



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

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

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

DR. JUAN MANUEL MEJÍA VILET

TUTOR

DR. LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. NORMA A. BOBADILLA SANDOVAL

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. JORGE ROJAS SERRANO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

DR. JOSE CARLOS CRISPÍN ACUÑA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, Diciembre de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



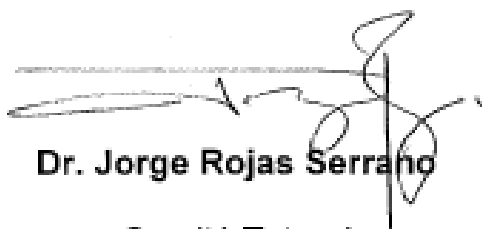
Dr. Luis Eduardo Morales Buenrostro

Tutor del alumno



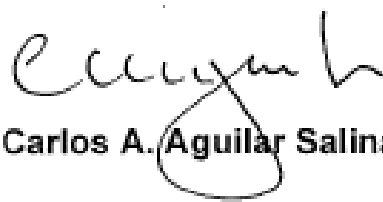
Dra. Norma Bobadilla Sandoval

Comité Tutorial



Dr. Jorge Rojas Serrano

Comité Tutorial



Dr. Carlos A. Aguilar Salinas

Responsable de la Entidad Académica

ÍNDICE DEL CONTENIDO

1.	RESUMEN DEL PROYECTO	4
1.1.	Antecedentes y objetivo del estudio	4
1.2.	Material y Métodos	5
1.3.	Resultados	6
1.4.	Conclusiones	9
1.5.	Perspectivas	9
2.	ESPECIFICACIONES DEL PROTOCOLO	10
3.	ANTECEDENTES	11
4.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	19
5.	HIPÓTESIS	20
6.	OBJETIVOS	21
7.	METODOLOGÍA	22
7.1.	Diseño general	22
7.2.	Descripción de las maniobras e intervenciones	25
7.3.	Seguimiento	28
7.4.	Tamaño de muestras	29
7.5.	Descripción de las técnicas de laboratorio	29
7.6.	Criterios para el retiro prematuro de participantes	29
7.7.	Procedimientos para el retiro de participantes	29
7.8.	Criterios de selección	30
7.9.	Desenlaces y variables	31
7.10.	Análisis estadístico	32
7.11.	Potencial de reclutamiento	34
7.12.	Riesgos potenciales	35
8.	PLAN INICIAL DE ACTIVIDADES	36
9.	RESULTADOS	37
9-I	CD163 soluble urinario	37
9-I.A.	Resumen del estudio de CD163 urinario	37
9-I.B.	Breve introducción específica del marcador	38
9-I.C.	Breves precisiones metodológicas del estudio del marcador	39
9-I.D.	Resultados del estudio del marcador CD163 urinario	42
9-I.E.	Discusión de los resultados del marcador CD163 urinario	62

9-II.	EGF urinario: biomarcador de daño crónico en nefritis lúpica	65
9-II.A.	Resumen del estudio de EGF	65
9-II.B.	Introducción al biomarcador EGF	66
9-II.C.	Breves precisiones metodológicas del estudio de EGF	66
9-II.D.	Resultados del estudio del biomarcador EGF	68
9-II.E.	Discusión de los resultados del biomarcador EGF	77
9-III.	Estudio de biomarcadores de activación de la vía del complemento	80
9-III.A.	Resumen del estudio de activación de vías del complemento	80
9-III.B.	Breve introducción del estudio de activación de vías del complemento	81
9-III.C.	Precisiones metodológicas del estudio	82
9-III.D.	Resultados del estudio de las vías de activación del complemento	86
9-III.E.	Discusión de los hallazgos del estudio	101
9-IV	Otros biomarcadores descartados por su baja utilidad diagnóstica	104
10	CONCLUSIONES	105
11	REFERENCIAS	106

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

1. RESUMEN DEL PROYECTO

1.1. Antecedentes y objetivo del estudio (resumen)

La nefropatía lúpica afecta a más del 50% de los pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG). Aproximadamente 20% de estos pacientes progresarán a enfermedad renal crónica terminal dentro de los primeros 5 años del diagnóstico de acuerdo a estadísticas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ). Dichos pacientes tienen una mortalidad hasta 63 veces mayor que individuos de la población general de la misma edad y sexo.

El pronóstico de este padecimiento no se ha modificado en las últimas décadas, a pesar de los avances en el desarrollo de múltiples fármacos biológicos, con resultados predominantemente negativos en los ensayos clínicos controlados. Una de las hipótesis para explicar dichos resultados negativos radica en el involucro de múltiples vías inflamatorias en la fisiopatogenia de la enfermedad, con participación heterogénea entre pacientes y en diversos momentos de la evolución y el tratamiento.

La búsqueda de biomarcadores se ha enfocado clásicamente en una molécula diferencialmente expresada entre pacientes con actividad de la enfermedad y pacientes inactivos, independientemente de su papel fisiopatogénico y la evolución de la enfermedad. Adicionalmente, la mayor parte de la investigación de biomarcadores se ha enfocado en marcadores circulantes, que pueden ser poco específicos para la inflamación de órganos particulares como los riñones.

En un estudio previo realizado en colaboración con la Universidad Estatal de Ohio, obtuvimos el perfil transcriptómico de pacientes mexicanos con nefropatía lúpica activa. En dicho estudio se observó que algunos de los genes expresados en el tejido renal difieren de aquellos expresados en suero. Se destaca la expresión de genes pertenecientes a vías inflamatorias mediadas por células dendríticas plasmacitoides, células mononucleares, interferón alfa y las vías del complemento.

El objetivo de este estudio es identificar proteínas con potencial uso como biomarcadores de actividad y cronicidad de la enfermedad en la orina de pacientes con nefropatía lúpica. La selección de potenciales candidatos se realizó a partir del estudio transcriptómico previo.

1.2. Material y Métodos (resumen)

En sí este proyecto representa un conjunto de diversos estudios, uno por cada biomarcador analizado.

En general, el estudio de todos los biomarcadores se dividió en una fase transversal para valoración de la potencial detección del biomarcador y su comportamiento en pacientes pre-definidos con actividad renal de lupus y en grupos controles sin actividad renal. Aquellos biomarcadores con resultados prometedores en la fase transversal fueron posteriormente evaluados longitudinalmente para su potencial uso en la clínica. En biomarcadores con resultados prometedores, el estudio se extendió a pacientes con las mismas características, reclutados en la Universidad Estatal de Ohio, centro con el cual se tiene una colaboración activa.

Para la fase transversal se reclutaron 120 pacientes con diagnóstico de nefropatía lúpica diagnosticada mediante biopsia renal percutánea entre enero de 2016 y enero de 2018. Como controles enfermos se incluyeron 70 pacientes con lupus eritematoso sin evidencia de actividad renal y adicionalmente se incluyeron 20 donadores sanos. Se colectaron muestras de plasma y orina que se congelaron a -70°C .

Para la fase longitudinal se siguió a 80 de los 120 pacientes durante 12 meses, colectando muestras de plasma y orina a los meses 3, 6 y 12 del diagnóstico por biopsia renal. Se colectaron prospectivamente los datos demográficos, clínicos, de tratamiento así como su evolución.

Se evaluaron al momento como potenciales marcadores de actividad proteínas relacionadas con células mieloides (sCD163, sCD11b, MCP-1), proteínas y productos de activación de las vías del complemento (factor H, C4a, C4d, Ba, C3a, C5a, sC5bC9). Como potenciales marcadores de daño renal se evaluaron las proteínas EGF y MME.

Aunque en cada marcador se utilizaron diversos análisis, en general, para todos ellos se utilizó estadística descriptiva, comparaciones entre grupos mediante pruebas no paramétricas y evaluación del curso longitudinal de biomarcadores mediante modelos lineales mixtos.

1.3. Resultados (resumen)

1.3.1. Marcador sCD163 urinario

La proteína sCD163 deriva de la fragmentación del receptor CD163 de los macrófagos M2c que infiltran el tejido renal en nefropatía lúpica y puede ser identificada en orina. Para el estudio de este marcador se evaluaron dos cohortes, una en México y una en la Universidad Estatal de Ohio.

Los niveles de uCD163 se encontraron más elevados en pacientes mexicanos (1805ng/mmol, RIC 760-4334) y estadounidenses (1358ng/mmol, 811-2356) con nefropatía lúpica activa en comparación con pacientes con lupus sin nefropatía (10ng/mmol, 0-40, $p < 0.001$) y otras enfermedades glomerulares. Los niveles de uCD163 correlacionaron con la gravedad clínica de la nefropatía, clase histopatológica y el índice histológico de actividad. Los niveles de uCD163 aumentaron desde 6 meses previos al episodio de nefropatía y posteriormente disminuyeron progresivamente con el tratamiento inmunosupresor en pacientes con respuesta parcial y completa, mientras que se mantuvieron elevados en pacientes no respondedores. Un valor de $uCD163 < 370$ ng/mmol a los 6 meses predijo el desarrollo de una respuesta completa con sensibilidad de 88% y especificidad de 88%. Un valor de uCD163 menor o mayor de 370ng/mmol tuvo una concordancia perfecta ($\kappa=1$) con un índice de actividad histopatológica mayor o menor de 1 en biopsias repetidas al año de tratamiento. En conclusión, la proteína uCD163 refleja la actividad histopatológica de la nefropatía lúpica y varía en respuesta al tratamiento.

1.3.2. Marcador EGF urinario

El marcador EGF (factor de crecimiento epidérmico) es una proteína cuyo sitio de mayor expresión en el organismo son los túbulos renales. El estudio de este marcador surgió de un estudio paralelo en el cual, mediante un abordaje de Proteómica urinaria, se encontraron elevados sus niveles en pacientes controles sanos y disminuidos en pacientes con nefropatía lúpica. Por tanto, se estudió como un potencial marcador de función y reserva tubular renal.

La espectrometría de masas mostró niveles disminuidos de péptidos de pro-EGF en pacientes con nefritis lúpica activa en comparación con controles normales. El análisis de western blot corroboró la disminución de niveles de pro-EGF. Los niveles de la proteína EGF urinaria (uEGF) se encontró disminuida en pacientes con nefritis lúpica activa de las cohortes mexicana y estadounidense. Los niveles de uEGF correlacionaron con el porcentaje de esclerosis glomerular, fibrosis intersticial, atrofia tubular y el índice histológico de cronicidad. En el análisis de supervivencia, los niveles de uEGF se asociaron independientemente de otras variables al

desenlace de duplicación de creatinina o progresión a enfermedad renal terminal. En el seguimiento, los niveles de uEGF permanecieron significativamente reducidos en pacientes que progresaron al desenlace renal en comparación con pacientes que permanecieron con función renal estable. En conclusión, los niveles de uEGF son un marcador de función renal.

1.3.3. Marcadores de activación de la vía del complemento

Debido al elevado coste económico de su evaluación, el estudio de estos marcadores se orientó a evaluar su involucro tanto en pacientes con nefropatía lúpica activa como en pacientes lupus eritematoso y microangiopatía trombótica renal, un padecimiento que suele asociarse con activación del sistema del complemento.

Se reclutaron prospectivamente 19 pacientes con Microangiopatía trombótica renal aguda y se parearon por índice de actividad histológica con 19 pacientes con nefropatía lúpica activa. Como controles se incluyeron 5 pacientes con hallazgos de Microangiopatía trombótica renal crónica, 16 pacientes con lupus sin nefropatía y 10 donadores renales.

Los niveles circulantes de proteínas C3, C4, C4a, C4d y factor H disminuyeron, mientras que los niveles de Ba y C5bC9 aumentaron en pacientes con MAT y con nefropatía activa en comparación con los controles. Los niveles urinarios de C5a, Ba y C5bC9 se elevaron más en pacientes con MAT en comparación con pacientes con nefropatía lúpica activa sugiriendo mayor activación de la vía alternativa del complemento. Los niveles de fragmentos urinarios del complemento correlacionaron con el grado de inflamación intersticial, fibrosis intersticial y atrofia tubular en la biopsia. Tras el tratamiento, los niveles de C3, C4 y factor H aumentaron; mientras que los de C5bC9 urinario disminuyeron. En dos pacientes con episodios repetidos de MAT, los niveles de factor H y fragmentos urinarios C5a, Ba y C5bC9 variaron de acuerdo al brote activo o el momento de inactividad de la enfermedad.

En conclusión, la nefritis lúpica activa está asociada con activación tanto de la vía clásica como alternativa del complemento. El desarrollo de MAT concomitante es probablemente mediado por activación de la vía alternativa del complemento.

1.3.4. Otros marcadores urinarios

Marcador CD11b

La proteína CD11b/Mac-1 es una integrina involucrada en la fagocitosis de partículas revestidas de complemento por las células mieloides. Este marcador se estudió en conjunto con un grupo japonés de la Universidad de Nagoya.

Los niveles de uCD11b al momento del brote de actividad de la nefritis lúpica fueron 33.4pg/mg (RIC 11.8-67.2) en comparación con 0.0 (RIC 0.0-1.1) en pacientes del grupo control. Los niveles de uCD11b no fueron distintos entre las diversas clases histopatológicas. Se observó correlación con el índice de actividad ($r=0.289$) y algunos de sus componentes (hipercelularidad endocapilar, leucostasis, semilunas celulares). Tras el tratamiento, los niveles de uCD11b disminuyeron en los grupos con remisión parcial y completa, permaneciendo significativamente menores que en el grupo sin respuesta al tratamiento. En 14 pacientes con biopsia repetida, la concordancia entre un valor de uCD11b menor o mayor de 12pg/mg y un índice de actividad histológica mayor o menor de 1, tuvo un kappa de 0.851. En el seguimiento, el grupo de pacientes que progresaron al desenlace de duplicación de creatinina mantuvieron niveles elevados de uCD11b, mientras que aquellos con función renal estable, disminuyeron progresivamente sus niveles de uCD11b.

En conclusión, los niveles de uCD11b correlacionan con hallazgos de actividad en la biopsia de pacientes con nefritis lúpica. Importantemente, la persistencia de niveles elevados de uCD11b tras el tratamiento está asociado con desenlaces renales adversos.

Marcador MCP-1

La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) es una citosina quimio atrayente de macrófagos al tejido renal que ha sido previamente estudiada como potencial marcador.

Los niveles de MCP-1 al momento del brote de actividad fueron significativamente mayores en pacientes con nefritis lúpica activa que en pacientes con lupus sin nefropatía (698pg/mg, RIC 285-1889 Vs. 136pg/mg, RIC 63-237). Los niveles de MCP-1 correlacionaron con cada uno de los ítems histológicos de cronicidad (esclerosis glomerular, fibrosis intersticial, atrofia tubular). Los niveles de MCP-1 se mantuvieron elevados en pacientes que progresaron a pobres desenlaces

renales (duplicación de creatinina, desarrollo de enfermedad renal terminal) en comparación con pacientes con función renal estable.

En conclusión, la persistencia de niveles urinarios elevados de MCP-1 tras el tratamiento de la nefritis lúpica se asocia con desenlaces renales adversos.

1.3.5. Conclusiones generales del estudio

Se han logrado identificar proteínas con potencial uso como marcadores de actividad renal (CD163 urinario) y proteínas con potencial uso como marcadores de daño renal (EGF urinario). Adicionalmente se han identificado otros marcadores (MCP-1 y uCD11b) cuya evolución puede aportar información pronóstica.

Si bien los marcadores de activación del complemento no pudieron estudiarse longitudinalmente, la activación de esta vía parece estar involucrada en la patogénesis de la nefropatía lúpica e importantemente, la activación de la vía alternativa media el desarrollo de microangiopatía trombótica.

1.3.6. Perspectivas

A pesar de la publicación de múltiples estudios de biomarcadores en nefritis lúpica en los últimos años, ninguno ha logrado alcanzar utilidad clínica. Los hallazgos de este estudio deberán continuar con una fase de evaluación en la cual se demuestre su utilidad para la toma de decisiones clínicas. Se plantea la realización de un ensayo clínico aleatorizado en el cual, la decisiones terapéuticas puedan basarse en la persistencia o desaparición de los niveles urinarios de CD163. Igualmente, se buscará un estudio para comparar el desempeño de los niveles urinarios de EGF con el estándar diagnóstico de función renal.

2. ESPECIFICACIONES DEL ESTUDIO

Título del Proyecto
Búsqueda de biomarcadores urinarios diferenciadores de vías inflamatorias activas en pacientes con nefropatía lúpica.
Registro ante los Comités de Ética e Investigación locales
NMM-2217-17/19-1.
Referencia de aprobación: 2217
Tipo de Investigación
Clínica
Instituciones participantes
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Universidad Estatal de Ohio – Wexner Medical Center
Financiamiento
Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSSIS) 2017-2 289663. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

3. ANTECEDENTES

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad multisistémica que afecta a 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. Tras la introducción de los esteroides y posteriormente de la ciclofosfamida la supervivencia a 5 años aumentó hasta 45% y 80% respectivamente⁴. Desafortunadamente, en la última década el tratamiento de la nefropatía lúpica se ha estancado, progresando aún un 10 a 20% de los pacientes a etapas terminales de enfermedad renal⁵. En México, el seguimiento de la cohorte de pacientes con nefropatía lúpica (aproximadamente 600 pacientes) en los últimos años 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. Sin embargo, 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 criterios clínicos heterogéneos de respuesta y c) la posibilidad de que las moléculas “blanco” de los diversos fármacos participen en distintas fases en la fisiopatogenia de la nefropatía lúpica. En respaldo a este último, por ejemplo, en el ensayo clínico de sirukumab (anticuerpo dirigido contra interleucina-6) se encontró que no todos los pacientes tratados con el fármaco tenían niveles elevados de interleucina-6 (su blanco) en sangre, por tanto, la inhibición de esta molécula pudo

no generar efecto en 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 este subgrupo de pacientes⁷.

La fisiopatogenia 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 activando vías proinflamatorias. En la fase inicial, recientemente se ha demostrado un papel predominante de la inmunidad innata mediante el reconocimiento de complejos inmunes por las células dendríticas plasmacitoides (pDC), que a su vez activan y reclutan a neutrófilos y macrófagos¹⁵. La activación de pDC se lleva a cabo a través de los receptores tipo Toll-like, especialmente TLR7 y TLR9, que a su vez reclutan un complejo proteico conocido como Mydosoma^{16,17}, este complejo estimula a diversos factores de transcripción (por ejemplo, IRF7) que aumentan la producción de interferón alfa (IFN α). El interferón liberado promueve la activación de células T y células B, generando células B autoreactivas e incrementando la producción de linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 de memoria¹⁸.

Todos estos eventos ocurren sistémicamente pero también de forma local en el tejido renal. Las biopsias renales de pacientes con nefropatía lúpica frecuentemente tienen agregados de linfocitos T y B, y ocasionalmente incluso centros germinales en el compartimento tubulointersticial¹⁹. En el tejido renal, el depósito de complejos inmunes activa 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 fisiopatogenia de la nefropatía lúpica como un proceso inflamatorio que ocurre progresivamente en un paciente con un nivel basal de autoinmunidad, acumulando inflamación hasta rebasar cierto umbral y desencadenar un nuevo episodio de actividad clínica. Siendo así, el efecto de los fármacos biológicos puede maximizarse al ser utilizados en la fase más apropiada de la enfermedad de acuerdo a su efecto biológico.

Actualmente, el único mecanismo potencial de 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 técnicas de expresión de mRNA (transcriptómicas) o proteínas (proteómicas).

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 han sugerido la presencia de mRNA involucrados en vías inflamatorias importantes: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas plasmacitoides, interferón alfa y vía del complemento²⁰.

A partir del análisis de este estudio, se seleccionaron diversas proteínas como candidatos a biomarcadores de actividad de acuerdo al nivel de cambio (“fold-change”) respecto a tejidos normales, significancia estadística, vía inflamatoria involucrada e importantemente, la posibilidad de encontrarse en forma soluble en líquidos biológicos. Los candidatos iniciales planeados y evaluados fueron los siguientes:

- | | |
|--|---|
| a) Marcadores inespecíficos de inflamación: | osteopontina (gene SPP1) |
| b) Marcadores de activación de macrófagos: | sCD163, MCP1 (CCL-2), CD11b |
| c) Marcador de activación de neutrófilos: | CXCL-1, CD11b |
| d) Marcador de reclutamiento de células B: | CD40LG |
| e) Marcadores de reclutamiento de células T: | IL18, CD44 |
| f) Marcadores de activación del complemento: | C4d (vía clásica/lectinas), Bb (vía alterna), sC5-C9 (vía terminal) |
| g) Marcadores de daño tubular: | NEP (gene MME), EGF |
| f) Marcador de fibrosis | FN1 |

Varios de estos mRNA han sido identificados en otros estudios tanto en sangre^{16,21} como en tejido renal²²⁻²⁴.

Osteopontina (OPN)

La osteopontina (OPN) es codificada por el gene SPP1. Es una glucoproteína secretada cuyo peso molecular varía entre 44-66kDa de acuerdo al grado de glucosilación²⁵. La OPN se expresa en osteoblastos, macrófagos, células T activas y células epiteliales tubulares distales. Esta proteína promueve la infiltración de macrófagos y células T a los sitios de inflamación ^{26,27}. La expresión de OPN en el epitelio tubular distal ha sido correlacionado con los niveles de creatinina sérica y el número de monocitos infiltrando el intersticio renal en diversas glomerulopatías incluyendo la nefropatía lúpica ²⁸. Los niveles séricos y urinarios de OPN han sido reportados elevados en pacientes con LEG ²⁹ y específicamente en pacientes con nefropatía lúpica ³⁰. Este último estudio incluyó únicamente 29 pacientes, la mayoría con niveles muy bajos de proteinuria sugiriendo una enfermedad poco activa.

De acuerdo al estudio de transcriptómica en tejido renal, la expresión del gen SPP1 (OPN) estuvo consistentemente elevado en glomérulos de pacientes con nefropatía lúpica proliferativa (clase 3/4, veces de cambio 7.90 Vs controles, $p < 0.001$), no así en glomérulos de nefropatía lúpica membranosa pura (clase V). Por tanto, esta proteína se planteó que podría funcionar como biomarcador de diagnóstico histopatológico (diferenciar entre NL proliferativa y membranosa) así como de respuesta al tratamiento.

CD163 soluble (sCD163)

CD163 es una proteína glucosilada de membrana expresada exclusivamente en monocitos y macrófagos que actúa como "*scavenger*" para los complejos de hemoglobina/haptoglobina ^{31,32}. La proteína se rompe para formar la forma soluble de CD163 (sCD163) en respuesta a estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido y su función es desconocida al momento ³³. Los niveles séricos de sCD163 han sido recientemente estudiados como biomarcador en enfermedades asociadas con activación excesiva de macrófagos como el síndrome hemofagocítico ³⁴. Dado que los macrófagos son la célula más importante que se encuentra en las semilunas glomerulares ³⁵ la molécula se ha estudiado en orina en pacientes con vasculitis sugiriendo un excelente potencial diagnóstico (área bajo la curva ROC 0.94) ³⁶.

En la nefropatía lúpica, el número de macrófagos infiltrantes se ha correlacionado con la severidad de la inflamación (índice de actividad). En un único estudio publicado a la fecha, esta proteína fue capaz de diferenciar nefropatía lúpica proliferativa con un área bajo la curva ROC de 0.825 en 74 pacientes estudiados ³⁷.

En el estudio de transcriptómica renal, la expresión del gen CD163 se incrementó en los glomérulos de pacientes con nefropatía lúpica proliferativa (FC 1.90, p=0.004) en comparación con los controles sanos. Esta proteína se planteó podría funcionar como biomarcador de clase histopatológica, en particular de la severidad de la nefropatía.

MCP-1 (CCL-2)

La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) o CCL-2 ha sido descrita en diversos modelos murinos de LEG, donde su delección o el bloqueo farmacológico disminuye el daño glomerular e intersticial ³⁸⁻⁴⁰. Los niveles urinarios de MCP1 han sido estudiados en nefropatía lúpica tanto en estudios transversales ⁴¹⁻⁴⁴ como longitudinales ⁴⁵. Los niveles urinarios de este marcador se elevaron antes de la nefropatía y permanecieron elevados en pacientes que no respondieron al tratamiento, sugiriendo persistencia de la actividad de la enfermedad ⁴⁵.

En nuestro estudio previo, la expresión génica de CCL2 se encontró incrementada tanto en glomérulo como en túbulo-intersticio en los casos de nefropatía lúpica proliferativa, no así en nefropatía membranosa pura. Esta proteína se planteó como un potencial marcador de actividad de la enfermedad aunque su evaluación longitudinal nunca fue reproducida.

CXCL-1

CXCL-1 es una citocina con propiedades quimiotácticas para los neutrófilos que actúa de forma autocrina. Esta proteína nunca ha sido evaluada en suero u orina de pacientes con nefropatía lúpica, sin embargo, en el estudio de transcriptómica renal, su expresión se incrementó consistentemente en glomérulo y túbulo-intersticio de todas las clases de nefropatía lúpica estudiadas en comparación con los controles sanos.

CD40LG

La molécula CD40 ligando (CD40LG) es una molécula de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF5) que funciona como citocina y estimula la proliferación de las células B en ausencia de coestimulación ante la presencia de IL-4 ⁴⁶. Así mismo, está involucrada en el "switch" de inmunoglobulinas. Esta molécula nunca ha sido estudiada como biomarcador en orina en pacientes con nefropatía lúpica, sin embargo, esta vía ha sido identificada en estudios de

epigenética y sus niveles se encuentran elevados en suero de pacientes con LEG ^{47,48} y sus niveles disminuyen posterior a la depleción farmacológica de células B ⁴⁹. Actualmente hay un ensayo clínico en progreso con una molécula inhibidora de CD40, el receptor de CD40LG (clinical trials NCT02770170).

En nuestro estudio previo, la expresión de esta molécula se encontró elevada en el tubulointersticio de todas las formas de nefropatía e interesantemente, solamente en los glomérulos de las nefropatías membranosas que, clínicamente son aquellas con respuesta a terapia con depletors de células B como rituximab ⁵⁰. Por tanto, esta molécula se planteó que potencialmente pudiera funcionar como biomarcador para diferenciar la actividad predominantemente en la membrana basal glomerular mediada por células B y, posiblemente, aquellos pacientes que se benefician de una terapia depletora de células B.

Interleucina 18

La interleucina 18 (IL18) es una citocina implicada en varias enfermedades autoinmunes por su papel en la liberación de interferón gamma. Sin embargo, en nefropatía lúpica, el IFNgamma no es uno de los principales mediadores aún y cuando los niveles de IL18 están consistentemente elevados en plasma de los pacientes. Los niveles de IL18 han sido estudiados en plasma y asociados con el pronóstico ^{51,52} de pacientes con LEG.

Esta citocina ha sido previamente evaluada en orina en nuestro departamento como parte de un estudio de lesión renal aguda. En el estudio transcriptómico, se encontraron elevados tanto en glomérulo como tubulointersticio de todas las clases de nefropatía lúpica evaluadas. Por tanto, se planteó que este biomarcador pudiera funcionar para evidenciar persistencia de la inflamación así como identificar pacientes que puedan responder mejor a terapias inhibidoras de células T.

CD44

La proteína CD44 es un receptor para ácido hialurónico que media la interacción entre células y la matriz extracelular, así como a moléculas como osteopontina ⁵³. Esta proteína ha sido poco mencionada en la literatura de lupus eritematoso generalizado, sin embargo, actúa también como receptor para LGALS9 facilitando la expresión de FOXP3 y el aumento de células T reguladoras ⁵⁴. En nuestro estudio previo, esta molécula se encontró elevada consistentemente

en glomérulo y tubulointersticio de nefropatía lúpica proliferativa. Se planteó que esta proteína podría funcionar como biomarcador de inflamación.

Vías del complemento

En fechas recientes, se ha identificado a las vías del complemento tanto de efector del daño como de mediadores de la inflamación ^{55,56}. A pesar del uso generalizado de las proteínas del complemento como biomarcador sérico de actividad de la enfermedad, pocos esfuerzos se han realizado para medir la actividad de estas vías en orina ⁵⁷.

Existen kits comerciales de ELISA para la medición de productos de algunas de las proteínas cuyo aumento indica activación de la vía clásica (C4d), de la vía alterna (Bb) o de la vía terminal del complemento (sC5-C9).

Las proteínas de la vía del complemento, especialmente de la vía terminal se encontraron altamente expresadas en glomérulo y tubulointersticio en las biopsias renales de pacientes con variantes proliferativas de nefropatía lúpica. Por tanto, se pensó que su actividad en orina podría ser un buen marcador de actividad.

NEP/MME

La proteína codificada por el gene MME es una metaloproteasa altamente expresada en el túbulo renal proximal ⁵⁸ y que incluso ha sido previamente estudiada como marcador de lesión renal aguda e incluso como potencial antígeno en casos de nefropatía membranosa ⁵⁹.

Esta proteína nunca ha sido estudiada en LEG o nefropatía lúpica, sin embargo, los reportes publicados de expresión génica en tejido renal a la fecha ^{23,24} y el estudio previo de transcriptómica han mostrado consistentemente una disminución en pacientes muy activos y aumento en pacientes con menor grado de actividad. Adicionalmente, hemos encontrado una correlación moderada a alta entre la expresión de MME con el índice de cronicidad. Por tanto, se planteó esta proteína es un potencial biomarcador tanto de actividad como de fibrosis.

Fibronectina (FN1)

Esta proteína ha sido estudiada como un marcador de daño renal, en estudios de inmunohistoquímica se ha encontrado una elevada expresión en glomérulos esclerosados⁶⁰. En nuestro estudio previo, la proteína se elevó en pacientes activos y se mantuvo elevada en aquellos con mayor grado de cronicidad en la segunda biopsia renal. Por tanto, se planteó que esta proteína podría funcionar como un biomarcador de cronicidad o fibrosis.

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 renal⁶¹. Sin embargo, la identificación de moléculas diferencialmente expresadas en diversas vías inflamatorias ofrece su potencial aplicación no sólo para diferenciar entre pacientes activos a nivel renal de aquellos inactivos, sino la identificación de cuáles vías inflamatorias se encuentre activas y por tanto, potencialmente también pudieran influenciar la decisión terapéutica. Dado que los biomarcadores en suero no han logrado reflejar el grado de inflamación renal^{62,63}, la búsqueda de biomarcadores en orina potencialmente reflejará más fielmente la inflamación renal.

4. Definición del problema

El pronóstico de la enfermedad renal asociada a lupus eritematoso generalizado no se ha modificado en las últimas décadas aún y cuando se han desarrollado múltiples fármacos con diversos blancos en vías inflamatorias potencialmente involucradas en la fisiopatogenia de la inflamación renal.

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.

Similarmente, la búsqueda de biomarcadores de la actividad se ha enfocado a diferenciar entre pacientes con inflamación activa de aquellos sin inflamación, sin encontrarse al momento un biomarcador aplicable a la práctica clínica.

Por tanto, la búsqueda de biomarcadores específicos de vías inflamatorias involucradas en la orina de pacientes con LEG y actividad renal potencialmente puede identificar vías fisiopatogénicas individualizadas y orientar las decisiones terapéuticas. Finalmente, esto pudiera mejorar el pronóstico renal y de sobrevida de los pacientes con nefropatía lúpica.

5. Hipótesis

Primaria

- sCD163 urinario tendrá una sensibilidad > 90% para diferenciar entre pacientes con nefropatía lúpica activa y nefropatía lúpica inactiva

Específicas

- Es posible identificar biomarcadores específicos de vías inflamatorias en la orina de pacientes con nefropatía lúpica activa.
- Existe una expresión diferencial en los niveles de fragmentos C3a, C4a, C5a, Ba, sC5-C9, factor H del complemento, osteopontina (OPN), sCD163, CD11b, NEP, EGF y FN1 entre pacientes con nefropatía lúpica activa, pacientes con antecedente de nefropatía lúpica actualmente inactivos, pacientes sin nefropatía lúpica y controles sanos.

6. Objetivos

Primario

- Identificar la presencia de las proteínas OPN, MCP1, sCD163, CD11b, CXCL1, IL-18, CD44, CD40LG, MME, EGF y FN1 en la orina de pacientes con nefropatía lúpica activa, pacientes con historia de nefropatía lúpica inactivos, pacientes con LEG sin nefropatía y controles sanos.
- Evaluar el rendimiento diagnóstico de cada una de las proteínas como biomarcador de actividad renal.

Secundarios

- Correlacionar cada una de las proteínas con los hallazgos histopatológicos de la biopsia renal percutánea
- Evaluar el rendimiento diagnóstico de las proteínas urinarias para diferenciar entre respondedores y no respondedores al tratamiento
- Evaluar la asociación de cada una de las proteínas urinarias con los desenlaces renales a mediano plazo

7. Metodología

7.1. Diseño General

Se trata de un estudio de evaluación transversal y longitudinal de prueba diagnóstica. En una fase exploratoria que no formará parte del estudio de prueba diagnóstica se determinarán las condiciones para realizar los ensayos de los diversos biomarcadores en orina.

