nefropatía lúpica.

5 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Correlacionar cada una de las proteínas con los hallazgos histopatológicos de la biopsia renal percutánea
- Correlacionar cada una de las proteínas con los marcadores convencionales de actividad renal

6 HIPÓTESIS

- Es posible identificar biomarcadores específicos de vías inflamatorias en la orina y suero de pacientes con nefropatía lúpica activa.
- Existe una expresión diferencial en los niveles de C3d, C4d, Ba, C5b-9 y CD163 soluble entre los pacientes con nefropatía lúpica activa, pacientes con nefropatía lúpica activa y microangiopatía trombótica, pacientes con antecedente de nefropatía lúpica actualmente inactivos y controles sanos.

7 METODOLOGÍA

7.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal de prueba diagnóstica. En una primera fase exploratoria se montaron las técnicas de laboratorio y ensayos necesarios para valorar la factibilidad de obtener señal de cada uno de los potenciales biomarcadores. Todos aquellos que se midieron exitosamente en orina y/o sangre fueron evaluados formalmente en el estudio de prueba diagnóstica.

7.2 Biomarcadores utilizados

- CD163 soluble: La molécula CD163 es un receptor de fase aguda involucrado en los mecanismos de fagocitosis de complejos hemoglobina-haptoglobina por los macrófagos. Tras su desprendimiento, la forma soluble (sCD163) tiene un papel antiinflamatoria y ha sido previamente detectado en orina en pacientes con vasculitis de vasos pequeños y pacientes con nefropatía lúpica. La medición en orina se realizó mediante un kit comercial de ELISA (DY1607 DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Fragmento C3d del complemento: El fragmento C3d del complemento es liberado durante la activación del fragmento C3 en la vía común del complemento. Para la identificación de C3d en orina se realizó un dotblot, con anticuerpo de ratón monoclonal contra C3d (ABCAM, 7C10, Cambridge, MA, USA) a una dilución de 1:4000, y previa normalización mediante espectrofotometría del contenido de proteína en la muestra de orina. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo IgG anti-ratón ligado a peroxidasa.
- Anticuerpos contra C1q del complemento: Los anticuerpos contra el fragmento C1q del complemento (C1a-Ab). La medición en sangre se realizó con un kit comercial de ELISA (ABCAM, ab170246) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y mediante la técnica previamente montada por el Laboratorio de Inmunología del INNSZ.
- C5b-9 soluble: El fragmento del complemento C5b-C9, mejor conocido como complejo de ataque de membrana representa el último paso de la activación del complemento por cualquiera de sus vías. La medición de C5b-C9 soluble se realizó mediante un kit comercial de ELISA (MicroVue sC5b-C9 plus EIA, Quidel, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma se diluyeron 1:40 y las de orina desde la muestra directa (grupo de donadores sanos) hasta 1:200 para los pacientes activos.
- Ba: El fragmento Ba del complemento se produce por la fragmentación del factor B durante la activación de la vía alternativa del complemento. La positividad de este fragmento representa activación de dicha vía. La medición se realizó mediante el kit de ELISA MicroVue Ba EIA (Quidel, CA, USA). Se siguieron las instrucciones del fabricante y se requirieron diluciones hasta 1:40 para medición de plasma y hasta 1:2000 para medición en orina.

- **C4d**: El fragmento C4d del complemento se produce por la fragmentación del factor C4 durante la activación de la vía clásica o de la vía de las lectinas del complemento. La medición se realizó mediante el kit de ELISA MicroVue C4d EIA (Quidel, CA, USA). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Se requirieron diluciones de 1:50 para las muestras de plasma y hasta 1:10 para muestras de orina.

7.3 Definición de los grupos

La población donde se determinaron los biomarcadores urinarios y séricos, incluyó a los siguientes grupos:

- a) Pacientes con nefropatía lúpica activa definida por biopsia renal percutánea**
 - -Pacientes con biopsia renal percutánea por sospecha de actividad renal. Las muestras de orina y suero, se obtuvieron previo a la realización del procedimiento, una vez firmado el consentimiento informado. Se corroboró con el análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea el grado de inflamación (actividad) y el diagnóstico de nefropatía lúpica activa.
- b) Pacientes con nefropatía lúpica activa y microangiopatía trombótica definidas por biopsia renal percutánea**
 - Pacientes con biopsia renal percutánea por sospecha de actividad renal. Las muestras de orina y suero, se obtuvieron previo a la realización del procedimiento, una vez firmado el consentimiento informado. Se corroboraron con el análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea el grado de inflamación (actividad), el diagnóstico de nefropatía lúpica activa y el diagnóstico de microangiopatía trombótica. Los pacientes con microangiopatía trombótica fueron posteriormente divididos en aquellos con datos histopatológicos predominantes de daño agudo y aquellos con datos predominantes de daño crónico. Los pacientes con datos de daño tanto agudo como crónico se incluyeron en el grupo de daño agudo.
- c) Pacientes con historia de nefropatía lúpica diagnosticada mediante biopsia renal percutánea y actualmente inactivos**

- Pacientes en seguimiento en la consulta externa de Nefrología quienes tenían diagnóstico de lupus eritematoso generalizado y nefritis lúpica con criterios de remisión completa en base a los criterios de las guías del ACR y de la EULAR. Las muestras de orina y suero, se obtuvieron como parte de su seguimiento, con previa firma del consentimiento informado
- d) Donadores sanos con riñones sanos corroborados en la biopsia cero realizada por protocolo en todo trasplante renal**
- Se invitó a participar a donadores renales previo al procedimiento de donación, ingresados a hospitalización del Instituto. Se solicitó una muestra de orina, una vez firmado el consentimiento informado. Posteriormente se corroboró la condición de normalidad del tejido renal en el análisis histopatológico reportado en la biopsia “cero” realizada por protocolo en todos los pacientes

7.4 Criterios de Selección de Pacientes

Inclusión

Para todos los pacientes:

- Hombre o mujer mayor de 18 años
- Consentimiento informado firmado previo a la obtención de la muestra de orina

Para el grupo de pacientes con actividad renal

- Diagnóstico de lupus eritematoso generalizado basado en los criterios de la ACR o SLICC
- Actividad renal diagnosticada mediante análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea definido por un índice de actividad mayor de 4 y proteinuria mayor de 1g en 24 horas o 1g/g por índice proteinuria/creatinuria.
- Menos de 2 semanas con dosis de prednisona mayor de 0.5mg/kg, mofetil micofenolato iniciado a dosis mayor de 2g/24h o menos de un bolo intravenoso de ciclofosfamida administrado en los últimos 6 meses.

Para el grupo de pacientes con actividad renal y microangiopatía trombótica

- Diagnóstico de lupus eritematoso generalizado basado en los criterios de la ACR o SLICC

- Actividad renal diagnosticada mediante análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea definido por un índice de actividad mayor de 4 y proteinuria mayor de 1g en 24 horas o 1g/g por índice proteinuria/creatinuria.
- Menos de 2 semanas con dosis de prednisona mayor de 0.5mg/kg, mofetil micofenolato iniciado a dosis mayor de 2g/24h o menos de un bolo intravenoso de ciclofosfamida administrado en los últimos 6 meses.
- Microangiopatía trombótica con afección renal aguda o crónica, diagnosticada mediante análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea definido por la presencia de esquistositos o trombos intravasculares, hiperplasia intimal de las arteriolas renales y/o patrón de doble contorno de la membrana basal glomerular sin la presencia de inmunocomplejos.

Para el grupo de pacientes con historia de actividad renal actualmente inactivos

- Diagnóstico de lupus eritematoso generalizado basado en los criterios de la ACR o SLICC
- Actividad renal previa diagnosticada de acuerdo a lo antes mencionado
- Respuesta completa al tratamiento con función renal normal para la edad y sexo, proteinuria menor de 150mg/24 horas y sedimento urinario inactivo (menos de 5 eritrocitos/campo) evidenciado en 2 visitas consecutivas separadas al menos 3 meses.

Para el grupo de donadores sanos

- Paciente programado para donación renal en las siguientes 4 semanas.
- Función renal normal para la edad y sexo, proteinuria menor de 150mg en 24 horas y sedimento urinario inactivo.
- Histología renal normal en la biopsia cero.
- Evaluación pre-trasplante completa en que se ha descartado enfermedades renales o sistémicas asociadas a daño renal.

Exclusión

- Paciente incapaz para firmar o quien no firme el consentimiento informado
- Enfermedad comórbida en los grupos con lupus eritematoso generalizado capaz de inducir proteinuria (diabetes mellitus, otras reumáticas).

Eliminación

- Muestra de biopsia renal percutánea insuficiente para la valoración de actividad (menor de 10 glomérulos obtenidos)
- Evidencia de otra etiología distinta a nefropatía lúpica en el análisis histopatológico de la biopsia renal
- Retiro del consentimiento informado

7.5 Tamaño de la muestra

Dado que el estudio fue principalmente exploratorio se decidió incluir al menos 10 pacientes por grupo. Una vez identificadas las características para la medición de los biomarcadores se planea en un estudio posterior aumentar el número de pacientes a 20 por grupo con lo cual se alcanzará un poder del 90%, con precisión del 10% para encontrar un área bajo la curva para diferenciar nefropatía lúpica activa de inactiva de 0.800.

