



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PROGRAMA MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

**OSTEOPONTINA URINARIA COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD RENAL EN PACIENTES
CON LUPUS ERITEMATOSOS GENERALIZADO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRÍA CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

DRA. MARÍA FERNANDA ZAVALA MIRANDA

TUTOR DE TESIS

DR. JUAN MANUEL MEJÍA VILET

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

DEPARTAMENTO NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MAYO, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Autorización de tesis.....	3
Resumen del proyecto	4
Antecedentes	8
Planteamiento del problema y justificación.....	18
Pregunta investigación	19
Objetivos del estudio	20
Hipótesis	21
Material y métodos	22
Análisis estadístico	29
Resultados	32
Discusión	50
Conclusiones	53
Abreviaturas	54
Referencias bibliográficas	55

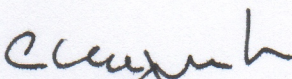
**OSTEOPONTINA URINARIA COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD RENAL EN
PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

AUTORIZACIÓN DE TESIS

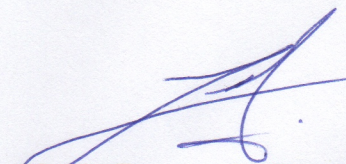


Dr. Juan Manuel Mejía Vilet

Adscrito del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Tutor de Tesis



Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas
Responsable de la Entidad Académica
Universidad Nacional Autónoma de México



Dra. María Fernanda Zavala Miranda
Candidata de grado a Maestría de Ciencias Médicas

OSTEOPONTINA URINARIA COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD RENAL EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

1. RESUMEN DEL PROYECTO

1.1 ANTECEDENTES DEL PROYECTO:

La nefritis lúpica (NL) es una de las complicaciones más frecuentes en los pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG), ocurre en alrededor del 60%. Generalmente afecta a una población de mujeres jóvenes y en los primeros 6-36 meses del diagnóstico. Clásicamente se ha descrito un peor desenlace de la enfermedad en pacientes de origen hispano. Si bien el pronóstico de los pacientes con LEG y actividad renal ha mejorado discretamente en los últimos años gracias a las nuevas terapias farmacológicas, incluso con fármacos biológicos, los desenlaces aún son desalentadores. En una población mexicana se ha reportado una tasa de recurrencia del 50% a los 60 meses, y una tasa de progresión a enfermedad renal crónica terminal (ERCT) a 5 años del 17%.

Por tanto, es necesario contar con biomarcadores que ayuden a detectar la enfermedad, predecir o demostrar recaída de la actividad renal de manera temprana. Actualmente, se han descrito múltiples biomarcadores específicos de actividad con la finalidad de distinguir pacientes con inflamación activa de aquellos quienes no presentan inflamación. Sin embargo, lupus eritematoso generalizado es una enfermedad con participación de diferentes vías de inflamación, lo cual hace más complejo establecer un biomarcador aplicable a la práctica clínica. La enfermedad puede también evaluarse mediante biopsia renal, la cual constituye el estándar de oro, sin embargo, su utilización sigue siendo limitada debido a que se trata de un procedimiento invasivo, con riesgo de complicaciones, y en la práctica clínica es difícil someter al paciente a biopsias repetidas.

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína N-ligada perteneciente a la familia de proteínas N-glucosiladas con ligandos de unión de integrina. Se ha identificado su papel como un potencial biomarcador de actividad y daño a órgano blanco (riñón) en pacientes con el diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG). Se ha reportado la correlación de sus niveles séricos con mayores índices de actividad (SLEDAI-2K ≥ 5), persistencia de la actividad renal a 5 años, y con alteración en la tasa de filtrado glomerular. Los estudios de OPN en orina y su ligando CD44 en pacientes con NL son escasos.

1.2 OBJETIVOS GENERALES DEL PROYECTO:

Evaluar el rendimiento diagnóstico de los niveles urinarios de OPN y su ligando CD44 para diferenciar entre pacientes con nefropatía lúpica activa de pacientes con nefritis lúpica inactiva.

1.3 METODOLOGÍA:

Se trata de un estudio transversal de evaluación de prueba diagnóstica. Se analizaron los biomarcadores OPN y su ligando CD44 en muestras de plasma y orina. Se reclutaron 4 grupos de pacientes con diagnóstico de LEG: pacientes con nefritis lúpica activa demostrada por biopsia renal, pacientes con actividad sistémica de LEG pero sin actividad renal, pacientes sin nefritis lúpica activa y solamente hallazgos de cronicidad en la biopsia renal y pacientes con LEG inactivos.

Se obtuvieron las variables demográficas, clínicas y serológicas, índice de actividad (SLEDAI 2k), índice de daño acumulado al momento del reclutamiento (SLICC/ACR DI), y el reporte histopatológico de la biopsia renal. Los valores urinarios de OPN y CD44 obtenidos en los ensayos de ELISA se normalizaron al valor de creatinina urinaria (concentración) de la muestra. Se realizó correlación con los hallazgos clínicos, laboratoriales e histopatológicos de la biopsia renal y los biomarcadores OPN plasmática (OPNp), OPN urinaria (OPNu), CD44 plasmática (CD44p) y CD44u (urinario).

Se construyeron curvas ROC para la diferenciación entre nefritis lúpica activa e inactiva, y se obtuvo el área bajo la curva (ABC) para los biomarcadores OPNp, OPNu, CD44p y CD44u. Se seleccionó el mejor punto de corte de los niveles urinarios de cada biomarcador con base al índice de Youden y se estimaron los valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos. Además, se evaluó la combinación de los biomarcadores y se compararon las curvas ROC utilizando la prueba de DeLong para detectar diferencias estadísticas.

1.4 RESULTADOS (RESUMEN):

1.4.1 CARACTERÍSTICAS BASALES:

Dentro del periodo de 2019 a 2022 se reclutaron 150 pacientes. Se incluyeron 62 (40%) pacientes en el grupo de actividad renal, 5 (3.3%) pacientes en el grupo de actividad sistémica

sin actividad renal, 19 (12%) pacientes en el grupo con hallazgos de cronicidad en la biopsia renal, y 64 (42.6%) pacientes en el grupo de lupus eritematoso generalizado inactivo. La mayor parte de la población eran mujeres (88.7%), con una mediana de edad de 35 años (RIQ 27-45). Como era de esperarse aquellas pacientes con actividad renal y actividad sistémica presentaron con más frecuencia anemia, trombocitopenia, hipocomplementemia, y títulos elevados de anticuerpos anti-DNA doble cadena (DNAdc). Así mismo, las pacientes con actividad renal presentaron una disminución de la tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe) y niveles de proteinuria.

1.4.2 ENSAYOS DE BIOMARCADORES EN ESTUDIO TRANSVERSAL:

1.4.2.1 OSTEOPONTINA:

Los pacientes inactivos presentaron niveles mayores de OPN en orina (416.34 ng/ml, RIQ 266.85-664.01), en comparación con el grupo de activos renales y activos sistémicos sin actividad renal. Sin embargo, esto no implicó diferencias significativas entre los grupos ($p=0.241$).

Los niveles de OPN en plasma se encontraron significativamente más elevados en pacientes con actividad renal (81.18 ng/ml, RIQ 53.75-169.46, $p<0.001$).

Los niveles elevados de OPN en plasma correlacionaron con el puntaje de actividad SLEDAI 2K ($r=0.51$, $p<0.001$), SLICC/ACR índice de daño ($r=0.24$, $p=0.003$), con la clase histológica del ISN/RPS tipo IV ($r=0.24$, $p=0.03$), con el índice de actividad ($r=0.46$, $p<0.001$), con $\text{TFGe} < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ($r=0.35$, $p<0.001$) y los niveles de proteinuria ($r=0.40$, $p<0.001$). No se encontró ninguna correlación de las variables con los niveles urinarios de OPN.

1.4.2.2 CD44:

Los niveles de CD44 en orina se encontraron más elevados en aquellos pacientes que presentaron una nefritis lúpica crónica (104.22ng/mg, RIQ 11.45-377.61), mientras que los niveles más bajos se encontraron en los grupos de LEG inactivo (22.57 ng/mg, RIQ 16.22-39.60) [$p=0.002$].

Los niveles de CD44 plasmático se observaron más bajos en los pacientes con actividad sistémica (41.64 ng/mg, RIQ 29.71-65.08), se observó diferencia entre los grupos ($p<0.001$).

(Tabla 11)

Los niveles de CD44 en plasma correlacionaron positivamente con el puntaje del SLEDAI 2k ($r=0.396$, $p<0.001$), puntaje de índice de daño SLICC/ACR ($r=0.23$, $p=0.007$), con $\text{TFGe} < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ($r=0.30$, $p=0.001$), proteinuria ($r=0.29$, $p=0.001$) y con los niveles de OPN en plasma ($r=0.34$, $p<0.001$).

1.4.3 CURVAS ROC:

1.4.3.1 CURVAS ROC BIOMARCADORES PLASMÁTICOS:

El área bajo la curva ROC (ABC) de OPN plasmática fue de 0.83 (IC 95% 0.765-0.909). Se estableció un punto de corte de >58 ng/ml, con una sensibilidad de 72% (IC 95% 0.60-0.82) y especificidad de 81% (IC 95% 0.71-0.88) para diferenciar nefritis lúpica activa de pacientes inactivos.

El ABC de CD44 plasmática fue de 0.68 (IC 0.58-0.78). Un punto de corte >40 ng/ml tuvo una sensibilidad de 87% (IC 95% 0.75-0.94) y una especificidad de 44% (IC 95% 0.33-0.55) para diferenciar nefritis lúpica activa de pacientes inactivos.