El estudio transversal de prueba diagnóstica consistió de los siguientes grupos:

a) Pacientes con nefropatía lúpica activa definida por biopsia renal percutánea (120 pacientes)

Se invitó a participar a pacientes programados para biopsia renal percutánea por sospecha de actividad renal por el departamento de Nefrología. Las muestras de orina se obtuvieron previo a la realización del procedimiento. Posteriormente 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 historia de nefropatía lúpica activa previa y actualmente sin actividad definida por criterios clínicos (40 pacientes)

Se invitó a participar a pacientes diagnosticados previamente como nefropatía lúpica activa mediante biopsia renal percutánea, que habían sido tratados y habían demostrado una respuesta completa de acuerdo a las definiciones clínicas actuales (creatinina no mayor de 115% del valor basal, índice proteinuria/creatinuria menor de 0.5g/g y sedimento urinario inactivo). La muestra de orina se solicitó al acudir el paciente a sus citas de seguimiento.

c) Pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado sin actividad renal pero con actividad sistémica (30 pacientes)

Se invitó a participar a pacientes en seguimiento en la consulta externa quienes tienen diagnóstico de lupus eritematoso generalizado, con actividad sistémica de la enfermedad definida por un puntaje SLEDAI-2k mayor de 6, pero sin datos de actividad renal definida por criterios clínicos. La muestra de orina se solicitó al acudir el paciente a sus citas en la consulta externa.

d) Donadores sanos con riñones sanos corroborados en la biopsia cero realizada por protocolo en todo trasplante renal (10 pacientes)

Se invitó a participar a donadores renales previo al procedimiento de donación, ingresados a hospitalización del Instituto. Los donadores renales ingresan un día previo a la cirugía, momento en el cual se solicitó la muestra de orina de aceptar participar en el estudio. 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 previo a la implantación del injerto renal.

Los biomarcadores investigados incluyeron los siguientes, algunos aún se encuentran en diversas fases del estudio:

- | | |
|--|--|
| a) Marcadores inespecíficos de inflamación: | osteopontina (gene SPP1) |
| b) Marcadores de activación de macrófagos: | sCD163, MCP1 (CCL-2), CD11b |
| c) Marcador de activación de neutrófilos: | CXCL-1, CD11b |
| d) Marcador de reclutamiento de células B: | CD40LG |
| e) Marcadores de reclutamiento de células T: | IL18, CD44 |
| f) Marcadores de activación del complemento: | C3a, C4a, C5a, C4d, Ba, sC5bC9, factor H |
| g) Marcadores de daño tubular: | NEP (gene MME), EGF |
| f) Marcador de fibrosis | FN1 |

Aquellos marcadores con un buen desempeño diagnóstico para diferenciar entre los grupos predefinidos mencionados previamente, se evaluaron en una fase longitudinal. En esta segunda fase, un total de 82 pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica activa mediante biopsia renal percutánea y susceptibles de tratamiento inmunosupresor, se vigilaron trimestralmente con mediciones de creatinina sérica (y tasa de filtración glomerular estimada), proteinuria, estudios serológicos (anticuerpos contra DNA de doble cadena) y niveles de complemento. Así mismo, se colectaron muestras de plasma, suero y orina en los meses 3, 6 y 12 del seguimiento.

Se evaluó la potencial asociación entre los biomarcadores estudiados en esta fase y los siguientes desenlaces:

- Respuesta al tratamiento (remisión parcial y/o remisión completa)
- Pérdida del 30% de la tasa de filtración glomerular
- Duplicación de creatinina sérica
- Progresión a enfermedad renal crónica terminal

Definiciones de desenlaces

Se utilizaron las siguientes definiciones:

Respuesta completa:

- Función renal estable ($\pm 10\%$ del valor de la tasa de filtración glomerular inicial) y proteinuria de 24 horas menor de 0.500g/g de creatinina

Respuesta parcial

- Función renal estable ($\pm 10\%$ del valor de la tasa de filtración glomerular inicial) y reducción en la proteinuria de 24 horas en un 50% hasta alcanzar niveles subnefróticos ($< 3.5\text{g}/24\text{h}$)

Pérdida del 30% de la tasa de filtración glomerular inicial

- Pérdida de al menos 30% de la tasa de filtración glomerular estimada a la presentación

Duplicación de creatinina

- Duplicación del valor inicial de creatinina sérica a la presentación

Enfermedad renal crónica terminal (ERCT)

- Requerimiento de terapia de reemplazo renal permanente (por 3 meses consecutivos) o trasplante renal

7.2. Descripción de las maniobras e intervenciones

Se trató de un estudio exploratorio 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 potenciales biomarcadores que fueron medidos exitosamente en orina, se evaluaron formalmente en el estudio de prueba diagnóstica.

A continuación se describen las metodologías realizadas para la medición de cada potencial biomarcador. Previo a la realización de los ensayos, todas las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 2000xg, colectándose el sobrenadante para los ensayos:

a) Osteopontina (OPN)

Es una glucoproteína secretada involucrada en mecanismos inflamatorios y cuyo gene se encuentra sobre expresado en nefropatía lúpica proliferativa. Para su medición se utilizó un kit de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) de R&D Systems (Human Osteopontin DuoSet ELISA, Minneapolis, MN [DY1433]) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

b) CD163 soluble (sCD163)

Se trata de una proteína glucosilada que tras liberarse puede encontrarse de forma soluble en la orina. Para su identificación se utilizó un kit comercial de ELISA de R&D Systems (Human CD163 DuoSet ELISA, Minneapolis, MN [DY1607]) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En estudios previos se ha utilizado una dilución de entre 4 y 10 veces de las muestras y el ensayo se mantiene estable hasta con 6 ciclos de congelación-descongelación de las muestras.

c) MCP-1 (CCL2)

Se trata de una citocina inflamatoria previamente estudiada en orina. Para su identificación se utilizó el kit comercial de ELISA de R&D Systems Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA (Minneapolis, MN, DY 279), el cual ha sido previamente valorado para uso en orina.

d) CXCL-1

Esta citocina nunca ha sido evaluada en plasma u orina de pacientes con nefropatía lúpica. Por tanto, se evaluó en primer lugar su presencia en orina. Se utilizó el set de ELISA de R&D Systems Human CXCL1/GRO alpha DuoSet ELISA (Minneapolis, MN, DY275).

e) CD40LG

Esta proteína no había sido evaluada en orina en pacientes con nefropatía lúpica. Se utilizó para su detección el kit de ELISA de R&D Systems Human CD40 Ligand/TNFSF5 DuoSet ELISA (Minneapolis, MN, DY617).

f) Interleucina 18

La interleucina 18 (IL-18) es un modulador de la actividad de las células NK y los linfocitos T colaboradores producido por las células dendríticas plasmáticas. Este marcador ha sido evaluado ampliamente en estudios de lesión renal aguda, incluyendo un estudio previo de nuestro departamento⁶⁴. Se midió en orina mediante un kit comercial de ELISA (Invitrogen/ThermoFisher, KHC0181, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del productor.

g) CD44

Se implementó el kit de R&D Biosystems Human CD44s DuoSet ELISA (Minneapolis, MN, DY7045), siguiendo las instrucciones del fabricante.

h) Neprilisina (MME/NEP)

También conocida como neprilisina, se utilizó para su medición el kit de R&D Systems Human Neprilysin DuoSet ELISA (Minneapolis, MN, DY1182) siguiendo las instrucciones del fabricante.

i) Fibronectina 1 (FN1)

Esta molécula se midió mediante el kit de ELISA de R&D Human Fibronectin DuoSet ELISA (Minneapolis, MN, DY1918) siguiendo el instructivo del fabricante.

j) Proteínas C3a, C4a, C4d, C5a, Ba, sC5-C9 y factor H

Se utilizaron los kits de ELISA comerciales de la empresa Quidel MicroVue C3a EIA, C4a EIA, C4d EIA, C5a EIA, Quidel MicroVue Ba EIA y Quidel MicroVue sC5b-9 plus EIA y factor H de R&D systems.

Para aquellos biomarcadores que se midieron por primera vez en orina y cuyas condiciones requirieron de ajuste, se utilizaron muestras de pacientes con nefropatía lúpica almacenadas en estudios previos, así como muestras de orina de los investigadores del estudio. Esta fase exploratoria no constituyó una parte del estudio de prueba diagnóstica sino simplemente es una fase exploratoria de factibilidad de medición. Los resultados de esta fase únicamente sirvieron para ajustar las condiciones de los ensayos y NO se incluyeron en el análisis de prueba diagnóstica.

Para el ensayo de prueba diagnóstica, se incluyeron muestras biológicas provenientes de los 4 grupos de pacientes previamente mencionados: pacientes con nefropatía lúpica activa diagnosticados mediante biopsia renal percutánea, pacientes con historia de nefropatía lúpica diagnosticada mediante biopsia renal percutánea y actualmente inactivos, pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado sin nefropatía lúpica, y donadores renales sanos.

7.3. Seguimiento

El estudio involucró una fase de desarrollo en la cual se ajustaron los protocolos para cada una de las pruebas y se exploró la detección en orina. La segunda fase involucró la medición en la cohorte completa de pacientes.

Para los pacientes incluidos en la fase transversal se realizó únicamente una sola visita, en la cual se realizó la toma de muestras biológicas. Para el grupo de pacientes con nefropatía lúpica, dicha visita coincidió con la semana en la cual el paciente había sido programado para biopsia renal percutánea por sus médicos tratantes. Para el grupo de controles donadores sanos, la visita coincidió con los días previos a la donación renal.

No se requirió de seguimiento por parte de la fase transversal del protocolo para los sujetos de estudio ni se realizaron modificaciones al tratamiento de los pacientes.

Para la fase longitudinal del protocolo se incluyeron pacientes con nefritis lúpica activa que recibieron tratamiento inmunosupresor. Habitualmente, estos pacientes se citan mensualmente con estudios de laboratorio durante los primeros 6 meses y posteriormente cada 2 a 3 meses del mes 6 al 12. Se contactó a los pacientes el día de su cita programada en los meses 3, 6 y 12, momento en los cuales se tomaron las muestras biológicas. Así mismo, se recabaron los resultados de laboratorio correspondientes a la visita médica realizada en cada uno de esos meses.

Dado que se esperaba que el reclutamiento se llevara a cabo durante varios meses, si bien todos los pacientes tendrán como mínimo 12 meses de seguimiento, se recabaron del expediente clínico los desenlaces renales alcanzados hasta la última visita, anotando las fechas específicas del desenlace o de su última valoración para realizar análisis de supervivencia.

7.4. Tamaño de la muestra

El cálculo de tamaño de la muestra se realizó en base a la fórmula para comparar una sensibilidad/especificidad predefinida contra un valor pre-especificado. Se consideraron para ello un nivel de alfa de 5%, beta de 20%, precisión del 10% y una sensibilidad esperada del 90%.

$$n = \frac{\left[z_{\alpha/2} \sqrt{V_0(\hat{\theta}_1)} + z_{\beta} \sqrt{V_A(\hat{\theta}_1)} \right]^2}{(\theta_0 - \theta_1)^2}$$

Con ello se obtuvo un estimado de 35 pacientes que, con un cálculo de 15% de pérdidas se redondeó a 40 pacientes.

Después del desarrollo del protocolo se lograron reclutar 120 pacientes en el grupo de nefritis lúpica activa y 70 pacientes en el grupo de lupus sin nefritis. Con ello, la precisión final del estudio para evaluar la sensibilidad del 90% fue finalmente de 7%.

7.5. Descripción de las técnicas a emplear

Las técnicas empleadas se desarrollaron en el punto 7.2. Mayormente se utilizaron kits comerciales de ensayos por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.6. Criterios para el retiro prematuro de los participantes

Cualquier participante podía retirar su consentimiento informado tras lo cual se dispondría adecuadamente de su muestra biológica y no se realizarían estudios adicionales.

7.7. Procedimientos para el retiro de algún participante del estudio

Dado que en el grupo de pacientes con nefropatía lúpica se tomó la muestra de orina previo a la toma de biopsia renal percutánea, en caso que se reportase una nefropatía distinta a LEG o nefropatía lúpica no activa, el paciente fue eliminado del estudio.

7.8. Criterios de selección

7.8.1. Criterios de inclusión para la fase transversal

Para todos los pacientes

- Hombre o mujer mayor de 18 años
- Diagnóstico de lupus eritematoso generalizado basado en los criterios de la ACR o SLICC
- Consentimiento informado firmado previo a la obtención de la muestra de orina

Grupo de pacientes con actividad renal

- Actividad renal diagnosticada mediante análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea definido por un índice de actividad mayor de 2 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 más de un bolo intravenoso de ciclofosfamida administrado en los últimos 6 meses.

Grupo de pacientes con historia de actividad renal y actualmente inactivos

- Actividad renal previa diagnosticada de acuerdo al punto anterior.
- Respuesta completa al tratamiento con función renal normal para la edad y sexo, proteinuria menor de 250mg/24 horas y sedimento urinario inactivo (menos de 5 eritrocitos/campo) evidenciado en 2 visitas consecutivas separadas al menos 3 meses y persistente por al menos 12 meses.

Grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado activo sistémico pero sin actividad renal

- Diagnóstico de lupus eritematoso generalizado como se especificó arriba y sin historia de actividad renal.
- Puntaje de SLEDAI-2k mayor de 6 puntos con al menos una afectación orgánica
- Función renal normal para la edad y sexo, proteinuria menor de 250mgs en 24 horas y sedimento urinario inactivo por al menos 12 meses

Grupo de donadores renales sanos

- Paciente programado para donación renal en las siguientes 4 semanas.
- Función renal normal para la edad y sexo, proteinuria menor de 250mg 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 como hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus.

7.8.2. Criterios de Exclusión para la fase transversal

- 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).

7.8.3. Criterios de Eliminación para la fase transversal

- 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

7.8.4. Criterios de selección para la fase longitudinal

- Del grupo seleccionado previamente con nefritis lúpica activa se debía de cumplir lo siguiente:
 - Firma de consentimiento informado de la fase de seguimiento
 - El paciente requiere iniciar o continuar tratamiento inmunosupresor de acuerdo a su médico tratante

7.9. Desenlaces y variables

Se colectaron las siguientes variables para cada paciente incluido:

1. Variables demográficas

- Fecha de nacimiento
- Sexo.

2. Variables clínicas basales

Se obtuvieron de los estudios realizados de forma rutinaria a los pacientes y que cumplieron con el criterio de obtención ± 2 semanas de la toma de muestra de orina.

- Presión arterial sistólica y diastólica (mmHg)
- 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: prednisona, mofetil micofenolato, azatioprina, ciclofosfamida, hidroxicloroquina

3. Variables obtenidas del análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea (grupo con nefropatía activa y grupo de donadores sanos)

- Número de glomérulos obtenidos (con la intención de valorar lo adecuado de la muestra)
- Fibrosis intersticial
- Atrofia tubular
- Índice de Actividad del NIH ⁶⁵
- Índice de Cronicidad del NIH ⁶⁵
- Clasificación de acuerdo a la ISN/RPS⁶⁶

4. 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-2k

5. Desenlaces renales (ver definiciones arriba)

- Respuesta al tratamiento (respuesta parcial / respuesta completa)
- Pérdida del 30% de la tasa de filtración glomerular
- Duplicación de creatinina
- Progresión a enfermedad renal crónica terminal

7.10. 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 utilizaron pruebas de ANOVA o Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni para el número de comparaciones.

Los valores obtenidos de los ensayos de ELISA se normalizaron 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 Dunnett 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 derivaron 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 la evaluación de muestras repetidas en los pacientes con nefritis lúpica activa se construyeron modelos lineales mixtos considerando los niveles de cada biomarcador como variable, dependiente, al paciente como efecto aleatorio, el curso clínico de la filtración glomerular y el grupo de respuesta al tratamiento como efectos fijos. Se evaluó la estructura de la varianza y la homogeneidad de los residuales y se seleccionó el mejor modelo mediante Chi-cuadrada para aquel con menor razón de verosimilitud. Se verificó cada modelo corroborando la distribución normal de los residuales.

Para la evaluación de asociaciones con desenlaces renales (respuesta renal, pérdida del 30% de la TFGe, duplicación de creatinina, enfermedad renal crónica terminal), adicionalmente se realizaron análisis de tiempo al evento.

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.

7.11. Potencial de reclutamiento

Se pretendía inicialmente reclutar un total de 120 pacientes para el estudio (40 pacientes por grupo). Se conocía que en el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán se realizan aproximadamente 80 biopsias percutáneas anuales en pacientes con nefropatía lúpica activa, 50 trasplantes de donador vivo relacionado y se atienden múltiples pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado en las consultas de seguimiento de nefrología y reumatología.

Para la fase longitudinal se planeaba incluir al menos 40 pacientes que cumplieren con al menos 12 meses de tratamiento y en quienes se hayan colectado muestras biológicas repetidas inicial, a los 3, 6 y 12 meses.

Como se ha mencionado, el reclutamiento final incluyó para la fase transversal un total de 120 pacientes con nefritis lúpica activa, 70 pacientes con lupus sin nefritis (40 con lupus inactivo y 30 con actividad sistémica no renal), y 10 donadores renales. Para la fase longitudinal se incluyeron 82 pacientes con muestras biológicas a los 3, 6 y 12 meses de seguimiento.

7.12. Riesgos potenciales

No se contemplaron riesgos específicos del protocolo, se consideró un estudio de riesgo mínimo.

Existieron riesgos asociados a la enfermedad de base que no son específicos del protocolo pero que fueron informados y evaluados en todos los pacientes. Estos riesgos incluyeron entre otros, infecciones de paciente inmunosuprimido, hospitalizaciones, eventos adversos de fármacos, progresión a enfermedad renal crónica terminal y muerte.

8. Plan Inicial de Actividades

Año	Mes	Actividad
2018	Marzo	Inicio del reclutamiento de pacientes y muestras biológicas
	Mayo -Diciembre	Pruebas de detección de biomarcadores en muestras biológicas Selección de biomarcadores blanco
2019	Julio-Diciembre	Fin del reclutamiento de pacientes y muestras biológicas
2020	Enero-Junio	Evaluación de biomarcadores urinarios
2020	Julio-Diciembre	Análisis Estadístico Preparación del manuscrito final

9. RESULTADOS

I. CD163 soluble urinario: un biomarcador no invasivo de actividad de nefritis lúpica

- *Publicado en Journal of the American Society of Nephrology*
- *Mejia-Vilet JM et al. Urinary soluble CD163: a novel noninvasive biomarker of activity for lupus nephritis. J Am Soc Nephrol 2020; 31(6):1335-1347*

A. RESUMEN

Introducción. La distinción clínica entre pacientes con nefritis lúpica con inflamación activa de aquellos con daño cicatricial crónico es compleja. Estudios previos han mostrado que la molécula CD163 soluble (sCD163), la cual deriva de la ruptura del receptor CD163 de los macrófagos M2c, correlaciona con la actividad de nefritis lúpica.

Métodos. Se midió CD163 en orina durante episodios de nefritis lúpica en pacientes de cohortes de México y los Estados Unidos tanto transversalmente como longitudinalmente. Además, se midieron niveles de CD163 en orina de manera seriada tras el tratamiento de los episodios y se evaluó la respuesta al tratamiento a los 12 meses. Se analizó la concordancia entre los niveles de CD163 urinario y la actividad histológica en 19 pacientes de la cohorte mexicana quienes fueron sometidos a una biopsia repetida durante el seguimiento.

Resultados. Los niveles de CD163 urinario fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con nefritis lúpica activa que en pacientes con lupus inactivo, lupus con actividad extra-renal pero no renal, así como en otras enfermedades glomerulares. Los niveles de CD163 urinario correlacionaron con la gravedad clínica, clase histopatológica y el índice histológico de actividad. Los niveles de CD163 urinario aumentaron durante el episodio de actividad renal respecto a los niveles documentados 6 meses antes, y posteriormente disminuyeron en pacientes con respuesta parcial o completa, manteniéndose elevados en los pacientes no respondedores. Un nivel de CD163 <370ng/mmol a los 6 meses predijo una respuesta completa a los 12 meses con >87% sensibilidad y >87% especificidad. Los niveles urinarios <370 o >370ng/mmol concordaron perfectamente ($\kappa=1.0$) con un índice de actividad histológica ≤ 1 o >1 en biopsias repetidas, respectivamente. La medición de CD163 en pacientes con proteinuria persistente a los 6 meses de tratamiento, mejoró la predicción de quiénes alcanzarán respuesta completa a los 12 meses.

Conclusiones. Los niveles de CD163 urinario reflejan la actividad histológica de la nefritis lúpica y son un biomarcador promisorio que varía con la actividad y el tratamiento de la nefritis lúpica.

B. BREVE INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA DEL MARCADOR CD163

La molécula CD163 es una proteína transmembrana de 130-kDa, miembro de la superfamilia de receptores “scavenger” de tipo B ricos en cisteína³². Este receptor se expresa principalmente en macrófagos diferenciados al fenotipo M2c que infiltran los tejidos durante la fase de curación de la inflamación^{67,68}. Las células CD163+ han sido encontradas en las semilunas celulares, lesiones glomerulares proliferativas, y lesiones tubulointersticiales agudas en pacientes con nefritis lúpica⁶⁹⁻⁷¹.

En un estudio que precedió a esta investigación, nuestro grupo encontró que la expresión génica de CD163 se encuentra incrementada en glomérulos de pacientes con nefritis lúpica activa en comparación con donadores renales sanos (Figura I-1)⁷². Esto fue posteriormente corroborado en otro estudio de transcriptómica de células individuales que mostró que los macrófagos M2c que infiltran el tejido renal representan la célula más numerosa aislada en orina en pacientes con nefritis lúpica⁷³.

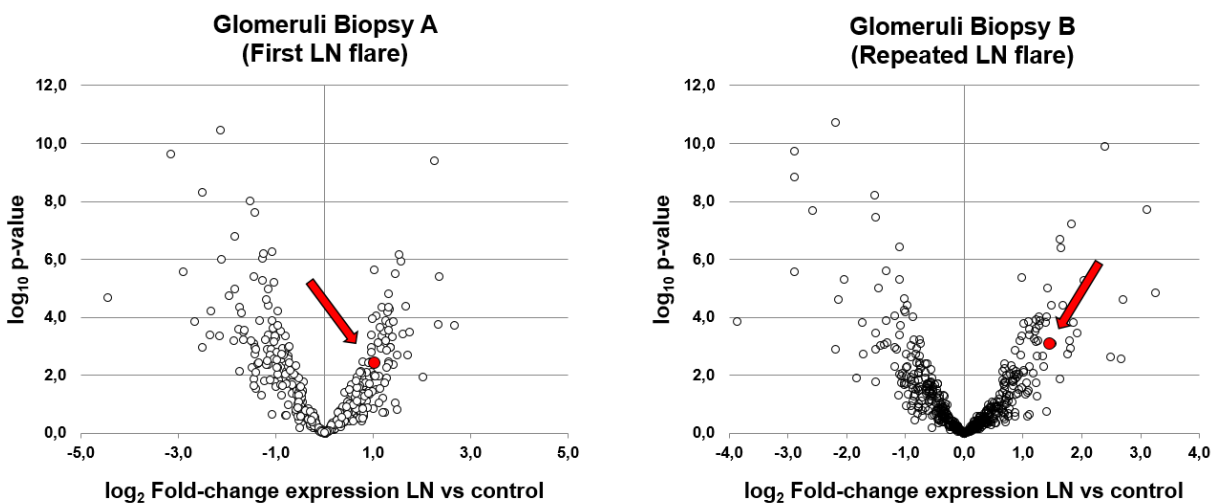


Figura I-1. Gráficos de volcán que muestran como la expresión génica de CD163 es mayor en glomérulos de pacientes con nefritis lúpica activa en comparación con controles sanos tanto durante un primer episodio de nefritis o en episodios repetidos de nefritis lúpica.

La molécula CD163 soluble deriva de la ruptura del receptor CD163 mediante metaloproteinasas. Tras la escisión, la molécula soluble se puede detectar en orina y ha sido aislada en enfermedades como vasculitis asociada a ANCA y nefritis lúpica^{37,74-77}. Un estudio previo en población japonesa reportó que los niveles urinarios de CD163 (uCD163) se incrementan en pacientes con nefritis lúpica activa así como el número de macrófagos CD163+ dentro del tejido renal, sugiriendo que uCD163 puede ser un biomarcador de inflamación en nefritis lúpica.

Esta parte de la investigación tuvo el objetivo de validar la correlación reportada de uCD163 con actividad histológica de la nefritis lúpica en cohortes multiétnicas, así como evaluar el rendimiento pronóstico de esta proteína para predecir respuesta al tratamiento en comparación con los biomarcadores clínicos y serológicos actuales.

C. BREVES PRECISIONES METODOLÓGICAS ESPECÍFICAS DEL ESTUDIO DE ESTE MARCADOR

Pacientes

El estudio consistió en una fase transversal y una longitudinal. La evaluación transversal se utilizó para validar el estudio japonés previo³⁷. Para la fase transversal se obtuvieron muestras de pacientes con nefritis lúpica activa mexicanos (n=120) y de la cohorte de la Universidad Estatal de Ohio (n=129) diagnosticados mediante biopsia renal. En ambos casos, se obtuvieron muestras de plasma y orina antes del procedimiento de biopsia renal, se procesaron y almacenaron a -70°C. Los datos clínicos se obtuvieron de los expedientes en el caso de pacientes estadounidenses y del registro prospectivo de la cohorte mexicana para los pacientes mexicanos.

Para la fase longitudinal se incluyeron 82 pacientes con NL activa de la cohorte mexicana que funcionaron como grupo de descubrimiento, y 49 episodios de NL activa registrados en 34 pacientes de la cohorte del estudio Ohio SLE Study⁴⁵ como grupo de validación. En ambos grupos se colectaron muestras biológicas previas a la biopsia diagnóstica y en los meses posteriores al tratamiento. Finalmente, 19 de los 82 pacientes quienes contaban con una biopsia de seguimiento fueron incluidos para evaluar la concordancia entre el biomarcador y los hallazgos histopatológicos.

Como controles se incluyeron muestras biológicas de donadores renales sanos (n=31), pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) con actividad extra-renal pero no renal (n=30) y

pacientes con nefritis lúpica previa pero inactivos y en remisión por al menos 12 meses al momento del estudio (n=40). Adicionalmente se incluyeron muestras biológicas de otras enfermedades glomerulares incluyendo nefropatía membranosa por APLA2R (n=13), glomeruloesclerosis focal y segmentaria (n=13), vasculitis por ANCA (n=22) y nefropatía por IgA (n=27).

Histología Renal

Las biopsias renales fueron analizadas por nefropatólogos expertos y clasificadas de acuerdo a la clasificación de la Sociedad Internacional de Nefrología (ISN) y la Sociedad de Patología Renal (RPS)⁷⁸. Los índices de actividad y cronicidad fueron evaluados de acuerdo a la descripción de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y su reciente revisión^{65,79}. Cada ítem de los índices se evaluó como : 0= no presente o presente en <5% de glomérulos, 1+= presente en 6-25% de glomérulos, 2+= presente en 26-50% de glomérulos, o 3+= presente en >50% de glomérulos. La interpretación de todas las biopsias renales se realizó previo a la disponibilidad de los resultados de uCD163.

Definiciones

Los pacientes con NL activa se definieron como sujetos que cumplieron al menos 4 criterios de la Sociedad Americana de Reumatología (ACR), con deterioro de la función renal o proteinuria >0.5g/g debida a lupus, y biopsia renal percutánea demostrando depósito de complejos inmunes.

Los pacientes controles sin actividad renal se definieron como sujetos que cumplieron al menos 4 criterios de la ACR, con función renal normal, sedimento urinario inactivo, y proteinuria de 24 horas menor de 250mgs. Todos estos criterios mantenidos por 12 meses consecutivos antes del estudio. Dentro de estos controles, el grupo con actividad sistémica debió cumplir con un puntaje SLEDAI-2K mayor de 6 puntos, con 4 puntos adjudicados a manifestaciones sistémicas.

La respuesta al tratamiento completa se definió como una función renal estable (dentro del 15% de la basal), con una razón proteinuria/creatinuria <0.5g/g obtenida mediante recolección de orina de 24 horas. La respuesta parcial se definió como una función renal estable, más reducción del 50% de la proteinuria hasta rangos subnefróticos. Se consideraron como no respondedores a los pacientes que no cumplieron ninguna de las dos definiciones mencionadas arriba. La respuesta histológica se definió como un índice de actividad ≤ 1 en la biopsia repetida.

Medición de CD163 en plasma y orina

Los niveles de CD163 en plasma y orina se midieron mediante un kit de ELISA comercial (DuoSet DY1607, R&D systems, Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras biológicas se corrieron por duplicado con coeficientes de variación intra-placa e inter-placa menores del 10%. Los niveles de CD163 obtenidos en muestras urinarias se normalizaron a la concentración de creatinina urinaria y se expresaron en ng/mmol de creatinina.

Análisis Estadístico

La distribución de las variables se evaluó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los estadísticos descriptivos se expresan como frecuencias absolutas y relativas o media y rango intercuartilar. Las comparaciones entre grupos se realizaron con prueba de Kruskal-Wallis, Chi-cuadrada o prueba exacta de Fisher. Las correlaciones se valoraron mediante correlación de Spearman, y en algunos casos específicos, correlación de Pearson. Para evaluar los factores asociados al incremento del índice de actividad, se construyó un modelo de regresión lineal con las variables transformadas logarítmicamente.

Para el análisis longitudinal de muestras repetidas, se construyeron modelos lineales mixtos para evaluar la asociación entre uCD163 y la respuesta al tratamiento en cada cohorte. El modelo incluyó los niveles \log_{10} -uCD163 como variable dependiente; el tratamiento, grupo de respuesta y meses de tratamiento (y sus interacciones), edad sexo y curso de tasa de filtración glomerular estimada (TFGe), proteinuria, anticuerpos anti-dsDNA y C3, como efectos fijos; y los sujetos como efectos aleatorios. Se obtuvieron las medias estimadas y sus intervalos de confianza al 95%, así como comparaciones entre cada punto del tiempo en el seguimiento. El diagnóstico del modelo se realizó mediante la evaluación de la distribución de los residuales estandarizados y la homogeneidad de la varianza residual entre los grupos de respuesta.

La capacidad predictiva de la respuesta a 12 meses de uCD163, proteinuria, C3, C4 y anticuerpos anti-dsDNA se evaluó mediante curvas receptor-operador (ROC) para cada punto del tiempo de seguimiento. Se calcularon árboles de decisiones e índice de reclasificación para evaluar el valor agregado de medir uCD163 sobre la proteinuria. La concordancia entre cada biomarcador y el índice de actividad histológica en las biopsias repetidas se evaluó mediante la kappa de Cohen.

D. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL MARCADOR CD163 URINARIO

D1. Análisis Transversal

D1.1. Pacientes Estudiados y Correlaciones Histopatológicas

Las características clínicas e histológicas de los pacientes incluidos se muestran en las Tablas I-1, I-2 y I-3. Las características clínicas del grupo de otras enfermedades glomerulares se muestran en la Tabla I-2.

Los niveles de uCD163 fueron significativamente mayores ($p < 0.001$) en pacientes con NL activa (1596 ng/mmol, RIC 588-3899) que en controles sanos (0 ng/mmol, RIC 0-1), pacientes con LEG inactivo (2.8 ng/mmol, RIC 0-35), y pacientes con LEG activo sistémico no renal (0 ng/mmol, RIC 0-31) (Figura I-2).