7.6 Recolección de datos

Se revisaron los expedientes físicos y electrónicos de los pacientes con los diagnósticos de cada uno de los grupos. Se colectaron en una base de datos electrónica (Excel 2010) las siguientes variables para cada paciente:

a) Variables demográficas: Fecha de nacimiento, sexo.

b) Variables clínicas basales: Presión arterial sistólica y diastólica (mm Hg), creatinina sérica (mg/dl), nitrógeno ureico sérico (mg/dl), serología para anticuerpos contra DNA de doble cadena, fragmentos C3 y C4 del complemento, hemoglobina, plaquetas, albúmina sérica, dosis de medicamentos inmunosupresores como prednisona, mofetil micofenolato, azatioprina, ciclofosfamida e hidroxicloroquina.

c) Variables obtenidas del análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea: número de glomérulos obtenidos (con la intención de valorar lo adecuado de la muestra), fibrosis intersticial, atrofia tubular, índice de actividad del NIH, índice de Cronicidad del NIH, clasificación de acuerdo a la ISN/RPS.

d) Otras variables: Fecha de la biopsia renal (excepto para el grupo con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado sin actividad renal), fecha de inicio de los síntomas (grupo con nefropatía activa), fecha de remisión completa (grupo con nefropatía previa), escala SLEDAI.

7.7 Análisis estadístico

Para la expresión de las características basales de cada uno de los grupos se utilizó estadística descriptiva mediante medias aritméticas y desviación estándar o medianas y rangos intercuantiles de acuerdo al tipo de distribución de la variable. Para la comparación de las características basales entre grupos se utilizó pruebas de ANOVA o Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni para el número de comparaciones.

Los valores obtenidos de los ensayos fueron normalizados al valor de creatinina urinaria (concentración) de la muestra.

Para el análisis de los resultados de los estudios de cada biomarcador se utilizó una prueba de Kruskal Wallis para la comparación de valores entre grupos seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

Para analizar las asociaciones entre los niveles urinarios de cada biomarcador y las características basales se utilizó la prueba de Chi-cuadrada de Pearson para variables categóricas, y la prueba de correlación de rangos de Spearman para variables continuas.

Se realizó el cálculo del área bajo la curva (AUC) mediante curvas ROC para comparar la capacidad de distinguir el estado clínico entre cada uno de los grupos específicos de pacientes. Se derivó la sensibilidad y especificidad de las curvas ROC. Así mismo, se identificaron los valores de punto de corte para definir niveles elevados de cada uno de los biomarcadores.

Para las pruebas que no impliquen comparaciones múltiples se consideró como significativo un valor de p menor de 0.05.

Todos los análisis se realizaron con SPSS 20.0 y GraphPad Prism 3.0.

8 RESULTADOS

Características clínicas y de laboratorio de los pacientes

Se seleccionaron las muestras de orina y sangre recabadas previo a la toma de la biopsia renal percutánea, de 12 pacientes con nefritis lúpica activa diagnosticada entre los años 2015 y 2018 en nuestro Instituto. Similarmente se colectaron las muestras de 12 pacientes con nefritis lúpica activa más microangiopatía trombótica, de 9 pacientes con historia de nefritis lúpica actualmente inactivos como controles enfermos, y de 5 donadores renales como controles sanos (excepto muestra de sangre). La mayoría (80-100% dependiendo del grupo) de los 38 pacientes fueron mujeres jóvenes. Las características generales de los 4 grupos de pacientes se muestran en la Tabla 1.

Los pacientes con nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica se presentaron con valores significativamente ($p=0.014$) más elevados de creatinina sérica (3.1mg/dl, RIC 2.0-5.8mg/dL) que los grupos de nefritis lúpica activa (1.3mg/dl, RIC 0.7-2.4mg/dl), nefritis lúpica inactiva (0.6mg/dl, RIC 0.6-0.7mg/dL) y los donadores sanos (0.8mg/dl, RIC 0.5-1.0mg/dl). Similarmente, los niveles de anticuerpos contra DNA_{dc} y el número de esquistocitos observados en el frotis de sangre periférica fueron significativamente mayores en el grupo con nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica. En contraste, las cifras de hemoglobina fueron significativamente menores en el grupo con nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de los 4 grupos.

Variable	NL y MAT (n=12)	NL activa (n=12)	NL inactiva (n=9)	Donadores (n=5)	P
Biopsia previa (%)	6 (50)	3 (25.0)	9 (100)	-	0,400
Edad, años	32 (20-37)	29 (25-38)	34 (25-49)	40 (30-48)	0,799
Mujeres (%)	12 (100)	10 (83.3)	9 (100)	4 (80)	0,478
Evolución de LEG (meses)	71 (26-126)	31 (2.8-84)	26 (1-70)	-	0,242
IMC, kg/m ²	25.6 (23.6-26.3)	26.2 (22.6-28.9)	28.1 (23.1-32.5)	28.3 (24.7-29.2)	0,843
TAS, mmHg	155 (140-169)	140 (133-150)	120 (120-129)	114 (99-129)	0,114
TAD, mmHg	100 (90-110)	90 (81-98)	80 (70-80)	70 (63-81)	0,068
TAM, mmHg	120 (104-126)	107 (101-115)	93 (85-96)	85 (75-97)	0,089

Creatinina, mg/dl	3.1 (2.0-5.8)	1.3 (0.7-2.4)	0.6 (0.6-0.7)	0.8 (0.5-1.0)	0,014
Proteinuria, g/g	6.9 (3.6-11.3)	5.0 (2.8-5.8)	0.2 (0.1-0.3)	0.0 (0.0-0.03)	0,242
Hematuria, %	10 (83.3)	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0,478
Piuria, %	10 (83.3)	10 (83.3)	0 (0)	0 (0)	1,000
Hemoglobina, g/dl	10.1 (8.5-10.9)	12.1 (10.3-13.3)	12.8 (11.6-13.8)	16.0 (14.8-17.2)	0,017
Plaquetas, /mm ³	139 (99-193)	248 (155-285)	254 (181-354)	267 (214-312)	0,060
Albúmina sérica, g/dl	2.2 (1.9-2.9)	2.2 (1.9-2.6)	4.3 (3.9-4.4)	4.3 (4.1-4.4)	0,887
Triglicéridos, mg/dl	243 (159-365)	187 (167-246)	103 (86-195)	154 (91-193)	0,412
Colesterol, mg/dl	192 (170-287)	187 (162-273)	167 (148-207)	196 (160-232)	0,656
C-HDL, mg/dl	45 (36-54)	36 (32-47)	53 (41-64)	48 (42-59)	0,412
C-LDL, mg/dl	101 (86-150)	112 (85-167)	86 (67-111)	139 (113-148)	0,882
DHL, u/dl	260 (196-359)	218 (203-263)	-	-	0,651
Coombs positivo (%)	3/11 (27)	1/5 (20)	-	-	0,038
Haptoglobinas bajas (%)	6 (50)	3/8 (38)	-	-	0,075
Haptoglobinas, u/dl	36 (10-202)	128 (10-260)	-	-	0,521
Esquistocitos (frotis)			-	-	0,037
Ninguno	5 (42)	11 (92)	-	-	
Algunos	3 (25.0)	1 (8)	-	-	
<1 por campo	4 (33.3)	0 (0)	-	-	
Porcentaje reticulocitos	2.7 (1.4-2.9)	2.01 (1.3-2.8)	-	-	
Nivel IgG Vs. ADAMTS13	7.5 (2.8-8.1)	-	-	-	

IgG ADAMTS13 positivo	0 (0)	-	-	-	
ADAMTS13 actividad (%)	80 (73-88)	-	-	-	
Anti-DNAc, u/ml	1112 (516-3823)	261 (58-873)	8 (7-27)	-	0,027
Anti-C1q, u/ul	21,5 (14,4-26,4)	12,9 (8,7-19,7)	-	-	0,017
Niveles de C3, ug/dl	43 (35-57)	52 (34-11)	107 (102-128)	-	0,410
Niveles de C4, ug/dl	8 (7-10)	8 (8-11)	14 (12-30)	-	0,887
ACL positivo, %	3 (25.0)	1 (8.3)	1 (8.3)	-	0,594
Serología positiva para SAAF, %	3 (25.0)	5 (41.7)	1 (11.1)	-	0,193
Vitamina D, u/dl	15 (9-19)	18 (9-30)	-	-	0,731
Síndrome glomerular				-	0,667
Nefrótico (%)	4 (33.3)	4 (33)	-	-	
Nefrítico (%)	7 (58.3)	6 (50)	-	-	
AUA (%)	1 (8.3)	1 (8)	-	-	
ERC (%)	0 (0)	1 (8)	-	-	

Características histopatológicas de los pacientes

Todos los pacientes de los grupos con nefritis lúpica activa contaron con una biopsia renal adecuada (>10 glomérulos). La clase de nefritis lúpica que predominó, en base a la clasificación de la ISN/RPS fue la III/IV+V. El índice de actividad del NIH fue al menos de 10 en todos los pacientes con nefritis lúpica activa. Como se muestra en la Tabla 2, el número de glomérulos con esclerosis global, el índice de cronicidad del NIH, el porcentaje de fibrosis intersticial, el porcentaje de atrofia tubular y el porcentaje de inflamación intersticial fueron significativamente mayores en el grupo de nefritis lúpica activa más microangiopatía trombótica, en comparación con el grupo

de nefritis lúpica activa sin MAT. El resto de las características histopatológicas de los diferentes grupos puede observarse en la Tabla 2.

Tabla 2. Características histopatológicas de la biopsia renal percutánea de los 4 grupos.