1.4.3.2 CURVAS ROC DE BIOMARCADORES URINARIOS:

El rendimiento de la OPN urinaria no fue útil para diferenciar a los pacientes con nefritis lúpica activa y sin nefritis, con un ABC de 0.48 (IC 95% 0.37-0.58). Por otro lado, el área bajo la curva de CD44 fue de 0.67 (IC 95% 0.58-0.77). Con el punto de corte <30 ng/mg se obtuvo una sensibilidad de 63% (0.49-0.75) y especificidad del 69% (0.58-0.78) para diferenciar pacientes inactivos de aquellos con nefritis lúpica activa.

1.4.3 CURVAS ROC CON COMBINACIÓN DE BIOMARCADORES:

La combinación de OPNp y CD44p mostró una ABC de 0.84 (IC 95% 0.77-0.91), con los puntos de corte previamente definidos por el índice de Youden de OPNp >58 ng/ml y CD44 >40 ng/ml, se obtuvo una sensibilidad de 63% (IC 95% 0.49-0.75) y especificidad de 85% (IC 95% 0.75-0.91). Sin embargo, al realizar la comparación de las curvas ROC de OPNp como marcador único, y la combinación de biomarcadores no se detectó una diferencia estadística.

1.5 CONCLUSIONES:

Los niveles de osteopontina plasmática funcionan como un biomarcador prometedor que correlaciona con la actividad de lupus eritematoso generalizado y con la inflamación renal. La medición de osteopontina en orina no mostró un desempeño apropiado como biomarcador para diferenciar pacientes con actividad renal secundaria a lupus.

1.6 PERSPECTIVAS:

Como continuación de este estudio se evaluará el curso longitudinal de los biomarcadores, en especial OPN plasmática, con la intención de evaluar su potencial diagnóstico de respuesta al tratamiento y predicción posterior de recaídas renales.

Los biomarcadores evaluados en este estudio pertenecen a una de las múltiples vías implicadas en la fisiopatología de la nefropatía lúpica. En un futuro, el uso de biomarcadores específicos de las diferentes vías de inflamación podrá explicar cuál de ellas predomina en los pacientes con nefritis lúpica con la finalidad de poder individualizar una terapia de tratamiento.

2. ANTECEDENTES

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune con una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales y epigenéticos. La presentación clínica es heterogénea se acompaña de alteraciones complejas que afectan el sistema inmune con inflamación y daño a órganos y tejidos. ^[1] Existe una inflamación local y sistémica mediada por una alteración entre la respuesta inmune innata y adaptativa, originada por una alteración en la eliminación de los cuerpos apoptóticos, un reconocimiento incorrecto de autoantígenos por parte de las células dendríticas (CD) y linfocitos T, y la activación de linfocitos B autorreactivos con la producción de autoanticuerpos. Adicionalmente, la participación de citocinas como el interferón tipo I que tiene un papel central en la fisiopatología de LEG. ^[2,3]

Actualmente la nefritis lúpica (NL) es una de las complicaciones más frecuentes en los pacientes con lupus eritematoso generalizado, ocurre en alrededor del 60% de los pacientes. La NL afecta principalmente a una población de mujeres jóvenes y en los primeros 6 a 36 meses del diagnóstico. Clásicamente, se ha descrito un peor desenlace de la enfermedad en pacientes de origen Hispano. Si bien el pronóstico de los pacientes con LEG y actividad renal ha mejorado discretamente en los últimos años, gracias a las nuevas terapias farmacológicas, incluso con fármacos biológicos, los desenlaces aún son desalentadores. En una población mexicana se ha reportado una tasa de recurrencia del 50% a los 60 meses y una tasa de progresión a enfermedad renal crónica terminal (ERCT) a 5 años del 17%. ^[4]

Hasta el momento el estándar de oro para el diagnóstico continúa siendo el análisis histopatológico de la biopsia renal, la cual se obtiene mediante un procedimiento invasivo, con riesgo de complicaciones, y en la práctica clínica es difícil someter al paciente a biopsias repetidas. Actualmente el uso de biomarcadores clínicos como la proteinuria, niveles séricos de complemento, o la medición de la tasa de filtrado glomerular estimado (TFGe) no siempre traducen el estado de inflamación intrarrenal, por lo que es necesario identificar biomarcadores que reflejen las diferentes vías inmunitarias implicadas en la fisiopatogenia de la NL. Si bien se han propuesto varios, aún no han incorporado al uso clínico. ^[5] En este estudio se propuso evaluar el biomarcador osteopontina (OPN), una citocina que traduce la activación de las vías del interferón.

2.1 OSTEOPONTINA

La osteopontina (OPN), también conocida como fosfoproteína 1 secretada (SPP1) o activador temprano de linfocitos T-1 (ETA-1), es una glicoproteína N-ligada perteneciente a la familia de proteínas N-glucosiladas con ligandos de unión de integrina (SIBLING: *small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*). Inicialmente fue descrita como una proteína de remodelación ósea, sin embargo, actualmente se ha identificado su papel como biomarcador en algunos tipos de cáncer; enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado; enfermedades hepáticas, enfermedades intestinales inflamatorias; enfermedades cardiovasculares y asma. ^[6]

Recientemente se ha enfatizado su participación en la respuesta inflamatoria inmune tanto innata como adquirida, siendo producida por múltiples células como linfocitos B, linfocitos T, células asesinas naturales (NK), macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (CD). Esta proteína también se encuentra presente en múltiples tejidos como hueso, pulmón, hígado, cerebro, articulaciones, tejido adiposo, riñón; y en líquidos corporales como sangre, orina, líquido biliar. ^[6-8]

2.2 GEN DE LA OSTEOPONTINA

El gen SPP1 codifica a la OPN, se localiza en el brazo largo del cromosoma 4 (4q21–4q25). El gen de OPN se compone de 7 exones, 6 de los cuales contienen la secuencia de codificación (exones 2-7), mientras que los dos primeros exones sólo contienen las regiones no traducidas (5' UTR). ^[6-8] Seis de los exones transcritos forman la OPN-a. Dos variantes de empalme con el exón 5 forman la OPN-b y la delección del exón 4 forman la OPN-c. ^[9]

La expresión genética de la OPN se ve afectada por algunas citocinas (IL-1b, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón (IFN), hormonas (vitamina D, estrógenos, angiotensina II y glucocorticoides), factor de crecimiento derivado de plaquetas y lipoproteínas de baja densidad oxidadas, entre otros. ^[10]

Se ha descrito que la expresión fisiológica del gen de la OPN se ve influenciada por ciertos polimorfismos genéticos. Al momento se ha identificado 50 polimorfismos en la región de flanco y 30 polimorfismos en la región no transcrita. Finalmente, su expresión también se ve modificada por los promotores del gen (secuencias reguladoras: la caja TATA, la caja GC, el casete CCAAT inverso y varias secuencias de unión al factor de transcripción). ^[7-11]

2.2.1 POLIMORFISMOS DE LA OSTEOPONTINA ASOCIADOS A NEFRITIS LÚPICA

La expresión del gen de OPN está frecuentemente incrementado en múltiples enfermedades autoinmunes, las cuales han demostrado estar asociadas a polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms* [SNPs]). En modelos murinos se han descrito algunos, los cuales son capaces de incrementar la expresión de inmunoglobulinas (Ig) como IgG3, Ig2a e IgM, además de citocinas como IFN, TNF- α , IL-1b; los cuales juegan un papel fundamental en la fisiopatología de lupus eritematoso generalizado (LEG). Como ya se ha documentado previamente la vía de señalización del IFN tipo I es esencial para la regulación de los receptores TLR-7 y 9 en linfocitos B, así como para la producción de anticuerpos específicos de LEG. ^[12]

En humanos se ha documentado que ciertos polimorfismos en el gen de OPN resultan en un incremento en la expresión de la proteína, lo cual confiere una mayor susceptibilidad para LEG, así como ciertas manifestaciones clínicas como la nefritis lúpica (NL). En el estudio realizado por *Fonton et al.* se demostró que el polimorfismo 707 C/T (rs1126616) se asocia con mayor actividad renal ($p = 0.0431$). ^[13] En otro estudio se realizó genotipificación de este mismo polimorfismo en pacientes con LEG. Se encontró que los genotipos CT y TT se presentaban con mayor frecuencia en pacientes con NL. ^[14] Finalmente, en otro estudio de 158 pacientes de origen chino se demostró que el polimorfismo 9250 CT se asocia con mayor susceptibilidad para NL ($p = 0.088$), mientras que el genotipo TT se encuentra con menor frecuencia en pacientes con NL ($p < 0.05$). ^[15]

Recientemente se realizó un estudio en 100 pacientes de población egipcia, donde se detectó que el polimorfismo 9250 (CT+TT) podría predecir el desarrollo de NL, sin embargo, no se encontró una asociación con los datos clínicos, estudios de laboratorio, ni con los índices histológicos de actividad ni cronicidad. ^[16]

2.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA DE OSTEOPONTINA

La OPN es una proteína pleiotrópica de la matriz extracelular, tiene una carga negativa, cuenta con 8 α -hélices y 6 hojas β -plegadas, carece de una extensa estructura terciaria. Se compone de aproximadamente 300 aminoácidos (297 en ratón, 314 en humanos) y contiene múltiples regiones conservadas, incluida un sitio de unión a calcio y un dominio de unión a heparina en el extremo C-terminal y una secuencia rica en aspartato en el extremo N-terminal, que está implicada en la interacción con el receptor CD44, particularmente con sus isoformas v6 y v7. ^[7] Su peso molecular puede variar desde 44 a 75 kDa, esto secundario a las modificaciones