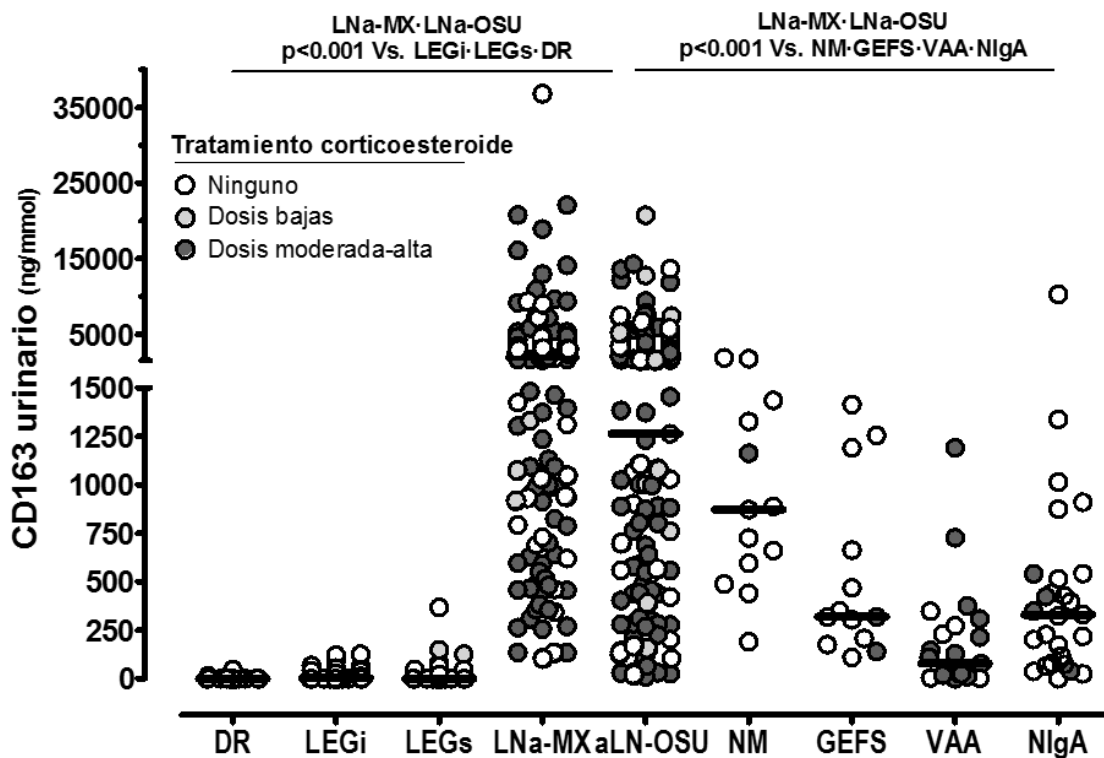


Figura I-2. Niveles de CD163 urinarios en distintas enfermedades glomerulares.

Los niveles de uCD163 no correlacionaron con la dosis de corticosteroides ($r=0.12$, $p=0.07$). No se observaron diferencias en las características clínicas basales entre aquellos con niveles indetectables o detectables de CD163 de ninguna de los grupos controles.

Tabla I-1. Características de los pacientes incluidos en la fase transversal.

Característica	Nefritis lúpica activa cohorte Mexicana n=120	Nefritis lúpica activa cohorte Ohio State n=129	Nefritis lúpica inactiva n=70		Donadores renales sanos n=31
			Lupus inactivo n=40	Lupus extra-renal n=30	
Edad, años	32 (25-39)	31 (26-40)	44 (30-57)	42 (27-50)	34 (29-41)
Mujer, n (%)	108 (90)	106 (82)	37 (93)	27 (90)	23 (74)
Raza, n (%)					
Caucásico	1 (1)	61 (47)	5 (13)	16 (53)	12 (39)
Afro-americano	0 (0)	56 (44)	1 (2)	10 (33)	5 (16)
Asiático	0 (0)	4 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mestizo	119 (99)	0 (0)	34 (85)	4 (13)	10 (32)
Otro	0 (0)	8 (6)	0 (0)	0 (0)	4 (13)
Creatinina, mg/dL	1.1 (0.7-2.0)	0.9 (0.7-1.6)	0.7 (0.6-0.8)	0.8 (0.7-0.9)	0.8 (0.7-0.9)
TFGe, ml/min/1.73	68 (35-110)	90 (48-123)	105 (90-119)	98 (85-116)	101 (96-109)
Proteinuria 24h, g/g	3.3 (2.2-5.2)	2.6 (0.9-4.8)	0.1 (0.0-0.25)	0.1 (0.0-0.25)	0.1 (0.0-0.1)
Anticuerpos dsDNA	101 (84)	89 (69)	23 (58)	26 (87)	-
C3, mg/dL	68 (44-88)	62 (43-86)	104 (88-122)	94 (65-109)	-
C4, mg/dL	8 (8-13)	11 (8-18)	21 (10-27)	15 (11-35)	-
SLEDAI-2k, puntos	16 (14-22)	17 (9-24)	0 (0-4)	17 (10-24)	-

Todos los valores se expresan como medianas (RIC) o número (frecuencia relativa).

Abreviaturas. TFGe, tasa de filtración glomerular estimada calculada mediante la fórmula CKD-EPI.

Tabla I-2. Características de los pacientes con otras enfermedades glomerulares activas.

Característica	N. membranosa PLA2R n=13	Glomeruloesclerosis focal y segmentaria n=13	Vasculitis asociada a ANCA activa n=22	Nefropatía por inmunoglobulina A n=27
Edad, años	42 (37-59)	37 (27-48)	55 (47-63)	45 (29-55)
Mujer, n (%)	6 (46)	5 (39)	16 (73)	10 (37)
Raza, n (%)				
Caucásico	1 (8)	0 (0)	0 (0)	22 (82)
Afro-americano	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (11)
Asiático	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (7)
Mestizo	12 (92)	13 (100)	22 (100)	0 (0)
Otros	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Creatinina, mg/dL	1.0 (0.9-1.3)	1.1 (0.9-1.6)	2.5 (1.1-3.5)	1.1 (1.0-1.8)
TFGe, mL/min/1.73m ²	76 (61-90)	89 (45-111)	26 (14-68)	66 (42-107)
Proteinuria 24h, g/g	5.2 (2.4-8.3)	4.8 (1.6-10.1)	1.6 (0.5-3.2)	1.3 (0.7-2.0)
Complemento C3, mg/dL	134 (95-140)	149 (122-174)	116 (97-128)	131 (112-150)
Complemento C4, mg/dL	31 (28-48)	399 (30-46)	30 (18-41)	29 (22-41)

Todos los valores se expresan como medianas (RIC) o número (frecuencia relativa).

Abreviaturas. TFGe, tasa de filtración glomerular estimada calculada mediante la fórmula CKD-EPI; PLA2R, anticuerpos anti-fosfolipasa A2; ANCA, anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos.

Tabla I-3. Características histológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

	Nefritis lúpica activa cohorte Mexicana n=120	Nefritis lúpica activa cohorte Ohio n=129
Clasificación ISN/RPS		
Clase II	2 (2)	11 (9)
Clase III ± V	35 (31)	38 (29)
Clase IV ± V	67 (59)	62 (48)
Clase V	9 (8)	18 (14)
ITEMS DE ACTIVIDAD		
Índice de Actividad	4 (1-9)	3 (2-6)
Necrosis Fibrinoide		
<5%	82 (73)	82 (63)
6-25%	24 (21)	33 (26)
26-50%	5 (4)	6 (5)
>50%	2 (2)	8 (6)
Hiper celularidad endocapilar		
<5%	51 (45)	28 (22)
6-25%	34 (31)	40 (31)
26-50%	14 (12)	32 (25)
>50%	14 (12)	29 (22)
Leucostasis		
<5%	55 (49)	67 (52)
6-25%	30 (26)	48 (37)
26-50%	18 (16)	13 (10)
>50%	10 (9)	1 (1)
Trombos hialinos		
<5%	94 (83)	86 (66)
6-25%	13 (11)	28 (22)
26-50%	3 (3)	10 (8)
>50%	3 (3)	5 (4)
Asas de alambre		
<5%	80 (71)	83 (64)
6-25%	23 (21)	27 (21)
26-50%	5 (4)	12 (9)
>50%	5 (4)	7 (6)
Cariorraxis		
<5%	89 (79)	82 (63)
6-25%	17 (15)	33 (26)
26-50%	6 (5)	6 (5)
>50%	1 (1)	8 (6)
Semilunas celulares		
<5%	74 (65)	86 (66)
6-25%	26 (23)	28 (22)
26-50%	13 (12)	10 (8)
>50%	0 (0)	5 (4)
Inflamación Intersticial		
<5%	12 (11)	39 (30)
6-25%	82 (72)	67 (52)
26-50%	15 (13)	23 (18)
>50%	4 (4)	0 (0)
ITEMS DE CRONICIDAD		
Índice de cronicidad	4 (3-6)	5 (2-8)
Esclerosis total		
<5%	18 (16)	57 (44)
6-25%	36 (32)	43 (33)
26-50%	29 (26)	22 (17)

>50%	30 (26)	7 (6)
Semilunas fibrosas		
<5%	75 (66)	92 (71)
6-25%	32 (28)	32 (25)
26-50%	5 (5)	5 (4)
>50%	1 (1)	0 (0)
Fibrosis Intersticial		
<5%	3 (3)	31 (24)
6-25%	70 (62)	50 (39)
26-50%	29 (25)	40 (31)
>50%	11 (10)	8 (6)
Atrofia Tubular		
<5%	8 (7)	30 (23)
6-25%	67 (59)	53 (41)
26-50%	25 (22)	38 (30)
>50%	13 (12)	8 (6)

Entre las enfermedades glomerulares, los niveles de uCD163 fueron los más altos en NL (Figura I-2). Los niveles de uCD163 variaron por clase histopatológica de NL, aumentaron al aumentar la gravedad clínica del episodio de NL (Figura I-3), y fueron mayores en pacientes con síndrome nefrítico (2376 ng/mmol, RIC 1101-5208) o nefrótico (2678 ng/mmol, RIC 982-6019) en comparación con aquellos con proteinuria no nefrótica, hematuria o función renal normal (760 ng/mmol, RIC 307-1778, $p < 0.001$).

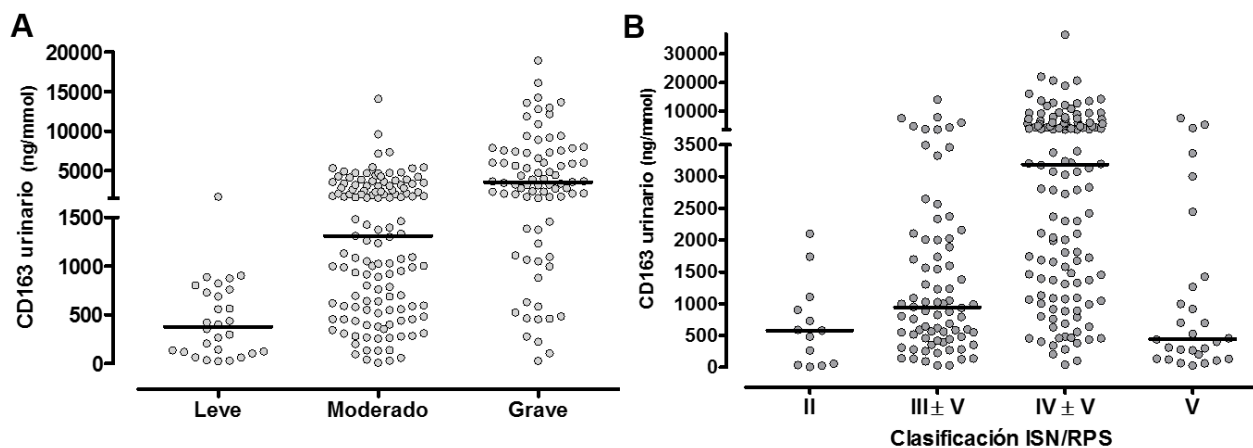


Figura I-3. Niveles de CD163 urinario de acuerdo a la gravedad clínica del episodio de nefritis (A) y la clasificación histopatológica (B).

No se observó correlación entre los niveles plasmáticos y urinarios de uCD163 (r de Pearson=0.04, Figura I-4), y los niveles plasmáticos del marcador no variaron con la gravedad clínica del episodio, la clase histológica o el síndrome de presentación. Los niveles de proteinuria determinaron el 40% de la variabilidad de los niveles de uCD163 ($r^2=0.42$, Figura I-4) y se mantuvieron elevados y diferenciados entre grupos tras corregir por los niveles de proteinuria (Figura I-5).

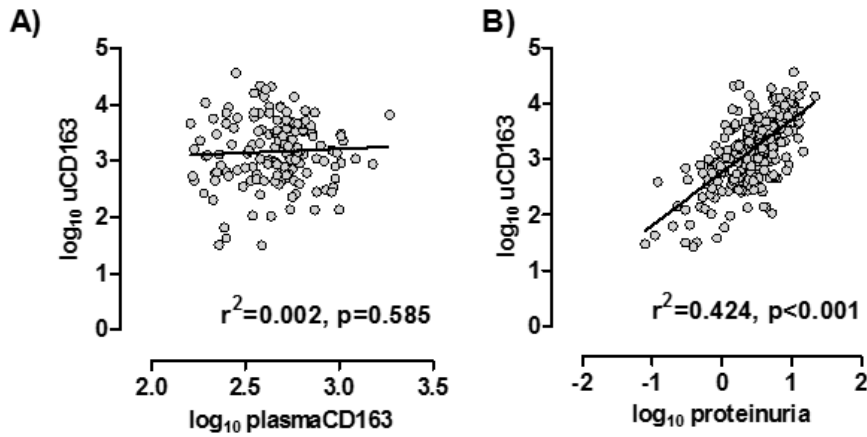


Figura I-4. Correlación entre los niveles plasmáticos y urinarios de CD163 (A), y entre uCD163 y la proteinuria.

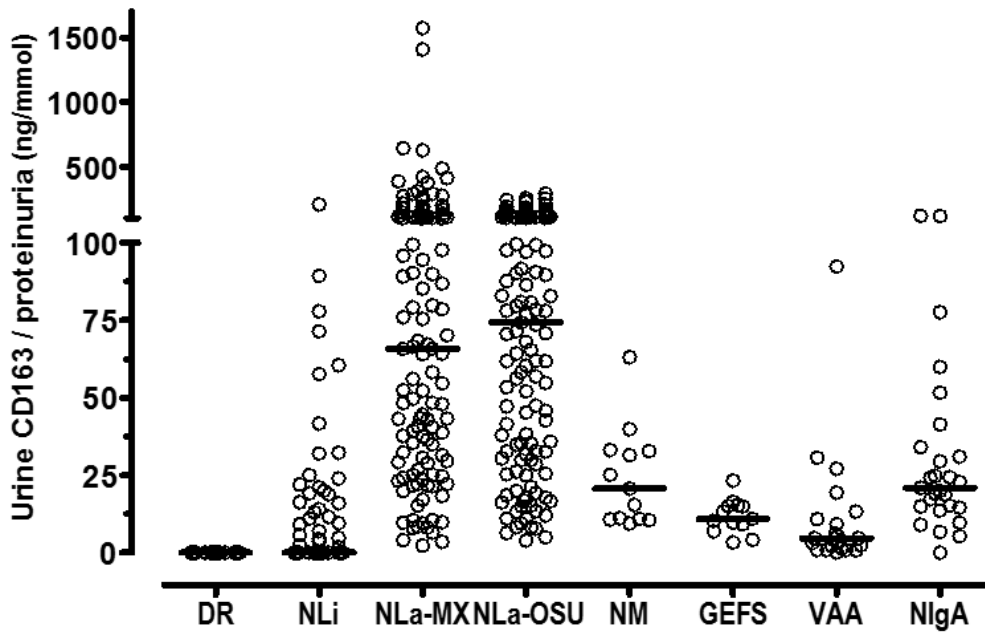


Figura I-5. Niveles de CD163 urinarios corregidos por proteinuria en las distintas enfermedades glomerulares.

Se calcularon correlaciones entre los niveles de uCD163, el índice histológico de actividad y cada uno de sus componentes (Tabla I-2). Los niveles de uCD163 correlacionaron positivamente con el índice histológico de actividad tanto en la cohorte de Ohio ($r=0.59$, $p<0.001$) como en la cohorte mexicana ($r=0.48$, $p<0.001$). No se observó correlación entre uCD163 y el índice de cronicidad o sus componentes (Tabla I-2). La correlación entre uCD163 y el índice de actividad se mantuvo constante en todos los niveles de daño crónico (Figura I-6).

Tabla I-2. Correlación entre CD163 urinario con los componentes de los índices de actividad y cronicidad.

Componente histológico	Todos los pacientes (n=249)		Cohorte mexicana (n=120)		Cohorte Ohio (n=129)	
	Spearman r	Valor p	Spearman r	Valor p	Spearman r	Valor p
Hipercelularidad endocapilar	0.372	<0.001	0.428	<0.001	0.450	<0.001
Leucostasis	0.426	<0.001	0.436	<0.001	0.414	<0.001
Necrosis Fibrinoide	0.333	<0.001	0.271	0.003	0.422	<0.001
Trombo hialino	0.377	<0.001	0.373	<0.001	0.384	<0.001
Asas de alambre	0.421	<0.001	0.352	<0.001	0.507	<0.001
Cariorexix	0.337	<0.001	0.303	0.001	0.422	<0.001
Semilunas celulares	0.386	<0.001	0.331	<0.001	0.456	<0.001
Int inflamación intersticial	0.277	<0.001	0.314	<0.001	0.252	0.004
Índice Actividad	0.530	<0.001	0.483	<0.001	0.591	<0.001
Esclerosis glomerular	-0.019	0.762	-0.162	0.077	-0.104	0.241
Semilunas fibrosas	0.032	0.619	0.192	0.069	-0.115	0.194
Fibrosis Intersticial	0.066	0.303	0.136	0.137	-0.011	0.901
Atrofia Tubular	0.074	0.244	0.159	0.083	-0.013	0.884
Índice cronicidad	0.105	0.098	0.247	0.099	-0.049	0.584

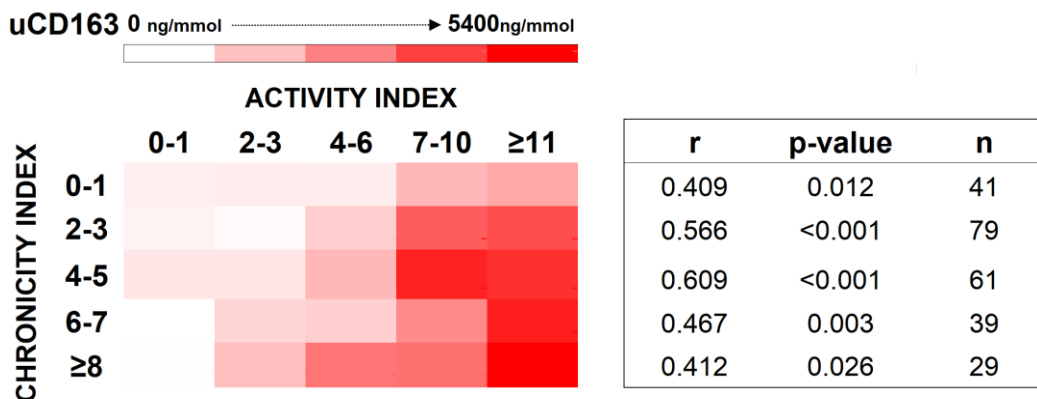


Figura I-6. Mapa de calor que muestra los niveles de uCD163 y su correlación con el índice de actividad a través de distintos valores del índice de cronicidad.

D.1.2. Predictores de Actividad Histológica de Nefritis Lúpica

Los factores asociados con el índice histológico de actividad se exploraron mediante regresión lineal. Como se muestra en la Tabla I-3, el modelo que incluyó edad, TFG_e, proteinuria, y C3 tuvo una $r^2=0.30$. El modelo mejoró su calibración al sustituir la proteinuria por los niveles urinarios de CD163 ($r^2=0.36$), pero no mejoró más al agregar ambas variables ($r^2=0.36$).

Tabla I-3. Factores asociados con el índice de actividad histológico mediante regresión lineal.

	β ajustada	β	IC al 95%	Valor p
Modelo 1: $r^2=0.304$				
Edad	-0.183	-2.029	-3.62 a -0.44	0.002
Log ₁₀ TFG _e	-0.186	-2.537	-4.2 a -0.95	0.002
Log ₁₀ proteinuria	0.219	2.576	1.20 a 3.89	<0.001
Log ₁₀ C3	-0.328	-6.921	-9.55 a -4.52	<0.001
Modelo 2: $r^2=0.359$				
Edad	-0.170	-0.072	-0.12 a -0.03	0.003
Log ₁₀ TFG _e	-0.148	-2.049	-3.62 a -0.48	0.011
Log ₁₀ C3	-0.259	-5.550	-8.04 a -3.06	<0.001
Log ₁₀ uCD163	0.343	2.858	1.88 a 3.84	<0.001
Modelo 3: $r^2=0.360$				
Edad	-0.165	-5.632	-9.46 a -1.80	0.004
Log ₁₀ TFG _e	-0.150	-2.065	-3.6 a -0.49	0.010
Log ₁₀ proteinuria	0.042	0.487	-1.12 a 2.09	0.550
Log ₁₀ C3	-0.262	-5.673	-8.17 a -3.18	<0.001
Log ₁₀ uCD163	0.343	2.647	1.53 a 3.77	<0.001

Abreviaturas. TFG_e, tasa de filtración glomerular estimada en el episodio agudo; C3, proteína C3 del complemento, uCD163, CD163 urinario.

D.1.3. Los niveles de CD163 urinario diferenciaron nefritis lúpica activa de inactiva

Como último paso de la evaluación transversal, se construyeron curvas ROC para evaluar uCD163 en los grupos predefinidos de pacientes con nefritis lúpica activa y sin nefritis. El área bajo la curva ROC (ABC) fue 0.998 (IC al 95% 0.995-1.00) y 0.980 (IC al 95%, 0.96-0.99) en las cohortes Mexicana y de Ohio, respectivamente. Un punto de corte >130 ng/mmol tuvo sensibilidad del 97% (IC al 95% 90-99%) y especificidad de 94% (IC al 95%, 91-97%) para diferenciar nefritis lúpica activa de pacientes inactivos en las cohortes combinadas (Figura I-7).

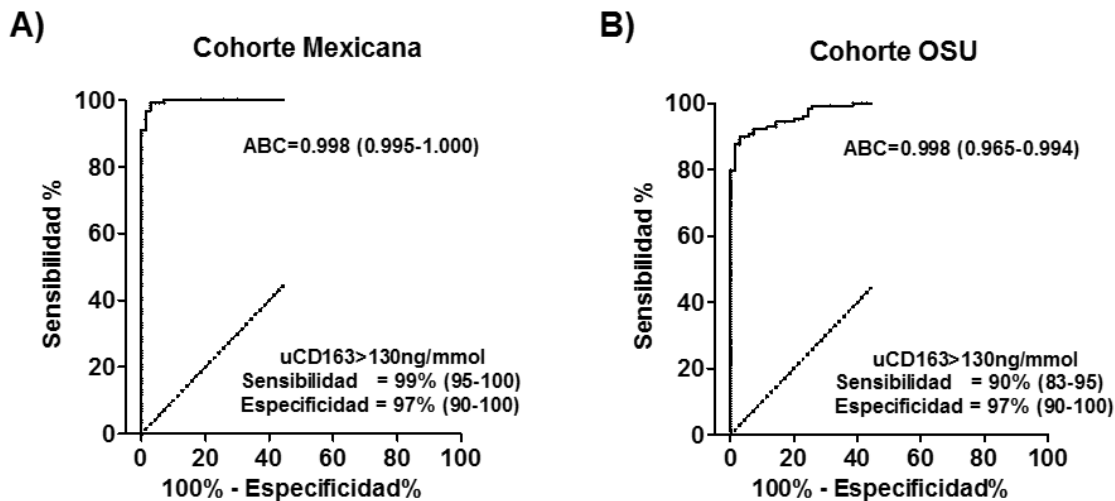


Figura I-7. Rendimiento diagnóstico de uCD163 para diferenciar entre grupos predeterminados de nefritis lúpica activa e inactiva.

D.2. Análisis Longitudinal

D.2.1. Curso de CD163 urinario en respuesta al tratamiento

Se analizaron muestras seriadas correspondientes a 49 episodios de nefritis lúpica de la cohorte OSS y 82 de la cohorte mexicana (Tabla I-4). Tras 12 meses de tratamiento, las tasas de respuesta completa, parcial y no respuesta fueron 45%, 18% y 37%, respectivamente en la cohorte OSS. En la cohorte mexicana, las tasas de respuesta completa, parcial y no respuesta fueron 35%, 27% y 38%, respectivamente. No hubo diferencia en las tasas de respuesta entre ambas cohortes ($p=0.45$).

Tabla I-4. Características de los episodios de nefritis lúpica activa evaluados longitudinalmente.

	Cohorte OSS n=49	Cohorte Mexicana n=82
Demográficos y Laboratorio		
Edad, años	32 (26-39)	34 (25-40)
Mujer, n (%)	49 (100)	76 (93)
Raza		
Caucásico	26 (53)	0 (0)
Afro-Americano	18 (37)	0 (0)
Asiático	4 (8)	0 (0)
Mestizo mexicano	0 (0)	82 (100)
Otra	1 (2)	0 (0)
Creatinina, mg/dL	1.0 (0.8-1.4)	1.1 (0.7-2.2)
Tasa de filtración glomerular, mL/min/1.73m ²	73 (51-102)	67 (26-110)
Proteinuria, g/g	3.3 (2.0-4.6)	3.3 (2.2-5.5)
Anticuerpos anti-dsDNA positivos	39 (80)	31 (84)
Complemento C3, mg/dL	71 (62-85)	61 (43-88)
Complemento C4, mg/dL	13 (8-17)	8 (8-13)
Puntaje SLEDAI-2k, puntos	20 (15-27)	18 (14-22)
Histopatología		
Clasificación ISN/RPS		
Class III ± V	9 (18)	28 (34)
Class IV ± V	33 (67)	47 (57)
Class V	7 (14)	7 (9)
Activity index	NA	4 (1-8)
Chronicity index	NA	4 (3-5)
Tratamiento y Respuesta al tratamiento*		
Inducción a la remisión		
Ciclofosfamida	5 (10)	23 (28)
Mofetil Micofenolato	32 (65)	53 (65)
Azatioprina	12 (25)	3 (4)
ICN + Micofenolato	0 (0)	3 (4)
Respuesta a 6 meses		
Respuesta completa	13 (27)	12 (15)
Respuesta parcial	12 (24)	29 (35)
Sin respuesta	24 (49)	41 (50)
Respuesta a 12 meses		
Respuesta complete	22 (45)	29 (35)
Respuesta parcial	9 (18)	22 (27)
Sin respuesta	18 (37)	31 (38)

Como se muestra en la Figura I-8, los perfiles de valores medios de uCD163 tras el tratamiento fueron distintos para aquellos episodios de nefritis lúpica que terminaron en respuesta completa, parcial o sin respuesta a los 12 meses de tratamiento (valor p de la interacción <0.001). Las medias estimadas de uCD163 aumentaron desde los niveles pre-episodio de nefritis al episodio agudo de nefritis, y posteriormente cayeron en pacientes con respuesta parcial o completa a los 12 meses en ambas cohortes (Figura I-8). Aunque los valores de uCD163 al momento del episodio agudo fueron numéricamente mayores en los no respondedores, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En los pacientes no respondedores, los niveles de uCD163 no cayeron al mismo grado que los respondedores durante el tratamiento.

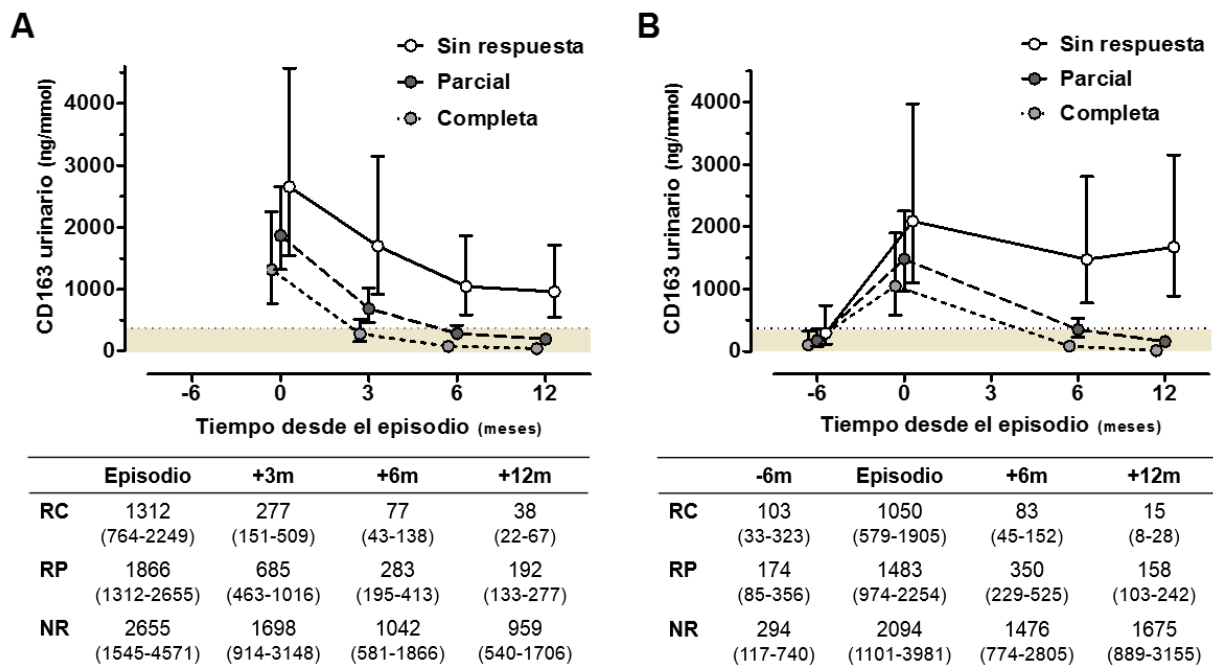


Figura I-8. Curso de CD163 urinario en respuesta al tratamiento en pacientes con respuesta completa (RC), parcial (RP) o sin respuesta (NR) en la cohorte mexicana (A) y de Ohio (B). El gráfico muestra las medias estimadas y sus intervalos de confianza al 95% estimados del análisis de modelos lineales mixtos. El área coloreada representa el corte de uCD163=370ng/mmol.

Se construyeron curvas ROC a partir de la cohorte de derivación (mexicana) para determinar el mejor punto de corte del biomarcador a los 6 meses que predice una respuesta completa a los 12 meses (Tabla I-5). Se analizaron individualmente los niveles de uCD163, proteinuria, anticuerpos anti-dsDNA, C3 y C4. Un valor de uCD163<370ng/mmol a los 6 meses tuvo sensibilidad del 90% y especificidad del 87% para predecir una respuesta completa a los 12 meses, en comparación con una proteinuria <1.5g/g a los 6 meses, la cual tuvo sensibilidad del 86% y especificidad del 81%.

Tabla I-5. Área bajo la curva de los distintos biomarcadores para predecir respuesta a 12 meses.

	ABC	Mejor punto corte	Sensibilidad	Especificidad
uCD163 al episodio	0.686	1495 ng/mmol	0.64	0.69
uCD163 a 3 meses	0.800	1552 ng/mmol	0.96	0.60
uCD163 a 6 meses	0.923	370 ng/mmol	0.88	0.88
uCD163 a 12 meses	0.972	364 ng/mmol	0.94	0.94
Proteinuria al episodio	0.670	3.94 g/g	0.77	0.51
Proteinuria a 3 meses	0.804	1.71 g/g	0.79	0.74
Proteinuria a 6 meses	0.934	1.59 g/g	0.90	0.83
Proteinuria a 12 meses	1.000	0.50 g/g	1.00	1.00
Anti-dsDNA-Ab al episodio	0.366	271 UI/mL	0.55	0.36
Anti-dsDNA-Ab a 3 meses	0.518	54 UI/mL	0.72	0.48
Anti-dsDNA-Ab a 6 meses	0.581	57 UI/mL	0.80	0.30
Anti-dsDNA-Ab a 12 meses	0.587	12 UI/mL	0.71	0.49
Complemento C3 al episodio	0.402	53 mg/dL	0.20	0.64
Complemento C3 a 3 meses	0.605	81 mg/dL	0.48	0.83
Complemento C3 a 6 meses	0.624	85 mg/dL	0.59	0.70
Complemento C3 a 12 meses	0.632	82 mg/dL	0.59	0.75
Complemento C4 al episodio	0.363	16 mg/dL	0.12	0.67
Complemento C4 a 3 meses	0.483	18 mg/dL	0.21	0.55
Complemento C4 a 6 meses	0.498	22 mg/dL	0.12	0.71
Complemento C4 a 12 meses	0.557	10 mg/dL	0.35	0.89

En la cohorte de validación (OSS), un valor de uCD163 <370ng/mmol a los 6 meses tuvo una sensibilidad de 87% y especificidad de 89% para predecir una respuesta completa a los 12 meses, validando lo observado en la cohorte de derivación (Tabla I-5). Aún y cuando la proteinuria es el componente principal de la definición de respuesta en nefritis lúpica, también puede considerarse un biomarcador. Un valor de proteinuria <1.5g/g a los 6 meses de tratamiento tuvo un desempeño predictivo similar a uCD163, mientras que el punto de corte comúnmente utilizado de 0.5g/g a los 6 meses, tuvo baja sensibilidad para identificar una respuesta completa. El resto de marcadores serológicos tuvieron un pobre desempeño para identificar a los pacientes con respuesta completa.