	NL y MAT (n=12)	NL activa (n=12)	NL inactiva (n=9)	Donadores (n=5)	P
No. Glomérulos	17 (13-19)	19 (12-26)	-		0,539
% Esclerosis total	24 (4-43)	10 (3-21)	-		0,228
% Esclerosis global	14 (4-31)	4 (0-10)	-		0,050
% Esclerosis segmentaria	0 (0-25)	0 (0-20)	-		0,872
% Fibrosis intersticial	30 (18-45)	15 (11-24)	-	10 (10-20)	0,036
% Atrofia tubular	35 (18-53)	15 (6-19)	-	10 (10-20)	0,011
% Inflamación intersticial	20 (10-33)	10 (5-15)	-	0 (0)	0,017
Índice de actividad	14 (10-14)	11 (11-12)	-	-	0,254
Índice de cronicidad	6 (4-8)	4 (3-5)	-	-	0,036
Esclerosis arterial n (%)	2 (17)	7(58.3)	-	-	0,008
ISN/RPS			-	-	0,714
Clase III/IV n (%)	-	1 (8.3)	-	-	
Clase V n (%)	1 (8.3)	-	-	-	
Clase III/IV+V n (%)	11 (91.7)	11 (91.7)	-	-	
Presencia de medias lunas n (%)	12 (100)	11 (91.7)	-	-	

Biomarcadores de la vía terminal del complemento

Niveles séricos y urinarios de sC5b-C9 como marcador de nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica

Los niveles de sC5b-C9 plasmáticos fueron significativamente ($p=0.010$) más elevados en los pacientes con nefropatía lúpica activa (1338ng/mg, rango intercuartilar [RIC] 1011-1945ng/mg) en comparación con el grupo con nefritis activa y microangiopatía trombótica (1279ng/mg, RIC 891-1962ng/mg) y vs 567 (470-1028) y orina [$p<0.001$, 178.8 (28.7-611.1) vs 92.6 (22.8-260.1) vs 10.2 (0.9-19.3) vs 0.7 (0.4-1.9)] fueron significativamente más altos en los pacientes con nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica en la biopsia renal, en comparación con los grupos de controles sanos y enfermos (Figura 1).

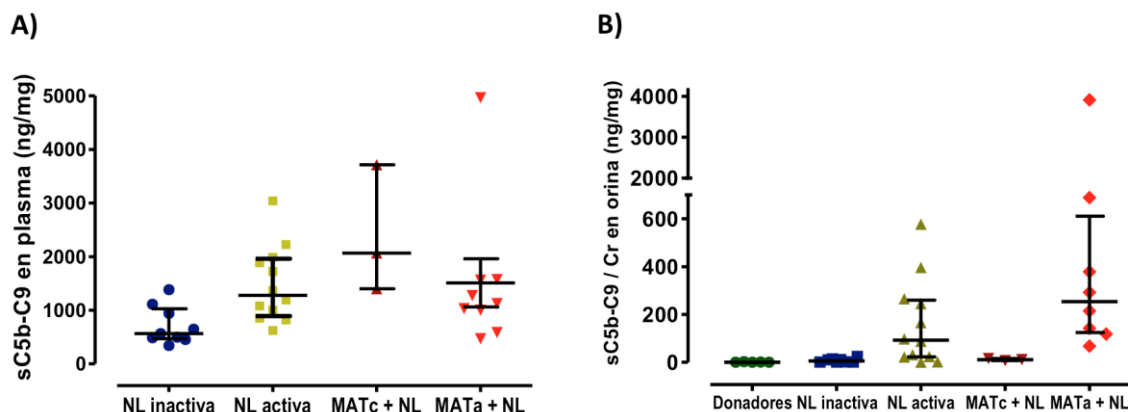


Figura 1. Niveles plasmáticos (A) y urinarios (B) de sC5b-C9 por grupos. Los gráficos se presentan con mediana y rangos intercuartilares.

Tanto los niveles plasmáticos como urinarios de sC5-C9 lograron distinguir adecuadamente entre los pacientes con nefritis lúpica activa de aquellos con nefritis inactiva, con un área bajo la curva ROC de 0.852 y 0.854 respectivamente, como se muestra en la Figura 2.

Para un punto de corte mayor de 975ng/ml, los niveles plasmáticos de sC5b-C9 tuvieron una sensibilidad de 78% y especificidad de 75% para diferenciar nefritis lúpica activa de inactiva. Para un punto de corte mayor de 18ng/mg, los niveles urinarios de sC5b-C9 tuvieron una sensibilidad de 83% y especificidad de 88% para diferenciar nefritis lúpica activa de inactiva.

Para la diferenciación entre los grupos de NL+MAT activa y nefritis lúpica activa, el área bajo la curva ROC de los niveles de sC5b-C9 plasmáticos y urinarios fue de 0.593 y 0.740 respectivamente.

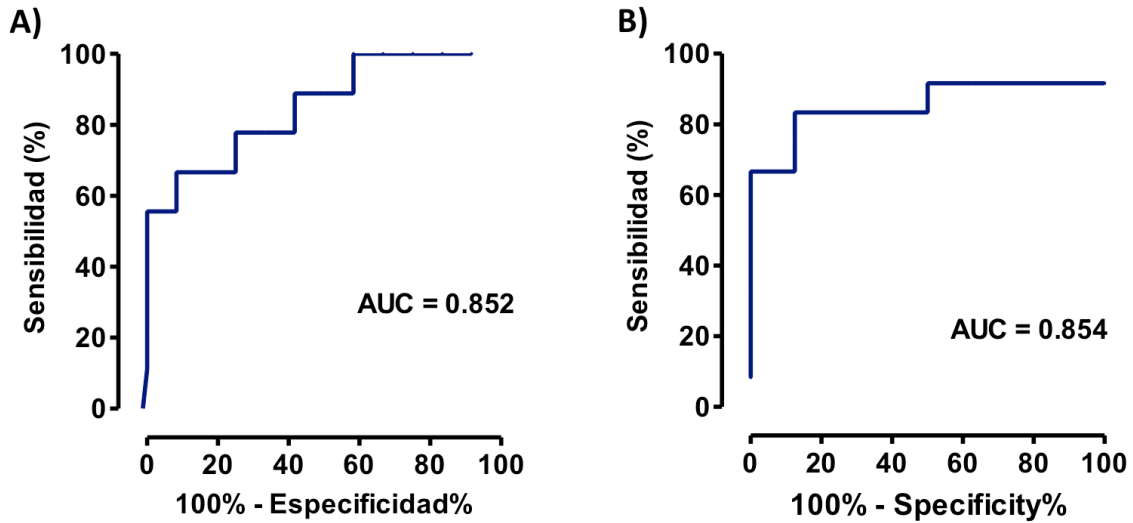


Figura 2. Gráficos que muestran las curvas ROC de los niveles plasmáticos (A) y urinarios (B) de sC5b-C9 para diferenciar nefritis lúpica activa de nefritis lúpica inactiva.

Biomarcadores de la vía alterna del complemento

Niveles séricos y urinarios de Ba como marcador de nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica

Los niveles urinarios del fragmento Ba del complemento representan la activación de la vía alternativa del complemento. Los niveles plasmáticos del fragmento Ba del complemento fueron significativamente mayores (256ng/dl, RIC 129-2976, $p=0.006$) en el grupo de nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica, en comparación el grupo de nefritis lúpica activa (61ng/dl, RIC 23-477ng/dl) y nefritis lúpica inactiva (50ng/dl, RIC 29-78), como se muestra en la Figura 3.

El área bajo la curva ROC de los niveles plasmáticos del fragmento Ba para diferenciar nefritis lúpica activa del grupo con nefritis activa + MAT fue de 0.736. Interesantemente, al eliminar los pacientes con hallazgos puramente crónicos de MAT, el área bajo la curva mejoró a 0.849. Esto sugiere que la vía alternativa del complemento se encuentra más activa en casos de nefritis lúpica que desarrollan microangiopatía trombótica activa.

Para los niveles urinarios del fragmento Ba, el área bajo la curva ROC fue de 0.711 para diferenciar nefritis lúpica activa de nefritis lúpica activa + MAT. Nuevamente, al eliminar los casos con hallazgos puramente crónicos de MAT, el área bajo la curva mejoró a 0.828.

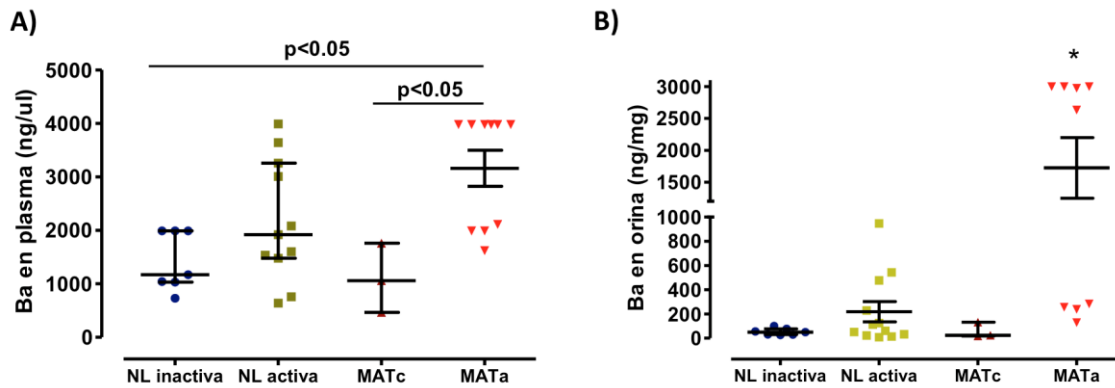


Figura 3. Niveles plasmáticos (A) y urinarios (B) del fragmento Ba del complemento. Los resultados se presentan como mediana y rangos intercuartilares.

* $p < 0.05$ contra todos los grupos.

En cuanto a la diferenciación de nefritis lúpica activa de inactiva, los niveles plasmáticos y urinarios del fragmento Ba del complemento tuvieron un área bajo la curva ROC de 0.618 y 0.727 respectivamente.