La actividad biológica de la OPN se localiza en el fragmento N-terminal, el cual es escindido por la trombina. Existen dos posibles sitios donde la trombina puede escindir la OPN, el primer sitio es a través del tripéptido RDG (arginina-glicina-aspartato) y por su dominio SVVYGLR (residuos de serina-valina-valina-tirosina, glicina, leucina y arginina).^[2,3,6] También se ha reportado que las metaloproteasas de matriz 3 y 7 (MMP-3 y MMP-7) pueden escindir la OPN humana en 3 diferentes sitios a la trombina (Gly166-Leu167, Ala201-Tyr202 y Asp210-Leu211) (**Figura 1**).^[9,10] Una vez escindida el peso molecular de la OPN fraccionada (OPNf) puede variar desde 44 a 75 kDa. Esta modificación facilita la exposición de sus epítomos que interactuarán con los receptores de las integrinas y CD44 que darán inicio a la respuesta inmune de células y células de la inmunidad innata y adaptativa, como se describe más adelante. (**Figura 1**).^[17-20]

Además, existe una variante intracelular de la OPN (iOPN), que se genera secundario a una transcripción alternativa en la región N-terminal, que genera una versión más corta de la OPN. Esta isoforma se mantiene en el espacio intracelular y carece de la secuencia señal en la región N-terminal. En modelos murinos se ha observado que interactúa con CD44, y promueve la proliferación, motilidad de macrófagos, fibroblastos y osteoclastos. Además, tiene una función reguladora de la respuesta inmune innata y adaptativa, incluyendo la diferenciación de las células *T helper* y activación de las células *Natural Killer*. En las células dendríticas plasmocitoides

interactúa con MyD88 en la vía de señalización del receptor TLR-9. Sin embargo, en humanos no está del todo claro este papel. ^[9]

2.4 OSTEOPONTINA Y SU PAPEL EN LA INMUNIDAD

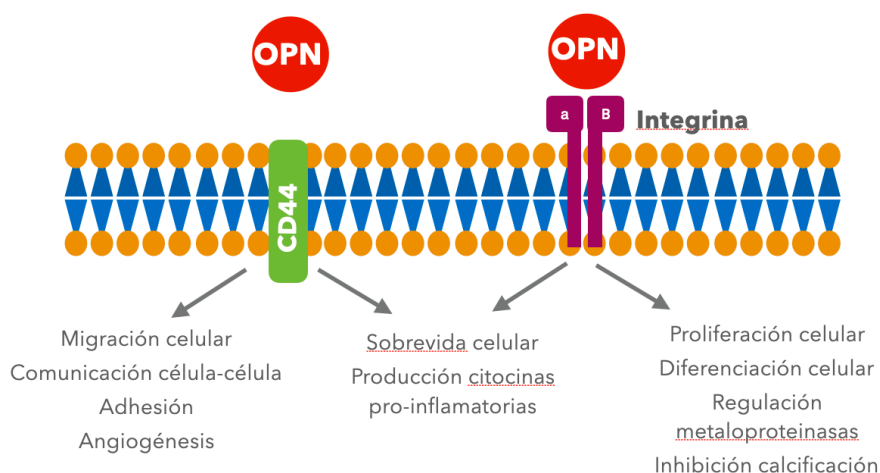
OPN es una molécula que participa en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. OPN es liberada por las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos una vez que son estimulados por los autoantígenos al unirse con los receptores tipo Toll (TLR). Esta liberación de OPN promueve la migración de neutrófilos y células dendríticas inmaduras. Así mismo, hay un incremento en la presentación de antígenos a las células T vírgenes. OPN disminuye la secreción de IL-10, que promueve una respuesta TH1. Así mismo OPN promueve la proliferación de linfocitos B y la generación de autoanticuerpos. ^[9]

Esta interacción con células de la inmunidad innata y adaptativa se debe a la importante unión que tiene con sus ligandos una vez que ha sido escindida por la trombina y metaloproteinasas. Se han demostrado interacciones con receptores de células OPN tanto dependientes de la región RGD como independientes. OPN puede interactuar con integrinas $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$. Éstos receptores facilitan la adhesión de la OPN con las células B. Todas las integrinas se unen al fragmento N-terminal de la OPN cortado por la trombina, donde se localiza el dominio RGD. Otro sitio de unión es la secuencia de siete aminoácidos (SVVYGLR, residuos humanos 162 $\pm$ 168) situada entre el RGD, donde se une particularmente la integrina $\alpha 9\beta 1$. ^[19,21,22]

El receptor CD44 (receptor del ácido hialurónico), es un receptor de OPN que contiene múltiples regiones de unión con el dominio no-RGD. La quimiotaxis y la adhesión de fibroblastos y de células T se llevan a través de la unión de OPN con su receptor CD44. Las isoformas de CD44, particularmente v6 y v7 se unen a la porción N-terminal y C-terminal independientemente de la región RGD, lo cual sugiere múltiples sitios de unión de OPN con CD44. A su vez la unión de

CD44 a OPN se inhibe por el uso de anticuerpos contra integrinas, lo cual sugiere que la interacción de OPN, CD44 e integrinas a nivel de la adhesión celular. (Figura 2) ^[8]

FIGURA 2. Efectos sobre la inmunidad de OPN al unirse a sus receptores.



2.5 ESTUDIOS EN MODELOS MURINOS DE NEFRITIS LÚPICA Y OSTEOPONTINA

Diversos estudios murinos han demostrado la relación entre los niveles elevados de OPN y enfermedades autoinmunes como LEG, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y otras glomerulonefritis. ^[6,7,23] Uno de los modelos murinos más comúnmente utilizados en la investigación del LEG es el ratón MRL/lpr, el cual es proclive al desarrollo de enfermedades autoinmunes. ^[24] En este modelo se encontraron niveles elevados de OPN en suero, y una expresión aumentada del RNA mensajero de OPN en las células T CD3+/CD4-/CD8-. ^[25] El grupo de *Shinohara et al.* reportó que los ratones que carecen de OPN, presentan alteraciones en la producción de IFN- α por las células dendríticas a través del receptor TLR-9. ^[26] La sobreexpresión de OPN en estos modelos murinos inducen la activación de células B, incremento en la producción de IgG, IgM, autoanticuerpos y la expresión de citocinas (TNF- α , IFN- γ and IL-1 β). Toda esta respuesta está involucrada en la patogénesis de LEG. ^[7]

2.6 ESTUDIOS HUMANOS DE NEFRITIS LÚPICA Y OSTEOPONTINA EN PLASMA

El grupo de *Wong et al.* midió la concentración plasmática de OPN y de IL18 en 54 pacientes de origen chino con LEG, con o sin alteraciones renales, y las compararon con 26 controles sanos. Encontraron que las concentraciones plasmáticas de OPN estaban incrementadas en el grupo de pacientes con LEG en comparación con el grupo control ($P < 0.001$). Además, el incremento en OPN correlacionó positiva y significativamente con el puntaje de

actividad de la enfermedad SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) en todos los pacientes con LEG ($r = 0.308$, $p = 0.023$). En pacientes con afección renal, se observó una correlación significativa con la concentración de IL-18 ($r=0.404$, $P =0.037$).^[27] En diversos estudios se propone que hay un predominio de citocinas Th1 en la respuesta inflamatoria que llevan a daño renal.^[28,29] El mismo grupo de *Wong et al.* demostró la participación de la IL-18, ya que esta citocina correlacionó con el puntaje de SLEDAI-2k y la presencia de alteraciones renales. Esta interleucina promueve la diferenciación a Th1 y la producción de $\text{INF-}\alpha$.^[30] Por tanto, este estudio sugiere que hay un predominio de la respuesta de Th1 tanto sistémica como a nivel renal. Con ello, OPN puede estar fuertemente asociada al estado proinflamatorio en LEG y podría ser un marcador de actividad adecuado.^[27]

Estos datos han sido reproducidos en una cohorte de 40 pacientes pediátricos con LEG, donde pacientes con LEG, con y sin nefritis lúpica, tuvieron niveles más elevados de OPN, en comparación de los controles ($p = 0.000$ y $p = 0.002$). Además, se observó que los pacientes con afección renal presentaron una concentración sérica más alta de OPN, y esta correlacionó positivamente con mayores niveles de IL-18 ($r = 0.48$, $p = 0.004$).^[31]

Rullo et al. dieron seguimiento a una cohorte de pacientes pediátricos ($n=42$) y adultos con LEG ($n=23$). Los niveles plasmáticos de OPN se encontraron elevados en ambos grupos en comparación de los controles ($p = 0.03$ y $p = 0.02$, respectivamente). Además, se encontró que los niveles elevados de OPN correlacionaron con la actividad elevada de $\text{IFN-}\alpha$ y la presencia de anticuerpos anti-nucleares. Los niveles elevados de OPN tuvieron una correlación negativa con la edad, y correlacionaron también con el puntaje de SLEDAI-2k a los 6 meses ($r = 0.51$ y 0.52 ; $P = 0.001$ y 0.01 en población pediátrica y adulta ambos, respectivamente). También se asociaron los niveles séricos de la OPN con un incremento del puntaje de daño SLICC/ACR (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology*) a los 12 meses en población pediátrica ($P = 0.001$), por lo que este grupo propuso que la elevación sérica de OPN precede al daño acumulado en estos pacientes.^[32]