D.2.2. Predicción Temprana de la Respuesta Renal

El análisis de supervivencia demostró que la mediana de tiempo para alcanzar un nivel de uCD163<370ng/mmol fue de sólo 3 meses (RIC 2-4), en comparación con una mediana de 8 meses (RIC 5-11 meses) para que la proteinuria alcance 0.5g/g (el punto que define una remisión completa). Esto sugiere que la evaluación de uCD163 en adición a la proteinuria podría agregar información para determinar una respuesta completa.

Para apoyar este punto, se construyeron árboles de reclasificación y se determinaron los índices de reclasificación neta (NRI) Como se muestra en la Figura I-11, la medición de uCD163 en adición a la proteinuria incrementó la posibilidad de identificar a los pacientes con respuesta completa desde un 35% hasta un 77% en el grupo de pacientes quienes persisten con proteinuria >0.5g/g tras 6 meses de tratamiento, con un NRI de 0.64. De igual manera, en pacientes con proteinuria >1.0g/g a los 6 meses, uCD163 aumentó la identificación de los respondedores desde 24 a 69% con un NRI de 0.13.

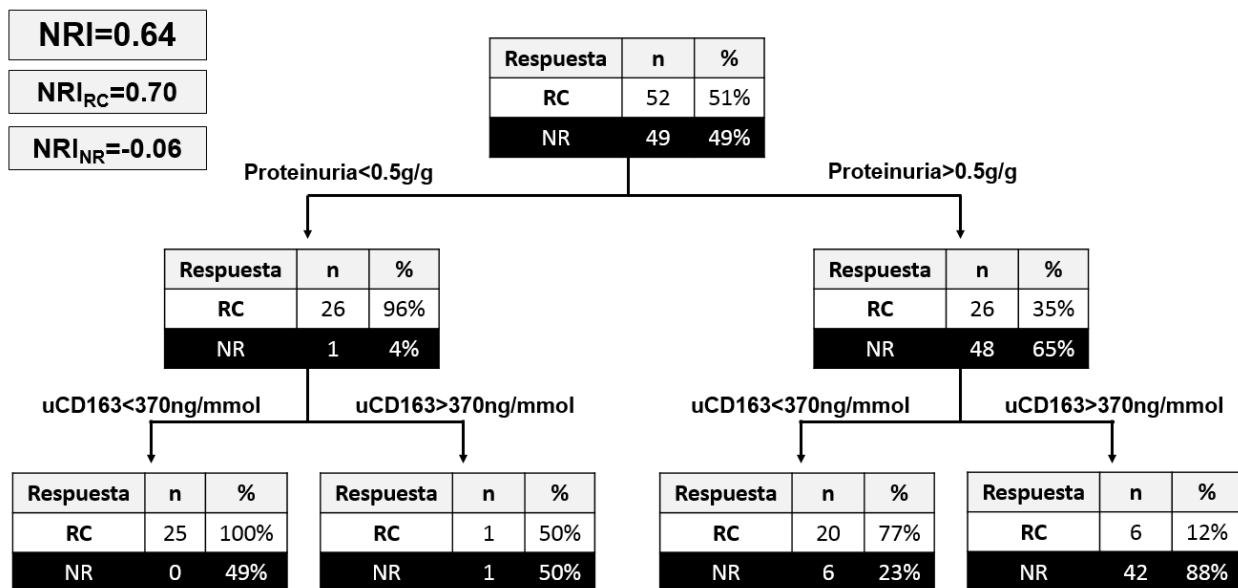


Figura I-9. Árbol de decisión para evaluar el valor agregado de medir uCD163 adicionalmente a la proteinuria. A los 6 meses, 27 pacientes tuvieron proteinuria <0.5g/g (brazo izquierdo), 26 (96%) alcanzaron respuesta completa (RC) a los 12 meses. Hubo poco valor agregado de medir uCD163 en estos pacientes. A los 6 meses, hubo 74 pacientes con proteinuria >0.5g/g (brazo derecho), 26 (35%) de ellos lograron respuesta completa a 12 meses. La medición de uCD163 ayudó a identificar correctamente 20/26 pacientes y 42/48 pacientes que alcanzaron RC y sin respuesta (NR), respectivamente a 12 meses. NRI, índice de reclasificación neta; NRI_{RC}, componente de remisión completa, NR_{NR}, componente de no respuesta.

D.2.3. Relación entre uCD163 y respuesta histológica

Debido a la discordancia conocida entre respuesta clínica e histológica⁸⁰⁻⁸², y para demostrar que una reducción o aumento de uCD163 refleja una disminución o aumento, respectivamente, de la actividad histológica de la nefritis lúpica; se midió uCD163 en 19 pacientes de la cohorte mexicana quienes contaban con una biopsia repetida durante el seguimiento (Tabla I-6). Se incluyeron 9 pacientes que se biopsiaron por protocolo a los 12 meses (pacientes 45, 46, 49, 50, 52, 99, 118, 119, 120). De ellos, el nivel de uCD163 fue <370ng/mmol en 8 de ellos, y en todos, el índice histológico de actividad fue ≤1. Solamente 1 paciente con respuesta parcial tuvo un nivel de uCD163 de 562ng/mmol, correspondiendo con una actividad histológica de 4.

Dos pacientes con respuesta completa a los 12 meses, en quienes sus niveles de uCD163 habían disminuido por debajo de 370ng/mmol experimentaron una recaída durante el seguimiento. En la recaída, ambos pacientes aumentaron sus niveles de uCD163 por arriba de 370ng/mmol, y la recaída de actividad renal se documentó en la biopsia renal.

Tabla I-6. Niveles urinarios de CD163 en pacientes con biopsias repetidas durante el seguimiento.

Paciente	Primera biopsia (biopsia diagnóstica)		Seguimiento			Segunda biopsia (por protocolo o indicación)		Desenlace	
	Histopatología	uCD163 (ng/mmol)	Respuesta 12 meses	uCD163 (ng/mmol)		Indicación	Histopatología	uCD163 (ng/mmol)	Último seguimiento (meses)
11	Clase IV+V IA=12 IC=3	2807	Complete response	3m: 595 6m: 248 12m: 87	Recaída al mes 28	Clase IV+V IA=6 IC=7	7964	Sin respuesta a reinducción (36 meses)	
12	Clase III+V IA=2 IC=4	950	Complete response	3m: 1032 6m: 0 12m: 0	Recaída al mes 27	Clase V IA=0 IC=3	802	Respuesta complete con reinducción (35 meses)	
45	Clase IV+V IA=8 IC=3	1075	Partial response	3m: 2397 6m: 457 12m: 368	Protocolo a 12 meses	Clase III IA=1 IC=2	368	Respuesta complete (20 meses)	
46	Clase IV+V IA=11 IC=3	22072	Partial response	3m: 330 6m: 169 12m: 211	Protocolo a 12 meses	Clase III IA=1 IC=3	211	Respuesta parcial (20 meses)	
49	Clase IV+V IA=10 IC=5	3581	Partial response	3m: 428 6m: 308 12m: 562	Protocolo a 12 meses	Clase III+V IA=4 IC=3	562	Recaída renal (19 meses)	
50	Clase IV+V IA=14 IC=2	5401	Complete response	3m: 428 6m: 232 12m: 182	Protocolo a 12 meses	Clase IV IA=1 IC=4	182	Respuesta completa (18 meses)	
52	Clase IV+V IA=16 IC=4	10889	Complete response	3m: 125 6m: 114 12m: 92	Protocolo a 12 meses	Clase III IA=1 IC=4	92	Respuesta complete (18 meses)	
99	Clase III+V IA=3 IC=3	3492	Complete response	3m: 50 6m: 87 12m: 24	Protocolo a 12 meses	Clase III IA=0 IC=4	24	Respuesta completa (15 meses)	
118	Clase III+V IA=10 IC=3	2082	Partial response	3m: 238 6m: 137 12m: 356	Protocolo a 12 meses	Clase III IA= 1 IC= 2	356	Respuesta parcial (12 meses)	
119	Clase III+V IA=4 IC=4	7338	Complete response	3m: 352 6m: 0 12m: 95	Protocolo a 12 meses	Clase III IA = 1 IC = 7	95	Respuesta completa (12 meses)	
120	Clase IV+V IA=4 IC=4	9169	Partial response	3m: 2138 6m: 0 12m: 207	Protocolo a 12 meses	Clase III IA=1 IC=3	207	Respuesta parcial (12meses)	
14	Clase IV+V IA=12 IC=6	1048	No response	3m: 7189 6m: 5738 12m: 1500	No respuesta a 12 meses	Clase IV+V IA=12 IC=6	1500	Sin respuesta (32 meses)	

16	Clase III IA=7 IC=1	4267	No respuesta	3m: 5098 6m: 8318 12m: 14796	Sin respuesta a 12 meses	Clase IV+V IA=17 IC=5	14796	Progresión a ERCT (16 meses)
35	Clase IV IA=3 IC=6	1675	No respuesta	3m: 1220 6m: 1676 12m: 1412	Sin respuesta a 12 meses	Clase IV+V IA=6 IC=7	1412	Duplicación de creatinina (21 meses)
37	Clase IV+V IA=12 IC=6	36803	No respuesta	3m: 20578	Sin respuesta a 3 meses	Clase IV+V IA=13 IC=10	20578	Progresión a ERCT (3 meses)
56	Clase IV+V IA=11 IC=4	18922	No respuesta	3m: 14690 6m: 8281 12m: 1998	Sin respuesta a 24 meses	Clase IV IA=4 IC=7	2336	Respuesta a cambio de IS (31 meses)
65	Clase IV+V IA=8 IC=6	991	No respuesta	3m: 10462 6m: 2789	Sin respuesta a 6 meses	Clase IV+V IA=10 IC=5	2789	Respuesta a cambio de IS (14 meses)
105	Clase IV+V IA=5 IC=3	4718	No respuesta	3m: 2526 6m: 1121	Sin respuesta a 6 meses	Clase IV+V IA=12 IC=5	1121	Progresión a ERCT (10 meses)
117	Clase IV+V IA=9 IC=7	1600	No respuesta	3m: 3646 6m: 2390	Sin respuesta a 6 meses	Clase IV IA=8 IC=10	2390	Duplicación de creatinina (12 meses)

Finalmente, 8 pacientes (pacientes 14, 16, 35, 37, 56, 65, 105, 117) quienes fueron re-biopsiados debido a una falta de respuesta al tratamiento, en todos ellos se identificaron niveles muy elevados (>1000 ng/mmol) de uCD163 y actividad histológica persistente (Figura I-12).

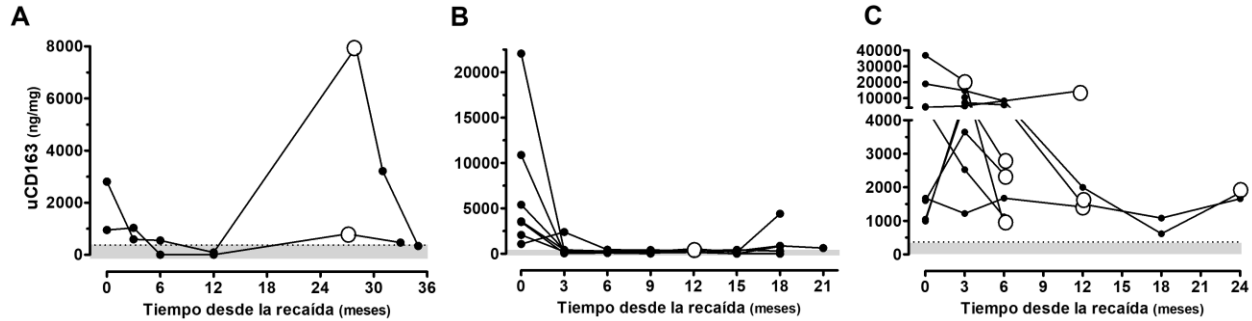


Figura I-12. Curso de uCD163 en los pacientes con recaída renal (A), respuesta al tratamiento (B) y sin respuesta al tratamiento (C) durante el seguimiento.

Al igual que en la primera biopsia, se observó una correlación positiva ($r=0.83$, $p<0.001$) entre el índice de actividad y los niveles de uCD163 en el momento de la biopsia repetida. Adicionalmente, existió una concordancia perfecta ($kappa=1.0$) entre un índice histológico de actividad ≤ 1 y niveles de uCD163 <370 ng/mmol. En contraste, la concordancia entre la proteinuria <0.5 g/g y el índice de actividad histológica fue solamente moderado ($kappa<0.6$), principalmente debido a que 3 pacientes con proteinuria persistente >0.5 g/g no tuvieron actividad histológica alguna (Tabla I-6, Tabla I-7).

Tabla I-6. Estudio de concordancia entre los niveles de biomarcadores y la actividad histológica en la biopsia renal repetida.

Parámetro	Kappa de Cohen	Interpretación
uCD163<370ng/mmol	1.000	Concordancia perfecta
uPCR<0.5g/g	0.526	Concordancia moderada
uPCR<1.0g/g	0.553	Concordancia moderada
uPCR<1.5g/g	0.553	Concordancia moderada
Anti dsDNA-Ab (-)	0.526	Concordancia moderada
C3 normalization	0.561	Concordancia moderada
C4 normalization	0.658	Concordancia moderada

Tabla I-7. Tablas de concordancia entre los diversos biomarcadores y la actividad histológica en la biopsia renal repetida.

	Actividad Histológica ≤1	Actividad Histológica >1	Concordancia (kappa)
uCD163			
uCD163 <370 ng/mmol	8	0	1.000
uCD163 >370 ng/mmol	0	10	
Proteinuria			
Proteinuria <0.5g/g	4	0	0.526
Proteinuria >0.5g/g	4	10	
Proteinuria <1.0g/g	5	1	0.553
Proteinuria >1.0g/g	3	9	
Proteinuria <1.5g/g	5	1	0.553
Proteinuria >1.5g/g	3	9	
dsDNA			
Anticuerpos anti-dsDNA (-)	4	0	0.526
Anticuerpos anti-dsDNA (+)	4	10	
C3			
C3 en intervalo referencia	7	3	0.561
C3 bajo	1	7	
C4			
C4 en intervalo referencia	6	1	0.658
C4 bajo	2	9	

El curso de uCD163 y la proteinuria se analizó de acuerdo a la respuesta histológica en estos pacientes con biopsias repetidas. Como se muestra en la Figura I-13, tanto uCD163 como la proteinuria se mantuvieron elevadas en pacientes sin respuesta histológica, mientras que uCD163 y los valores de proteinuria disminuyeron en pacientes con respuesta histológica. Los niveles de uCD163 disminuyeron a <370ng/mmol a los 3 y 6 meses en 5/8 (63%) y 8/8 (100%) pacientes con respuesta histológica; mientras que la proteinuria se mantuvo >0.5g/g a los 3, 6 y 12 meses en 2/8 (25%), 2/8 (25%) y 4/8 (50%) de los pacientes con respuesta completa, respectivamente.

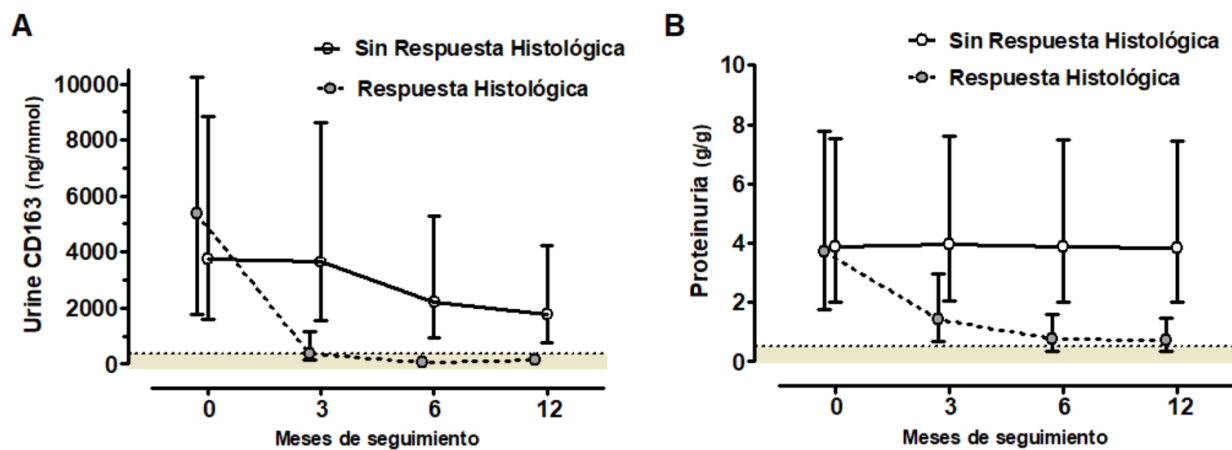


Figura I-13. Curso de uCD163 (A) y proteinuria (B) de acuerdo a la respuesta histopatológica observada en la biopsia repetida.

D.2.4. Niveles de uCD163 y desenlaces clínicos

Tras una mediana de seguimiento de 28 meses (RIC 19-41 meses), 23/116 (20%) de los pacientes combinados de ambas cohortes duplicaron sus niveles de creatinina sérica respecto a los niveles basales. Mediante análisis de regresión de Cox bivariado, la TFGe durante el episodio agudo, el índice de cronicidad, la respuesta al tratamiento a los 6- y 12-meses, los niveles de proteinuria y uCD163 se asociaron con la duplicación de creatinina (Tabla I-9). La persistencia de niveles de uCD163 >370ng/mmol a los 6 y 12 meses, aumentó el riesgo de duplicación de creatinina con un hazard ratio de 2.82 (IC al 95%, 1.11-7.16) y 3.62 (IC al 95%, 1.43-9.20), respectivamente.

Tabla I-9. Análisis de regresión de Cox bivariado para el desenlace de duplicación de creatinina durante el seguimiento.

	Hazard Ratio	IC al 95%	Valor p
Edad, por año	0.95	0.91-0.99	0.039
Hombre, Vs. mujer	2.26	0.53-9.73	0.272
Raza			
Caucásico	1.00	Referencia	Referencia
Mestizo Mexicano	9.09	1.06-78.0	0.044
Afroamericano	5.18	0.53-50.2	0.156
<u>Estudios al momento de la recaída renal</u>			
TFGe, por 10ml/min/1.73m ²	0.84	0.75-0.94	0.002
Proteinuria, por g/g	1.06	0.94-1.19	0.365
Hematuria, Vs. no	1.83	0.53-6.41	0.342
Hemoglobina, por g/dL	0.89	0.74-1.08	0.241
Albúmina, por g/dL	1.21	0.68-2.15	0.511
Anticuerpos dsDNA (+), Vs. no	1.52	0.61-3.80	0.375
Complemento C3, por mg/dL	1.00	0.99-1.02	0.538
Complemento C4, por mg/dL	1.01	0.96-1.06	0.662
Plasma CD163, por 100ng/mL	1.05	0.86-1.27	0.649
Orina CD163, por µg/mmol	1.05	0.99-1.12	0.083
<u>Parámetros histológicos</u>			
Índice de actividad, por punto	1.04	0.95-1.14	0.394
Índice de cronicidad, por punto	1.42	1.20-1.66	<0.001
<u>Laboratorio de seguimiento</u>			
6-meses			
TFGe, por 10ml/min/1.73m ²	0.65	0.56-0.76	<0.001
Proteinuria, por g/g	1.15	1.03-1.28	0.013
uCD163, por µg/mmol	1.19	1.02-1.39	0.031
12-meses			
TFGe, por 10ml/min/1.73m ²	0.63	0.53-0.73	<0.001
Proteinuria, por g/g	1.31	1.15-1.50	<0.001
uCD163, por µg/mmol	1.27	1.12-1.44	<0.001
<u>Parámetros al seguimiento</u>			
6-meses			
uCD163>370ng/mmol	2.82	1.11-7.16	0.029
Proteinuria>0.5g/g	5.65	0.76-42.2	0.092
12-meses			
uCD163<370ng/mmol	3.62	1.43-9.20	0.007
Proteinuria>0.5g/g	7.82	1.73-33.4	0.005
<u>Respuesta al tratamiento a 12 meses</u>			
Respuesta completa	0.09	0.02-0.41	0.002
Respuesta parcial	0.40	0.15-1.09	0.073
Sin respuesta	1.00	Referencia	Referencia

Abreviaturas. TFGe, tasa de filtración glomerular estimada; uCD163, niveles urinarios de CD163.

E. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MARCADOR uCD163

Los estudios de biomarcadores en nefritis lúpica han estado limitados por su diseño transversal, tamaño pequeño, y evaluación en una cohorte única sin una cohorte de validación⁸³. En este estudio, tras evaluar una población de pacientes grande, étnicamente y clínicamente diversa, mediante abordajes transversal y longitudinal, se observó que uCD163 está asociado con la gravedad clínica y actividad histológica de la nefritis lúpica. Además, uCD163 diferenció entre nefritis lúpica activa e inactiva en grupos pre-definidos; y reflejó la respuesta al tratamiento en el seguimiento. En aquellos pacientes con respuesta al tratamiento, uCD163 disminuyó más rápidamente que la proteinuria y los marcadores serológicos. Un valor de uCD163 <370ng/mmol tras el tratamiento de inducción predijo una buena respuesta 6 meses después. En aquellos pacientes con proteinuria persistente tras el tratamiento de inducción, uCD163 identificó a aquellos que desarrollarían una respuesta completa. Importantemente, en contraste con la proteinuria, uCD163 concordó perfectamente con la actividad histológica en muestras repetidas durante el seguimiento.

El biomarcador CD163 deriva de la escisión del receptor CD163 de los macrófagos M2c^{34,84}. Previamente se ha establecido un papel de los macrófagos y la inmunidad innata en la patogénesis de la nefritis lúpica⁸⁵, incluso observándose una asociación entre el grado de infiltración por estos macrófagos y el pronóstico renal^{86,87}.

Estudios más recientes han mostrado que el infiltrado de macrófagos en riñones con nefritis lúpica se compone de células CD163⁺⁶⁹⁻⁷³. Estos macrófagos “polarizados” infiltran los tejidos inflamados supuestamente durante la fase de curación de la inflamación aguda⁶⁷, aunque nuestros datos sugieren más una asociación con las fases inflamatorias agudas. Adicionalmente, análisis transcriptómicos de glomérulos renales han demostrado una expresión aumentada de genes de linaje mieloide en nefritis lúpica, entre ellos, el gen CD163^{72,73,88}.

Se ha demostrado previamente, que los niveles de uCD163 aumentan en diversas enfermedades glomerulares. En vasculitis asociada a ANCA, un corte de 300-350ng/mmol logró diferenciar entre vasculitis renal activa e inactiva con sensibilidad >70% y especificidad >94%^{74,76}. Igualmente, nosotros encontramos un aumento de uCD163 en diversas enfermedades glomerulares activas, sin embargo, los niveles más elevados se encontraron en muestras de pacientes con nefritis lúpica activa.

En pacientes con lupus, un estudio previo demostró que los niveles plasmáticos de CD163 aumentan en pacientes con actividad sistémica, no renal de lupus⁸⁹. Nosotros encontramos que

CD163 aumenta tanto en plasma como orina durante el episodio agudo de nefritis lúpica, sin embargo, solamente los niveles urinarios se asocian con la gravedad clínica y la actividad histológica de la enfermedad. Más aún, uCD163 no se eleva significativamente en los pacientes con actividad extra-renal de lupus, y no correlaciona con los niveles plasmáticos, sugiriendo que uCD163 es un biomarcador específico de inflamación renal.

Los niveles de uCD163 se comportan como un biomarcador histológico que correlaciona con el número de células CD163+ que infiltran el glomérulo. Un estudio previo³⁷ mostró que uCD163 correlaciona con el índice histológico de actividad, lo cual corroboramos e incluso demostramos que existen correlaciones con cada uno de sus componentes. Igualmente encontramos que estas asociaciones son independientes de la proteinuria y el grado de daño renal. Al correlacionar con el grado de inflamación, los niveles de uCD163 también diferenciaron entre las diversas clases histopatológicas, en particular aquellas con gran infiltración de macrófagos (clases III/IV) de aquellas con pobre infiltración (clases II/IV).

Los niveles de uCD163 aumentan de sus valores pre-episodio de nefritis hasta el momento del episodio agudo de nefritis, y posteriormente disminuyen durante el tratamiento, especialmente en los pacientes con respuesta clínica. Los niveles de uCD163 mejoraron al final de la fase de inducción a la remisión, momento en que un nivel de uCD163 <370ng/mmol predijo una respuesta completa al tratamiento a los 12 meses con alta sensibilidad y especificidad. En contraste, la proteinuria mejora lentamente alcanzando su nadir durante la fase de mantenimiento⁹⁰. Por tanto, la medición de uCD163 al final de la fase intensiva de inmunosupresión, puede facilitar la toma de decisiones terapéuticas al discriminar entre pacientes que desarrollarán una respuesta completa de aquellos sin respuesta.

Más aún, uCD163 mostró mejor rendimiento diagnóstico para predecir respuesta al tratamiento en comparación con los marcadores serológicos. Los pocos pacientes sin respuesta al tratamiento con niveles de uCD163 <370ng/mmol fueron pacientes con daño renal avanzado que posteriormente progresaron a enfermedad renal terminal, reflejando sujetos con proteinuria persistente secundaria a daño crónico y no a inflamación activa. Esta observación aún deberá validarse en estudios futuros con biopsias repetidas en este escenario clínico.

La proteinuria ha sido comúnmente utilizada como un marcador de respuesta en nefritis lúpica, así como un subrogado para la remisión de la nefritis lúpica. Sin embargo, se ha demostrado que la respuesta clínica e histológica puede ser discordante, esto es, la presencia de proteinuria no siempre refleja actividad inflamatoria de la enfermedad, y su ausencia no siempre refleja la

resolución de la inflamación renal⁸⁰⁻⁸². Por ello, evaluamos uCD163 en pacientes con biopsias repetidas y demostramos que los niveles de uCD163 reflejan la actividad histológica. En contraste, la proteinuria solamente tiene una concordancia moderada con los hallazgos histológicos en biopsias repetidas.

El punto de corte óptimo para uCD163 aún debe de definirse en otros estudios. La observación que uCD163 disminuyó a cero en 23% de los respondedores, así como la mediana de uCD163 de 2.8 ng/mmol en pacientes con lupus sin actividad renal sugiere que los niveles de uCD163 disminuyen progresivamente hasta niveles indetectables en aquellos pacientes con respuesta al tratamiento, reflejando la resolución completa de la inflamación renal. Un punto de corte temprano y tardío óptimo será determinado por otros desenlaces a largo plazo.

Finalmente, uCD163 puede ser útil en otros escenarios clínicos. Por ejemplo, al intentar disminuir o suspender la inmunosupresión de tratamiento, los niveles de uCD163 pueden identificar de forma no invasiva la presencia de inflamación renal y por tanto, un mayor riesgo de recaída si se suspende o disminuye el tratamiento. Esto sería un punto muy interesante dado que se ha demostrado que aquellos pacientes con inflamación residual tras el tratamiento tienen un riesgo mayor de recaídas⁸².

Como nosotros y otros han demostrado, uCD163 no es específico de nefritis lúpica y sus niveles se elevan en otras enfermedades glomerulares^{37,69,91}. Por ejemplo, uCD163 ha sido propuesto recientemente como un marcador de actividad en vasculitis asociada a ANCA^{76,77}. Por lo tanto, aunque uCD163 es útil para identificar la actividad inflamatoria de la nefritis lúpica, no logra diferenciar entre nefritis lúpica activa y otras enfermedades glomerulares inflamatorias.

La limitación más importante de este estudio es que solamente tuvimos biopsias repetidas de un pequeño porcentaje de pacientes para demostrar que uCD163 refleja actividad histológica así como refleja la actividad clínica. Para introducir uCD163 a la práctica clínica como marcador de respuesta y demostrar su superioridad sobre la proteinuria se requiere un ensayo prospectivo de seguimiento con biopsias renales repetidas.

En conclusión, nuestros datos demuestran que uCD163 refleja la actividad de la nefritis lúpica en cohortes multiétnicas con un tamaño de muestra considerable en nefritis lúpica. Los niveles de uCD163 varían en respuesta al tratamiento de acuerdo a la actividad histológica de la enfermedad. Estas observaciones sugieren que uCD163 puede ser un biomarcador valioso de actividad en nefritis lúpica.

II. EGF (*Epidermal Growth Factor*) urinario: biomarcador de daño crónico en nefritis lúpica

A. RESUMEN DEL ESTUDIO DE ESTE MARCADOR

Introducción. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es una proteína cuyo principal sitio de síntesis en el organismo son los túbulos renales. Estudios en otras enfermedades renales han asociado los niveles de EGF urinario (uEGF) con daño renal crónico.

Objetivo. Evaluar el papel de uEGF como biomarcador de daño renal crónico en nefritis lúpica.

Métodos. Este marcador había sido previamente identificado mediante proteómica urinaria. La expresión de uEGF se caracterizó en dos cohortes multiétnicas de nefritis lúpica. La asociación entre uEGF al momento de la recaída y los desenlaces renales a largo plazo se evaluó en 120 pacientes con seguimiento suficiente. El curso de los niveles de uEGF se evaluó en dos cohortes longitudinales de nefritis lúpica con muestras urinarias repetidas.

Resultados. Los pacientes con nefritis lúpica activa tuvieron niveles de uEGF significativamente menores que pacientes con LEG sistémico activo no renal, pacientes con LEG inactivo y donadores renales. Los niveles de uEGF se correlacionaron inversamente con el índice de cronicidad y sus componentes en la biopsia renal ($r=-0.67$, $p<0.001$). El análisis de supervivencia multivariado mostró que uEGF se asoció con el tiempo a la duplicación de creatinina (HR 0.88, IC al 95% 0.77-0.99, $p=0.045$). Los pacientes que progresaron a DCr y enfermedad renal terminal tuvieron menores niveles de uEGF al momento de la recaída y sus niveles disminuyeron en los meses post-recaída. Un punto de corte de 5.3ng/mg identificó a todos los pacientes que progresaron a ERCT.

Conclusión. Los niveles de uEGF correlacionan con el daño renal histológico crónico. Niveles bajos de uEGF al momento de la recaída o que disminuyen en el seguimiento se asocian con desenlaces renales adversos en nefritis lúpica.

B. INTRODUCCIÓN AL BIOMARCADOR uEGF

Actualmente, no existen otros marcadores en adición a los niveles de creatinina sérica para diagnosticar daño renal temprano y progresivo, así como para predecir el pronóstico de la nefritis lúpica⁸³.

Mediante un análisis de proteómica en escopeta (“shotgun proteomics”) para el descubrimiento de proteínas candidatas a biomarcadores urinarios, observamos niveles disminuidos de la proteína pro-EGF en pacientes con nefritis lúpica en comparación con controles sanos. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es una proteína globular sintetizada en los riñones, específicamente en el asa de Henle y el túbulo contorneado distal⁹²⁻⁹⁴.

Mientras que la proteína EGF está ausente en plasma, es fácilmente detectable en la orina de individuos normales. Los niveles de uEGF correlacionan con la expresión de RNAm de EGF y niveles reducidos de uEGF se han documentado en diversas enfermedades renales⁹³. Los niveles de uEGF reducidos se han asociado con el grado de fibrosis intersticial y daño renal crónico en pacientes con nefropatía IgA⁹⁵⁻⁹⁷, enfermedad renal asociada a diabetes⁹⁸⁻¹⁰⁰, síndrome de Alport¹⁰¹, y otras enfermedades glomerulares^{102,103} y no glomerulares¹⁰⁴.

El objetivo del presente estudio fue diseccionar la relación entre uEGF, histopatología renal y desenlaces renales en pacientes con nefritis lúpica.

C. BREVES ESPECIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA DEL ESTUDIO DE uEGF

Los estudios previos de proteómica urinaria correspondieron a un estudio previo realizado en conjunto con la Universidad Estatal de Ohio. Para este estudio se verificaron los hallazgos del estudio previo en pacientes la Universidad Estatal de Ohio (OSU) y de la Ciudad de México. El comportamiento de los marcadores a través del tiempo se evaluó en dos cohortes prospectivas correspondientes al estudio Ohio SLE Study (OSS) y un subgrupo de pacientes de la cohorte mexicana.

a) Pacientes del Estudio

Para la fase transversal se evaluó uEGF en orinas colectadas pre-procedimiento en pacientes programados para biopsia renal percutánea por nefritis lúpica activa. En todos los casos, se definió nefritis lúpica activa mediante la presencia de depósitos de complejos inmunes y lesiones inflamatorias asociadas de acuerdo a la clasificación de la ISN/RPS⁷⁸.

Para la fase transversal se incluyeron 29 pacientes de OSU y 124 pacientes mexicanos. Se incluyó a 49 pacientes con lupus sin actividad o actividad serológica mínima (SLEDAI < 6 puntos), 22 pacientes con LEG activo no renal (SLEDAI $2k \geq 6$, con 4 puntos debidos a daño orgánico), y 10 donadores renales sanos.