Excreción urinaria de C3d como marcador de nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica

Los niveles de C3d urinarios fueron evaluado mediante un método semicuantitativo de dot-blot. Como se muestra en la Figura 4, los niveles de C3d urinario fueron numéricamente mayores (pero no estadísticamente, $p = 0.216$) en el grupo con nefritis lúpica y MAT (20.1dpi, RIC 15.2-28.5), en comparación con el grupo con nefritis lúpica activa (17.4dpi, RIC 16.7-21.0) y los donadores renales (14.8dpi, RIC 13.7-20.9).

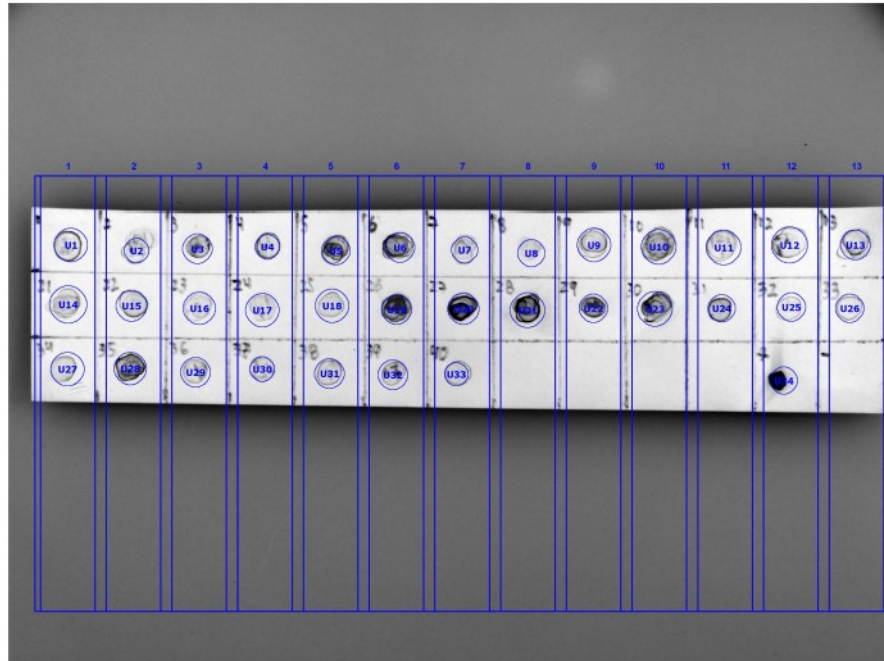


Figura 4. Analisis densitométrico del dotblot para detectar la presencia de C3d en orina

Tras dividir el grupo de pacientes con nefritis lúpica activa y MAT en aquellos con hallazgos histopatológicos predominantemente de MAT aguda y aquellos con hallazgos de MAT crónica se observaron niveles más elevados de C3d urinario en los pacientes con MAT aguda ($23.7 \text{ dpi} \times 10^3$) en comparación con los grupos de donadores, nefritis lúpica activa y nefritis lúpica con MAT crónica (14.8, 17.7 y 15.3 $\text{dpi} \times 10^3$ respectivamente, $p=0.037$, Figura 5).

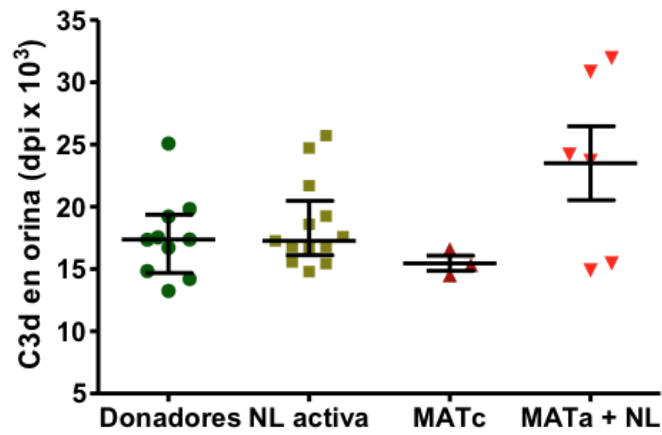


Figura 5. Niveles urinarios de C3d por grupos.

Biomarcadores de la vía clásica del complemento

Niveles séricos y urinarios de C4d como marcador de nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica

Contrario a lo reportado en estudios previos en los cuales se ha encontrado positividad para C4d en las biopsias renales de pacientes con hallazgos de MAT, los niveles séricos de C4d fueron significativamente más elevados ($p=0.011$) en el grupo de pacientes con nefritis lúpica inactiva (10.7ng/dl, RIC 4.1-14.8ng/dl) en comparación con los grupos de pacientes con NL activa (2.7ng/dl, RIC 1.8-6.1ng/dl) y NL activa + MAT (3.3ng/dl, RIC 2.3-4.1ng/dl), Figura 6.

Los niveles urinarios de este biomarcador no mostraron diferencias entre los grupos como se muestra en la Tabla 3.

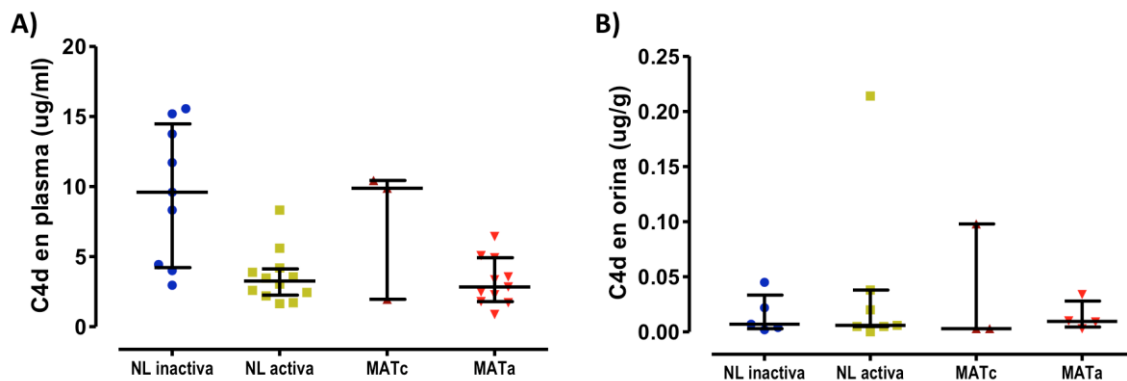


Figura 6. Niveles del fragmento C4d del complemento en plasma (A) y orina (B) de los pacientes estudiados.

Otros biomarcadores: anticuerpos anti-C1q y anti-CD163 soluble

Anticuerpos anti-C1q como marcador de nefritis lúpica activa y microangiopatía trombótica

Los niveles séricos de anticuerpos dirigidos contra el fragmento C1q fueron significativamente más elevados ($p=0.019$) en los pacientes del grupo con NL activa y MAT (21.5u/dl, RIC 14.4-26.4u/dl), en comparación con el grupo de pacientes con NL activa (12.9u/dl, RIC 8.7-19.7u/dl) y el grupo de pacientes con NL inactiva (6.6u/dl), Figura 7

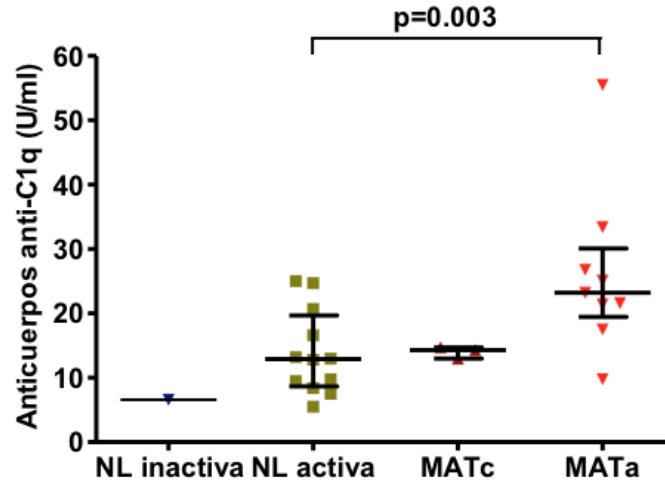


Figura 7. Niveles séricos de anticuerpos contra C1q. El gráfico se presenta con mediana y rango intercuartil.

CD-163 soluble en orina como marcador de nefritis lúpica activa

Los niveles urinarios de sCD163 (corregidos por concentración urinaria de creatinina) fueron significativamente más elevados ($p < 0.001$) en pacientes con nefritis lúpica activa (66.3ng/mg, RIC 52-182ng/mg) en comparación con los pacientes con nefritis lúpica inactiva (1.0ng/mg, RIC 0.3-3.8ng/mg) y los donadores sanos como se muestra en la Figura 8.

El área bajo la curva ROC fue de 1.0, con sensibilidad de 100% y especificidad de 100% para diferenciar nefritis lúpica activa de nefritis lúpica inactiva para un punto de corte de 6.35ug/mg (Figura 8).