El grupo de *Wirestam et al.*, en 2017, realizó un estudio transversal para poder caracterizar a la OPN y su implicación clínica en el LEG. Se obtuvo suero de 240 adultos con LEG clasificados por los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y por los criterios de SLICC. Se evaluó la actividad de la enfermedad mediante el puntaje SLEDAI-2k y el índice de daño mediante el puntaje SLICC/ACR-RD. Se identificó que los pacientes con LEG

tuvieron niveles séricos de OPN 4 veces mayores en comparación con los controles ($p < 0.0001$). Además, se observó una correlación de los niveles plasmáticos de OPN con el puntaje SLEDAI-2K, en particular en aquellos pacientes con diagnóstico de LEG de menos de 12 meses de evolución ($r = 0.666$, $p = 0.028$). Adicionalmente, se observó una alta correlación de los niveles plasmáticos de OPN con el puntaje SLICC/ACR ($p < 0.0001$), especialmente si había actividad renal ($p > 0.0001$), cardiovascular ($p > 0.0001$) y malignidad ($p = 0.012$). Finalmente, se encontró una asociación entre el diagnóstico de síndrome anti-fosfolípidos y los niveles plasmáticos de OPN ($p = 0.009$).^[33]

Estos estudios transversales han establecido una posible asociación entre los niveles séricos de OPN y el desarrollo de LEG, y proponen a esta proteína como un potencial marcador de actividad y daño a órganos blanco. Recientemente, el grupo de *Wirestam et al.* publicó en 2019 un estudio multicéntrico para determinar la asociación de la OPN plasmática como predictor de daño, la asociación de actividad, y la presencia de ciertos fenotipos en 344 pacientes con diagnóstico reciente de LEG de la *SLICC Inception Cohort* y con seguimiento de 5 años. En comparación con el grupo control, nuevamente se encontró un incremento de los niveles plasmáticos de OPN 4 veces mayor en pacientes con LEG ($p < 0.0001$). Posterior al análisis mediante un modelo de regresión logística binaria, se encontró que los niveles plasmáticos de OPN no predicen el daño acumulado global, definido como SLEDAI ≥ 1 a un año. Los niveles plasmáticos iniciales de OPN correlacionaron con el puntaje SLEDAI-2k al momento de ser reclutados ($r = 0.27$, $p < 0.0001$): aquellos que presentaron un puntaje de actividad alto (SLEDAI-2K ≥ 5) presentaron una mayor concentración de OPN plasmática ($p < 0.0001$). La concentración elevada de OPN plasmática correlacionó con la actividad serológica ($r = 0.24$, $p < 0.0001$). Aquellos pacientes con anticuerpos anti-DNA_{dc} positivos, presentaron niveles significativamente más altos de OPN (media 55.7 ng/mL, IC 95% 48.2–63.2, $n = 150$) en comparación con los pacientes con anticuerpos negativos (media 37.4 ng/mL, IC 95% 33.6–41.2, $n = 194$), $p < 0.0001$. También aquellos pacientes con niveles bajos de C3 y/o C4 presentaron niveles más altos de OPN (media 54.7 ng/mL, IC 95% 46.6–62.8, $n = 130$, $p = 0.0003$). La velocidad de sedimentación globular (VSG) correlacionó con los niveles plasmáticos de OPN ($r = 0.38$, $p < 0.0001$). En cuanto a la actividad de la enfermedad, sólo la afección renal se asoció significativamente con niveles más elevados de OPN plasmática (media 63.7 ng/mL, IC 95% 49.9–77.5, $n = 75$, $p < 0.0001$). Se documentaron niveles más elevados de OPN plasmática en aquellos pacientes con disminución en la tasa de filtrado glomerular (TFG, media 54 ng/mL, IC 95% 42.3–66.9, $n = 83$) en comparación con aquellos pacientes con TFG > 90 ml/min/1.73m² (media 42.5, IC 95% 38.9–46, $n = 261$,

p=0.01). En el seguimiento de 5 años, se encontró que aquellos pacientes que persistieron con actividad de la enfermedad persistieron con niveles elevados de OPN plasmática (p = 0.0006), actividad renal (p < 0.0001) y con alteración en la TFG (p = 0.01).^[34]

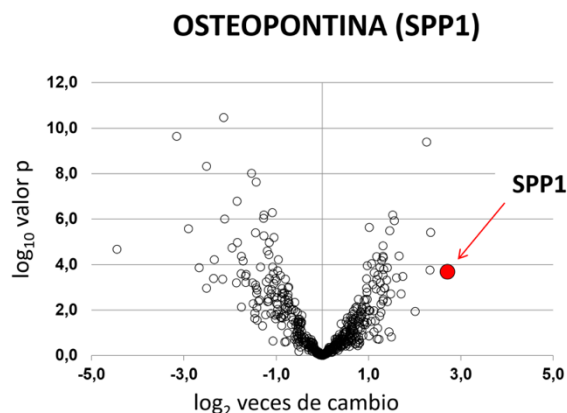
2.7 EXPRESIÓN EN TEJIDO RENAL DE OSTEOPONTINA Y NEFRITIS LÚPICA

En el estudio reportado por *Okada* y colaboradores, se estudió la expresión de OPN en el tejido renal en diversas glomerulopatías, como la nefropatía por IgA (IgAN) (n= 20), nefritis lúpica (n=12) y vasculitis asociada a anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (VAA) (n=14). En este estudio se reportó que la expresión de OPN se observó constitutivamente en la membrana apical de los túbulos distales, se incrementó de manera paralela en el citoplasma del epitelio tubular proximal y distal al tener mayor grado de infiltración de células mononucleares en el intersticio tanto en pacientes con IgAN como pacientes con NL. La infiltración de monocitos CD68 se correlacionó significativamente con el grado de expresión de OPN en el epitelio tubular.^[35]

En el estudio de *Ma et al*, se exploró la asociación entre el infiltrado por linfocitos T y la podocitopatía por LEG (PL). Se realizaron 60 biopsias renales en pacientes con diagnóstico de podocitopatía lúpica (PL), se realizaron tinciones con inmunohistoquímica para identificar linfocitos T (CD3), macrófagos (CD68) y la expresión de OPN. Se observó que las lesiones en podocitos eran más graves en pacientes con PL en comparación con los controles. La expresión de OPN era mayor en casos que en controles, y en pacientes con mayor grado de actividad. Se observó mayor expresión de OPN en aquellos casos con mayor cantidad de infiltrados por linfocitos T en el intersticio renal, mientras que los macrófagos se localizaron en el glomérulo (P<0.05). En comparación con los controles, los pacientes con LEG presentaron mayor expresión de OPN en tejido renal (P<0.05). Los infiltrados intrarenales de macrófagos correlacionaron positivamente con la expresión tisular de OPN (P<0.001).^[36]

Finalmente, en un estudio de transcriptómica realizado en tejido renal de pacientes mexicanos con nefritis lúpica, se observó una expresión 6 a 10 veces mayor del gen de la OPN en casos de nefritis lúpica activa en comparación con tejidos de donadores renales sanos. Esta elevación se observó tanto en tejido glomerular como tubulointersticial, y en distintos episodios de inflamación renal en el mismo paciente (**Figura 3**).^[37]

FIGURA 3. Gráfico de volcán de la expresión del gen SPP1 en pacientes con nefritis lúpica en comparación con controles sanos. El punto rojo muestra el gen SPP1. [37]



2.8 ESTUDIOS DE OSTEOPONTINA URINARIA EN NEFRITIS LÚPICA

El grupo de *Kitagori* estudió ambas isoformas de la OPN, la forma completa y la fragmentada; las midió en orina y en plasma de pacientes con LEG (n=29) y otras glomerulopatías como: nefropatía por IgA (IgAN) (n= 14), síndrome de cambios mínimos (n=5), nefropatía diabética (ND) (n= 14) y en pacientes sanos (n= 17). No se encontraron diferencias significativas en la concentración urinaria de OPN completa entre los grupos, sin embargo, la fracción fragmentada de OPN en plasma y orina se encontró significativamente más elevada en pacientes con LEG a comparación de los controles ($P < 0.05$). Además, se encontró en cantidades más altas en aquellos pacientes con NL activa, con proteinuria (índice proteinuria/creatininuria (IPC) > 0.5 g/g) a comparación de los que se encontraban inactivos con IPC < 0.05 g/g ($p < 0.0001$).