Para la fase longitudinal, se incluyeron 91 pacientes de la cohorte mexicana prospectiva con una mediana de seguimiento de 27 meses (rango 14-44 meses), 23 pacientes con nefritis lúpica activa, y 22 pacientes con lupus activo no-renal de la cohorte del estudio OSS. Esta cohorte tuvo una mediana de seguimiento de 110 meses (rango 56-180 meses). Un subgrupo de 17 pacientes quienes se presentaron con nefritis lúpica activa y tasa de filtración glomerular (TFGe) $< 30 \text{ mL/min/1.73m}^2$ fueron estudiados para evaluar el comportamiento de uEGF durante el daño renal agudo.

Finalmente, para evaluar el coeficiente de variación intra-individuo de la medición de uEGF, se incluyeron 4 muestras de orina obtenidas en los días 0, 7, 28 y 56, de 13 sujetos sanos.

b) Medición de EGF por ELISA

Se utilizó un kit comercial de ELISA (DuoSet DY236, R&D systems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras se diluyeron desde 1:10 hasta 1:200 y se corrieron por duplicado con coeficientes de variación menores del 10% entre un mismo ensayo y distintos ensayos, en ambos centros. Los valores obtenidos de uEGF se normalizaron por niveles urinarios de creatinina (uEGF/Cr). Los valores de uEGF/Cr se transformaron logarítmicamente para los análisis estadísticos.

c) Definición de variables y desenlaces

Todos los datos clínicos se colectaron prospectivamente. Las biopsias renales se clasificaron de acuerdo a los criterios de la ISN/RPS⁷⁸ y los índices de actividad/cronicidad se calcularon de acuerdo a lo descrito^{65,79}.

Los desenlaces renales incluyeron el número de pacientes que desarrollaron 30% de reducción de la TFGe, duplicación de creatinina sérica (DCr) o progresión a enfermedad renal terminal (ERCT). La función renal estable se definió como una TFGe no menor del 80% de la TFGe basal o de la mejor TFGe obtenida dentro de los primeros 12 meses de tratamiento del episodio.

d) Análisis Estadístico

Las variables clínicas al momento de la recaída renal se presentan como número y frecuencia relativa, o mediana y rango intercuartilar. Se obtuvieron correlaciones de Pearson entre uEGF/Cr y las variables histológicas, y en algunos casos (variables ordinales) se calcularon correlaciones de Spearman. Las asociaciones entre los parámetros a la recaída y el tiempo a los desenlaces renales se evaluaron mediante análisis de regresión de Cox.

Para el análisis longitudinal se utilizaron modelos lineales mixtos para evaluar la asociación entre medidas repetidas de uEGF/Cr y desenlaces renales a largo plazo. Los modelos incluyeron log₁₀-EGF/Cr como la variable dependiente; el grupo de desenlace, meses de seguimiento y su interacción, edad, sexo y curso de TFGe en medidas repetidas como efectos fijos; y los sujetos como efectos aleatorios. Las medias estimadas y sus intervalos de confianza al 95% se obtuvieron y graficaron contra el tiempo de seguimiento. El modelo final se diagnosticó mediante la evaluación de la distribución de los residuales estandarizados y la homogeneidad de la varianza residual entre los grupos de desenlace.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 24.0 (IBM, Armonk, NY, EUA) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Se consideraron los valores de $p < 0.05$ como significativos estadísticamente.

D. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL MARCADOR uEGF

a) Asociación entre uEGF, actividad de nefritis lúpica e histología

Se midieron los niveles de uEGF en la muestra de pacientes transversal (Tabla II-1). Los niveles de uEGF/Cr se compararon con pacientes con LEG renal activo no renal (sSLE), pacientes con LEG inactivo o mínimamente activo (iSLE), y donadores renales sanos.

Tabla II-1. Características de los pacientes incluidos en los análisis transversal y longitudinal.

	Análisis Transversal				Análisis Longitudinal	
	NL activa n=153	LEG activo no renal * n=23	LEG inactivo n=49	Donadores renales n=10	NL activa Cohorte Mex n=91	NL activa Cohorte OSS n=28
Edad, años	32 (25-39)	43 (32-49)	43 (32-50)	39 (27-47)	32 (25-40)	32 (27-44)
Mujer, n (%)	137 (90)	22 (96)	46 (94)	6 (60)	85 (93)	25 (89)
Raza, n (%)						
Caucásico	13 (9)	18 (78)	-	-	-	14 (50)
Afroamericano	13 (9)	5 (22)	-	-	-	12 (43)
Mestizo-Mexicano	124 (80)	-	49 (100)	10 (100)	91 (100)	-
Otros	3 (2)	-	-	-	-	2 (7)
Creatinina, mg/dL	1.1 (0.7-2.0)	0.7 (0.6-0.8)	0.7 (0.6-0.8)	0.8 (0.6-1.0)	1.2 (0.7-2.2)	1.1 (0.9-1.6)
TFGe, ml/min/1.73m ²	68 (36-111)	103 (87-122)	104 (89-120)	110 (93-122)	64 (28-109)	74 (43-97)
Proteinuria, g/g	3.2 (1.9-4.9)	0.1 (0.0-0.1)	0.1 (0.1-0.2)	0.0 (0.0-0.1)	3.2 (2.2-5.0)	1.6 (1.0-2.7)
Anticuerpos anti-dsDNA +	116 (76)	20 (91)	36 (74)	-	76 (84)	22 (79)
C3 bajo, n (%)	112 (73)	16 (70)	11 (22)	-	67 (74)	21 (75)
C4 bajo, n (%)	127 (83)	18 (78)	24 (49)	-	78 (86)	22 (79)
SLEDAI-2k, puntos	16 (14-22)	17 (9-24)	0 (0-4)	-	16 (14-22)	22 (18-28)
Biopsia Renal, n (%)						
Clase II	3 (2)	-	-	-	1 (1)	-
Clase III ± V	50 (33)	-	-	-	30 (33)	10 (36)
Clase IV ± V	84 (55)	-	-	-	55 (60)	18 (64)
Clase V	16 (10)	-	-	-	5 (6)	-
Índice Actividad, puntos	4 (1-9)	-	-	-	4 (1-8)	NA
Índice Cronicidad, puntos	4 (3-6)	-	-	-	4 (3-6)	NA

* El grupo de LEG activo no renal también fue incluido en el análisis longitudinal.

Abreviaturas. NL, nefritis lúpica; TFGe, tasa de filtración glomerular estimada.

Los niveles de uEGF/Cr fueron menores en pacientes con nefritis lúpica activa (6.9ng/mg, RIC 3.4-12.2) en comparación con pacientes con LEG sistémico (18.2ng/mg, RIC 10.8-27.5), LEG inactivo (16.6ng/mg, RIC 7.1-22.3) y donadores renales sanos (16.8ng/mg, RIC 16.0-17.9). Dentro de todos estos grupos, uEGF/Cr fue menor en pacientes con historia de nefritis lúpica previa, en comparación con pacientes que nunca habían tenido actividad renal (Figura II-1, Tabla II-2).

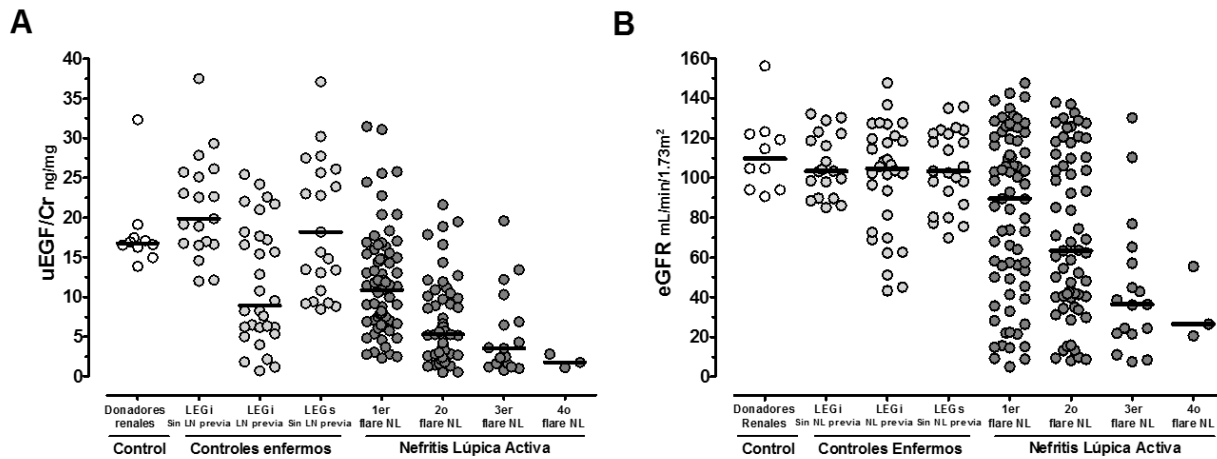


Figura II-1. Niveles urinarios de EGF (A) y TFGe (B) en los grupos de pacientes de acuerdo a su historia previa de actividad renal.

Tabla II-2. Niveles de uEGF/Cr en los grupos de pacientes de acuerdo a su historia previa de actividad renal.

Grupo de Estudio	n	uEGF/Cr ng/mg
Nefritis Lúpica Activa		
Primer episodio de nefritis	71	10.9 (6.7-15.4)
Segundo episodio de nefritis	62	5.3 (2.6-9.3)
Tercer episodio de nefritis	17	3.5 (1.4-8.6)
Cuarto episodio de nefritis	3	1.8 (1.1-2.8)
Lupus inactivo		
Sin actividad renal previa	19	19.9 (16.6-25.7)
Nefritis lúpica previa	30	8.9 (6.0-17.8)
Lupus activo sistémico no renal		
Sin actividad renal previa	23	18.2 (10.8-27.5)
Nefritis lúpica previa	0	-
Donadores renales	10	16.8 (16.0-17.9)

No fue posible detectar EGF en las muestras de plasma de ninguno de estos pacientes. Las diferencias entre el grupo con nefritis lúpica activa, LEG inactivo, LEG sistémico y donadores renales se mantuvieron tras corregir por los niveles de proteinuria. Todo lo anterior sugiere que los niveles urinarios de EGF provienen únicamente del riñón.

Los niveles de uEGF/Cr correlacionaron positivamente con la TFGe al momento de la recaída renal ($r=+0.656$, $p<0.001$), y negativamente con el índice histológico de cronicidad en la biopsia renal (Spearman $r=-0.669$, $p<0.001$) y con todos sus componentes: esclerosis glomerular ($r=-0.539$, $p<0.001$), fibrosis intersticial ($r=-0.654$, $p<0.001$), y atrofia tubular ($r=-0.665$, $p<0.001$) (Figura II-2). En la Tabla II-3 se observa cómo, en el grupo con nefritis lúpica activa, uEGF/Cr disminuye por cada punto de incremento del índice de cronicidad arriba de 1.

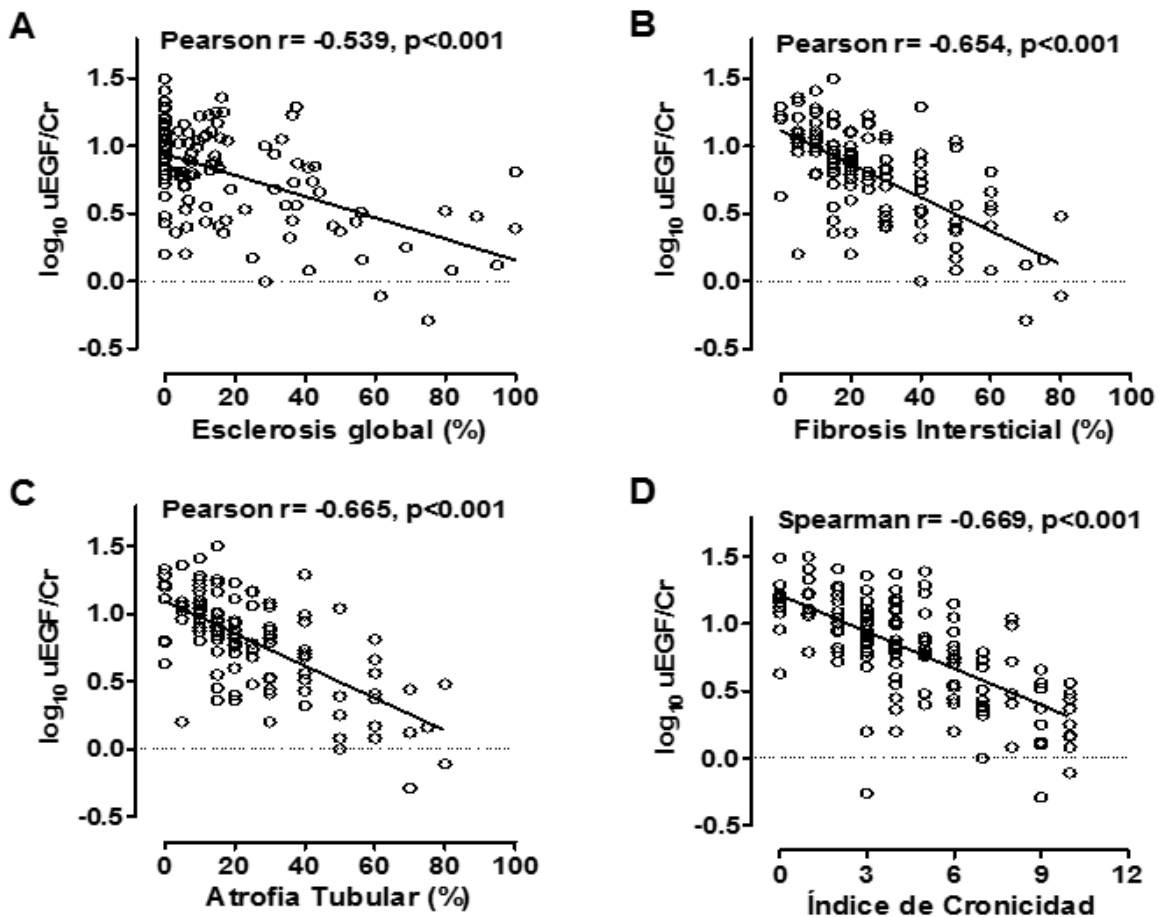


Figura II-2. Correlación entre uEGF y los componentes del índice de cronicidad en biopsias renales de pacientes con nefritis lúpica activa.

Tabla II-3. Niveles de creatinina sérica, TFGe y uEGF/Cr de acuerdo al índice histológico de cronicidad.

Índice cronicidad	Creatinina	TFGe	uEGF/Cr	n
0	0.70 (0.6-0.9)	110 (90-127)	15.5 (13.8-18.1)	9
1	0.63 (0.5-0.9)	130 (91-136)	16.6 (11.8-23.6)	9
2	0.79 (0.6-1.0)	103 (90-128)	10.0 (8.8-16.4)	15
3	0.91 (0.6-1.3)	93 (54-114)	8.9 (7.1-11.8)	28
4	1.21 (0.7-1.7)	58 (38-109)	7.0 (3.5-12.8)	26
5	1.02 (0.7-1.6)	73 (45-111)	7.5 (5.8-11.4)	17
6	1.68 (1.0-2.9)	42 (22-79)	5.4 (3.2-7.3)	14
7	1.96 (1.2-2.4)	40 (29-69)	3.7 (2.3-4.8)	11
8	1.89 (1.3-2.4)	36 (29-60)	4.1 (2.2-7.1)	6
9	2.41 (1.5-4.0)	30 (14-50)	2.1 (1.3-3.6)	8
10	3.81 (2.6-5.1)	16 (11-25)	1.9 (1.4-2.8)	10

b) Asociación entre uEGF al momento de la recaída renal y desenlaces renales

La asociación entre uEGF/Cr durante el episodio de nefritis lúpica y la duplicación de creatinina se evaluó en 120 pacientes con nefritis lúpica activa y más de 12 meses de seguimiento. Estos pacientes fueron tratados con corticosteroides y mofetil micofenolato (65%), ciclofosfamida intravenosa (27%), inhibidor de calcineurina y micofenolato (5%), o azatioprina (3%). Tras una mediana de seguimiento de 26 meses (RIC 17-35), 32 (27%) pacientes duplicaron su creatinina sérica.

Tabla II-4. Factores asociados con el tiempo a la duplicación de creatinina en el seguimiento de pacientes con nefritis lúpica activa.

Parámetro	Univariado			Multivariado		
	HR	IC al 95%	p	HR	IC al 95%	p
Edad, por año	0.95	0.92-0.99	0.017	0.93	0.88-0.98	0.005
Mujer, Vs. hombre	1.51	0.36-6.32	0.571	1.82	0.41-8.19	0.433
TFGe por 10ml/min/1.73m ²	0.79	0.71-0.87	<0.001	1.05	0.92-1.19	0.470*
Proteinuria, por g/g	1.13	1.03-1.25	0.013	0.92	0.82-1.03	0.134
Índice cronicidad, por punto	1.46	1.28-1.65	<0.001	1.19	1.01-1.40	0.040
uEGF/Cr, per ng/mg	0.75	0.67-0.85	<0.001	0.88	0.77-0.99	0.045

En el análisis de regresión de Cox bivariado, la edad, TFGe, proteinuria, uEGF/Cr y el índice histológico de cronicidad se asociaron con el tiempo para duplicación de creatinina. En el análisis multivariado, la edad (HR 0.93, IC al 95% 0.88-0.98), uEGF/Cr (HR 0.88, IC al 95% 0.77-0.99) y el índice histológico de cronicidad (HR 1.19, 1.01-1.40) se asociaron significativamente con el tiempo a la duplicación de creatinina (Tabla II-4). El área bajo la curva dependiente de tiempo de uEGF/Cr para predecir duplicación de creatinina fue de 0.820. Un valor de uEGF/Cr <5.3ng/mg al momento de la recaída tuvo 81% de sensibilidad y 77% de especificidad para predecir duplicación de creatinina en los siguientes dos años.

Para evaluar el efecto aditivo de uEGF/Cr al momento de la recaída y el rendimiento pronóstico de los parámetros clínicos e histopatológicos, se construyeron modelos anidados de regresión de Cox. La adición de uEGF/Cr a todos los modelos evaluados mejoró el ajuste del modelo y la capacidad predictiva (Tabla II-5).

c) Expresión longitudinal de uEGF

Para evaluar el curso de uEGF/Cr en el tiempo, se evaluaron 91 pacientes de la cohorte mexicana quienes tenían orinas repetidas al momento de la recaída renal y a los 6- y 12-meses de seguimiento (Tabla II-1). Tras 27 meses de seguimiento (rango 14-44 meses), 64 (70%) pacientes mantuvieron una función renal estable (dentro del 20% de la TFGe), 23 (25%) duplicaron su creatinina, y 14 (15%) progresaron a enfermedad renal crónica terminal.

Los coeficientes de regresión individuales de \log_{10} -uEGF/Cr correlacionaron positivamente con los coeficientes de regresión individuales de eGFR ($r=0.494$, $p<0.001$) (Figura II-3).

Los valores de uEGF/Cr a la recaída renal, 6 y 12 meses para los grupos con función renal estable y para aquellos que desarrollaron desenlaces renales adversos se muestran en la Tabla II-6. Los niveles de uEGF/Cr empezaron a un nivel más bajo y disminuyeron aún más en pacientes quienes progresaron a desenlaces renales adversos. Interesantemente, uEGF/Cr también disminuyó en los primeros 6 meses posteriores a la recaída renal en pacientes con función renal estable, pero posteriormente se estabilizaron.

Tabla II-5. Comparación de modelos anidados para la predicción del tiempo a la duplicación de creatinina.

	Modelo	Parámetro	HR	IC al 95%	Valor p	Prueba LR	Valor p
M0:	Edad + sexo	Edad, por año	0.95	0.91-0.99	0.012	-	-
		Mujer, vs. hombre	2.00	0.47-8.42	0.347		
M1:	Edad + sexo + proteinuria	Edad, por año	0.95	0.91-0.99	0.014	M1 Vs. M0	0.031
		Mujer, vs. hombre	1.57	0.36-6.76	0.548		
		Proteinuria, por g/g	1.12	1.02-1.24	0.021		
M1':	Edad + sexo + proteinuria + uEGF/Cr	Edad, por año	0.94	0.90-0.98	0.007	M1' Vs. M1	<0.001
		Mujer, vs. hombre	1.79	0.41-7.88	0.442		
		Proteinuria, por g/g	1.09	0.97-1.23	0.139		
		uEGF/Cr, por ng/mg	0.77	0.69-0.87	<0.001		
M2:	Edad + sexo + TFGe	Edad, por año	0.93	0.89-0.98	0.005	M2 Vs. M0	<0.001
		Mujer, vs. hombre	1.88	0.44-8.03	0.397		
		TFGe, por mL/min/1.73m ²	0.79	0.72-0.87	<0.001		
M2':	Edad + sexo + TFGe + uEGF/Cr	Edad, por año	0.93	0.89-0.98	0.003	M2' Vs. M2	<0.001
		Mujer, vs. hombre	2.28	0.53-9.84	0.269		
		eGFR, por mL/min/1.73m ²	0.89	0.79-0.99	0.035		
		uEGF/Cr, por ng/mg	0.83	0.73-0.95	0.005		
M3:	Edad + sexo + proteinuria + TFGe + índice de cronicidad	Edad, por año	0.94	0.89-0.98	0.008	M3 Vs. M0	<0.001
		Mujer, vs. hombre	1.44	0.33-6.38	0.632		
		Proteinuria, por g/g	1.06	0.94-1.20	0.372		
		TFGe, por mL/min/1.73m ²	0.87	0.78-0.98	0.017		
		Índice de cronicidad	1.28	1.09-1.50	0.002		
M3':	Edad + sexo + proteinuria + TFGe + índice de cronicidad + uEGF/Cr	Edad, por año	0.93	0.88-0.98	0.005	M3' Vs. M3	0.019
		Mujer, vs. hombre	1.82	0.41-8.19	0.433		
		Proteinuria, por g/g	1.05	0.92-1.19	0.470		
		TFGe, por mL/min/1.73m ²	0.92	0.82-1.03	0.134		
		Índice de cronicidad	1.19	1.01-1.40	0.040		
		uEGF/Cr, por ng/mg	0.88	0.77-0.99	0.045		

Abreviaturas. TFGe, tasa de filtración glomerular estimada; uEGF/Cr, niveles de EGF urinario corregido por creatinina urinaria.

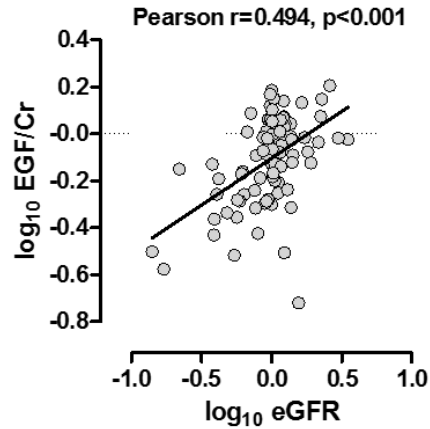


Figura II-3. Correlación entre los coeficientes individuales de regresión de uEGF/Cr y TFGe.

Debido a que el límite inferior del intervalo de confianza al 95% de los niveles de EGF/Cr a los 12 meses de tratamiento fue 5.3ng/mg en pacientes quienes permanecieron con función renal estable en la cohorte Mexicana, este punto de corte fue validado como valor predictivo asociado con la progresión a enfermedad renal terminal en 23 pacientes con nefritis lúpica activa y 28 pacientes con lupus no renal de la cohorte OSS. Como se muestra en la Figura II-4, los 7 pacientes quienes progresaron a enfermedad terminal en esta cohorte tuvieron descensos progresivos de uEGF/Cr a valores menores de 5.3ng/mg. Solamente 3/21 (14%) pacientes que no progresaron a enfermedad renal terminal tuvieron valores de uEGF/Cr menores de 5.3ng/mg en el seguimiento. Todos los pacientes con lupus activo no renal tuvieron valores de uEGF/Cr mayores de 5.3ng/mg.

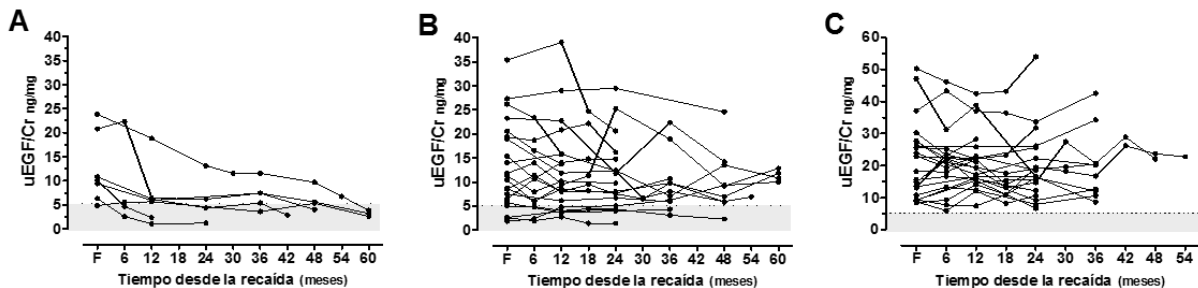


Figura II-4. Niveles de uEGF/Cr en los pacientes de la cohorte longitudinal del estudio OSS.

d) EGF urinario en pacientes con nefritis lúpica grave y lesión renal aguda

Evaluamos a uEGF/Cr en un subgrupo de 17 pacientes de la cohorte longitudinal mexicana quienes se presentaron con un episodio grave de nefritis lúpica y TFGe <30mL/min/1.73m². Todos los pacientes recibieron tratamiento inmunosupresor. Como se muestra en la Figura II-5, aquellos pacientes quienes recuperaron TFGe a un valor mayor de 50mL/min/1.73m², tenían valores significativamente mayores de uEGF/Cr al momento del episodio de nefritis (6.5ng/mg, IC al 95% 4.7-7.8, p=0.001) y durante el seguimiento, que los pacientes quienes no recuperaron función renal y persistieron con una TFGe <30mL/min/1.73m² o incluso progresaron a enfermedad renal terminal (1.8ng/mg, IC al 95% 1.0-3.4ng/mg).

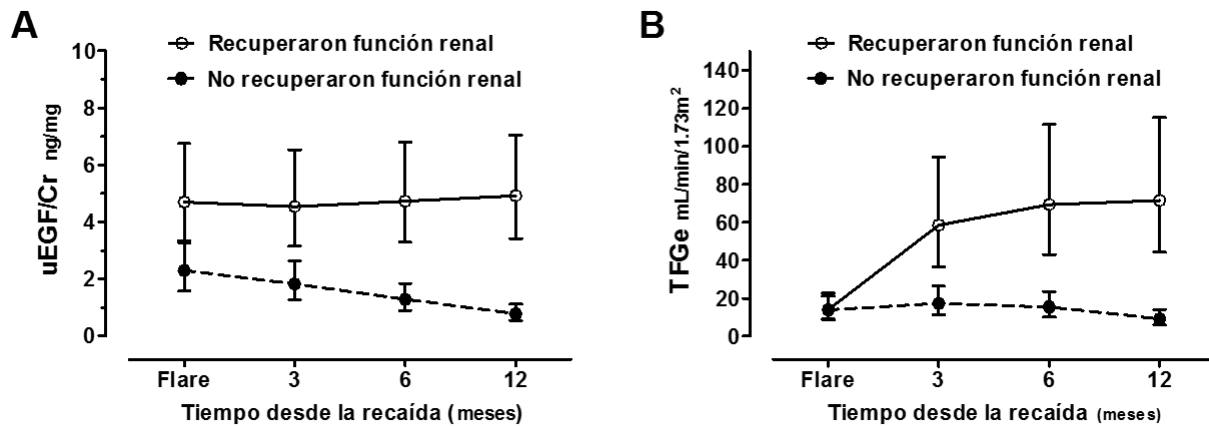


Figura II-5. EGF urinario (A) y TFGe (B) en pacientes quienes se presentaron con TFGe menor de 30mL/min/1.73m² en el episodio agudo de nefritis.

e) Variabilidad de EGF urinario en muestras longitudinales

La mediana del coeficiente de variación intra-individuo de los pacientes con lupus no renal activo de la cohorte OSS fue 11% (rango 8-28%). Para determinar si esta variabilidad intra-individuo representa variabilidad del ensayo o variabilidad biológica, evaluamos uEGF/Cr en 4 muestras urinarias de 13 controles sanos obtenidas en un periodo de 56 días (días 0, 7, 28, 56). La mediana de variabilidad intra-individuo en este grupo fue 10.6% (RIC 8.9%-17.7%, rango 4.0%-28.8%).

5 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL BIOMARCADOR EGF

En este estudio, encontramos que uEGF/Cr deriva de los riñones, correlaciona con el índice histopatológico de cronicidad y sus componentes, y se asocia con el pronóstico renal a largo plazo en pacientes con nefritis lúpica. El curso de uEGF/Cr a través del tiempo refleja el curso de la función renal, por tanto, un valor basal muy bajo o una disminución progresiva de uEGF/Cr están asociados con pérdida progresiva de función renal, con mayor riesgo de desenlaces renales adversos.

La molécula EGF fue originalmente identificada en la década de 1950 como un factor derivado de un pre-pro-proteína^{105,106}. Los valores más elevados de RNAm en el cuerpo se encuentran en los riñones y correlacionan con la excreción urinaria de EGF¹⁰⁷. Mientras tanto, EGF no es detectable en plasma humano^{108,109}. Esta molécula se expresa principalmente por las células epiteliales del asa ascendente gruesa de Henle y el túbulo distal, y su expresión se encuentra reducida en enfermedades renales crónica⁹³, incluyendo la enfermedad renal por diabetes^{99,110}.

EGF urinario no es un biomarcador de función renal específico de nefritis lúpica. Como ha sido reportado en otras enfermedades renales^{95-101,103,104}, encontramos que los niveles de uEGF/Cr correlacionan inversamente con los equivalentes histológicos de daño renal crónico, incluyendo esclerosis glomerular, fibrosis intersticial y atrofia tubular; así como con la combinación de todos ellos en el índice histopatológico de cronicidad. Una relación inversa entre uEGF/Cr y el daño renal crónico también ha sido reportada en múltiples otras cohortes de enfermedades glomerulares (ERCB, C-PROBE, NEPTUNE, PKU-IgAN Consortium), las cuales incluyeron a algunos pacientes con lupus⁹³.

Los niveles de uEGF/Cr al momento del episodio de nefritis se asociaron con la pérdida progresiva de función renal y, al combinarse con otros biomarcadores de función renal como la proteinuria, TFGe, y el índice histopatológico de cronicidad; mejoró la capacidad predictiva de desenlaces renales de estas variables. La asociación de los niveles basales de uEGF/Cr con desenlaces renales adversos también ha sido demostrada en otras enfermedades glomerulares⁹³, síndrome de Alport¹⁰¹ y enfermedad renal por diabetes^{98,99,111}.

Los niveles de uEGF/Cr han sido poco estudiados longitudinalmente. Nosotros demostramos que el curso de uEGF/Cr tras el tratamiento anticipa la función renal subsecuente. Como tal, un valor bajo de uEGF/Cr basal o una disminución progresiva en sus niveles se asocia con pérdida progresiva de la función renal y desenlaces renales adversos. Esto sugiere que uEGF/Cr tendrá un papel como marcador de enfermedad renal crónica en adición a los biomarcadores actuales.

Debido a que uEGF/Cr puede ser medido por ELISA, es fácilmente medible en el laboratorio clínico. Para su uso clínico, nosotros sugeriríamos que uEGF/Cr fuera medido durante el episodio de nefritis, y posteriormente tras la resolución de la nefritis para establecer un valor basal en ausencia de cambios agudos que pueden ocurrir durante la enfermedad activa.

Este marcador podría ser útil en varios escenarios de nefritis lúpica. Para pacientes con un episodio agudo de nefritis y lesión renal agudo, los niveles de uEGF/Cr durante la recaída y su comportamiento posterior pueden diferenciar entre pacientes que recuperarán función renal de aquellos que no lo harán, y por tanto puede influir la selección de tratamiento, su intensidad y su duración. Debido a la propiedad de las nefronas para compensar la pérdida renal por hiperfiltración, las nefronas pueden compensar hasta una pérdida de 40-50% de masa renal sin manifestar cambios en la creatinina sérica o la TFG_e¹¹². Por tanto, uEGF/Cr podría identificar tempranamente a pacientes con daño renal crónico antes que la creatinina sérica se eleve o la tasa de filtración glomerular disminuya.

De igual manera, los pacientes en remisión tras un episodio de nefritis lúpica, frecuentemente tienen daño renal crónico que no es evidente por sus valores de creatinina sérica y TFG_e. El monitoreo seriado de uEGF/Cr en pacientes con lupus inactivo puede proveer datos de daño histológico silente, alertando al clínico que esos pacientes, por ejemplo, puedan requerir monitoreo más frecuente tras exposición a medicamentos nefrotóxicos. Finalmente, la creatinina sérica y la TFG_e no reflejan exactamente la función renal en pacientes con muy baja o muy alta masa muscular. Para esos casos, uEGF/Cr puede dar un valor más exacto del daño renal crónico.