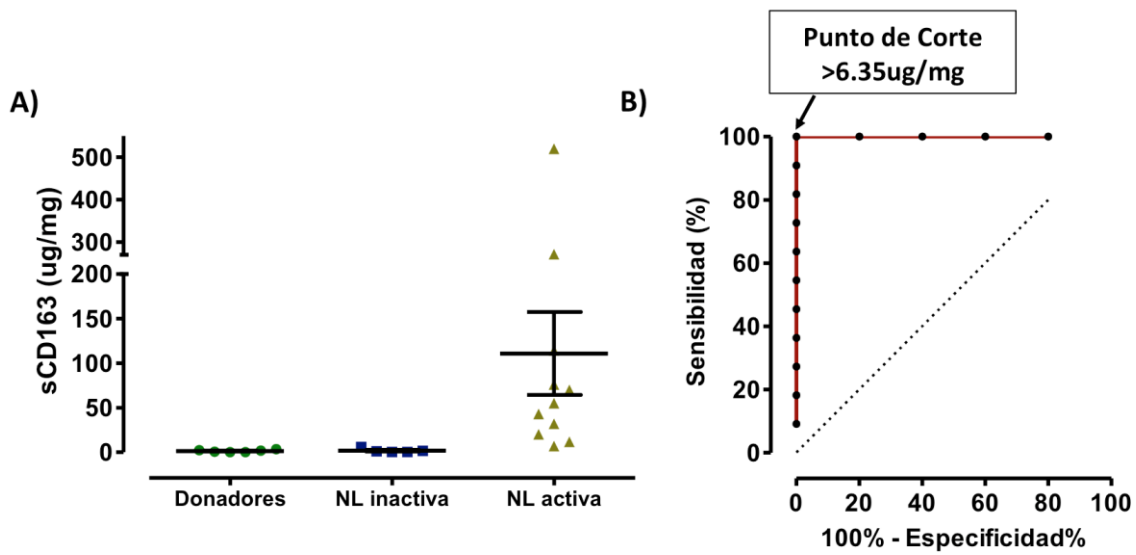


Figura 8. A) Concentración de sCD163 en orina. Los resultados se muestran como mediana y rangos intercuartiles. B) Curva ROC de sCD163 en orina para diferenciar nefritis lúpica activa de nefritis lúpica inactiva.

El resumen de los resultados obtenidos para cada biomarcador, tanto en las determinaciones de sangre como en las de orina, se muestra en la Tabla 3

Tabla 3. Resultados de los diferentes biomarcadores séricos y urinarios evaluados en este estudio.

Biomarcador	NL y MAT	NL activa	NL inactiva	Donadores	P
Anti-C1q sérico (ng/ml)	21.5 (14.4-26.4)	12.9 (8.7-19.7)	6.6	-	0.019
C3d en orina (DPIx10 ³)	20.1 (15.2-28.5)	17.4 (16.7-21.0)	-	14.8 (13.7-20.9)	0.216
sCD163 en orina (ug/mg)					
sC5b-C9 sérico (ng/ml)	1338 (1011-1945)	1279 (891-1962)	567 (470-1028)	-	0.010
sC5b-C9 en orina (ng/mg)	178.8 (28.7-611.1)	92.6 (22.8-260.1)	10.2 (0.9-19.3)	0.7 (0.4-1.9)	<0.001
sC5b-C9u/IPC	36 (8-80)	35 (6-138)	22 (3-109)	-	0.675
C4d plasmático (ug/ml)	2.7 (1.8-6.1)	3.3 (2.3-4.1)	10.7 (4.1-14.8)	-	0.011

C4d en orina (ug/g)	19.2 (6.4-73.5)	16.8 (8.1-35.1)	5.3 (2.3-44.7)	0 (0-0)	0.450
Ba plasmático (ng/ml)	255.5 (128.5-2976)	61.0 (23.0-476.5)	50.1 (28.9-77.5)	-	0.006
Ba en orina (ng/mg)	374.6 (218.7-2403)	107.0 (51-440)	47.8 (37-158)	0,11 (0.08-0.12)	0.004

Con la intención de evaluar longitudinalmente el comportamiento de los biomarcadores, se analizaron muestras de sangre y orina seriadas de una paciente con nefritis lúpica y microangiopatía trombótica. Como se muestra en la Figura 9, se encontró elevación de los niveles plasmáticos y urinarios de sC5b-C9, posiblemente mediado por la activación de la vía alterna del complemento dado que los niveles del fragmento Ba del complemento siguieron la misma tendencia, mientras que los niveles del fragmento C4d siguieron un curso heterogéneo.

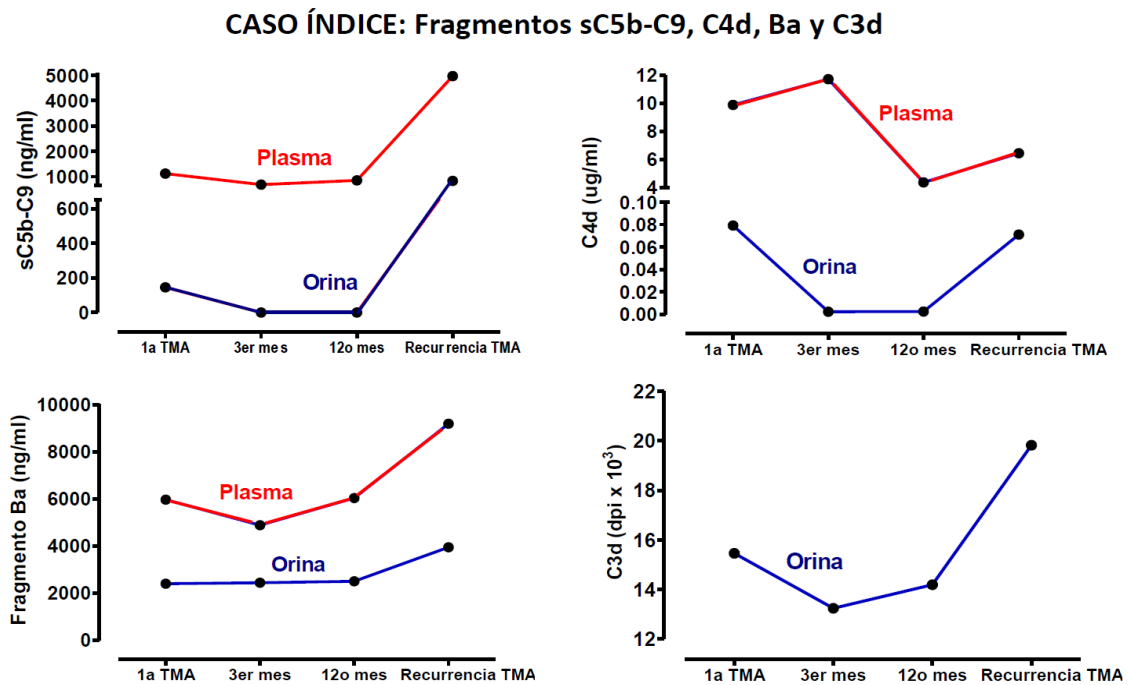


Figura 9. Caso de una paciente quien tuvo 2 episodios documentados de microangiopatía trombótica y actividad de nefritis lúpica.

9 DISCUSIÓN

El lupus eritematoso generalizado (LEG) y la nefritis lúpica (NL) son enfermedades autoinmunes con una fisiopatología compleja, poligénica y heterogénea. Dentro de los mecanismos patogénicos más frecuentemente descritos se incluyen el depósito de complejos inmunes a nivel glomérulo-tubular, la activación anómala del sistema inmunológico a nivel renal y la respuesta de las células renales parenquimatosas a estos insultos⁵¹. La participación de los macrófagos²³ y del sistema del complemento en la NL está bien demostrada⁵²; sin embargo, su papel exacto aún no está del todo claro, ya que ambos aparentemente desempeñan un papel dual en esta patología. Por un lado, parecieran tener un rol protector o inmunorregulador. Y por otro lado, su activación sería un evidente participante del daño renal en los pacientes con LEG⁵³. Otro mecanismo importante de daño renal, en los pacientes con nefritis lúpica, son las lesiones vasculares⁴⁰, en particular, la presencia de MAT coexistente, la cual se ha asociado a peores desenlaces renales y a una mayor mortalidad. Dentro de la compleja y aún desconocida fisiopatología de esta entidad, también parecieran participar activamente diferentes vías del complemento (clásica, alterna y terminal)^{43,44}. A pesar de esto, a la fecha existían pocos trabajos que intentaron obtener biomarcadores séricos o urinarios confiables para identificar de manera confiable la participación de estos potenciales mecanismos patogénicos y por ende la presencia de NL activa y/o MAT.

Los resultados de nuestro estudio sugieren la participación de la vía terminal y alterna en los pacientes con NL y MAT coexistente, de acuerdo a los resultados obtenidos de sC5b-9 y Ba, en sangre y orina. La utilidad de la medición de sC5b-9 en plasma, como biomarcador de la activación de la vía terminal del complemento en pacientes con SHUa, ya había sido estudiada en trabajos previos^{43,44}, aunque con algunos resultados discrepantes, todos ellos en pacientes que no padecían NL. Noris y colaboradores⁵⁴ encontraron que los niveles plasmáticos de sC5b-9, no correlacionaron en 9 de 19 pacientes con SHUa durante la fase aguda de la enfermedad; mientras que 23 de los 36 pacientes en remisión continuaban con niveles plasmáticos elevados de sC5b-9. Por el contrario, Volokhina y Cataland^{55,56}, reportaron de manera separada, en 2 series pequeñas de pacientes con SHUa sin NL, que todos los pacientes en la fase aguda de la enfermedad tenían niveles significativamente elevados de sC5b-9 plasmático, mientras que la totalidad de los pacientes en remisión tenían niveles comparables a los de los controles sanos, por lo que ambos autores, abogaron por la utilidad de las determinaciones seriadas de sC5b-9 como un biomarcador

de activación de la vía terminal del complemento. Si bien es cierto que los resultados reportados por estos 3 estudios son en pacientes sin NL, 9 de nuestros 12 pacientes (75%) del grupo de NL con MAT, cumplían criterios para SHUa lo que explicaría la concordancia de los resultados que obtuvimos de sC5b-9 en plasma con lo reportado por Volokhina y Cataland. Adicionalmente, los niveles de sC5b-9 en orina, también se encontraron significativamente más elevados en los grupos con NL activa y MAT renal en comparación con los controles, sobretodo en los pacientes con MAT activa, lo que apoya una mayor activación de la vía terminal durante esta fase aguda. Además, los niveles urinarios de sC5b-C9 correlacionaron con la creatinina sérica ($r=0.308$, $p=0.017$) y con la proteinuria ($r=0.686$, $p<0.001$). La utilidad de la medición de sC5b-9 en orina como biomarcador de MAT activa en pacientes con NL activa, pareciera ser bastante buena, nuestro estudio es el primero en utilizar la determinación de esta molécula en muestra de orina, como biomarcador de la activación de la vía terminal del complemento en pacientes con NL activa y/o MAT renal concordante con SHUa; una manera potencialmente menos invasiva, más sencilla y expedita de procesar que en una muestra de sangre.