La actividad de la trombina en orina, enzima que escinde a la OPN, correlaciona positivamente con la concentración de OPN fragmentada ($p < 0.0001$). Lo cual sugiere que la concentración de la OPN fragmentada correlaciona por tanto con la inflamación renal y puede ayudar como un marcador urinario de actividad en NL. Sin embargo, en este estudio la concentración de OPN completa y fragmentada no se asoció con el puntaje SLEDAI-2k ni con cambios en la tasa de filtrado glomerular (TFG). [38]

Los estudios de OPN en orina de pacientes con LEG y actividad renal son escasos y no han sido extrapolados a nuestra población. Por lo que en este estudio se propone el estudio de la OPN como un biomarcador urinario que refleja el grado de la inflamación renal. El hallazgo de un biomarcador específico de actividad renal en LEG potencialmente podrá ser de utilidad para orientar la terapéutica y de tal manera tener un impacto en el pronóstico renal y sobrevida de estos pacientes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente la nefritis lúpica ocurre en alrededor del 60% de los pacientes con lupus eritematoso generalizado. Generalmente, se trata de pacientes jóvenes, y suele ser la manifestación inicial de la enfermedad o desarrollarse en los primeros 6 a 36 meses del diagnóstico. Si bien la presencia de nuevos medicamentos, incluso fármacos biológicos han tenido un impacto en el pronóstico de los pacientes con nefritis lúpica, existe el riesgo de toxicidad por las dosis acumuladas y los costos son importantes, lo que disminuye su apego. Adicionalmente, las tasas de recaída renal y la tasa de progresión renal siguen teniendo un gran impacto en los pacientes, sobre todo en nuestra población mexicana. Además, la de mortalidad sigue siendo significativamente más alta en comparación de los pacientes sin nefropatía lúpica. Por tanto, es necesario contar con un biomarcador que ayude a predecir o demostrar la persistencia de la actividad renal de manera temprana.^[31]

Actualmente se han descrito múltiples biomarcadores específicos de actividad con la finalidad de distinguir pacientes con inflamación activa de aquellos quienes no presentan inflamación. Al ser el lupus eritematoso generalizado una enfermedad con participación de diferentes vías de inflamación, es más complejo establecer un único biomarcador aplicable a la práctica clínica. Recordando que el estándar de oro sigue siendo la biopsia renal, el cual es un procedimiento invasivo con riesgo de complicaciones, en este estudio se propone la búsqueda de un nuevo biomarcador no invasivo de actividad renal, específico de la actividad de la vía del interferón.

Hasta el momento, estudios previos han demostrado que los niveles de OPN en plasma correlacionan con la actividad renal y con un mayor puntaje de SLEDAI. Sin embargo, al tratarse de una enfermedad sistémica, los hallazgos en plasma no siempre reflejan la actividad renal. En este sentido, los estudios de OPN junto con su ligando CD44 en orina de pacientes con LEG y actividad renal son escasos, con metodología limitada, y no aplicables a nuestra población.

En este estudio, se busca generar un biomarcador útil de actividad renal en lupus, con fundamente fisiopatológico y con potencial de guiar la terapéutica en esta enfermedad y generar un impacto en el pronóstico renal y sobrevida de pacientes con lupus.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es la osteopontina urinara un biomarcador útil para identificar a los pacientes con lupus eritematoso generalizado y actividad renal?

5. OBJETIVOS

Primario

- Evaluar el rendimiento diagnóstico de los niveles urinarios de OPN para diferenciar entre pacientes con nefropatía lúpica activa, lupus con actividad sistémica sin actividad renal, nefropatía lúpica inactiva, y pacientes con lupus sin actividad de la enfermedad

Secundarios

- Correlacionar los niveles de OPN en orina con los hallazgos histopatológicos de la biopsia renal percutánea (índices de actividad) y los parámetros serológicos
- Correlacionar los niveles de OPN urinaria con otros resultados de laboratorio clínico

6. HIPÓTESIS

Hipótesis Alternativa

- Los niveles urinarios de OPN diferenciarán a los pacientes con nefropatía lúpica activa de aquellos con lupus eritematoso sin actividad renal con una sensibilidad y especificidad mayores del 80%

Hipótesis Nula

- Los niveles urinarios de OPN no diferenciarán a los pacientes con nefropatía lúpica activa de aquellos con lupus eritematoso sin actividad renal

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño General

Se trató de un estudio transversal de evaluación de prueba diagnóstica. Inicialmente se realizó una fase exploratoria de factibilidad de medición, para determinar las condiciones para realizar los ensayos de los biomarcadores en suero y en orina.

Se analizaron los biomarcadores Osteopontina (OPN) y CD44. Se utilizaron los kit de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) de R&D Systems (Human Osteopontin DuoSet ELISA, Minneapolis, MN [DY1433]) y el kit de R&D Systems (Human CD44s DuoSet ELISA, Minneapolis, MN, [DY7045]), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En la fase exploratoria se incluyó un grupo reducido de pacientes con nefritis lúpica activa, pacientes con lupus eritematoso generalizado inactivo, y donadores renales donde se corroboró la presencia del biomarcador tanto en plasma como en orina, y se obtuvo el coeficiente de variabilidad intraensayo.

En la evaluación transversal del estudio de prueba diagnóstica se reclutaron los siguientes grupos de pacientes:

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

Se incluyó a pacientes programados para biopsia renal percutánea por sospecha de actividad renal. Se obtuvieron muestras séricas y de orina previo a la realización de la biopsia renal. Posteriormente se corroboró con el resultado histopatológico de la biopsia renal percutánea el grado de inflamación (índice de actividad ≥ 4 puntos) y el diagnóstico de nefropatía lúpica activa. Las muestras de orina y plasma se obtuvieron al acudir el paciente a sus citas de la consulta externa o en hospitalización en el Instituto previo a la realización de la biopsia renal

b) Pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado, actividad sistémica pero sin actividad renal

Se incluyeron a pacientes diagnosticados con lupus eritematoso generalizado con base a 4 criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés), con actividad sistémica actual definida por un puntaje de SLEDAI-2k >6 puntos, con al menos

4 puntos clínicos y sin hallazgos de enfermedad renal como se especificó arriba. Las muestras de orina y plasma se obtuvieron al acudir el paciente a sus citas en la consulta externa

c) Pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado sin actividad

Se invitó a participar a pacientes en seguimiento en la consulta externa de Reumatología y Nefrología quienes tuvieran el diagnóstico de lupus eritematoso generalizado en base en 4 criterios de la ACR, sin actividad sistémica o renal definida por criterios clínicos y con un puntaje de SLEDAI-2K <2 puntos. Las muestras de orina y plasma se obtuvieron al acudir el paciente a sus citas en consulta externa

d) Pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado, sin actividad renal y datos de cronicidad definida por biopsia renal percutánea

Se incluyó a pacientes que fueron sometidos a biopsia renal percutánea por sospecha de actividad renal, cuyos hallazgos histopatológicos presentaran un índice de cronicidad del NIH ≥ 4 y sin datos de actividad, definido por un índice de actividad ≤ 2 puntos, en el cual ninguno de los puntos fuera secundario a hallazgos de actividad glomerular. Las muestras de orina y plasma se obtuvieron al acudir el paciente a sus citas de consulta externa o en hospitalización del Instituto previo a la realización de la biopsia renal

De todos los grupos se obtuvieron a través del expediente electrónico las variables demográficas, clínicas, tratamiento actual, dosis acumuladas, estudios de laboratorio y parámetros serológicos. Además se obtuvieron los puntajes de actividad (SLEDAI-2K) y de daño acumulado SLICC/ACR (SLICC/ACR DI) al momento del reclutamiento. Para aquellos pacientes sometidos a biopsia renal se incluyeron las variables de la clasificación del *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society* (ISN/RPS), así como los índices de actividad y cronicidad del National Institutes of Health (NIH).

Una vez que el paciente aceptara su participación y firmara el consentimiento informado del estudio, se recolectaron las muestras de orina (10 ml), plasma (3 ml) y suero (3ml). Las muestras fueron centrifugadas, almacenadas y congeladas a -70°C en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

7.2 Criterios de selección

7.2.1 Criterios de inclusión

Para todos los pacientes

- Hombre o mujer mayor de 18 años
- Diagnóstico de lupus eritematoso generalizado basado en los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC)
- Consentimiento informado firmado previo a la inclusión en el estudio

Grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado y actividad renal

- Actividad renal diagnosticada mediante análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea definido por un índice de actividad ≥ 4 y/o proteinuria mayor de 1g en 24 horas o 1g/g por índice proteinuria/creatinuria
- Menos de 2 semanas con tratamiento de inducción a la remisión, definido como dosis de prednisona mayor de 0.5mg/kg, o más de un bolo intravenoso de ciclofosfamida administrado en los últimos 6 meses

Grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado, actividad sistémica sin actividad renal

- Actividad sistémica de lupus con puntaje de SLEDAI-2k ≥ 6 puntos (incluyendo mínimo 4 puntos clínicos), previo a su inclusión fueron evaluados por el servicio de Reumatología
- Sedimento urinario inactivo definido como ausencia de leucocituria y hematuria
- Índice proteinuria/creatininuria de muestra al azar o de recolección de 24 horas con proteinuria menor de 250mg/g
- Menos de 2 semanas con tratamiento inmunosupresor, definido como dosis de prednisona mayor de 0.5mg/kg, más de un bolo intravenoso de ciclofosfamida administrado en los últimos 6 meses

Grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado sin actividad

- Diagnóstico de lupus eritematoso generalizado sin actividad sistémica, con puntaje de SLEDAI-2K ≤ 2 puntos y ausencia de cambios en los parámetros serológicos (complemento y anticuerpos anti-DNAc) durante el 1 año de seguimiento, previo a su inclusión fueron evaluados por el servicio de Reumatología
- Función renal normal para la edad y sexo
- Índice proteinuria/creatininuria de muestra al azar o recolección de 24 horas menor de 250mg/g
- Sedimento urinario inactivo definido como ausencia de leucocituria y hematuria

Grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado sin actividad renal y datos de cronicidad en biopsia renal

- Pacientes con sospecha de actividad renal que fueran sometidos a biopsia renal, que en los hallazgos histopatológicos se reportara un índice de cronicidad del NIH ≥ 4 y un índice de actividad < 2 puntos
- Menos de 2 semanas con tratamiento con dosis de prednisona mayor de 0.5mg/kg, mofetil micofenolato iniciado a dosis mayor de 3g/24h, más de un bolo intravenoso de ciclofosfamida administrado en los últimos 6 meses