No existen variaciones diurnas en la excreción de uEGF, y su tasa de excreción es parecida al muestrearse en días consecutivos, reforzando la posibilidad de evaluar uEGF en muestras únicas de orina^{113,114}. Sin embargo, es importante notar que la variabilidad intra-individuo puede llegar a ser hasta del 28%. Estos valores han sido reportados para este marcador en estudios de pacientes con enfermedad renal crónica⁹⁵ y nefropatía IgA⁹⁵. Por tanto, en el monitoreo de muestras repetidas en el mismo sujeto, los cambios de uEGF/Cr pueden ser considerados significativos únicamente cuando sean mayores del 30%.

La mayor limitación de este estudio es que no tuvimos biopsias renales repetidas para corroborar la correlación de uEGF/Cr con mayor daño histopatológico renal a través del tiempo. Adicionalmente, el intervalo entre muestras fue muy grande para evaluar adecuadamente la variabilidad específica en pacientes con lupus, aunque suponemos que debe de ser similar a la

observada en individuos sanos. Finalmente, la concordancia interobservador entre los nefropatólogos de ambos centros no pudo ser evaluada.

En resumen, uEGF/Cr es un potencial biomarcador de daño renal. A diferencia de la creatinina sérica que aumenta durante el episodio agudo y podría representar tanto daño agudo como daño crónico, los niveles urinarios de EGF reflejan el grado de daño renal crónico. Por tanto, niveles bajos de uEGF/Cr en el episodio agudo o niveles que disminuyen a través del tiempo se asocian con pobre pronóstico de la función renal.

III. Estudio de Biomarcadores de Activación de la Vía del Complemento en Nefritis Lúpica

A. RESUMEN DEL ESTUDIO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL COMPLEMENTO EN NL

Introducción. Es conocido que la activación de las vías del complemento tiene un papel en la mediación del daño renal inducido por nefritis lúpica. La microangiopatía trombótica (MAT) asociada a la nefritis lúpica es una manifestación rara caracterizada por microtrombosis de vasos renales y activación principalmente de la vía alternativa del complemento.

Objetivo. El objetivo de este estudio fue comparar los niveles séricos y urinarios de fragmentos de activación de la vía del complemento entre pacientes con nefritis lúpica activa (NL_a) y pacientes con NL_a y microangiopatía trombótica aguda asociada (MAT_a+NL_a).

Métodos. Se obtuvieron muestras de plasma y orina de 19 pacientes con MAT_a+NL_a, 19 pacientes con NL_a pareados por índice de actividad histológica, 5 pacientes con microangiopatía trombótica crónica (MAT_c+NL_a), 16 pacientes con nefritis lúpica inactiva (NL_i) y 10 donadores renales sanos. Se midieron los fragmentos del complemento C3a, C4a, C4d, C5a, Ba, C5bC9, y factor H mediante ELISA. Se evaluó la deposición de C4d en el tejido renal por inmunohistoquímica. Se realizó un seguimiento de 12 meses y se re-evaluaron los fragmentos del complemento posterior al tratamiento.

Resultados. Los grupos de MAT_a+NL_a y NL_a tuvieron niveles incrementados en plasma de Ba y C5bC9, y disminuidos de C3, C4, C4a, C4d y factor H. Los niveles urinarios de C3a, C5a, Ba y C5bC9 fueron mayores en pacientes con MAT_a+NL_a que en NL_a. Los niveles urinarios de fragmentos del complemento correlacionaron con el grado de inflamación intersticial, fibrosis intersticial y atrofia tubular. Tras el tratamiento, los niveles de C3, C4 y factor H circulantes aumentaron, mientras que los niveles de C5bC9 disminuyeron. En dos pacientes con episodios repetidos de MAT_a+NL_a, el factor H y C5a urinario disminuyeron, mientras que Ba y C5bC9 aumentaron con el tratamiento tras cada episodio. No se observaron diferencias en depósito de C4d en capilares glomerulares o peritubulares, tubular, o arteriolas entre pacientes con NL_a y MAT_a+NL_a.

Conclusiones. Los niveles circulantes y urinarios de productos de activación del complemento sugieren que el daño en la microangiopatía trombótica asociada a nefritis lúpica está mediado por la vía alternativa del complemento.

Si bien la planeación original de este estudio involucraba fases transversal y longitudinal con los mismos grupos de estudio de nefritis lúpica activa e inactiva que los anteriores marcadores, dos puntos obligaron a modificar substancialmente la metodología: 1) los costos de medición que salían del presupuesto y 2) la observación durante las pruebas que los pacientes con microangiopatía trombótica asociada a lupus tenían niveles muy elevados de fragmentos de activación de la vía alternativa del complemento. Por tanto, este estudio tiene una metodología completamente distinta a lo inicialmente planeado.

B. BREVE INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DEL COMPLEMENTO EN NEFRITIS LÚPICA

La presentación clásica de la nefritis lúpica es una enfermedad mediada por complejos inmunes que se depositan en los diferentes compartimentos renales. Sin embargo, existen presentaciones clínicas raras que conllevan un pronóstico pobre, tales como la microangiopatía trombótica (MAT) asociada a nefritis lúpica¹¹⁵. La prevalencia de la MAT asociada a lupus en estudios de biopsias renales va de 5.4% al 17.6%¹¹⁶⁻¹¹⁸.

La microangiopatía trombótica es un diagnóstico histopatológico secundario a diversas etiologías¹¹⁹. La MAT renal asociada a lupus puede ser secundaria a púrpura trombótica trombocitopénica (TTP-LEG), nefropatía asociada a síndrome antifosfolípidos (NASAF, definida como MAT en el contexto de anticuerpos antifosfolípidos positivos), síndrome urémico hemolítico atípico o MAT mediada por complemento (MAT-MC), hipertensión maligna, enfermedades infecciosas, entre otras¹¹⁹⁻¹²¹.

Los mecanismos subyacentes a la MAT asociada a LEG son poco comprendidos, aunque existe evidencia indirecta de activación del sistema del complemento¹²². El sistema del complemento constituye un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa que puede ser activado por la vía clásica (VC), la vía de las lectinas o la vía alternativa (VA) mediante la ruptura secuencial y el reclutamiento de proteínas, que lleva a la formación del complejo de ataque de membrana, un complejo proteico que promueve la lisis de células no nucleadas y la activación de células nucleadas¹²³. Otros productos, como las anafilotoxinas C3a y C5a, median señales proinflamatorias al endotelio y otras células inflamatorias.

Existe evidencia proveniente de modelos animales que el sistema del complemento participa en la patogénesis de la nefritis lúpica mediada por complejos inmunes, con activación tanto de la vía clásica como de la vía de las lectinas, con posterior reclutamiento de la vía alternativa¹²⁴⁻¹²⁶. En humanos, hay evidencia indirecta de activación mediante el estudio de los fragmentos circulantes del complemento¹²⁷⁻¹³¹ y de la deposición de complemento en los riñones¹³²⁻¹³⁷. Adicionalmente, en estudios previos se ha propuesto que el depósito de C4d en los capilares renales en la MAT asociada a LEG puede considerarse un marcador de esta enfermedad¹³⁸⁻¹⁴⁰.

El objetivo del estudio fue comparar los niveles plasmáticos y urinarios de productos de activación del complemento entre pacientes con MAT-LEG y pacientes con nefritis lúpica activa sin MAT para proveer evidencia indirecta de la patogénesis de la MAT-LEG.

C. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO DE LAS VÍAS DEL COMPLEMENTO EN NEFRITIS LÚPICA

a) Pacientes y controles

Se incluyó prospectivamente a todos los pacientes con LEG y MAT demostrada mediante biopsia renal percutánea atendidos entre Enero de 2015 y Septiembre de 2018. Todos los pacientes cumplieron al menos 4 criterios de diagnóstico de lupus del Colegio Americano de Reumatología (ACR)¹⁴¹.

La MAT renal fue clasificada como activa o crónica en base a criterios histopatológicos¹⁴². Se definió como MATa como la presencia de uno o más trombos de plaquetas obstruyendo el lumen de los vasos con cambios mucoides del espacio subendotelial, engrosamiento y separación de las células endoteliales. La MATc se definió por el predominio de cambios mucoides, lesiones en “piel de cebolla” y dobles contornos de las membranas basales glomerulares (Figura III-1). Como todos los pacientes con MATa o MATc tenían enfermedad concomitante por complejos inmunes, estos grupos se definieron como MATa+NLa y MATc+NLa.

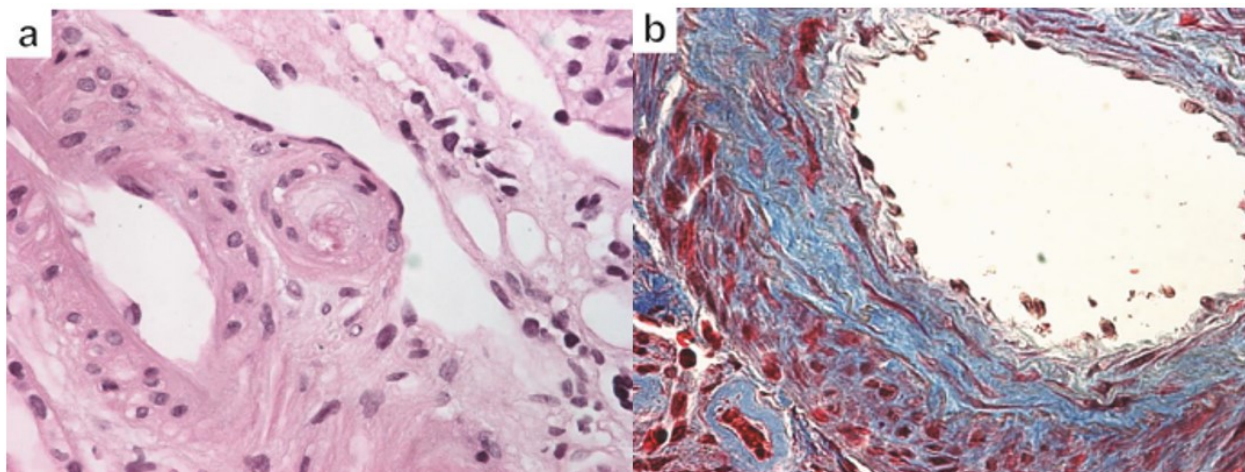


Figura III-1. Imágenes representativas de los cambios utilizados para definir una microangiopatía trombótica aguda (A) y una microangiopatía trombótica crónica (B).

Como controles enfermos, se incluyeron 19 pacientes con nefritis lúpica activa (NLa) pareados por índice de actividad histopatológica con los pacientes del grupo MATa+NLa. Adicionalmente se incluyeron 16 pacientes con nefritis lúpica en remisión (nefritis lúpica inactiva, NLi) definidos por proteinuria <500mg/24h y sedimento urinario normal por al menos 12 meses. Como controles sanos se incluyeron 10 donadores renales.

Se registraron variables clínicas, histopatológicas y de tratamiento. Los tratamientos de inducción a la remisión y mantenimiento fueron definidos por el equipo médico tratante. Todos los pacientes fueron seguidos por más de 12 meses con visitas mensuales durante los primeros 6 meses y cada 3 meses posteriormente. Dos pacientes quienes presentaron dos y tres episodios de MAT aguda, fueron evaluados en cada episodio de MAT aguda y posterior al tratamiento.

b) Clasificación etiológica de microangiopatía trombótica

De acuerdo a los niveles de actividad de la proteína ADAMTS-13 (*A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin type I motif number 13*) y a la serología de anticuerpos antifosfolípidos (AFL), los pacientes se clasificaron en 3 grupos: si la actividad de ADAMTS13 fue <10% se definieron como PTT-LEG; si la actividad de ADAMTS13 fue >10% con una serología AFL positiva, se definieron como NASAF; los pacientes restantes con actividad de ADAMTS13 >10% y serología AFL negativa se clasificaron como MAT-MC una vez que se descartaron otras causas secundarias de MAT (síndrome urémico hemolítico mediado por toxina Shiga, hipertensión maligna, MAT infecciosa, etc.).

c) Evaluación de laboratorio

Se obtuvieron muestras plasmáticas en ayuno y muestras de orina de todos los grupos, excepto en los donadores renales de quienes solamente se obtuvo orina. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente y almacenadas a -70°C. Tras 6 meses de tratamiento se obtuvieron muestras de plasma y orina de 10 pacientes del grupo de MATa+LNa.

Se determinaron niveles de complemento C3, C4, anticuerpos antinucleares, anticuerpos contra DNA de doble cadena (anti-dsDNA), anticuerpos anti-C1q, anticuerpos anti-cardiolipinas, anticuerpos anti-β2 glicoproteína-1 y anticoagulante lúpico. La actividad de ADAMTS13 fue determinada mediante ELISA (*Technozym 5450701, Technoclone GmbH, Viena, AU*) y anticuerpos IgG contra ADAMTS13 mediante ELISA (*Technozym 5450401, Technoclone GmbH, Viena, AU*).

d) Cuantificación de productos de activación del complemento

Los productos de activación del complemento en plasma y orina fueron evaluados mediante ELISA. Se evaluó el fragmento Ba (*Quidel-MicroVue Ba EIA, San Diego, CA*), fragmento C3a (*Quidel-MicroVue C3a EIA, San Diego, CA*), fragmento C4a (*Quidel-MicroVue C4a EIA, San Diego, CA*), fragmento C5a (*Quidel-MicroVue C5a EIA, San Diego, CA*), fragmento C5bC9 soluble (*Quidel-MicroVue sC5bC9 plus EIA, San Diego, CA*) y factor H (*R&D systems DY4779, Minneapolis, MN*). Todos los ensayos se realizaron por duplicado siguiendo las instrucciones del fabricante con coeficiente de variación menor al 8%. La concentración de fragmentos urinarios se corrigió por la concentración de creatinina urinaria.

e) Histopatología Renal

Todas las biopsias renales fueron evaluadas por una nefropatóloga experta y clasificadas de acuerdo al sistema de clasificación de la ISN/RPS⁷⁸. Los índices histopatológicos de actividad y cronicidad fueron calculados como se ha descrito previamente^{65,79}. Los depósitos de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) y complemento (C1a, C3c) en glomérulo, capilares peritubulares, membrana basal tubular y arteriolas se evaluó mediante inmunofluorescencia. La deposición del fragmento C4d del complemento se evaluó mediante inmunohistoquímica y se

definió como positivo o negativo. Un patrón de “casa llena” se definió como aquel que contenía las tres inmunoglobulinas más C3c y C1q.

f) Definiciones de desenlaces

Los grupos de MATa+NLa y NLa fueron seguidos por más de 12 meses y evaluados para tiempo a la progresión a enfermedad renal crónica terminal (ERCT), definida como el requerimiento persistente de terapia sustitutiva renal o trasplante renal.

Otros desenlaces evaluados fueron remisión completa (RC), definida como función renal estable (dentro del 15% del valor basal) y reducción de la proteinuria de 24 horas a menos de 500mgs. Remisión parcial (RP) se definió como función renal estable y reducción del 50% de la proteinuria a niveles subnefróticos. Las recaídas de MAT fueron definidas histológicamente mediante biopsia renal.

g) Análisis Estadístico

La estadística descriptiva se presenta como mediana y rango intercuartilar (RIC). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante Chi-cuadrada o prueba exacta de Fisher, o mediante ANOVA de Kruskal-Wallis con corrección de Dunnett. Se construyeron mapas de calor con los valores transformados a escala z. Se obtuvieron correlaciones entre los niveles de productos de activación del complemento mediante coeficientes de Spearman. Las concentraciones pre- y post-tratamiento de fragmentos del complemento se compararon mediante una t de Student pareada. La respuesta al tratamiento y progresión a ERCT fue evaluada mediante el método de Kaplan-Meier y comparado mediante la prueba log-rango.

Las variables asociadas con progresión a ERCT fueron evaluadas mediante análisis bivariado de regresión de Cox. No se realizó un análisis multivariado debido al pequeño número de eventos de ERCT. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron con SPSS 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY) y GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, La Jolla, CA).

D. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LAS VÍAS DEL COMPLEMENTO EN NEFRITIS LÚPICA

a) Población estudiada

De un total de 262 pacientes con nefritis lúpica diagnosticada por biopsia renal en el período de estudio, 19 (7.3%) pacientes tuvieron MATa+NLa, y 5 (1.9%) pacientes tuvieron MATc+NLa. Todos los pacientes con lupus y el 80% de los donadores renales fueron mujeres. La mediana de edad del grupo MATa fue 29 años (RIC 21-34), con una mediana de 62 meses (RIC 10-81) de diagnóstico de LEG. Como se muestra en la Tabla III-1 y Tabla III-2, los pacientes con MATa+NLa se presentaron con cifras mayores de presión arterial media (123 mmHg [RIC 111-130] Vs. 107 mmHg [RIC 87-110], $p < 0.001$), menor hemoglobina (9.2 g/dL [RIC 7.2-10.5] Vs. 11.9 g/dL [RIC 11.0-13.1], $p < 0.001$), menor cifra de plaquetas (135/mm³ [RIC 96-171] Vs 223/mm³ [RIC 157-280], $p = 0.001$), menor TFGe (15 mL/min/1.73m² [RIC 8-34] Vs. 54 mL/min/1.73m² [36-110], $p = 0.002$), y mayor proteinuria (8.3g/g [RIC 3.9-11.9] Vs. 4.0g/g [RIC 2.7-5.8], $p = 0.034$); en comparación con los pacientes con nefritis lúpica activa. No se observaron diferencias entre positividad para anticuerpos AFL entre los grupos de MATa+NLa y NLa.

Tabla III-1. Datos clínicos de los grupos de pacientes incluidos en el estudio.

Parámetro	NL activa n=19	MAT activa + NL activa n=19	MAT crónica + NL activa n=5	NL inactiva n=16	Donadores renales n=10
Edad, años	30 (25-36)	29 (21-34)	32 (24-44)	34 (26-41)	39 (27-46)
Mujer, n (%)	19 (100)	10 (100)	5 (100)	16 (100)	8 (80)
Meses con LEG	53 (22-89)	62 (10-81)	175 (115-223)	30 (1-70)	-
Presión arterial media, mmHg	107 (87-110)	123 (111-130)	113 (97-153)	89 (83-100)	84 (73-94)
Creatinina, mg/dL	1.3 (0.8-2.4)	3.8 (2.0-5.0)	2.0 (1.3-3.3)	0.7 (0.6-1.5)	0.8 (0.6-0.9)
TFGe, mL/min/1.73	54 (36-110)	15 (8-34)	35 (17-61)	103 (47-127)	112 (96-131)
Albúmina, g/dL	2.3 (1.9-2.9)	2.2 (1.9-2.7)	3.0 (2.3-3.8)	4.3 (3.9-4.5)	4.3 (4.2-4.6)
24h uPCR, g/g·Cr	4.0 (2.7-5.8)	8.3 (3.9-11.9)	3.6 (2.0-9.3)	0.2 (0.2-0.3)	0.0 (0.0-0.0)
Hematuria, n (%)	19 (100)	17 (89)	4 (80)	0 (0)	0 (0)
Anti dsDNA-Ab, UI/dL	259 (84-938)	382 (135-911)	33 (16-654)	8 (5-43)	-
Anti C1q-Ab, UI/dL	10.1 (7.5-16.6)	17.1 (10.1-25.1)	9.8 (6.4-14.6)	6.6 (5.9-6.9)	-
C3, mg/dL	57 (43-72)	42 (34-54)	71 (54-78)	105 (95-124)	-
C4, mg/dL	8 (8-11)	8 (8-10)	11 (10-14)	19 (13-28)	-

Tabla III-2. Evaluación hematológica de los pacientes estudiados.

Parámetro	NL activa n=19	MAT activa + NL activa n=19	MAT crónica + NL activa n=5	Valor p
Hemoglobina, g/dL	11.9 (11.0-13.1)	9.2 (7.2-10.5)	10.9 (8.6-13.5)	<0.001
Plaquetas, per 100/mm ³	223 (157-280)	135 (96-171)	149 (128-251)	0.004
Reticulocitos, %	2.1 (1.3-3.8)	2.3 (1.3-3.1)	3.0 (2.1-3.5)	0.638
Lactato deshidrogenasa, U/L	246 (206-268)	343 (217-379)	315 (203-395)	0.600
>límite referencia*, n (%)	4 (21)	9 (47)	3 (60)	0.164
Haptoglobina, mg/dL	146 (58-204)	40 (10-196)	40 (6-152)	0.079
<límite referencia*, n (%)	3 (16)	8 (42)	2 (40)	0.211
Frotis de sangre, n (%)				0.041
>10 esquistocitos/hpf	0 (0)	1 (5)	0 (0)	
<10 esquistocitos/hpf	1 (5)	7 (37)	3 (60)	
Sin esquistocitos	18 (95)	11 (58)	2 (40)	
Prueba Coombs (+), n (%)	2 (11)	2 (11)	0 (0)	0.189
Actividad de ADAMTS13, %	NA	78 (72-92)	80 (75-87)	0.915
<10%	0 (0)	1 (5)	0 (0)	
>10%	19 (100)	18 (95)	5 (100)	
Acs anti-ADAMTS13, n (%)	NA	2 (11)	0 (0)	1.000
Acs anti-fosfolípidos (+), n (%)	7 (35)	5 (26)	1 (20)	0.683

Todos los valores se expresan como mediana (rango intercuartilar) o n (%)

* Límite superior de referencia para lactato deshidrogenasa es 271U/L. El límite inferior de referencia para haptoglobina es 30mg/dL.

Abreviaturas. NL, nefritis lúpica; MAT, microangiopatía trombótica, Acs, anticuerpos; ADAMTS13, a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif number 13; NA, not available.

b) Clasificación clínica de la microangiopatía trombótica

La evaluación hematológica de los pacientes se muestra en la Tabla III-2. De los 19 pacientes con MATa+NLa, un paciente (5%) tuvo actividad de ADAMTS13 <10% con anticuerpos anti-ADAMTS13 positivos y fue clasificado como PTT-LEG; 4 (21%) pacientes tuvieron actividad de ADAMTS13 >10% y serología AFL positiva y se clasificaron como NASAF; 14 (74%) pacientes tuvieron actividad de ADAMTS13 >10% (mediana 83%, RIC 68-114%) y serología AFL negativa y fueron clasificados como MAT-MC.

No se encontraron diferencias clínicas en la presentación de estos grupos. Para resaltar, aunque todos los pacientes en la MATa+NLa tuvieron MATa comprobada por biopsia renal, solamente 8 (42%) de los pacientes tuvieron esquistocitos en el frotis sanguíneo, 11 (58%) tuvieron haptoglobinas normales, y 10 (53%) tuvieron niveles de lactato deshidrogenasa dentro de los límites de referencia (Tabla III-2).

c) Características histopatológicas

Como se muestra en la Tabla III-3, no se observaron diferencias en los ítems de actividad o cronicidad entre los grupos de MATa+NLa y NLa. Dentro de estos grupos, el 95% de los pacientes tuvieron nefritis lúpica clase IV±V. Los pacientes con MATc+NLa tuvieron menores índices de actividad (mediana 2, RIC 1-10) e índices de cronicidad más altos (mediana 8, RIC 3-10) en la biopsia renal.

Tabla III-3. Características histopatológicas de los pacientes.

Parámetro	NL activa n=19	MAT activa + NL activa n=19	MAT crónica + NL activa n=5	Valor p
Glomérulos	17 (16-22)	17 (14-20)	19 (11-28)	0.864
<u>Ítems de Actividad</u>				
<i>Hiper celularidad endocapilar</i>	53 (38-76)	31 (13-73)	0 (0-15)	0.017
<i>Trombos hialinos</i>	0 (0-0)	0 (0-28)	0 (0-2)	0.170
<i>Asas de alambre</i>	12 (0-28)	14 (0-34)	0 (0-0)	0.037
<i>Necrosis fibrinoide</i>	0 (0-18)	7 (0-16)	0 (0-18)	0.901
<i>Cariorexis</i>	9 (0-18)	9 (0-15)	0 (0-13)	0.462
<i>Leucostasis</i>	43 (18-60)	31 (13-57)	0 (0-20)	0.024
<i>Semilunas celulares</i>	19 (0-28)	14 (8-24)	0 (0-15)	0.166
<i>Inflamación Intersticial</i>	10 (5-20)	20 (15-30)	10 (3-28)	0.004
Índice de actividad	11 (10-13)	11 (9-14)	2 (1-10)	0.119
<u>Ítems de Cronicidad</u>				
<i>Glomérulos esclerosados</i>	12 (4-29)	35 (11-66)	15 (7-70)	0.073
<i>Semilunas fibrosas</i>	9 (0-18)	5 (0-12)	0 (0-2)	0.144
<i>Fibrosis intersticial</i>	15 (10-20)	40 (20-50)	60 (15-70)	0.002
<i>Atrofia tubular</i>	15 (10-20)	40 (20-50)	60 (15-70)	0.003
Índice de Cronicidad	4 (3-5)	6 (5-9)	8 (3-10)	0.007
<u>Clasificación ISN·RPS</u>				
Clase III ± V	1 (5)	1 (5)	1 (20)	0.110
Clase IV ± V	18 (95)	18 (95)	4 (80)	0.110

No se observaron diferencias significativas en el depósito de C4d en los capilares glomerulares, capilares peritubulares, membrana basal tubular o arteriolas entre los grupos con MATa+NLa (Tabla III-4). La inmunohistoquímica para C4d fue positiva en capilares glomerulares en casi todos (con excepción de uno) los pacientes de estos grupos, y se co-depositó con todos los tipos de inmunoglobulinas, sugiriendo activación de C4 secundaria a la enfermedad por complejos inmunes. Más aún, la inmunohistoquímica para C4d positiva en los capilares peritubulares y arteriolas no se co-depositó con inmunoglobulinas ni con el fragmento C1q en la mayoría de los pacientes. Así como en los capilares glomerulares, C4d se co-depositó con inmunoglobulinas en la membrana basal tubular en más de la mitad de los pacientes.

Tabla III-4. Inmunofluorescencia de la biopsia renal y tinción de C4d por inmunohistoquímica.

	NL activa n=13	MAT activa + NL activa n=15	Valor p
Capilares glomerulares			
IHQ C4d positiva	12 (92)	14 (93)	1.000
Inmunofluorescencia			
C3c	13 (100)	15 (100)	1.000
C1q	13 (100)	14 (93)	1.000
IgG	13 (100)	14 (93)	1.000
IgM	13 (100)	12 (80)	0.226
IgA	13 (100)	11 (73)	0.102
Capilares peritubulares			
IHQ C4d positiva	8 (62)	11 (73)	0.689
Inmunofluorescencia			
C3c	0 (0)	1 (7)	1.000
C1q	0 (0)	1 (7)	1.000
IgG	0 (0)	1 (7)	1.000
IgM	0 (0)	1 (7)	1.000
IgA	0 (0)	1 (7)	1.000
Membrana basal tubular			
IHQ C4d positiva	6 (46)	12 (80)	0.114
Inmunofluorescencia			
C3c	9 (69)	10 (67)	1.000
C1q	4 (31)	8 (53)	0.276
IgG	7 (54)	7 (47)	1.000
IgM	1 (8)	1 (7)	1.000
IgA	1 (8)	0 (0)	0.464
Arteriolas			
IHQ C4d positiva	4 (31)	8 (53)	0.276
Inmunofluorescencia			
C3c	4 (31)	4 (27)	1.000
C1q	3 (23)	2 (13)	0.639
IgG	1 (8)	0 (0)	0.464
IgM	1 (8)	0 (0)	0.464
IgA	0 (0)	0 (0)	1.000

Abreviaturas. IHQ, inmunohistoquímica.

d) Proteínas del complemento y productos de activación del complemento en plasma

Los valores de complemento C3 fueron menores en el grupo MATa+NLa (42mg/dL [RIC 34-54]) en comparación con el grupo NLa (57mg/dL [RIC 43-72], $p=0.017$) (Tabla III-5). Ambos grupos tuvieron valores de C3 menores que los grupos con NLi y MATc+NLa.

Tabla III-5. Niveles de productos de activación del complemento en plasma y orina.

	NL Activa n=19	MAT Activa + NL Activa n=19	Valor p
C3 sérico, mg/dL	57 (43-72)	42 (34-54)	0.017
C4 sérico, mg/dL	8 (8-11)	8 (8-10)	0.643
Factor H plasma, $\mu\text{g/mL}$	443 (339-697)	400 (294-473)	0.366
C4a plasma, ng/mL	725 (469-1399)	911 (539-1277)	0.661
C4a orina, ng/mg	26 (9-123)	65 (33-108)	0.255
C4d plasma, $\mu\text{g/mL}$	3.3 (2.4-5.9)	2.8 (2.0-5.0)	0.603
C4d orina, pg/mg	7 (0-29)	11 (8-29)	0.190
C5a plasma, ng/mL	13 (5-25)	15 (12-31)	0.267
C5a orina, ng/mg	1.5 (0.6-2.6)	23 (4-46)	<0.001
Ba plasma, ng/mL	1536 (1080-2080)	3060 (1740-4980)	0.002
Ba orina, ng/mg	119 (51-440)	2267 (804-5013)	<0.001
C5bC9 plasma, ng/mL	1383 (852-1988)	1460 (1030-2574)	0.815
C5bC9 orina, ng/mg	88 (24-265)	375 (143-542)	0.015

Abreviaturas. NL, nefritis lúpica; MAT, microangiopatía trombótica.

Los niveles de factor H del complemento (FHC) se observaron reducidos en los grupos con MATa+NLa (443 $\mu\text{g/mL}$ [RIC 339-697]) y NLa (400 $\mu\text{g/mL}$ [RIC 294-473]). Los niveles del fragmento Ba fueron mayores en MATa+NLa (3060 ng/mL [RIC 1740-4980]) en comparación con el grupo con NLa (1536 ng/mL [RIC 1080-2080], $p=0.002$). Los valores plasmáticos del complemento C4, fragmentos C4a y C4d fueron menores tanto en el grupo MATa+NLa como NLa en comparación con NLi. Los niveles plasmáticos de C5bC9 fueron mayores en los grupos de MATa+NLa y NLa que en el grupo de NLi. No se observaron diferencias en el nivel plasmático de C5a entre los grupos incluidos (Figura III-1, Figura III-2).

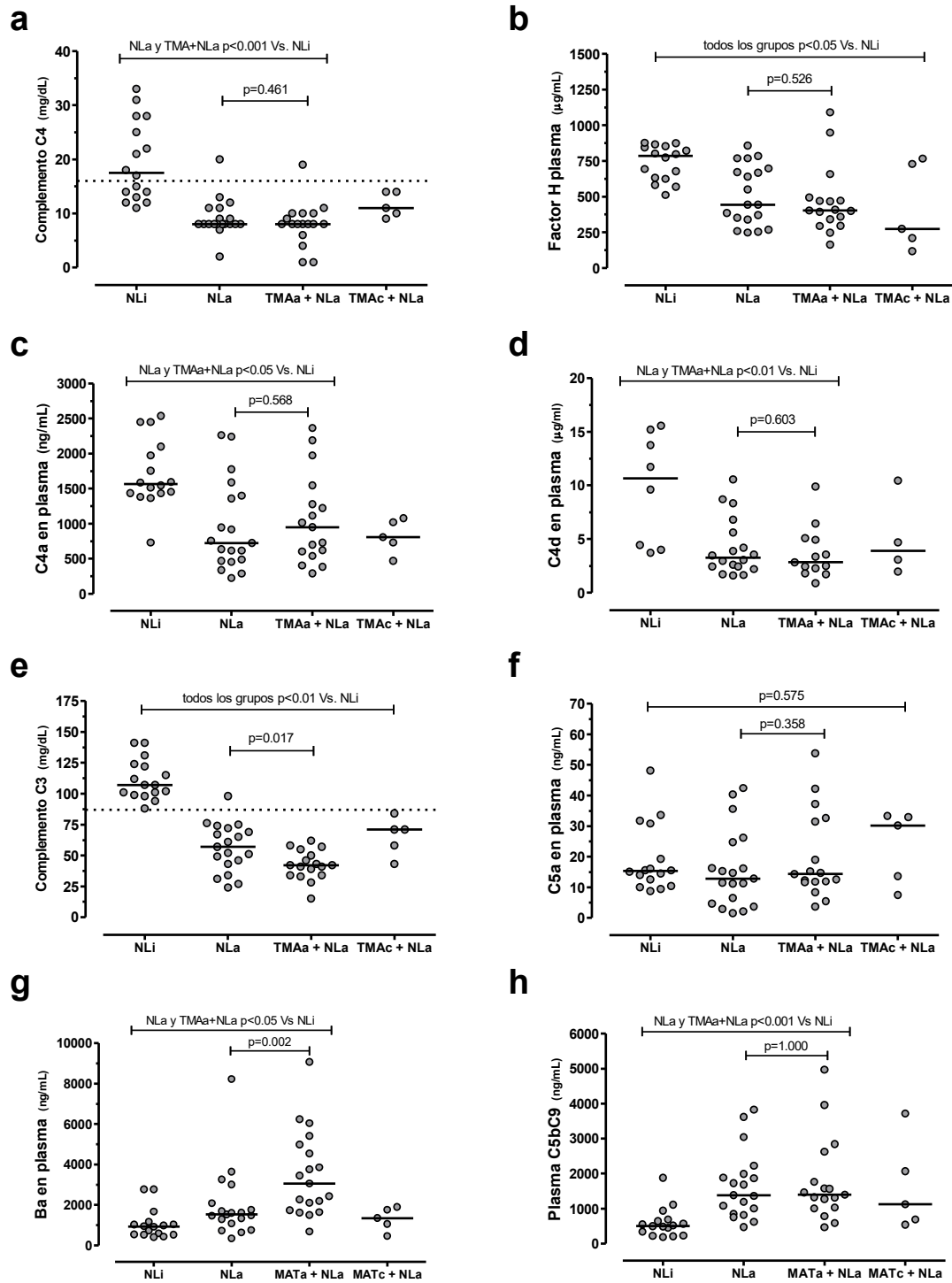


Figura III-1. Fragmentos de activación del complemento en plasma.