Con respecto a la activación de la vía alterna del complemento en pacientes con NL y otras glomerulopatías, relativamente pocos trabajos han investigado la potencial utilidad de medir los productos de degradación de sus componentes. La mayoría de estos estudios datan de hace casi 20 años, y obtuvieron resultados contradictorios entre ellos. Nuestros resultados orientan también hacia la participación de la activación de la vía alterna del complemento en los pacientes con NL y/o MAT renal coexistente, de acuerdo con lo obtenido en las determinaciones del fragmento Ba en sangre y orina; así como la tendencia observada de una mayor excreción urinaria de C3d en el subgrupo de pacientes con NL y MAT renal activa. Estos hallazgos son concordantes con los estudios de Manzi y Negi^{29,30}, donde la presencia en orina de C3d y en suero de Bb, ambas documentadas mediante western blot, fueron mejores predictores de actividad clínica de LEG y NL, que los niveles séricos de C3, C4 y de los anticuerpos contra DNA de doble cadena. Lo que sugiere que la excreción urinaria aumentada de productos de degradación de la vía alterna del complemento, podría reflejar la activación de esta vía, y el consecuente daño renal mediado por complemento en pacientes con NL y MAT renal. Si bien es cierto que teóricamente, Ba y Bb son generados en cantidades equimolares luego de la activación de la vía alterna del complemento⁵⁷, pudieran encontrarse algunas discrepancias con respecto a su correlación clínica, derivadas de su diferente estabilidad, aclaramiento y detección por ELISA. Nuestro estudio es el primero en utilizar la determinación sérica y urinaria del fragmento Ba, como biomarcador de la activación de la vía

alterna del complemento en pacientes con NL activa y/o MAT renal activa. Su utilidad como potencial biomarcador de la activación de la vía alterna del complemento, ya se ha estudiado en otras glomerulopatías. Thurman y cols.⁵⁸ encontraron una relación directa entre los niveles urinarios de Ba y la proteinuria, así como una relación inversa entre los niveles urinarios de Ba y la TFG, en pacientes con glomerulonefritis focal y segmentaria primaria, independientemente del estadio de la ERC, lo que sugiere que los niveles altos en orina se deben a la glomerulopatía y no solo al deterioro progresivo de la función renal. En nuestro estudio los niveles de Ba en orina correlacionaron con los niveles de proteinuria y creatinina sérica en el grupo de pacientes con NL y MAT renal, esto podría deberse a la activación de la vía alterna a nivel glomerular pero también puede ser secundario a la activación de esta vía a nivel tubular. Aunque la presencia de los niveles altos de Ba en orina pueda considerarse como un marcador no específico de la activación del complemento en paciente con proteinuria nefrótica; el hecho de que los niveles séricos de Ba también haya sido significativamente mayor en este grupo de pacientes con respecto a los controles, indica que la vía alterna del complemento esta activa. Se necesitan más estudios que confirmen estos hallazgos y determinen la importancia pronóstica de la activación de la vía alterna del complemento en estos pacientes.

En relación a la activación de la vía clásica del complemento, contrario a lo reportado recientemente por Martin y cols^{59,60}, no encontramos correlación entre los niveles séricos y urinarios del fragmento C4d con la presencia de NL activa. Lo cual indicaría que en nuestros pacientes con NL activa, la activación de la vía clásica no tiene un papel relevante y por lo tanto la utilidad del fragmento C4d para predecir actividad es nula. Es poco probable que estos resultados se deban a una variación en la técnica de la medición ya que se utilizó el mismo anticuerpo (mouse anti-human C4d antibody, catalogue number 253; Quidel®, San Diego, CA, USA), con la misma técnica de ELISA que los estudios previos (valor mínimo detectado 5.6 µg/L) y con las diluciones recomendadas por el fabricante. Lo que resultaría en un coeficiente de variación interensayo de 16.7% e intraensayo de 13.2%, de acuerdo también a los estudios previos que lo han utilizado; variación insuficiente para explicar los desenlaces que obtuvimos. Otra potencial explicación, además del tamaño de nuestra muestra, es un puntaje menor de SLEDAI y unos niveles de complemento relativamente mayores en nuestra población, en comparación con la de otros estudios. Otra potencial utilidad de C4d como biomarcador, está en relación a la identificación de la activación de la vía clásica del complemento en los pacientes con MAT activa, Chuan y cols⁶¹ demostraron la presencia de C4d en tejido renal obtenido mediante biopsia renal percutánea, en

el 88.1% de los casos de MAT activa con involucro renal. Mientras que, Song y cols encontraron que en pacientes con nefritis lúpica y SHUa la presencia de C4d en tejido vascular renal predijo un peor desenlace renal en comparación con aquellos que no lo presentaron. Lo observado en estos 2 estudios sugiere la participación de la activación del complemento por la vía clásica en pacientes con NL y MAT activa con involucro renal. Sin embargo, al analizar los niveles séricos y urinarios de C4d encontrados en nuestra población con MAT activa, no encontramos diferencia con el resto de los grupos. Como se mencionó previamente, esto contrasta con lo reportado previamente en la literatura. Incluso dentro de nuestra misma población con NL y MAT activa, los resultados del comportamiento de los niveles de C4d fueron discordantes; tal y como se puede observar en el caso índice (Figura 6), una mujer con NL activa y MAT activa clasificada como SHUa, que durante su seguimiento presentó una recaída de la MAT; los niveles en orina y sangre de C4d durante la fase aguda aumentaban mientras que después de recibir el tratamiento disminuían; apoyando la activación de la vía clásica del complemento al inicio de la enfermedad.

La utilidad de los anticuerpos anti-C1q para predecir actividad renal en los pacientes con LEG es ampliamente conocida⁶². Trendelenburg y cols, encontraron que solo un paciente de 36 con NL activa corroborada por biopsia renal, no presentó positividad de estos anticuerpos⁶³. Adicionalmente la combinación de su positividad con la elevación en los niveles de anticuerpos anti-DNA dc se ha asociado a una mejor capacidad para predecir la presencia de NL activa proliferativa⁶⁴⁻⁶⁶. Estos resultados se reprodujeron en nuestro estudio, encontrándose niveles significativamente más altos de anticuerpos anti-C1q en los pacientes con NL activa y en los pacientes con NL activa y MAT renal, en comparación con los controles inactivos y los controles sanos. Hasta el momento no existen estudios que hayan demostrado la utilidad de los anticuerpos anti-C1q para predecir la presencia de MAT en pacientes con LEG. Tomando en cuenta el papel tan relevante de C1q en la activación de la vía clásica del complemento; así como los resultados negativos que obtuvimos con la medición de los niveles de C4d en orina y sangre de estos pacientes, como subrogado de la participación de la vía clásica; sería difícil dar una explicación distinta para los niveles significativamente más altos en el grupo de NL y MAT, que la mayor actividad serológica y un mayor deterioro de la función renal al momento del diagnóstico; este último pudiera resultar en títulos más elevados de estos anticuerpos por un menor aclaramiento renal.

Por último, nuestros resultados con respecto a la utilidad de sCD-163 en orina como marcador de NL activa, son concordantes con lo reportado por Endo y cols²⁴, incluso con una mayor área bajo la curva (1 vs 0.825), pero con un punto de corte corregido por creatinuria, de 6.35 ug/mg en lugar del utilizado por ellos (3.93ng/mg). Logrando un 100% de especificidad y sensibilidad para diferenciar nefropatía lúpica activa. Tomando en cuenta que sCD163 es un marcador de superficie expresado exclusivamente por macrófagos tipo M2, los niveles elevados encontrados en la orina de nuestros pacientes sugieren un rol importante de activación de los macrófagos en la patogénesis de NL. Por lo que los niveles elevados en orina de sCD163 podrían ser un muy buen biomarcador para identificar la presencia de inflamación glomerular dependiente de macrófagos en la fase activas de la nefropatía lúpica proliferativa.

Las limitaciones más evidentes de nuestro estudio son las propias de un estudio exploratorio de prueba diagnóstica, es decir el número limitado de pacientes por grupo y la potencial variabilidad intra e interensayo al momento de medir los diferentes biomarcadores que utilizamos. Aunque poco probable que haya repercutido en los resultados que obtuvimos, debemos mencionar que se ha reportado la activación extra-renal del complejo de ataque de membrana y otros componentes del complemento⁶⁰, cuando no se utilizan recipientes con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para recolectar las muestras de orina.

10 CONCLUSIONES

En resumen, de acuerdo a lo encontrado en este estudio exploratorio:

- 1.-En pacientes con NL y MAT (predominantemente SHUa), pareciera que la activación del complemento es mediante la vía alterna y la vía terminal.
- 2.- La medición de sCD163 urinario, pareciera ser un biomarcador prometedor en la identificación de pacientes con NL activa; traduciendo una potencial participación de los macrófagos M2 en esta enfermedad.
- 3.- Se corrobora la utilidad de los anticuerpos anti-C1q para identificar pacientes con NL activa.
- 4.- Aunque nuestros resultados son esperanzadores para la obtención de nuevos biomarcadores para detectar NL y/o MAT activa, se necesitan más estudios con un mayor número de pacientes que corroboren y reproduzcan lo encontrado en este trabajo.