7.2.2 Criterios de Exclusión

- Paciente que no acepte a firmar el consentimiento informado
- Enfermedad comórbida en los grupos con lupus eritematoso generalizado capaz de inducir proteinuria (diabetes mellitus, otras enfermedades reumáticas)
- Paciente en anuria con requerimiento crónico de terapia de reemplazo renal

7.2.3 Criterios de Eliminación

- Muestra de biopsia renal percutánea insuficiente para la valoración de actividad (menor de 10 glomérulos obtenidos)
- Evidencia de otra etiología distinta a nefropatía lúpica en el análisis histopatológico de la biopsia renal
- Información incompleta en expediente electrónico
- Más de 2 semanas con tratamiento de inducción a la remisión con dosis de prednisona mayor de 0.5mg/kg y más de un bolo intravenoso de ciclofosfamida administrado en los últimos 6 meses

- Retiro del consentimiento informado

7.3 Variables registradas

1. *Variables demográficas:* fecha de nacimiento, sexo, edad, meses del diagnóstico, antecedentes actividad lúpica previa
2. *Variables clínicas basales:* criterio de obtención ± 2 semanas de la toma de muestra de orina y suero. Presión arterial sistólica y diastólica (mmHg), puntajes SLEDAI-2K y SLICC-DI. Dosis de medicamentos inmunosupresores: prednisona, mofetil micofenolato, azatioprina, ciclofosfamida, hidroxicloroquina. Dosis acumulada de inmunosupresores: prednisona, ciclofosfamida
3. *Variables laboratoriales basales:* obtenidas ± 2 semanas de la toma de muestras
 - Hemoglobina, leucocitos, linfocitos, plaquetas
 - Creatinina sérica (mg/dL), nitrógeno ureico sérico (mg/dL), albúmina (g/dL), se calculó la tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe)
 - Examen general de orina: densidad urinaria, leucocitos, eritrocitos en orina.
 - Proteínas en orina al azar (g/dL) y creatinina en orina al azar (g/dL)
 - Recolección de orina de 24 hrs: proteinuria (g/dL), creatinina urinaria (g/dL), volumen urinario.
 - Serología para anticuerpos contra DNA de doble cadena, fragmentos C3 y C4 del complemento
4. *Variables obtenidas del análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea (grupo con nefropatía activa):* índice de Actividad del NIH, índice de Cronicidad del NIH ^[39] y clasificación de acuerdo con la ISN/RPS. ^[40]

7.4 HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

OSTEOPONTINA URINARIA COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD RENAL EN PACIENTES CON LEG

Fecha de recolección: ____/____/____

Grupo de Selección: ____

Nombre:			
Registro:			
Fecha de nacimiento:	Edad:	Contacto:	

DEFINICIONES: CRITERIOS SELECCIÓN

1. Grupo pacientes LEG + actividad renal	2. Grupo pacientes LEG sistémico sin actividad renal	3. Grupo pacientes con LEG inactivo
- BRP: IA >4 - Proteinuria >1g en 24 horas o 1g/g por IPC, sedimento activo. < 2 semanas con tratamiento de inducción a la remisión: - PDN > 0.5mg/kg - MMF > de 2g/24h - Bolo CFM administrado en los últimos 6 meses.	- Actividad sistémica de lupus con puntaje de SLEDAI2k >=6 puntos. - Incluyendo mínimo 4 puntos clínicos - Sedimento urinario inactivo (ausencia de leucocituria y hematuria). - IPC muestra al azar o de recolección de 24 horas con proteinuria < 500mg/g.	- Sin actividad sistémica de LEG. - SLEDAI 2k <2 puntos. - Sin cambios en los parámetros en al menos 1 año (complemento/ DNAdc). - IPC muestra al azar o recolección de 24 horas < 500mg/g.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Paciente que no acepte a firmar el consentimiento informado.
- Otras comorbilidades capaz de inducir proteinuria (diabetes mellitus, amiloidosis, cáncer, otras glomerulopatías y otras enfermedades reumáticas autoinmunes).

TRATAMIENTO ACTUAL:

*contestar en caso de paciente en manejo de inducción.

	SI	NO	Fecha inicio *	Días de inicio *	Dosis actual	Dosis acumulada
PDN						
CFM						
MMF						
RTX						
FK						
AZA						
HCO						
MTX						
Otros						

ACTIVIDAD

Puntaje SLEDAI 2k	
Puntaje de SLICC	

EXPLORACIÓN FÍSICA

TAS	
TAD	

LABORATORIOS MOMENTO DE CAPTURA

Leu		Cr		Prot. U 24 hrs		C3	
Hb		BUN		Crea U 24 hrs.		C4	
Plq		Albúmina		IPC		DNAdc	
Linf		TFG		Eritros orina			
Neu		Sedimento:		Leucos orina			

BIOPSIA RENAL (si/no):

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

Fecha: ____/____/____

NOMBRE: _____

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

7.5 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 intercuartilares de acuerdo con el tipo de distribución de la variable estudiada.

Para la comparación de las características basales entre los 4 principales grupos de estudio se utilizaron pruebas de ANOVA o Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni o Dunnett para el número de comparaciones, respectivamente.

Los valores obtenidos de OPN y CD44 en los ensayos de ELISA en orina se normalizaron al valor de creatinina urinaria (concentración) de la muestra.

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

Para analizar las asociaciones entre los niveles plasmáticos y urinarios de cada biomarcador con las características basales y hallazgos histopatológicos (grupo con biopsia renal), 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 la construcción de curvas ROC para comparar la capacidad de distinguir el estado clínico entre los 4 grupos específicos de pacientes. Se seleccionaron los puntos de corte de cada biomarcador urinario y plasmático para definir niveles elevados, esto con base en el índice de Youden. Se obtuvo la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de cada biomarcador. Se utilizó la prueba de DeLong para la comparación de los valores de área bajo la curva ROC de los biomarcadores o su combinación.

Para las pruebas se consideró como significativo un valor de p menor de 0.05. Todos los análisis se realizaron con SPSS Statistics 24.0 y GraphPad Prism 3.0.

7.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El cálculo de tamaño de la muestra para detectar diferencia entre pacientes con nefropatía lúpica activa, pacientes con nefropatía lúpica inactiva, y pacientes con actividad sistémica sin afección renal, basado en una sensibilidad del 80%, especificidad en 80%, con una relación casos y controles 1:1, con un intervalo de confianza de 95% y una precisión del 10%. El número estimado de sujetos por grupo fue de 62 pacientes.

7.7 COMITÉ DE BIOÉTICA E INVESTIGACIÓN

Este protocolo fue aprobado por los respectivos comités del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán el 05 de octubre de 2020, con número de referencia: 3496, registro: CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627. Y No. Oficio MCONTROL-1202/2020. Se obtuvieron reaprobaciones anuales, aprobándose la última revisión por parte de los Comités Institucionales en diciembre de 2022.

7.8 POTENCIAL DE RECLUTAMIENTO

Se pretendía reclutar de manera inicial un total de 186 pacientes para el estudio (62 pacientes por grupo). Sin embargo, ante la contingencia por la pandemia de SARS-CoV2, que se vivió a nivel Nacional no se obtuvo la misma recepción de pacientes con diagnóstico de Lupus Eritematoso Generalizado en las consultas de seguimiento de Nefrología y Reumatología durante la fase de reclutamiento del estudio. Así mismo el número de biopsias renales del departamento de Nefrología se vio disminuido. Tras la discusión con el Comité Tutorial del estudio, se decidió agregar un cuarto grupo de estudio que incluyó a los pacientes con sospecha de actividad renal que fueron sometidos a biopsia renal y dentro de los hallazgos se encontró un índice de cronicidad del NIH ≥ 4 y ausencia de actividad renal significativa.