Nota. Para cada grupo la línea representa la mediana. La línea punteada representa el límite inferior de los valores de referencia.

Abreviaturas. NLI, nefritis lúpica inactiva; NLa, nefritis lúpica activa; MATa, microangiopatía trombótica activa; MATc, microangiopatía trombótica crónica.

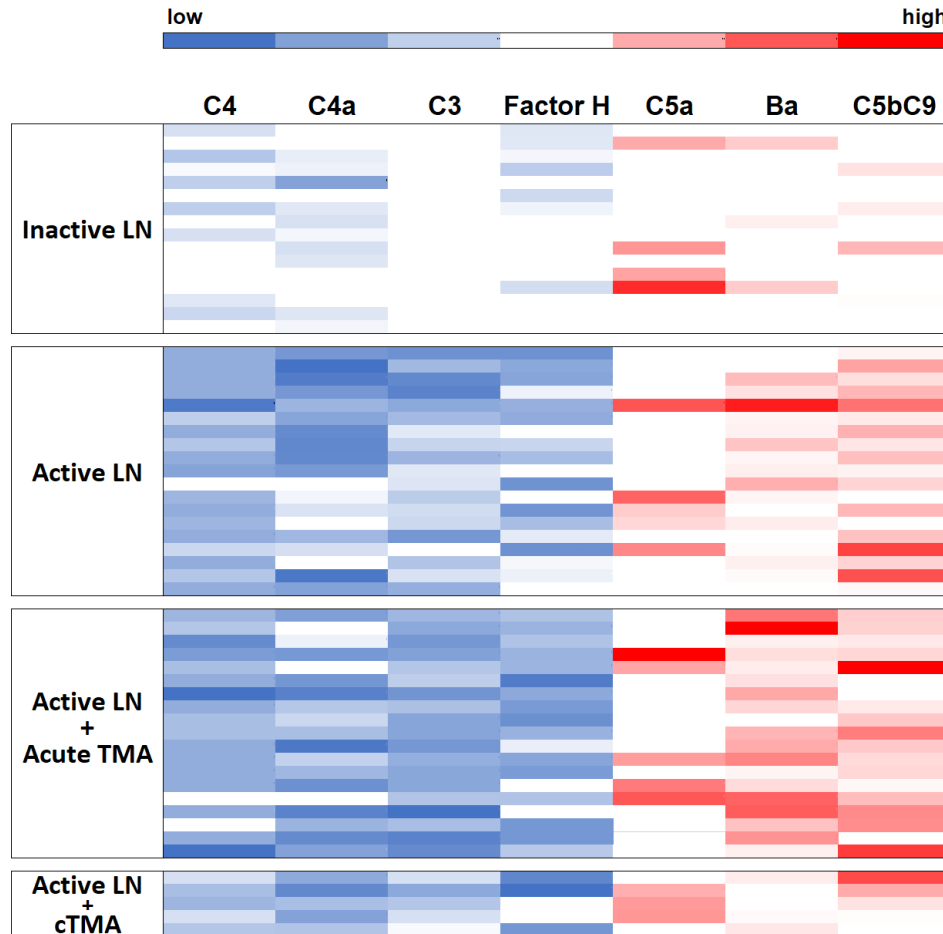


Figura III-2. Mapa de calor muestra los valores individuales (filas) de productos de activación del complemento en plasma en los pacientes de todos los grupos de estudio.

e) Proteínas del complemento y productos de activación del complemento en orina

Los fragmentos del complemento en orina C4a, C5a, Ba y C5bC9 fueron significativamente mayores en los grupos de MATa+NLa y NLa en comparación con NLi y donadores renales (Tabla III-5). El fragmento Ba urinario (2267ng/mg [RIC 804-5013] Vs. 119 ng/mg [RIC 51-440], $p < 0.001$), C5a urinario (23.3 ng/mg [RIC 4.3-45.8] Vs 1.5 ng/mg [RIC 0.6-2.6], $p < 0.001$), fragmento C5bC9 (375ng/mg [RIC 143-542] Vs. 88ng/mg [RIC 24-265], $p = 0.015$), se observaron significativamente mayores en pacientes con MATa+NLa en comparación con NLa, sugiriendo mayor activación de la vía alternativa del complemento en este grupo (Tabla III-5, Figura III-3 , Figura III-4).

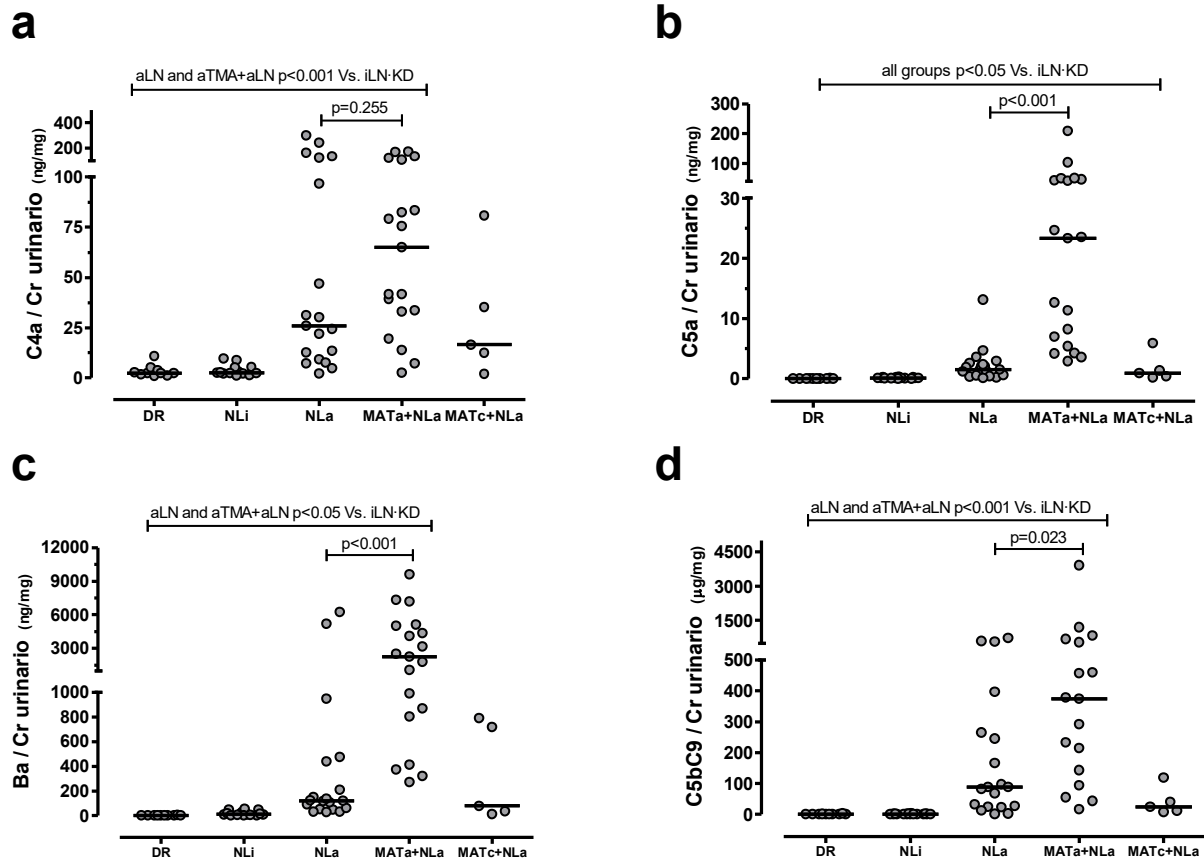


Figura III-3. Fragmentos de activación del complemento en orina.

Nota. Para cada grupo, la línea representa la mediana.

Abreviaturas. DR, donadores renales; NLI, nefritis lúpica inactiva; NLa, nefritis lúpica activa; MATa, microangiopatía trombótica activa; MATc, microangiopatía trombótica crónica.

Los fragmentos urinarios C4a, C5a y Ba, correlacionaron positivamente con el porcentaje de fibrosis intersticial, atrofia tubular, e inflamación intersticial, así como con el índice de cronicidad de la biopsia renal (Tabla III-6).

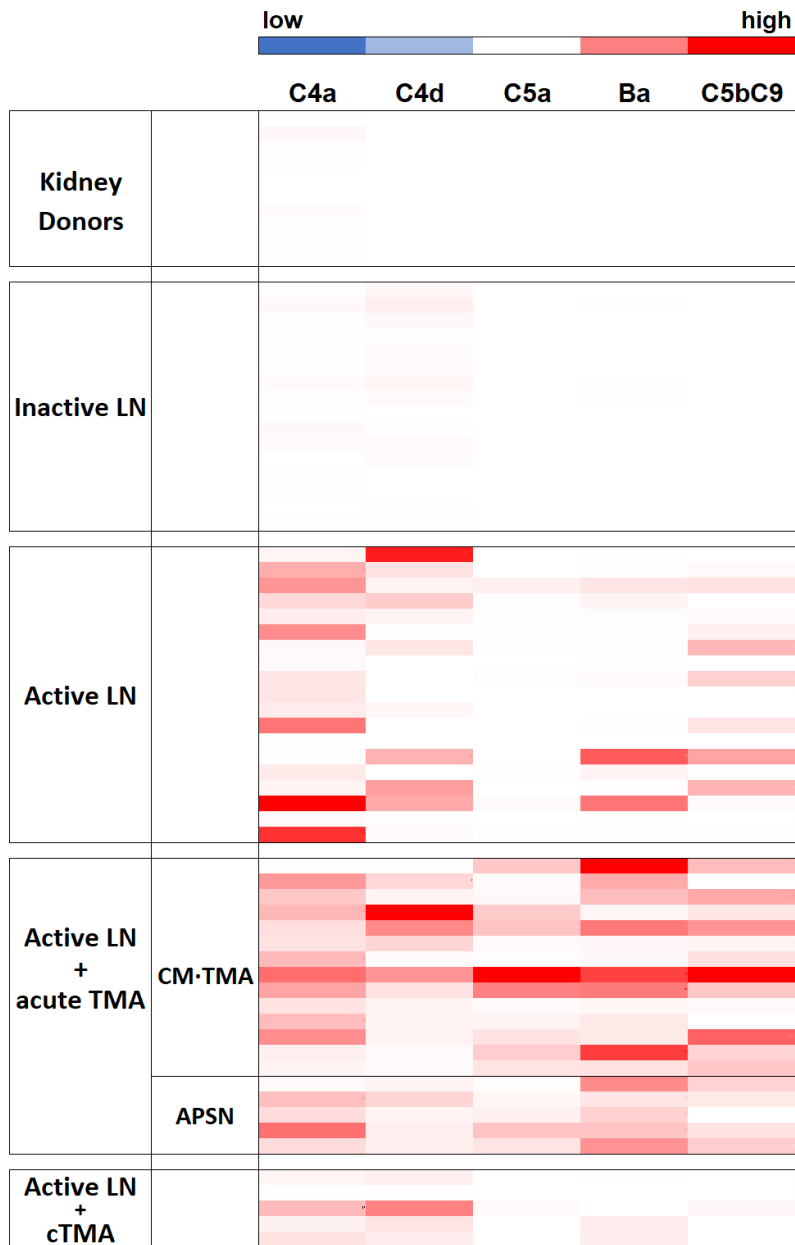


Figura III-4. Mapa de calor muestra los valores individuales (filas) de productos de activación del complemento en orina en los pacientes de todos los grupos de estudio.

Tabla III-6. Correlación entre los productos de activación del complemento en plasma y orina con los hallazgos histopatológicos de la biopsia renal.

	Plasma C4a	Orina C4a	Factor H	Plasma C5a	Orina C5a	Plasma Ba	Orina Ba	Plasma C5bC9	Orina C5bC9
Ítems de Actividad									
Hipercelularidad Endocapilar	r=0.132 p=0.410	r=0.013 p=0.936	r=0.045 p=0.781	r=-0.075 p=0.643	r=-0.143 p=0.371	r=-0.002 p=0.992	r=-0.053 p=0.740	r=-0.071 p=0.661	r=0.055 p=0.738
Trombos hialinos	r=0.149 p=0.351	r=0.150 p=0.350	r=-0.189 p=0.242	r=-0.036 p=0.825	r=0.214 p=0.179	r=-0.037 p=0.820	r=0.218 p=0.172	r=0.168 p=0.293	r=0.111 p=0.494
Asas de alambre	r=0.260 p=0.100	r=0.277 p=0.080	r=0.145 p=0.372	r=-0.011 p=0.946	r=0.191 p=0.233	r=0.112 p=0.487	r=0.340 p=0.030	r=-0.022 p=0.891	r=0.128 p=0.433
Necrosis fibrinoide	r=-0.067 p=0.677	r=-0.211 p=0.186	r=0.038 p=0.818	r=-0.036 p=0.822	r=-0.128 p=0.424	r=-0.081 p=0.614	r=0.166 p=0.299	r=-0.098 p=0.542	r=0.152 p=0.348
Cariorexix	r=-0.114 p=0.480	r=-0.219 p=0.168	r=-0.091 p=0.5778	r=0.104 p=0.516	r=-0.105 p=0.515	r=-0.159 p=0.322	r=0.127 p=0.429	r=0.080 p=0.621	r=0.216 p=0.180
Leucostasis	r=-0.014 p=0.928	r=0.096 p=0.549	r=-0.050 p=0.757	r=-0.152 p=0.341	r=-0.084 p=0.603	r=-0.050 p=0.757	r=-0.151 p=0.346	r=-0.142 p=0.375	r=0.058 p=0.722
Semilunas celulares	r=0.139 p=0.388	r=-0.097 p=0.546	r=-0.101 p=0.535	r=0.006 p=0.972	r=-0.007 p=0.964	r=0.122 p=0.447	r=0.120 p=0.456	r=0.089 p=0.578	r=0.194 p=0.231
Inflamación intersticial	r=0.177 p=0.256	r=0.485 p<0.001	r=0.218 p=0.166	r=0.139 p=0.374	r=0.429 p=0.004	r=0.302 p=0.049	r=0.588 p<0.001	r=-0.208 p=0.181	r=0.278 p=0.074
Índice de Actividad	r=-0.077 p=0.624	r=-0.071 p=0.652	r=-0.051 p=0.748	r=-0.063 p=0.688	r=-0.151 p=0.334	r=-0.047 p=0.763	r=-0.002 p=0.988	r=-0.130 p=0.406	r=0.073 p=0.647
Ítems de cronicidad									
Esclerosis glomerular	r=-0.074 p=0.647	r=0.065 p=0.687	r=0.131 p=0.421	r=-0.078 p=0.628	r=0.244 p=0.124	r=0.223 p=0.161	r=0.402 p=0.009	r=-0.233 p=0.142	r=0.042 p=0.796
Semilunas fibrosas	r=0.172 p=0.283	r=0.118 p=0.463	r=0.184 p=0.255	r=-0.057 p=0.721	r=0.059 p=0.715	r=0.142 p=0.376	r=0.243 p=0.126	r=-0.125 p=0.435	r=0.212 p=0.189
Fibrosis intersticial	r=0.226 p=0.144	r=0.409 p=0.003	r=0.080 p=0.616	r=0.187 p=0.230	r=0.375 p=0.013	r=0.263 p=0.089	r=0.459 p=0.001	r=-0.333 p=0.029	r=0.078 p=0.622
Atrofia tubular	r=0.224 p=0.148	r=0.354 p=0.012	r=0.034 p=0.830	r=0.179 p=0.251	r=0.341 p=0.025	r=0.231 p=0.137	r=0.444 p=0.001	r=-0.343 p=0.024	r=0.086 p=0.589
Índice de Cronicidad	r=0.203 p=0.192	r=0.500 p=0.001	r=0.123 p=0.437	r=0.139 p=0.373	r=0.418 p=0.005	r=0.289 p=0.060	r=0.500 p=0.001	r=-0.273 p=0.076	r=0.148 p=0.349

f) Productos de activación del complemento tras el tratamiento

Se colectó una segunda muestra de plasma y orina a los 6 meses del tratamiento en 10 pacientes con MATa+NLa, tras completar el tratamiento inmunosupresor de inducción a la remisión. El nivel de factor H del complemento mejoró en todos los pacientes desde 381ug/mL (RIC 346-407) hasta 828ug/mL (RIC 710-966, p<0.001). Igualmente, los valores de complemento C3 (48mg/dL [RIC40-57] Vs. 84mg/dL [RIC 69-101], p=0.002), complemento C4 (8mg/dL [RIC 8-9] vs. 15mg/dL [RIC 12-25], p=0.017), y C5bC9 urinario (188ng/mg [RIC 107-357] vs. 2ng/mg [RIC 1-5], p=0.009), mejoraron posterior al tratamiento (Figura III-5, Tabla III-7, Figura III-6). A pesar que los fragmentos C5a y Ba en plasma y orina disminuyeron en la mayoría de los pacientes, en dos de ellos los niveles aumentaron en el seguimiento.

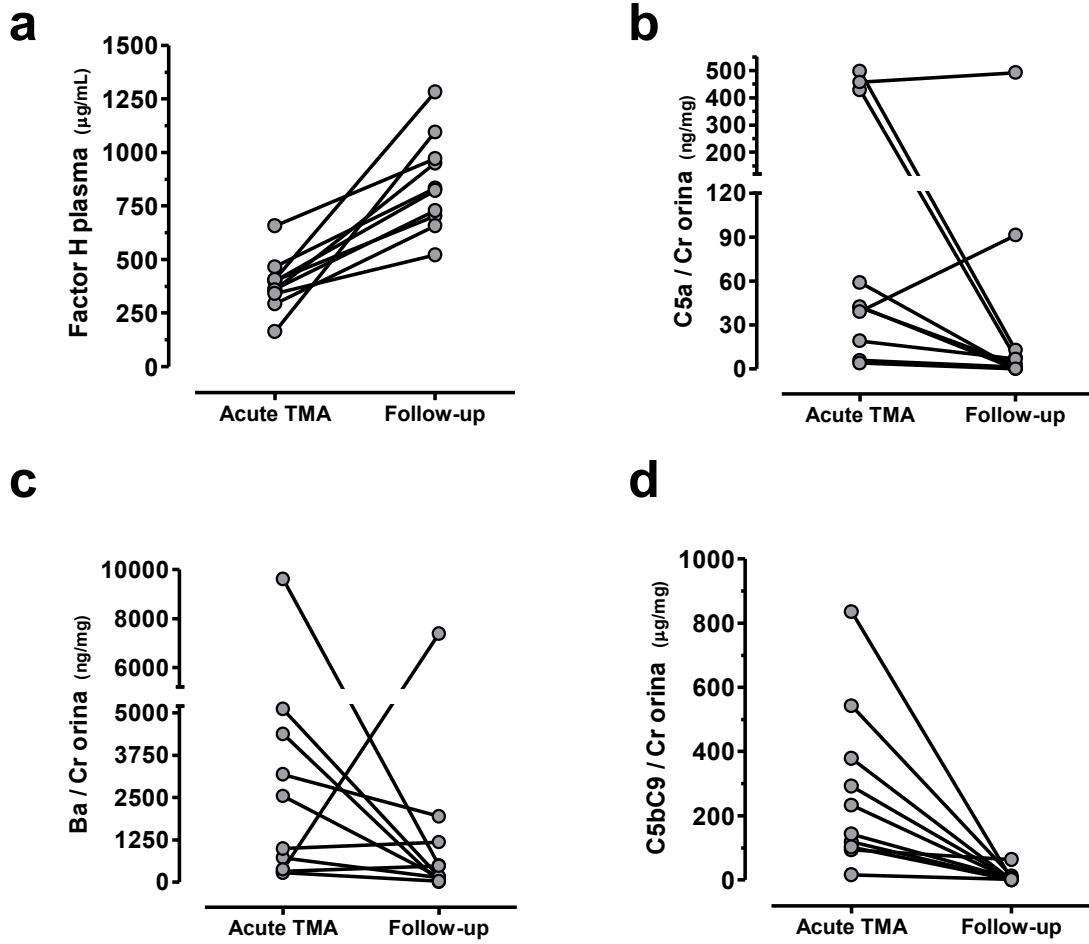


Figura III-5. Niveles de factor H en plasma y de fragmentos urinarios originados en la vía alternativa del complemento durante el episodio de MAT aguda y en el seguimiento.

Tabla III-7. Fragmentos de activación del complemento durante el episodio aguda y en el seguimiento tras el tratamiento.

	MAT aguda n=10	Seguimiento n=10	Valor p
C3 sérico, mg/dL	48 (40-57)	84 (69-101)	0.002
C4 sérico, mg/dL	8 (8-9)	15 (12-25)	0.017
Factor H plasma, µg/mL	381 (346-407)	828 (710-966)	<0.001
C4a plasma, ng/mL	858 (608-1195)	890 (553-1495)	0.866
C4a orina, ng/mg	5.7 (3.3-8.3)	8.0 (3.8-14.9)	0.396
Ba plasma, ng/mL	3095 (2134-4698)	1877 (1167-2380)	0.754
Ba orina, ng/mg	177 (46-408)	32 (14-101)	0.272
C5a plasma, ng/mL	17 (13-32)	10 (6-18)	0.151
C5a orina, ng/mg	4.2 (2.4-33.6)	0.5 (0.0-1.2)	0.139
C5bC9 plasma, ng/mL	1219 (691-1445)	698 (448-1125)	0.171
C5bC9 orina, ng/mg	188 (107-357)	2 (0-5)	0.009

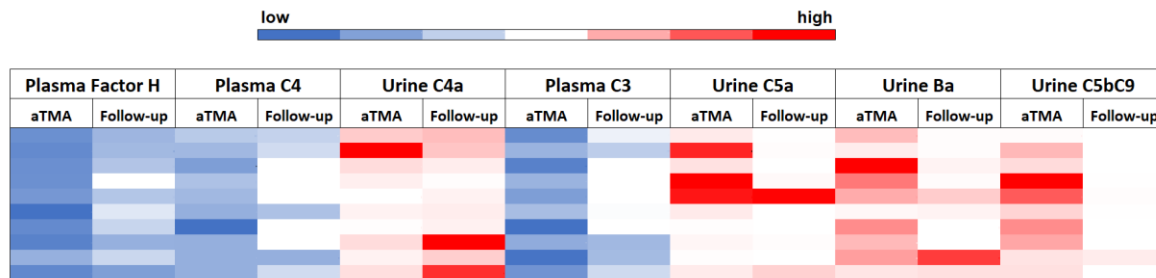


Figura III-6. Mapa de calor mostrando los valores de factor H y fragmentos de activación del complemento al momento del episodio de MAT y al seguimiento tras el tratamiento.

g) Pacientes con episodios repetidos de microangiopatía trombótica

Dos pacientes de la cohorte tuvieron episodios repetidos de MAT en el seguimiento. Como se muestra en la Figura III-7, en ambos casos, los niveles de factor H del complemento mejoraron tras la inmunosupresión y disminuyeron durante los episodios de MAT. Igualmente, C5a, Ba y C5bC9 urinarios aumentaron durante el episodio agudo y después disminuyeron tras recibir tratamiento nuevamente.

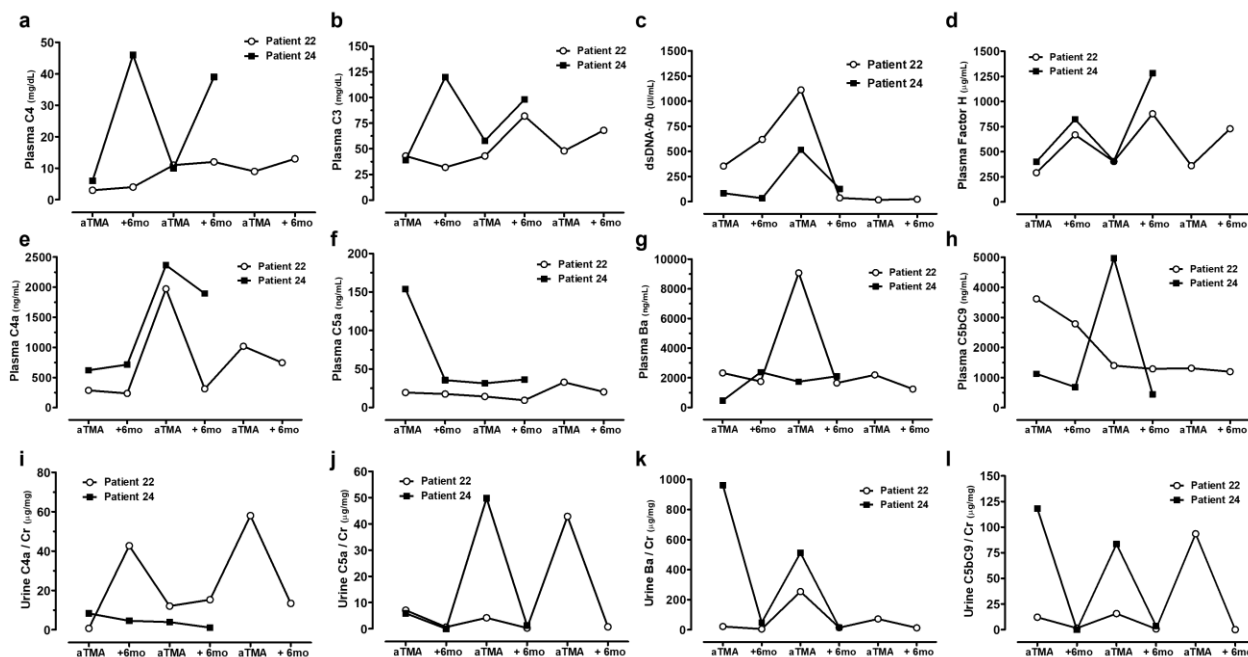


Figura III-7. Comportamiento de los fragmentos del complemento en dos pacientes con episodios repetidos de microangiopatía trombótica.

h) Respuesta al tratamiento y desenlaces a largo plazo

El tratamiento administrado en los grupos con MATa+NLa y NLa se muestra en la Tabla III-8. A los 6 meses, 6 (32%) de los pacientes con MATa+NLa tuvieron respuesta parcial o completa en comparación con 8 (42%) de los pacientes con NLa ($p=0.737$). A los 12 meses, 7 (37%) de los pacientes con MATa+NLa tuvieron respuesta parcial o completa en comparación con 12 (63%) de pacientes con NLa.

Tabla III-8. Tratamientos de inducción a la remisión administrados a los pacientes.

	NL activa n=19	MAT activa + NL activa n=19	MAT crónica + NL activa n=5
Prednisona oral	19 (100)	19 (100)	5 (100)
Pulsos de metilprednisolona	10 (53)	17 (90)	3 (60)
Ciclofosfamida i.v.	6 (32)	14 (74)	1 (20)
Mofetil micofenolato	13 (68)	5 (26)	4 (80)
Recambio plasmático	0 (0)	17 (90)	3 (60)
Hidroxicloroquina	7 (37)	9 (47)	3 (60)
Anticoagulación total	0 (0)	4 (21)	0 (0)

Tras una mediana de seguimiento de 23 meses (RIC 12-48), 12 (32%) pacientes (4 del grupo NLa y 8 del grupo MATa+NLa) progresaron a enfermedad renal terminal (log-rango $p=0.075$) (Figura III-8). En el análisis bivariado de regresión de Cox, los niveles de creatinina sérica a la presentación y todos los ítems histopatológicos de cronicidad (esclerosis glomerular, semilunas fibrosis, fibrosis intersticial y atrofia tubular) se asociaron con progresión a enfermedad terminal. De todos los fragmentos del complemento evaluados, solamente los niveles de Ba urinarios se asociaron con progresión a enfermedad renal terminal (HR 1.204, IC al 95% 1.028-1.410) (Tabla III-9).

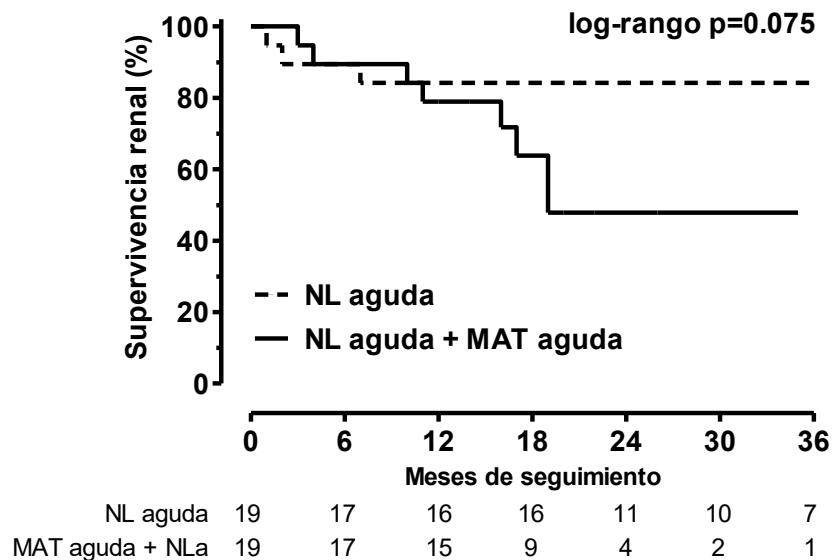


Figura III-8. Análisis de supervivencia para los grupos de MAT aguda y nefritis lúpica aguda.

Tabla III-9. Análisis de regresión de Cox bivariado para factores asociados con el tiempo de progresión a enfermedad renal terminal.

	HR	IC al 95%	Valor p
Parámetros clínicos			
Edad, por año	0.963	0.883-1.051	0.402
Creatinina sérica, por mg/dL	1.396	1.071-1.821	0.014
TFGe, por 10ml/min/1.73m²	0.766	0.594-0.987	0.039
Proteinuria de 24horas, por g/g	1.114	0.966-1.285	0.138
Parámetros histológicos			
Esclerosis glomerular, por 10%	1.310	1.068-1.606	0.009
Semilunas fibrosas, por 10%	1.585	1.071-2.344	0.021
Fibrosis intersticial, por 10%	1.518	1.129-2.039	0.006
Atrofia tubular, por 10%	1.489	1.120-1.979	0.006
Inflamación intersticial, por 10%	1.985	1.234-3.192	0.005
Índice de Actividad, por punto	1.024	0.883-1.188	0.754
Índice de Cronicidad, por punto	1.492	1.180-1.885	0.001
Fragmentos del complemento			
Factor H en plasma, por 100ng/mL	1.222	0.935-1.596	0.141
C4a en plasma, por 100ng/mL	1.014	0.933-1.102	0.349
C4a en orina, por 10ng/mg	1.036	0.952-1.128	0.750
C5a en plasma, por ng/mL	0.988	0.963-1.013	0.340
C5a en orina, por ng/mg	1.007	0.998-1.016	0.146
Ba en plasma, por 100ng/mL	1.018	0.995-1.042	0.124
Ba en orina, por µg/mg	1.204	1.028-1.410	0.021
C5bC9 en plasma, por 100ng/mL	0.987	0.935-1.042	0.640
C5bC9 en orina, por ng/mg	1.041	0.990-1.094	0.114

E. DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO DE LAS VÍAS DEL COMPLEMENTO

La vía del complemento está involucrada en la patogenia de la nefritis lúpica y la microangiopatía trombótica. En este estudio, a través de la medición de los fragmentos de activación del complemento en plasma y orina, se provee evidencia indirecta que tanto la vía clásica como la vía alternativa del complemento están activas en nefritis lúpica. Aún más, en comparación con los pacientes con nefritis lúpica activa, los pacientes que tienen microangiopatía trombótica aguda concomitante tienen mayor activación de la vía alternativa del complemento con la consecuente formación de anafilotoxinas y del complejo de ataque a la membrana. Los productos urinarios de la vía alternativa del complemento están asociados con los ítems histopatológicos de cronicidad en la biopsia renal y los fragmentos disminuyen en respuesta a la terapia inmunosupresora.