11 BIBLIOGRAFIA

1. Fors Nieves CE, Izmirly PM. Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review. *Curr Rheumatol Rep*. 2016. doi:10.1007/s11926-016-0571-2.
2. Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, et al. The GLADEL Multinational Latin American Prospective Inception Cohort of 1,214 Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(1):1-17. doi:10.1097/01.md.0000104742.42401.e2.
3. Yurkovich M, Vostretsova K, Chen W, Aviña-Zubieta JA. Overall and cause-specific mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(4):608-616. doi:10.1002/acr.22173.
4. Parikh S V., Rovin BH. Current and Emerging Therapies for Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2016:1-11. doi:10.1681/ASN.2016040415.
5. Tektonidou MG, Dasgupta A, Ward MM. Risk of End-Stage Renal Disease in Patients With Lupus Nephritis, 1971–2015 A Systematic Review and Bayesian Meta-Analysis. *ARTHRITIS Rheumatol*. 2016;68(6):1432-1441. doi:10.1002/art.39594.
6. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016:CJN.05780616. doi:10.2215/CJN.05780616.
7. Rovin BH, Furie R, Latinis K, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1215-1226. doi:10.1002/art.34359.
8. Wofsy D. Treatment of lupus nephritis with abatacept: the Abatacept and Cyclophosphamide Combination Efficacy and Safety Study. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2014;66(11):3096-3104. doi:10.1002/art.38790.
9. Mysler EF, Spindler AJ, Guzman R, et al. Efficacy and safety of ocrelizumab in active proliferative lupus nephritis: Results from a randomized, double-blind, phase III study. *Arthritis Rheum*. 2013;65(9):2368-2379. doi:10.1002/art.38037.
10. Aranow C, van Vollenhoven R, Rovin BH, et al. A Phase 2, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Proof-of-Concept Study to Evaluate the Efficacy and Safety of

Sirukumab in Patients with Active Lupus Nephritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(9):S1239-S1239. doi:10.1002/art.39722.

11. Rovin BH, Dooley MA, Radhakrishnan J, Ginzler EM, Forrester TD, Anderson PW. The impact of tabalumab on the kidney in systemic lupus erythematosus: results from two phase 3 randomized, clinical trials. *Lupus.* 2016;25(14):1597-1601. doi:10.1177/0961203316650734.

12. Furie R, Petri M, Zamani O, et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):3918-3930. doi:10.1002/art.30613.

13. BII023 Proof-of-Concept Study in Participants With Lupus Nephritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01499355>. Accessed March 19, 2017.

14. Thanarajasingam U, Niewold TB. Sirukumab : a novel therapy for lupus nephritis? *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23(10):1449-1455. doi:10.1517/13543784.2014.950837.

15. Banchereau R, Hong S, Cantarel B, et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell.* 2016. doi:10.1016/j.cell.2016.03.008.

16. Jego G, Palucka AK, Blanck J-PJ, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 2003;19(2):225-234. doi:S1074761303002085 [pii].

17. Gallagher KME, Lauder S, Rees IW, Gallimore AM, Godkin AJ. Type I Interferon (IFN) Acts Directly on Human Memory CD4+ T Cells Altering Their Response to Antigen. *J Immunol.* 2009;183(5):2915-2920. doi:10.4049/jimmunol.0801607.

18. Ramos HJ, Davis AM, Cole AG, Schatzle JD, Forman J, Farrar JD. Reciprocal responsiveness to interleukin-12 and interferon- γ specifies human CD8 α effector versus central memory T-cell fates. *Blood.* 2009;113:5516-5525. doi:10.1182/blood-2008-11-188458.

19. Parikh S V., Malvar A, Song H, et al. Molecular imaging of the kidney in lupus nephritis to characterize response to treatment. *Transl Res.* 2016. doi:10.1016/j.trsl.2016.10.010.

20. Soliman S, Mohan C. Lupus nephritis biomarkers. *Clin Immunol.* 2016. doi:10.1016/j.clim.2016.08.001.

21. Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies — quintessential biomarkers of SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;12(2):1-9. doi:10.1038/nrrheum.2015.151
22. Mejia-Vilet JM, Parikh SV, Song H, Fadda P, Shapiro JP, Ayoub I, Yu L, Zhang J, Uribe-Uribe N, Rovin BH. Immune gene expression in kidney biopsies of lupus nephritis patients at diagnosis and at renal flare. *Nephrol Dial Transplant*. 2018. doi: 10.1093/ndt/gfy125
23. Wang Y, Harris DC. Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 21–27
24. Endo N, Tsuboi N, Furuhashi K. Urinary soluble CD163 level reflects glomerular inflammation in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Dec;31(12):2023-2033.
25. Schur PH: Complement and lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:793-798, 1982
26. Kelly RH, Carpenter AB, Sudol KS, Jagarlapudi SP, Manzi S. Complement C3 fragments in urine: detection in systemic lupus erythematosus patients by Western blotting. *Appl Theor Electrophor* 3:265-269, 1993
27. Penin LH, Lambert PH, Miescher PA Complement breakdown products in plasma from patients with systemic lupus erythematosus and patients with membranoproliferative or other glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1975 56:165-176.
28. Welch TR, Frenze M, Witte D. Evidence of a role for local complement expression in a murine model of progressive glomerulonephritis. *Pediatric Res* 2000;48:200–5.
29. Morita Y, Ikeguchi H, Nakamura J, Hotta N, Yuzawa Y, Matsuo S. Complement activation products in the urine from proteinuric patients. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:700–7.
30. Manzi S, Rairie J, Betts Carpenter A, Kelly R, Jagarlapudi S, Sereika S et al. Sensitivity and specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. *Arthritis Rheumatism* 1996;39:1178–88.
31. Negi VS, Aggarwal A, Dayal R, Naik S, Misra R. Complement degradation product C3d in urine: marker of lupus nephritis. *J Rheumatol* 2000;27:380–3.
32. Montinaro V, Lopez A, Monno R, Cappiello V, Manno C, Gesualdo L et al. Renal C3 synthesis in idiopathic membranous nephropathy: correlation to urinary C5b-9 excretion. *Kidney Int* 2000;57:137–46.

33. Welch TR, Beischel L, Witte DP. Differential expression of complement C3 and C4 in the human kidney. *J Clin Invest* 1993;92:1451–8.
34. Abe K, Miyazaki M, Koji T, Furusu A, Shiohita K, Tsukasaki S et al. Intraglomerular synthesis of complement C3 and its activation products in IgA nephropathy. *Nephron* 2001;87:231–9.
35. Norden AGW, Lapsley M, Lee PJ, Pusey CD, Scheinman SJ, Tam FWK et al. Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome. *Kidney Int* 2001;60:1885–92.
36. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 723–737.
37. Droste A, Sorg C, Hogger P. Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 110–113.
38. Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH et al. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 2002; 99: 378–380.
39. Banfi G, Bertani T, Boeri V, Faraggiana T, Mazzucco G, Monga G, Sacchi G: Renal vascular lesions as a marker of poor prognosis in patients with lupus nephritis. Gruppo Italiano per lo Studio della Nefrite Lupica (GISNEL). *Am J Kidney Dis* 1991, 18:240.
40. Mejía-Vilet JM, Córdova-Sánchez BM, Uribe-Uribe NO. Prognostic significance of renal vascular pathology in lupus nephritis. *Lupus*. 2017;26(10):1042-1050.
41. Lansigan F, Isufi I, Tagoe CE: Microangiopathic haemolytic anaemia resembling thrombotic thrombocytopenic purpura in systemic lupus erythematosus: the role of ADAMTS13. *Rheumatology* 2011, 50:824-829.
42. Appel G, Pirani C, D'Agati V: Renal vascular complications of systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol* 1994, 4:1499-1515.
43. Cohen D, Koopmans M, Kremer Hovinga IC, Berger SP, Roos van Groningen M, Steup-Beekman GM, de Heer E, Bruijn JA, Bajema IM: Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58:2460-2469.

44. Song D, Wu LH, Wang FM, et al. The spectrum of renal thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jan 15;15(1):R12. doi: 10.1186/ar4142.
45. Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol* 2007;25(11):1256-64.
46. Licht C, Muus P, Legendre C, Douglas KW, Hourmant M, Delmas Y, et al. Eculizumab Is An Effective Long-Term Treatment In Patients with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) Previously Receiving Chronic Plasma Exchange/Infusion (PE/PI): Extension Study Results. *Blood* 2011;118(21)
47. Greenbaum LA, Babu S, Furman R, Sheerin N, Cohen D, Gaber O, et al. Continued improvements in renal function with sustained eculizumab (ECU) in patients (PTS) with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) resistant to plasma exchange/infusion (PE/PI). *J Am Soc Nephrol* 2011;22(suppl):197A.
48. Coppo R et al. Dramatic effects of eculizumab in a child with diffuse proliferative lupus nephritis resistant to conventional therapy. *Pediatr Nephrol* 2015; 30: 167–172
49. El-Husseini A et al. Thrombotic microangiopathy in systemic lupus erythematosus: efficacy of eculizumab. *Am J Kidney Dis* 2015; 65: 127–130
50. Pickering MC et al. Eculizumab as rescue therapy in severe resistant lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54:2286–2288
51. Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis?. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Mar; 12(3): 143–153.
52. Bao L, Cunningham P, Quigg R. Complement in lupus nephritis: new perspectives. *Kidney Dis* 2015;1:91–99
53. Birmingham D, Hebert L. The Complement system in lupus nephritis. *Semin Nephrol* 2015 35:444-454.
54. Noris M, Galbusera M, Gastoldi S, et al. Dynamics of complement activation in aHUS and how to monitor eculizumab therapy. *Blood*. 2014;124(11):1715-1726.