7.9 RIESGOS POTENCIALES

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

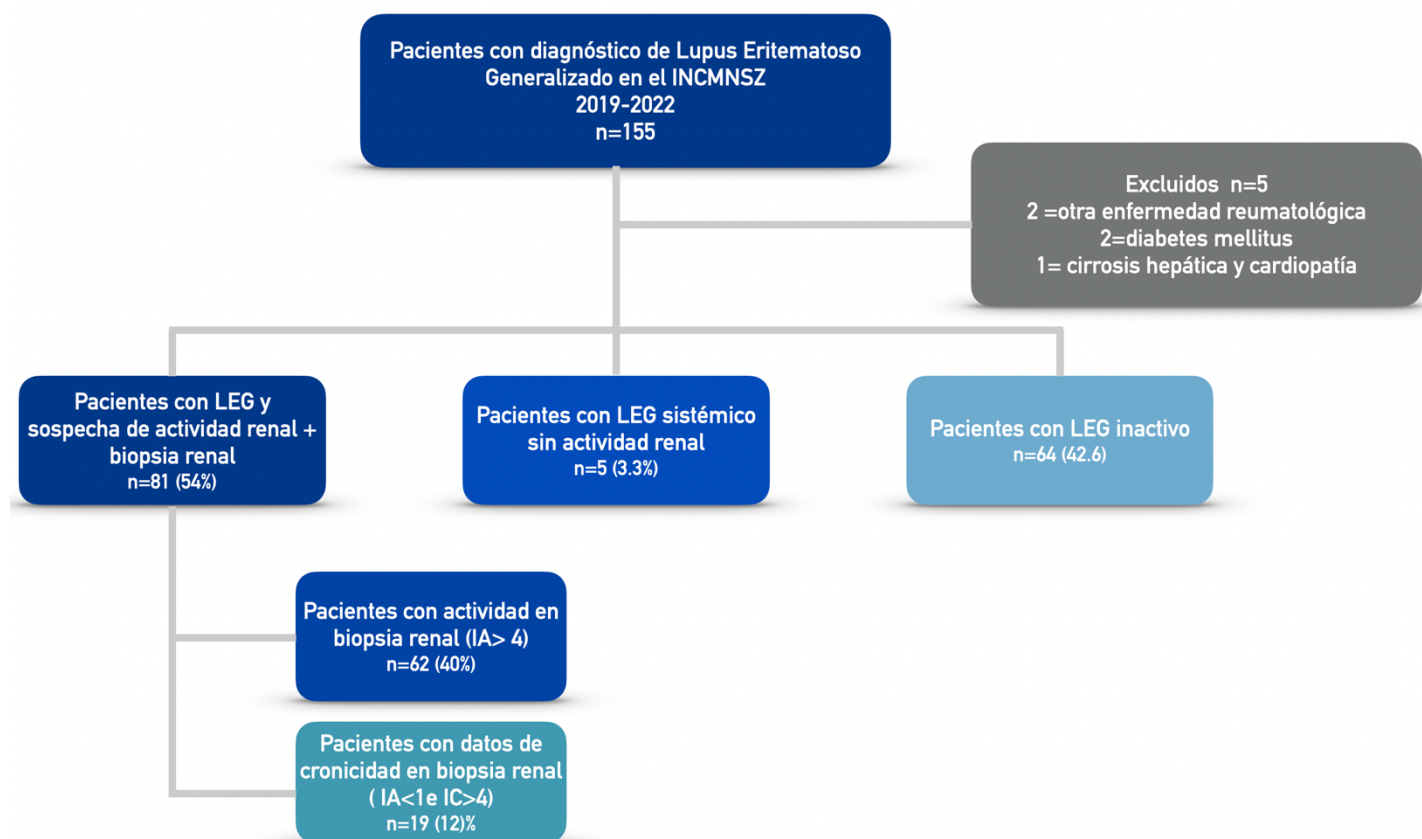
7.10 CRONOGRAMA INICIAL

AÑO	MES	ACTIVIDAD
2021	Febrero	Inicio del reclutamiento de pacientes y muestras biológicas. Fase exploratoria.
	Marzo-Abril	Sometimiento a los Comités de Ética e Investigación
	Mayo-Diciembre	Inicio de pruebas de detección de biomarcadores en muestras biológicas
2022	Enero-Junio	Fin del reclutamiento Evaluación del biomarcador urinario
	Julio-	Análisis estadístico.
	Diciembre	Preparación del manuscrito final.

8. RESULTADOS

Dentro del periodo de marzo del 2019 a junio del 2022 se reclutaron 150 pacientes. Se incluyeron 62 (40%) pacientes en el grupo de actividad renal, 19 (12%) pacientes en el grupo con hallazgos histopatológicos de cronicidad, 5 (3.2%) pacientes en el grupo de actividad sistémica sin actividad renal, y 64 (42.6%) pacientes en el grupo de lupus eritematoso generalizado inactivo. **(Figura 4)**

FIGURA 4. Diagrama de reclutamiento de pacientes con lupus eritematoso en el periodo marzo 2019- agosto 2022.



8.1 CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de compuso de 133 mujeres (88.7%), con una mediana de edad de 35 años (RIQ 27-45), siendo la población más joven la del grupo de pacientes con actividad renal 29.5 años (RIQ 24-37). Entre los hallazgos importantes se encontró que el grupo de actividad renal contó con menos años de diagnóstico de LEG, con una mediana de 6 años (RIQ 3-9), a diferencia de otros grupos ($p < 0.001$). Como era esperable, el grupo con actividad renal presentó un mayor puntaje de SLEDAI-2K. (Tabla 1)

TABLA 1. Características basales de la población.

	Total población (n=150)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=62)	Pacientes con LEG y actividad sistémica (n=5)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=19)	Pacientes con LEG inactivos (n=64)	p
Sexo (mujeres %)	133 (88.7)	51 (82.3)	5 (100)	16 (84.2)	61 (95.3)	0.95
Edad (años)	35 (27-45)	29.5 (24-37)	48 (37.5-49)	31 (24-37)	40 (35-53.75)	<0.001
Años de diagnóstico (años)	8.5 (4-16.25)	6 (3-9)	20 (9.5-21.5)	5 (1-12)	14.5 (8-21)	<0.001
Antecedente actividad (%)						
Hematológica	79 (52.7)	32 (51.6)	3 (3.8)	10 (12.7)	34 (53.1)	0.987
Muco-cutánea	109 (72.7)	45 (72.6)	5 (100)	11 (57.9)	48 (75)	0.246
Serológica	134 (89.3)	55 (88.7)	5 (100)	18 (94.7)	56 (87.5)	0.698
Neurológica	23 (15.3)	12 (19.4)	1 (20)	4 (21.1)	6 (9.4)	0.379
Serosas	42 (28)	23 (37.1)	1 (20)	7 (36.8)	11 (17.2)	0.067
Articular	119 (79.3)	50 (80.6)	4 (80)	13 (68.4)	52 (81.3)	0.662
SAAF (%)	40 (26)	12 (19.4)	1 (20)	5 (26.3)	21 (32.8)	0.382
Serológico	31 (77.5)	11 (91.7)	1 (100)	5 (100)	14 (63.6)	
Manifiesto	9 (22.5)	1 (8.3)	0	0	8 (36.4)	
TAS (mmHg)	120 (110-1130)	130 (113.75-141.25)	110 (98.5-125)	116 (110-130)	120 (110-125)	<0.001
TAD (mmHg)	78 (70-80.2)	80 (70-90)	70 (65.5-79.5)	70 (70-80)	75 (70-80)	0.011
SLEDAI 2k (puntaje)	6 (0-12)	11 (8-16)	8 (6.5-10)	8 (6-12)	0	<0.001
SLICC índice de daño (puntaje)	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-2.5)	0	0 (0-1)	0.038

En cuanto a los estudios de laboratorio, se encontraron niveles de hemoglobina más bajos en el grupo de pacientes activos renales con una mediana de 12.1 g/dL (RIQ 10.6-13.42), y en el grupo de pacientes con actividad sistémica con 11.4 g/dL (RIQ 9.75-13.9) en comparación al grupo de inactivos ($p<0.0001$). Como era de esperarse las pacientes con actividad renal presentaron menores tasas de filtrado glomerular (TFG), tuvieron mayor hipoalbuminemia, y los índices de proteinuria/creatininuria (IPC) más elevados (4.21 g/g [RIQ 2.1- 6.07]), además de presentar leuco-eritrocituria en el examen general de orina. (**Tabla 2**)

TABLA 2. Estudios de laboratorio basales de la población de estudio.

	Total población (n=150)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=62)	Pacientes con LEG y actividad sistémica (n=5)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=19)	Pacientes con LEG inactivos (n=64)	p
Leucocitos (cels/μl)	5.45 (4.10-7.10)	6.05 (4-7.95)	3.7 (3.2-4.7)	5.80 (4.60-1.80)	5.10 (4.20-6.55)	0.034
Hemoglobina (g/dL)	13 (11.57-14.60)	12.10 (10.60-13.42)	11.4 (9.75-13.9)	13.10 (11.3-15.30)	13.90 (12.90-14.87)	<0.001
Plaquetas (k/μl)	245 (200.75-284.25)	251 (205-285)	195 (150.5-244)	244 (181-288)	248 (205.25-285)	0.413
Linfocitos (%)	24 (15.67-31.65)	16.50 (10.65-26)	17.50 (14.3-20.1)	24 (15.90-29.1)	29.4 (22.85-34.60)	<0.001
Neutrofilos (%)	64.45 (55.15-74.20)	70.8 (61.75-81.67)	70.7 (68.25-78.95)	69.30 (56.3-76)	57.25 (52.85-63.80)	<0.001
BUN (mg/dL)	16.95 (11.37-26.35)	25.2 (18.69-36.1)	13.4 (10.45-16.3)	15.30 (10.80-22.80)	12.55 (10.15-16.85)	<0.001
Creatinina (mg/dL)	0.80 (0.66-1.07)	1.01 (0.70-1.93)	0.81 (0.69-1.14)	0.88 (0.67-1.20)	0.72 (0.61-0.87)	<0.001
Albúmina (g/dL)	3.75 (3.10-42.27)	3 (2.28-3.46)	3.64 (2.86-3.82)	3.75 (3.38-4.20)	4.29 (4.00-4.53)	<0.001
Proteínas orina (mg)	542.15 (101.25-3415)	3,252 (1,181-5,906)	237 (127.5-340)	2,500 (717-4,220)	99 (75-178.5)	<0.001
Creatinina orina	986 (758-1163)	967 (723-1155)	833 (327-975)	986 (819.1,130)	988 (779.5-1225)	0.309
Volumen (ml)	1800 (1100-2300)	1700 (1125-2200)	1700 (800-2000)	1700 (1000-2600)	2000 (1500-2450)	0.396
Índice prot/Cr	1.18 (0.12-4.23)	4.21 (2.10-6.07)	0.31 (0.18-0.93)	2.88 (1.41-4.15)	0.11 (0.07-0.21)	0.963
Densidad	1.015 (1.010-1.0180)	1.016 (1.011-1.018)	1.016 (1.00-1.022)	1.014 (1.012-1.015)	1.016 (1.011-1.019)	0.913
Eritros en orina (si)	59 (40.1)	37 (61.7)	2 (40)	5 (27.8)	15 (23.4)	<0.001
Leucos en orina (si)	65 (44.2)	45 (75)	2 (40)	14 (77.8)	4 (6.3)	<0.001

Además, ambos grupos con actividad (actividad renal y actividad sistémica no renal), como era esperable, presentaron niveles más bajos de complemento C3 y más altos de anticuerpos anti-DNA_{dc}. (**Tabla 3**)

TABLA 3. Perfil inmunológico de la población de estudio.