El papel de las vías del complemento en la patogénesis de lupus y la nefritis lúpica es complejo¹⁴³. Las deficiencias de los componentes de la vía clásica están asociados con el desarrollo de lupus eritematoso generalizado¹⁴⁴. Aún más, la activación de la vía del complemento por complejos inmunes lleva al desarrollo de la nefritis lúpica, posiblemente a través de la vía clásica y de las lectinas. Ambas vías son posteriormente amplificadas por la vía alternativa¹³⁵. Los ratones deficientes en factor B y D están protegidos para el desarrollo de nefritis lúpica^{124,125}, como también pasa con los ratones con señalización deficiente o bloqueada de las anafilotoxinas C3a y C5a^{126,145,146}.

Los estudios previos han mostrado que los fragmentos del complemento en plasma C4d, Ba, Bb, C4a, C5a y C5bC9 están aumentados en pacientes con nefritis lúpica activa^{127–129,147,148}. En este estudio, los fragmentos plasmáticos Ba y C5bC9 se encontraron aumentados en nefritis lúpica activa en comparación con pacientes inactivos. Sin embargo, los niveles plasmáticos de C5a no fueron distintos entre los grupos con nefritis lúpica activa e inactiva, lo cual puede ser secundario a una unión inespecífica del anticuerpo del ELISA a la proteína C5 y no al fragmento C5a. También observamos que los valores de complemento C4 y sus fragmentos C4a y C4d disminuyen en pacientes con NL activa. Esto contrasta con estudios previos^{128–130} que reportaron valores de C4d mayores en pacientes activos, aunque en uno de esos estudios¹³⁰ también se reportó una correlación negativa entre C4d y C5bC9. Nuestra hipótesis es que debido al enlace tioéster de C4d, el fragmento circulante se une covalentemente a las superficies celulares y, por lo tanto, es rápidamente removido de la circulación. Esto es respaldado por nuestro hallazgo de mayores concentraciones de C4d urinario en pacientes con NL activa.

Debido a que el lupus eritematoso es una enfermedad sistémica, los fragmentos urinarios del complemento podrían reflejar mejor la inflamación renal. En este estudio mostramos con los fragmentos C4a, C4d, C5a, Ba y C5bC9 urinarios están aumentados en pacientes con nefritis lúpica activa. Los fragmentos C4d, C5a y C5bC9 urinarios habían sido reportados como elevados en estudios previos^{129,147,149}.

La microangiopatía trombótica se desarrolla después que un estímulo dañino al endotelio supera la capacidad reguladora de la activación del complemento, con activación y daño mediado por complemento¹⁵⁰. Tanto C5a¹⁵¹ como el complejo de ataque de membrana C5bC9¹⁵² estimulan la expresión del factor tisular en células endoteliales, activando la vía extrínseca de la coagulación. El bloqueo de las anafilotoxinas o de la vía terminal del complemento ha demostrado prevenir trombosis y pérdidas fetales en síndrome antifosfolípido primario (SAF) en modelos animales¹⁵³.

En SAF primario humano, estudios previos han descrito niveles aumentados de C3a y Bb en plasma en comparación con pacientes con otras enfermedades reumáticas distintas al lupus¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Nosotros mostramos que en pacientes con MAT asociada a lupus, Ba plasmático y los fragmentos C5a, Ba y C5bC9 urinarios están incrementados en comparación con pacientes con nefritis lúpica activa por complejos inmunes, sugiriendo que la vía alternativa del complemento participa en la patogénesis de la microangiopatía trombótica asociada a lupus. Reportes de caso de pacientes con MAT asociada a lupus que responden a eculizumab¹⁵⁷ respaldan este hallazgo. Desafortunadamente, este tratamiento no está disponible en nuestro centro, sin embargo, al administrar tratamiento inmunosupresor, observamos que los niveles de fragmentos de la vía alterna del complemento disminuyeron en la mayoría de los pacientes. Interesantemente, en pacientes con episodios repetidos de MAT asociada a lupus, los fragmentos urinarios C5a, Ba, y C5bC9 aumentaron durante los episodios agudos y disminuyeron con el tratamiento.

Otra observación interesante del estudio fue el papel del factor H del complemento. El factor H del complemento es un regulador abundante en plasma que se une a C3b, acelerando la depuración de la convertasa C3 de la vía alternativa del complemento (C3bBb) y actúa como un cofactor del factor I para inactivar al fragmento C3b. La deficiencia de factor H en ratones lleva a una glomerulonefritis acelerada mediada por complejos inmunes^{124,125,158}, y variantes genéticas del factor H han sido asociadas con susceptibilidad para el desarrollo de lupus¹⁵⁹. Como se ha mostrado en estudios previos¹⁶⁰, observamos que los niveles plasmáticos de factor H se reducen en pacientes con nefritis lúpica activa y MAT asociada a lupus, y posteriormente mejoran tras el tratamiento. Al igual que lo observado con los fragmentos urinarios del complemento, los niveles

de factor H disminuyen durante las recaídas y mejoran con el tratamiento en pacientes con enfermedad recidivante.

A nivel tisular, el fragmento C4d ha sido utilizado como un biomarcador indirecto de la activación de las vías clásica y de las lectinas¹⁶¹. Los depósitos glomerulares de C4d se observan frecuentemente en MAT de distintas etiologías¹⁴⁰ y ha sido propuesto como un indicador de MAT en nefritis lúpica¹³⁸. Sin embargo, los depósitos glomerulares de C4d se observan en 46-100% de los pacientes con nefritis lúpica sin MAT, y su intensidad correlaciona con la extensión del depósito de complejos inmunes^{133,136,137}. Nosotros observamos que el depósito de C4d tanto en pacientes con MAT aguda y pacientes con exclusivamente nefritis lúpica, sugiriendo que el depósito glomerular de C4d es secundario a la actividad de la enfermedad mediada por complejos inmunes y no un indicador específico de MAT asociada a lupus. Igualmente, observamos depósitos de C4d en las membranas basales tubulares, capilares peritubulares y arteriolas de los grupos con MAT agudo y con nefritis lúpica activa exclusiva.

Finalmente, como ha sido reportado en otros estudios, se observó una peor respuesta al tratamiento y peor pronóstico en pacientes con MAT asociada a lupus en comparación con nefritis lúpica activa. En el análisis bivariado, el nivel urinario de Ba se asoció con el pronóstico renal, un hallazgo también descrito en un estudio previo de nefritis lúpica activa¹³⁰.

El presente estudio tiene limitaciones. Debido a la rareza de la enfermedad, el tamaño de muestra no fue suficiente para tener un poder estadístico adecuado para múltiples comparaciones y para análisis multivariados. La detección de fragmentos plasmáticos y urinarios del complemento proveen únicamente evidencia indirecta de activación del complemento y, debido a la cantidad limitada de tejido renal, no fue posible demostrar la deposición de estos fragmentos en el tejido renal. Como se mencionó, tampoco se realizaron estudios funcionales o genéticos del complemento, y el tratamiento con inhibidores del complemento no estuvo disponible para evaluar sus efectos.

En conclusión, en este estudio proveemos evidencia indirecta que la nefritis lúpica activa está asociada con activación del complemento tanto por la vía clásica como por la vía alternativa. Sin embargo, la microangiopatía trombótica concomitante a la nefritis lúpica activa está probablemente mediada por la vía alternativa del complemento.

IV. Otros Biomarcadores descartados por su pobre utilidad diagnóstica

Los siguientes marcadores no tuvieron el rendimiento diagnóstico esperado o no pudieron ser medidos apropiadamente en orina durante la fase transversal de estudio:

- a) CXCL-1 como marcador de activación de neutrófilos
- b) CD40LG como marcador de co-estimulación y reclutamiento de células B
- c) IL-18 y CD44 como marcadores de reclutamiento de células T
- d) Proteína NEP (neprilisina) como marcador de daño tubular
- e) Proteína FN1 (fibronectina-1) como marcador de daño fibrótico

10. CONCLUSIONES FINALES DEL ESTUDIO

Si bien inicialmente planeado como un solo proyecto de biomarcadores urinarios, este proyecto se compone de diversos estudios, en específico uno por cada biomarcador, que buscan objetivos diversos.

Por una parte se lograron identificar marcadores clínicos con potencial para diferenciar entre pacientes con nefritis lúpica activa, de aquellos con daño renal crónico. Estos últimos incluso potencialmente permitirán identificar tempranamente daño renal temprano con mayor sensibilidad que la creatinina sérica, nuestro marcador de función renal actual.

Por otra parte, el estudio de otros biomarcadores tuvo un giro hacia un valor más de descubrimiento de fisiopatogenia del daño renal en la nefritis lúpica, y en particular en la manifestación de microangiopatía trombótica.

El estudio ha derivado en una línea completa de investigación en el campo de biomarcadores y continuará su desarrollo en los próximos años, con la intención de generar cambios en el pronóstico renal de pacientes con lupus eritematoso generalizado en nuestro país.

11. REFERENCIAS

1. Fors Nieves CE, Izmirly PM. Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review. *Current Rheumatology Reports* 2016; 18: 21.
2. Pons-Estel BA, Catoggi 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: 1–17.
3. Yurkovich M, Vostretsova K, Chen W, et al. Overall and Cause-Specific Mortality in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014; 66: 608–616.
4. Parikh S V., Rovin BH. Current and Emerging Therapies for Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2016; 1–11.
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: 1432–1441.
6. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 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: 1215–1226.
8. Wofsy D. Treatment of lupus nephritis with abatacept: the Abatacept and Cyclophosphamide Combination Efficacy and Safety Study. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2014; 66: 3096–3104.
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: 2368–2379.
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: S1239–S1239.
11. Rovin BH, Dooley MA, Radhakrishnan J, et al. The impact of tabalumab on the kidney in systemic lupus erythematosus: results from two phase 3 randomized, clinical trials. *Lupus* 2016; 25: 1597–1601.

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: 3918–3930.
13. BII023 Proof-of-Concept Study in Participants With Lupus Nephritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01499355> (accessed 30 March 2020).
14. Thanarajasingam U, Niewold TB. Sirukumab : a novel therapy for lupus nephritis? *Expert Opin Investig Drugs* 2014; 23: 1449–55.
15. Banchereau R, Hong S, Cantarel B, et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell*. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.008.
16. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity* 2003; 19: 225–234.
17. Gallagher KME, Lauder S, Rees IW, et al. Type I Interferon (IFN) Acts Directly on Human Memory CD4+ T Cells Altering Their Response to Antigen. *J Immunol* 2009; 183: 2915–2920.
18. Ramos HJ, Davis AM, Cole AG, et al. Reciprocal responsiveness to interleukin-12 and interferon- γ specifies human CD8 α effector versus central memory T-cell fates. *Blood* 2009; 113: 5516–5525.
19. Clark MR, Trotter K, Chang A. The Pathogenesis and Therapeutic Implications of Tubulointerstitial Inflammation in Human Lupus Nephritis. *Semin Nephrol* 2015; 35: 455–464.
20. Mejia-Vilet JM, Parikh S V, Song H, et al. Immune gene expression in kidney biopsies of lupus nephritis patients at diagnosis and at renal flare. *Nephrol Dial Transplant*. Epub ahead of print 25 May 2018. DOI: 10.1093/ndt/gfy125.
21. Mie Jourde-Chiche N, Whalen E, Gondouin B, et al. Modular transcriptional repertoire analyses identify a blood neutrophil signature as a candidate biomarker for lupus nephritis. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1093/rheumatology/kew439.
22. Peterson KS, Huang JF, Zhu J, et al. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest*. Epub ahead of print 2004. DOI: 10.1172/JCI200419139.
23. Parikh S V, Malvar A, Song H, et al. Characterising the immune profile of the kidney biopsy at lupus nephritis flare differentiates early treatment responders from non-responders. *Lupus Sci Med* 2015; 2: e000112.

24. Parikh S V., Malvar A, Song H, et al. Molecular imaging of the kidney in lupus nephritis to characterize response to treatment. *Transl Res*. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.10.010.
25. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993; 7: 1475–82.
26. Yamamoto K, Ikeda Y, Masuko K, et al. High frequencies of identical T-cell clonotypes accumulating in different areas of synovial lesions of rheumatoid arthritis patients. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 756: 208–10.
27. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, et al. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 1999; 162: 1024–31.
28. Okada H, Moriwaki K, Konishi K, et al. Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 498–506.
29. Wong CK, Lit LCW, Tam LS, et al. Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005; 44: 602–606.
30. Kitagori K, Yoshifuji H, Oku T, et al. Cleaved Form of Osteopontin in Urine as a Clinical Marker of Lupus Nephritis. *PLoS One* 2016; 11: e0167141.
31. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 2009; 113: 887–892.
32. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409: 198–201.
33. Møller HJ, Nielsen MJ, Maniecki MB, et al. Soluble macrophage-derived CD163: A homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin–hemoglobin binding. *Immunobiology* 2010; 215: 406–412.
34. Schaer DJ, Schleiffenbaum B, Kurrer M, et al. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. *Eur J Haematol* 2005; 74: 6–10.
35. Zhao L, David MZ, Hyjek E, et al. M2 Macrophage Infiltrates in the Early Stages of ANCA-Associated Pauci-Immune Necrotizing GN. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10: 54–62.
36. O'Reilly VP, Wong L, Kennedy C, et al. Urinary Soluble CD163 in Active Renal Vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 2906–16.
37. Endo N, Tsuboi N, Furuhashi K, et al. Urinary soluble CD163 level reflects glomerular inflammation in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 1–11.

38. Rovin BH, Phan LT. Chemotactic factors and renal inflammation. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 1065–84.
39. Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- κ B activation. *Kidney Int* 1998; 53: 1608–1615.
40. Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, et al. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2555–2566.
41. Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, et al. MIP-1 α and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 56: 995–1003.
42. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest* 1995; 73: 804–9.
43. Tesar V, Masek Z, Rychlík I, et al. Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1662–7.
44. Tsai CY, Wu TH, Yu CL, et al. Increased Excretions of β_2 -Microglobulin, IL-6, and IL-8 and Decreased Excretion of Tamm-Horsfall Glycoprotein in Urine of Patients with Active Lupus nephritis. *Nephron* 2000; 85: 207–214.
45. Rovin BH. Urine Chemokines as Biomarkers of Human Systemic Lupus Erythematosus Activity. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 467–473.
46. Guo Y, Walsh AM, Fearon U, et al. CD40L-Dependent Pathway Is Active at Various Stages of Rheumatoid Arthritis Disease Progression. *J Immunol* 2017; 198: 4490–4501.
47. Javierre BM, Richardson B. A new epigenetic challenge: systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 2011; 711: 117–36.
48. Goules A, Tzioufas AG, Manousakis MN, et al. Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2006; 26: 165–171.
49. Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, et al. Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: An open-label trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 501–513.
50. Chavarot N, Verhelst D, Pardon A, et al. Rituximab alone as induction therapy for membranous lupus nephritis: A multicenter retrospective study. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e7429.
51. Wu CY, Yang HY, Yao TC, et al. Serum IL-18 as biomarker in predicting long-term renal outcome among pediatric-onset systemic lupus erythematosus patients. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e5037.

52. Jafari-Nakhjavani MR, Abedi-Azar S, Nejati B. Correlation of plasma interleukin-18 concentration and severity of renal involvement and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Nephropathol* 2016; 5: 28–33.
53. Yung S, Chan TM. The Role of Hyaluronan and CD44 in the Pathogenesis of Lupus Nephritis. *Autoimmune Dis* 2012; 2012: 1–9.
54. Wu C, Thalhamer T, Franca RF, et al. Galectin-9-CD44 Interaction Enhances Stability and Function of Adaptive Regulatory T Cells. *Immunity* 2014; 41: 270–282.
55. Noris M, Remuzzi G. Genetics of Immune-Mediated Glomerular Diseases: Focus on Complement. *Semin Nephrol* 2017; 37: 447–463.
56. Trouw LA, Pickering MC, Blom AM. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13: 538–547.
57. Manzi S, Rairie JE, Carpenter AB, et al. Sensitivity and specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1178–88.
58. Di Lullo L, Ronco C, Bellasi A, et al. [Neprilysin inhibition and chronic kidney disease]. *G Ital Nefrol* 2017; 34: 102–112.
59. Ronco P, Debiec H. Membranous nephropathy: A fairy tale for immunopathologists, nephrologists and patients. *Mol Immunol* 2015; 68: 57–62.
60. Baelde HJ, Eikmans M, van Vliet AI, et al. Alternatively spliced isoforms of fibronectin in immune-mediated glomerulosclerosis: the role of TGF β and IL-4. *J Pathol* 2004; 204: 248–257.
61. Soliman S, Mohan C. Lupus nephritis biomarkers. *Clin Immunol*. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.clim.2016.08.001.
62. Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies — quintessential biomarkers of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 12: 1–9.
63. Okamura M, Kanayama Y, Takeda KT, et al. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann of the Rheum Dis Rheum Dis* 1993; 52: 14–20.
64. Ramirez-Sandoval JC, Barrera-Chimal J, Simancas PE, et al. Tubular urinary biomarkers do not identify aetiology of acute kidney injury in kidney transplant recipients. *Nephrology* 2014; 19: 352–358.
65. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, et al. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. *Am J Med* 1983; 75: 382–391.

66. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004; 65: 521–530.
67. Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 2011; 80: 915–925.
68. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol* 2017; 79: 541–566.
69. Li J, Liu CH, Xu DL, et al. Significance of CD163-Positive Macrophages in Proliferative Glomerulonephritis. *Am J Med Sci* 2015; 350: 387–392.
70. Li J, Yu YF, Liu C-H, et al. Significance of M2 macrophages in glomerulonephritis with crescents. *Pathol - Res Pract* 2017; 213: 1215–1220.
71. Olmes G, Büttner-Herold M, Ferrazzi F, et al. CD163+ M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 90.
72. Mejia-Vilet JM, Parikh S V, Song H, et al. Immune gene expression in kidney biopsies of lupus nephritis patients at diagnosis and at renal flare. *Nephrol Dial Transplant*. Epub ahead of print 25 May 2018. DOI: 10.1093/ndt/gfy125.
73. Arazi A, Rao DA, Berthier CC, et al. The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis. *Nat Immunol* 2019; 20: 902–914.
74. O'Reilly VP, Wong L, Kennedy C, et al. Urinary Soluble CD163 in Active Renal Vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 2906–16.
75. Kitagawa A, Tsuboi N, Yokoe Y, et al. Urinary levels of the leukocyte surface molecule CD11b associate with glomerular inflammation in lupus nephritis. *Kidney Int* 2019; 95: 680–692.
76. Dekkema GJ, Abdulahad WH, Bijma T, et al. Urinary and serum soluble CD25 complements urinary soluble CD163 to detect active renal anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: a cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. Epub ahead of print 1 March 2018. DOI: 10.1093/ndt/gfy018.
77. Moran SM, Monach PA, Zgaga L, et al. Urinary soluble CD163 and monocyte chemoattractant protein-1 in the identification of subtle renal flare in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. Epub ahead of print 31 October 2018. DOI: 10.1093/ndt/gfy300.
78. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004; 65: 521–30.
79. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney Int* 2018; 93: 789–796.

80. Alvarado AS, Malvar A, Lococo B, et al. The value of repeat kidney biopsy in quiescent Argentinian lupus nephritis patients. *Lupus* 2014; 23: 840–7.
81. Malvar A, Pirruccio P, Alberton V, et al. Histologic versus clinical remission in proliferative lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32: 1338–1344.
82. De Rosa M, Azzato F, Toblli JE, et al. A prospective observational cohort study highlights kidney biopsy findings of lupus nephritis patients in remission who flare following withdrawal of maintenance therapy. *Kidney Int* 2018; 94: 788–794.
83. Birmingham DJ, Merchant M, Waikar SS, et al. Biomarkers of lupus nephritis histology and flare: deciphering the relevant amidst the noise. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32: i71–i79.
84. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13: 453–61.
85. Maria NI, Davidson A. Renal Macrophages and Dendritic Cells in SLE Nephritis. *Curr Rheumatol Rep* 2017; 19: 81.
86. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, et al. A new morphologic index for the evaluation of renal biopsies in lupus nephritis. *Kidney Int* 2000; 58: 1160–1173.
87. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, et al. Predictive power of the second renal biopsy in lupus nephritis: Significance of macrophages. *Kidney Int* 2001; 59: 304–316.
88. Peterson KS, Huang JF, Zhu J, et al. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest* 2004; 113: 1722–1733.
89. Zizzo G, Guerrieri J, Dittman LM, et al. Circulating levels of soluble MER in lupus reflect M2c activation of monocytes/macrophages, autoantibody specificities and disease activity. *Arthritis Res Ther* 2013; 15: R212.
90. Korbet SM, Lewis EJ. Complete remission in severe lupus nephritis: Assessing the rate of loss in proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 2813–2819.
91. Li J, Liu CH, Xu DL, et al. Significance of CD163-Positive Macrophages in Proliferative Glomerulonephritis. *Am J Med Sci* 2015; 350: 387–392.
92. Gesualdo L, Di Paolo S, Calabró A, et al. Expression of epidermal growth factor and its receptor in normal and diseased human kidney: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Kidney Int* 1996; 49: 656–65.
93. Ju W, Nair V, Smith S, et al. Tissue transcriptome-driven identification of epidermal growth factor as a chronic kidney disease biomarker. *Sci Transl Med* 2015; 7: 316ra193-316ra193.

94. Salido EC, Yen PH, Shapiro LJ, et al. In situ hybridization of prepro-epidermal growth factor mRNA in the mouse kidney. *Am J Physiol Physiol* 1989; 256: F632–F638.
95. Segarra-Medrano A, Carnicer-Caceres C, Valtierra-Carmeno N, et al. Valor de los niveles urinarios de interleucina 6, factor de crecimiento epidérmico, proteína quimioattractante de monocitos de tipo 1 y factor de crecimiento transformante β 1 para la predicción de la extensión de las lesiones de fibrosis en biopsias de enf. *Nefrología* 2017; 37: 531–538.
96. Ranieri E, Gesualdo L, Petrarulo F, et al. Urinary IL-6/EGF ratio: a useful prognostic marker for the progression of renal damage in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1996; 50: 1990–2001.
97. Torres DD, Rossini M, Manno C, et al. The ratio of epidermal growth factor to monocyte chemotactic peptide-1 in the urine predicts renal prognosis in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2008; 73: 327–333.
98. Wu L, Li X-Q, Chang DY, et al. Associations of urinary epidermal growth factor and monocyte chemotactic protein-1 with kidney involvement in patients with diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. Epub ahead of print 23 October 2018. DOI: 10.1093/ndt/gfy314.
99. Betz BB, Jenks SJ, Cronshaw AD, et al. Urinary peptidomics in a rodent model of diabetic nephropathy highlights epidermal growth factor as a biomarker for renal deterioration in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int* 2016; 89: 1125–1135.
100. Satirapoj B, Dispan R, Radinahamed P, et al. Urinary epidermal growth factor, monocyte chemoattractant protein-1 or their ratio as predictors for rapid loss of renal function in type 2 diabetic patients with diabetic kidney disease. *BMC Nephrol* 2018; 19: 246.
101. Li B, Zhang Y, Wang F, et al. Urinary epidermal growth factor as a prognostic marker for the progression of Alport syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2018; 33: 1731–1739.
102. Wu L, Li X-Q, Goyal T, et al. Urinary epidermal growth factor predicts renal prognosis in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2018; 77: 1339–1344.
103. Azukaitis K, Ju W, Kirchner M, et al. Low levels of urinary epidermal growth factor predict chronic kidney disease progression in children. *Kidney Int* 2019; 96: 214–221.
104. Bartoli F, Penza R, Aceto G, et al. Urinary epidermal growth factor, monocyte chemotactic protein-1, and β 2-microglobulin in children with ureteropelvic junction obstruction. *J Pediatr Surg* 2011; 46: 530–536.
105. Gray A, Dull TJ, Ullrich A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* 1983; 303: 722–725.
106. Mroczkowski B, Reich M, Whittaker J, et al. Expression of human epidermal growth factor precursor cDNA in transfected mouse NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 126–30.

107. Hirata Y, Orth DN. Epidermal Growth Factor (Urogastrone) in Human Tissues*. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 667–672.
108. Callegari C, Laborde NP, Buenaflor G, et al. The source of urinary epidermal growth factor in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988; 58: 26–31.
109. Oka Y, Orth DN. Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest* 1983; 72: 249–259.
110. Lindenmeyer MT, Kretzler M, Boucherot A, et al. Interstitial Vascular Rarefaction and Reduced VEGF-A Expression in Human Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1765–1776.
111. Satirapoj B, Tasanavipas P, Supasynhd O. Clinicopathological correlation in asian patients with biopsy-proven lupus nephritis. *Int J Nephrol*; 2015. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1155/2015/857316.
112. Sharma A, Mucino MJ, Ronco C. Renal Functional Reserve and Renal Recovery after Acute Kidney Injury. *Nephron Clin Pract* 2014; 127: 94–100.
113. Dailey GE, Kraus JW, Orth DN. Homologous Radioimmunoassay for Human Epidermal Growth Factor (Urogastrone)*. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 46: 929–936.
114. Nakamura K, Imai Y, Matuzaki F. Human Epidermal Growth Factor/Urogastrone in Human Fluids Detected by Radioreceptor Assay. *Folia Endocrinol Jpn* 1983; 59: 1587–1596.
115. Mejia-Vilet JM, Rovin BH. Chapter 59. Epidemiology and Management of Lupus Nephritis. In: *Dubois Systemic Lupus Erythematosus*. 2019, pp. 727–744.
116. Wu LH, Yu F, Tan Y, et al. Inclusion of renal vascular lesions in the 2003 ISN/RPS system for classifying lupus nephritis improves renal outcome predictions. *Kidney Int* 2013; 83: 715–723.
117. Barber C, Herzenberg A, Aghdassi E, et al. Evaluation of Clinical Outcomes and Renal Vascular Pathology among Patients with Lupus. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 757–764.
118. Mejía-Vilet JM, Córdova-Sánchez BM, Uribe-Urbe NO, et al. Prognostic significance of renal vascular pathology in lupus nephritis. *Lupus* 2017; 0: 1–9.
119. Brocklebank V, Wood KM, Kavanagh D. Thrombotic Microangiopathy and the Kidney. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13: 300–317.
120. Tektonidou MG, Sotsiou F, Nakopoulou L, et al. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: Prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2569–2579.

121. Kottke-Marchant K. Diagnostic approach to microangiopathic hemolytic disorders. *Int J Lab Hematol* 2017; 39: 69–75.
122. Gavriilaki E, Anagnostopoulos A, Mastellos DC. Complement in Thrombotic Microangiopathies: Unraveling Ariadne's Thread Into the Labyrinth of Complement Therapeutics. *Front Immunol*; 10. Epub ahead of print 27 February 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00337.
123. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11: 785–797.
124. Watanabe H, Garnier G, Circolo A, et al. Modulation of Renal Disease in MRL/lpr Mice Genetically Deficient in the Alternative Complement Pathway Factor B. *J Immunol* 2000; 164: 786–794.
125. Elliott MK, Jarmi T, Ruiz P, et al. Effects of complement factor D deficiency on the renal disease of MRL/lpr mice. *Kidney Int* 2004; 65: 129–138.
126. Bao L, Osawe I, Haas M, et al. Signaling through Up-Regulated C3a Receptor Is Key to the Development of Experimental Lupus Nephritis. *J Immunol* 2005; 175: 1947–1955.
127. Belmont HM, Hopkins P, Edelson HS, et al. Complement activation during systemic lupus erythematosus: C3A and C5a anaphylatoxins circulate during exacerbations of disease. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1085–1089.
128. Buyon JP, Tamerius J, Belmont HM, et al. Assessment of disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison of the use of complement split products and conventional measurements of complement. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1028–1037.
129. Manzi S, Rairie JE, Carpenter AB, et al. Sensitivity and specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1178–1188.
130. Song D, Guo W, Wang F, et al. Complement Alternative Pathway's Activation in Patients With Lupus Nephritis. *Am J Med Sci* 2017; 353: 247–257.
131. Martin M, Smolağ KI, Björk A, et al. Plasma C4d as marker for lupus nephritis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 266.
132. Nisihara RM, Magrini F, Mocelin V, et al. Deposition of the lectin pathway of complement in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Hum Immunol* 2013; 74: 907–910.
133. Kim SH, Jeong HJ. Glomerular C4d Deposition Indicates in situ Classic Complement Pathway Activation, but is not a Marker for Lupus Nephritis Activity. *Yonsei Med J* 2003; 44: 75.
134. Li SJ, Liu ZH, Zen CH, et al. Peritubular capillary C4d deposition in lupus nephritis different from antibody-mediated renal rejection. *Lupus* 2007; 16: 875–880.

135. Sato N, Ohsawa I, Nagamachi S, et al. Significance of glomerular activation of the alternative pathway and lectin pathway in lupus nephritis. *Lupus* 2011; 20: 1378–1386.
136. Batal I, Liang K, Bastacky S, et al. Prospective assessment of C4d deposits on circulating cells and renal tissues in lupus nephritis: a pilot study. *Lupus* 2012; 21: 13–26.
137. Sahin OZ, Gurses S, Tasli F, et al. Glomerular C4d Staining Can Be an Indicator of Disease Activity in Lupus Nephritis. *Ren Fail* 2013; 35: 222–225.
138. Cohen D, Koopmans M, Kremer Hovinga ICL, et al. Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2460–2469.
139. Shen Y, Chen X-W, Sun C-Y, et al. Association between anti- β 2 glycoprotein I antibodies and renal glomerular C4d deposition in lupus nephritis patients with glomerular microthrombosis: a prospective study of 155 cases. *Lupus* 2010; 19: 1195–1203.
140. Chua JS, Baelde HJ, Zandbergen M, et al. Complement Factor C4d Is a Common Denominator in Thrombotic Microangiopathy. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 2239–2247.
141. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725–1725.
142. Appel GB, Pirani CL, D'agati V. Renal Vascular Complications of Systemic. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4: 1499–1515.
143. Bao L, Quigg RJ. Complement in Lupus Nephritis: The Good, the Bad, and the Unknown. *Semin Nephrol* 2007; 27: 69–80.
144. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The Role of Complement in the Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 431–456.
145. Wenderfer SE, Ke B, Hollmann TJ, et al. C5a Receptor Deficiency Attenuates T Cell Function and Renal Disease in MRL/lpr Mice. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3572–3582.
146. Wenderfer SE, Wang H, Ke B, et al. C3a receptor deficiency accelerates the onset of renal injury in the MRL/lpr mouse. *Mol Immunol* 2009; 46: 1397–1404.
147. Kusunoki Y, Akutsu Y, Itami N, et al. Urinary Excretion of Terminal Complement Complexes in Glomerular Disease. *Nephron* 1991; 59: 27–32.
148. Birmingham DJ, Hebert LA. The Complement System in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol* 2015; 35: 444–454.

149. Gou SJ, Yuan J, Wang C, et al. Alternative Complement Pathway Activation Products in Urine and Kidneys of Patients with ANCA-Associated GN. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 1884–1891.
150. de Jorge EG, Macor P, Paixão-Cavalcante D, et al. The Development of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Depends on Complement C5. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 137–145.
151. Redecha P, Tilley R, Tencati M, et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody–induced fetal injury. *Blood* 2007; 110: 2423–2431.
152. Saadi S, Holzknrecht RA, Patte CP, et al. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med* 1995; 182: 1807–1814.
153. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, et al. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2120–2124.
154. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1030–1035.
155. Breen KA, Seed P, Parmar K, et al. Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2012; 107: 423–429.
156. Rand JH, Wu XX, Wolgast LR, et al. A novel 2-stage approach that detects complement activation in patients with antiphospholipid antibody syndrome. *Thromb Res* 2017; 156: 119–125.
157. Kello N, Khoury L El, Marder G, et al. Secondary thrombotic microangiopathy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome, the role of complement and use of eculizumab: Case series and review of literature. *Semin Arthritis Rheum* 2019; 49: 74–83.
158. Bao L, Haas M, Quigg RJ. Complement Factor H Deficiency Accelerates Development of Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 285–295.
159. Zhao J, Wu H, Khosravi M, et al. Association of Genetic Variants in Complement Factor H and Factor H-Related Genes with Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002079.
160. Wang F, Yu F, Tan Y, et al. Serum complement factor H is associated with clinical and pathological activities of patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51: 2269–77.
161. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012; 81: 628–639.