55. Volokhina EB, Westra D, van der Velden TJ, van de Kar NC, Mollnes TE, van den Heuvel LP. Complement activation patterns in atypical hemolytic uremic syndrome during acute phase and in remission [published online ahead of print July 31, 2014]. *Clin Exp Immunol*. <http://dx.doi.org/10.1111/cei.12426>. 4.
56. Cataland SR, Holers VM, Geyer S, Yang S, Wu HM. Biomarkers of terminal complement activation confirm the diagnosis of aHUS and differentiate aHUS from TTP. *Blood*. 2014;123(24):3733-3738.
57. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Complement involvement in kidney diseases: From physiopathology to therapeutical targeting. *World J Nephrol* 2015 May 6; 4(2): 169-184
58. Thurman JM, Wong M, Renner B, Frazer Abel A, Giclas PC, Joy MS, et al. Complement activation in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS ONE* 2015 10(9): e0136558. doi:10.1371/journal.pone.0136558.
59. Martin M, Smolař K, Björk A. Plasma C4d as marker for lupus nephritis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 2017 (19):266-286.
60. Cohen D, Koopmans M, Kremer Hovinga IC, Berger SP, Roos van Groningen M, Steup-Beekman GM, de Heer E, Bruijn JA, Bajema IM: Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58:2460-2469.
61. Chua JS, Baelde HJ, Zandbergen M, Wilhelmus S, van Es LA, de Fijter JW, et al. Complement factor C4d is a common denominator in thrombotic microangiopathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015 (8):245-253.
62. Siegert C, Daha M, Tseng C, et al. Predictive value of IgG autoantibodies against C1q for nephritis in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1993 (52): 851–856.
63. Trendelenburg M, Lopez-Trascasa M, Potlukova E, et al. High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsy-proven active lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2006 (21): 3115–3121.

64. Moroni, G., A. Radice, G. Giammarresi, et al. 2008. Are laboratory tests useful for monitoring the activity of lupus nephritis? A six year prospective study in a cohort of 228 lupus nephritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 68: 234–237
65. Moroni G, Quaglini S, Radice A. The value of a panel of autoantibodies for predicting the activity of lupus nephritis at time of renal biopsy. *J Immunol Res* 2015, 113-122.
66. Yang W, Tan Y, Yu F, et al. Combination of anti-C1q and anti-dsDNA antibodies is associated with higher renal disease activity and predicts renal prognosis of patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2012 (27): 3552–3559.
67. Van der Pol P, De Vries K, Van Gijlswijk D. Pitfalls in urinary complement measurements. *Transplant Immunology* 27 (2012) 55–58.

12 ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES URINARIOS DIFERENCIADORES DE VÍAS
INFLAMATORIAS ACTIVAS EN PACIENTES CON NEFROPATÍA LÚPICA**

VERSIÓN 1.1 (27 ABRIL 2017)

Investigador principal: JUAN MANUEL MEJÍA VILET
Dirección del investigador: Vasco de Quiroga No. 15, Belisario
Domínguez Sección XVI, Tlalpan, CDMX.
Teléfono de contacto del investigador: 4444253688
Investigadores participantes: Ismael Gómez Ruiz
Nombre del patrocinador del estudio: Departamento de Nefrología y Metabolismo
Mineral
Dirección del patrocinador: Vasco de Quiroga No. 15, Belisario
Domínguez Sección XVI, Tlalpan, CDMX.
Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación: **Versión 1.0 (22
marzo 2017).**

INTRODUCCIÓN:

Este documento es una invitación a participar en un estudio de investigación del Instituto. Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento; pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Procedimiento para dar su consentimiento. Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar o no como sujeto de investigación en este proyecto. El investigador le debe explicar ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y **usted tendrá todo el tiempo que requiera para pensar, solo o con quien usted decida consultarlo, antes de decidir si acepta participar.** Cualquiera que sea su decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto.

Con el fin de tomar una decisión verdaderamente informada sobre si acepta participar o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los posibles riesgos y beneficios a su salud al participar. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar quien usted quiera, por ejemplo un familiar, su médico tratante, el investigador principal de este estudio o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final, una vez leída y entendida esta información, se le invitará a que forme parte del proyecto y si usted acepta, sin ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki, y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Al final de la explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de qué son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.
- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para usted
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
- VII. La libertad que tiene de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se afecte su atención y el tratamiento en el Instituto.
- VIII. La seguridad de que no se le va a identificar de forma particular y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
- IX. El compromiso del investigador de proporcionarle la información actualizada que pueda ser obtenida durante el estudio, aunque esto pudiera afectar a su disposición para continuar con su participación.
- X. La disponibilidad del tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación.

Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de tomar una decisión final en los días futuros.

INVITACION A PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACION Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado(a) Sr(a).

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), a través del grupo de investigación, le invitan a participar como sujeto de investigación en este estudio que tiene como objetivo: Identificar sustancias en orina que faciliten el diagnóstico de inflamación en los riñones asociadas a lupus eritematoso generalizado.

La duración total del estudio es: 1 muestra de orina de 50ml.
Su participación en el estudio tendrá una duración de: 1 día.
El número aproximado de participantes será: 80 participantes.
Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características: Tiene diagnóstico de lupus eritematoso generalizado o es usted un donador renal sano.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Como única maniobra del estudio se le solicitará una sola muestra de orina (50ml) en el recipiente que le proporcionará el investigador del estudio. Dicha muestra se almacenará en el ultracongelador ubicado en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral.

En dicha muestra de orina se buscarán diversas sustancias con posibilidad de diferenciar la presencia de inflamación renal entre personas con lupus eritematoso, así como con donadores renales sanos.

Ninguno de esos estudios tendrá un costo para usted. No se requerirán visitas adicionales. No se realizarán modificaciones a su tratamiento.

RIESGOS E INCONVENIENTES

No existen riesgos para usted en la participación en este estudio. Como se comentó únicamente se le solicitará una muestra de orina que se almacenará inmediatamente.

Esto se considera como un estudio con riesgo mínimo por el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

BENEFICIOS POTENCIALES

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda de sustancias diagnósticas de inflamación renal en la orina permitirá diseñar nuevas pruebas de diagnóstico que pudieran beneficiarle a pacientes con lupus eritematoso generalizado.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

El estudio no implica NINGÚN COSTO para usted.

COMPENSACION

No hay compensaciones para usted consideradas en este estudio.

ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:

Su participación es voluntaria. Por lo que usted puede elegir no participar en el estudio. En caso de decidir no participar, usted seguirá recibiendo el tratamiento o manejo habitual (estándar) para su enfermedad en esta Institución.

POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:

Los resultados o materiales obtenidos en el estudio serán propiedad del INCMNSZ. Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero por el mismo.

ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio al Dr. Juan Manuel Mejía Vilet del INCMNSZ (tel. 54870900 Ext. 4142). La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:

Recuerde que su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, tanto su relación habitual con el INCMNSZ como su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho no se verán afectados. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el INCMNSZ. Se le informará a tiempo si se obtiene nueva información que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN

Su nombre no será usado en ninguno de los reporte públicos del estudio. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y serán codificadas con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal, las muestras biológicas, incluyendo la sangre y orina, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas, así como su información médica y/o genética, puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto, y estos estudios deberán ser sometidos a aprobación por un Comité de Ética.

Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 5 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán sólo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Sólo los investigadores tendrán acceso a ellos. El personal del estudio (monitores o auditores) podrá tener acceso a la información de los participantes.

Si bien existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio, su confidencialidad será protegida como lo marca la ley, asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o

- Es solicitado por la ley.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su muestra de orina y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

El Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ aprobó la realización de este estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de Ética en Investigación para decidir la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:

En caso de que usted tenga cualquier duda respecto al estudio, por favor póngase en contacto con el Dr. Juan Manuel Mejía Vilet en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 Ext. 4142).

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Arturo Galindo Fraga, teléfono 54870900 Ext. 6101).

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas de orina y en su caso el tejido sobrante de biopsia renal para ser utilizadas en este estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas:

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido el formato de consentimiento informado, en su lengua materna?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Declaración del paciente: Yo,

_____ declaro que es mi decisión participar como sujeto de investigación clínica en el estudio. Mi participación es voluntaria. Se me ha informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica ni en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en este estudio. También puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si así los solicito. Si tengo preguntas sobre el estudio, puedo ponerme en contacto con el Dr. Juan Manuel Mejía Vilet , tel. 54870900 ext. 4142.

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Tengo claro que en caso de tener preguntas sobre mis derechos como sujeto de investigación clínica en este estudio, problemas, preocupaciones o dudas, y deseo obtener información adicional, o bien, hacer comentarios sobre el desarrollo del estudio, tengo la libertad de hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Arturo Galindo Fraga, tel: 54870900 ext. 6101).

Nombre del / de la Participante Firma del / de la Participante Fecha

Coloque la huella digital del participante sobre esta línea si no sabe escribir

Nombre del representante (si aplica) Firma del representante legal Fecha

Nombre del Investigador Firma del Investigador Fecha

Nombre del Testigo 1 Firma del Testigo 1 Fecha

Dirección:

Nombre del Testigo 2 Firma del Testigo 2 Fecha

Dirección:

Lugar y Fecha:

(El presente documento es original y consta de 7 páginas)