	Total población (n=150)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=62)	Pacientes con LEG y actividad sistémica (n=5)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=19)	Pacientes con LEG inactivos (n=64)	p
C3	96.5 (56-124.25)	57 (41.75-92)	54 (33-83)	95 (68-122)	116 (102-137)	<0.001
C3 bajo <87 (si)	57 (38)	43 (69.4)	4 (80)	7 (36.8)	3 (4.7)	<0.001
C4	14 (8-23)	8 (8-15)	8 (8-12.5)	16 (12-31)	21.50 (13.25-30.75)	<0.001
C4 bajo <19 (si)	96 (64)	53 (85.5)	5 (100)	12 (63.3)	26 (40.6)	<0.001
DNA_{dc}	41.70 (6.17-246.85)	190.35 (49.32-624)	447.5 (77.9-1016.9)	11.6 (6.10-83.3)	9.35 (3.72-29.12)	0.008
DNA >9.6	101 (67)	54 (87.1)	4 (80)	12 (63.2)	31 (48.4)	<0.001

Dentro de nuestra población, el 74% de los pacientes ha tenido algún antecedente de actividad renal en su evolución. Como hallazgo importante los pacientes con menor tasa de filtrado glomerular estimado (TFGe) fueron los pacientes con actividad renal con una mediana de 77 ml/min/1.73m² (RIQ 40-113), de los cuales 21 pacientes (33.9%) presentaron una TFG <60 ml/min/1.73m² (p<0.001). (**Tabla 4**)

TABLA 4. Antecedente de actividad y función renales al momento del reclutamiento.

	Total población (n=150)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=62)	Pacientes con LEG y actividad sistémica (n=5)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=19)	Pacientes con LEG inactivos (n=64)	p
Actividad renal previa(%)	112 (74.7)	62 (100)	1 (20)	19 (100)	30 (46.9)	<0.001
Número flares (RIQ)	2 (1-2)	2 (1-3)	1 (1-1)	2 (1-3)	1 (1-2)	0.001
Inducción						
CFM (%)	54 (48.2)	34 (54.8)	0	9 (47.4)	11 (36.7)	0.304
MMF (%)	75 (67)	39 (62.9)	1 (100)	15 (78.9)	20 (66.7)	0.534
RTX (%)	13 (11.6)	11 (17.7)	0	2 (10.5)	0	0.095
Multitarget (%)	15 (13.4)	11 (17.7)	0	4 (21.1)	0	0.080
AZA (%)	1 (0.9)	0	0	0	1 (3.3)	0.430
TFG (ml/min/1.73 m2)	91.5 (67.75-116)	77 (40.25-113.25)	89 (60-105)	94 (62-118)	97 (81.25-117)	0.004
TFG<90 ml/min/1.73m2 (si)	73 (48.7)	35 (56.5)	3 (60)	9 (47.4)	26 (40.6)	0.330
TFG<60 ml/min/1.73m2 (si)	27 (18.2)	21 (33.9)	0	4 (21.2)	2 (3.1)	<0.001

Un 80% de los pacientes con actividad renal al momento del reclutamiento se encontraban recibiendo esteroides con mediana de dosis de 10 mg al día (RIQ 5-27.5 mg/día, $p>0.001$). Un 59.7% de los pacientes se encontraba recibiendo mofetil micofenolato y sólo un 74.2% se encontraba usando un antimalárico. **(Tabla 5)**

TABLA 5. Medicamentos de la población al momento del reclutamiento.

	Total población (n=150)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=62)	Pacientes con LEG y actividad sistémica (n=5)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=19)	Pacientes con LEG inactivos (n=64)	p
IECA/ ARA 2 (%)	86 (57.3)	41 (66.1)	2 (40)	13 (68.4)	30 (47)	0.094
MTX (%)	9 (6)	2 (3.2)	2 (3.2)	2 (3.2)	3 (4.7)	0.007
Bolos MPD (%)	9 (6)	8 (12.9)	0	1 (5.3)	0	0.022
PDN (%)						
Dosis PDN (mg)	92 (61.3)	50 (80.6)	5 (100)	16 (84.2)	21 (32.8)	<0.001
Días inicio previo reclutamiento (días)	5 (5-20) 0 (0-8)	10 (5-27.5) 3 (0-10)	5 (5-20) 0	7.5 (5-27.5) 0 (0-11)	5 (5-5) 0	
MMF (%)	70 (46.7)	37 (59.7)	1 (20)	13 (68.4)	19 (29.7)	0.001
AZA (%)	32 (21.3)	9 (14.5)	2 (40)	2 (10.5)	19 (29.7)	0.081
Antimalárico (%)	102 (68)	46 (74.2)	3 (60)	15 (78.9)	38 (59.4)	0.215
Tacrolimus (%)	12 (8)	8 (12.9)	0	3 (15.8)	1 (1.6)	0.054

El patrón histológico más frecuentemente observado en las biopsias renales fue la clase mixta (ISN/RPS IV+V). Cabe destacar que la presencia de fibrosis intersticial (FI) y atrofia tubular (AT) no fue diferente entre los grupos. El grupo de pacientes con hallazgos crónicos presentó una fibrosis intersticial (FI) de 30% (RIQ 20-40) y atrofia tubular (AT) de 20% (RIQ 10-40). (Tabla 6)

TABLA 6. Análisis descriptivo de las biopsias renales realizadas.

BIOPSIAS REALIZADAS n=81		
Mediana (RIQ)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=62)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=19)
No. Glomérulos (RIQ)	17 (13-23)	19 (16-22)
ISN/RPS		
II (%)	0	0
III (%)	1 (1.7)	8 (42)
III+V (%)	10 (17.2)	4(21)
IV (%)	7 (12)	3 (15.8)
IV+V (%)	37 (63.8)	8 (42)
V (%)	1 (1.7)	0
Fibrosis intersticial (RIQ)	30 (15-40)	30 (20-40)
Atrofia tubular (RIQ)	15 (10-40)	20 (10-40)
Glomerulosclerosis global (RIQ)	3 (1-8.5)	3 (1-4)
Glomerulosclerosis segmentaria (RIQ)	4 (2-7)	8 (4-8)
Índice actividad /n=50	5.5 (4-8.25)	1 (1-1)
Índice de cronicidad /n=50	5.50 (4-9)	6 (5-8)

8.2 RESULTADO DE LOS ENSAYOS DE BIOMARCADORES

8.2.1 ENSAYOS DE OSTEOPONTINA EN PLASMA Y ORINA

Los ensayos de OPN en suero y plasma se realizaron con el del kit de inmunoensayo ligado a enzima de R&D Systems (*Human Osteopontin Duo Set ELISA, Minneapolis, MN [DY1433]*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La medición del biomarcador presentó un coeficiente de variación intra/inter-ensayo menor del 10%. Los niveles de OPN obtenidos de las muestras urinarias se normalizaron a la concentración de creatinina urinaria y se expresaron en ng/mg de creatinina.

Los pacientes inactivos de LEG presentaron niveles mayores de OPN en orina (416.34 ng/mg RIQ 266.85-664.01), en comparación con el grupo de pacientes activos renales y activos sistémicos sin actividad renal. Sin embargo, esto no implicó diferencias significativas entre los grupos ($p=0.241$).

En cuanto a los niveles de OPN en plasma, se encontraron títulos más elevados en pacientes con actividad renal (81.18 ng/mg, RIQ 53.75-169.46), seguidos por el grupo de actividad sistémica sin actividad renal (39.27 ng/mg, RIQ 33.05-64.19) y los niveles más bajos se observaron en el grupo inactivo con una $p<0.001$. (**Tabla 7**)

TABLA 7. Concentración de Osteopontina en orina y plasma.

	Total población (n=150)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=62)	Pacientes con LEG y actividad sistémica (n=5)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=19)	Pacientes con LEG inactivos (n=64)	p
Concentración ajustada OPN orina (ng/mg) [IQR]	382.76 (205.92–629.49)	392.91 (155.79-746.76)	341.73 (102.18-452.56)	266.59 (73.83-452.91)	416.34 (266.85-664.01)	0.241
Concentración OPN en plasma (ng/ml) [IQR]	48.21 (26.65-83.38)	81.18 (53.75-169.46)	39.27 (33.05-64.19)	39.86 (20.21-74.06)	31.209 (18.69-50.79)	<0.001

Dichos resultados se corroboraron en un grupo de 36 pacientes con NL de los cuales ya se contaba con el seguimiento de 3, 6 y 12 meses. Si bien este grupo no había sido considerado en la planeación de este estudio, se utilizó para corroborar los hallazgos de los biomarcadores. Los niveles de OPN fueron medidos en muestras de orina. La respuesta al tratamiento fue la siguiente: 13 pacientes alcanzaron respuesta completa a los 12 meses, 9 pacientes presentaron respuesta parcial y 14 no presentaron respuesta a los 12 meses. En los pacientes que no alcanzaron respuesta durante el seguimiento presentaron los niveles más bajos de OPN urinaria con una media de 61ng/mg (DE 47) a los 12 meses (**Figura 5 y Tabla 8**).

FIGURA 5. Pacientes con nefritis lúpica activa divididos en grupos dependiendo respuesta a tratamiento.

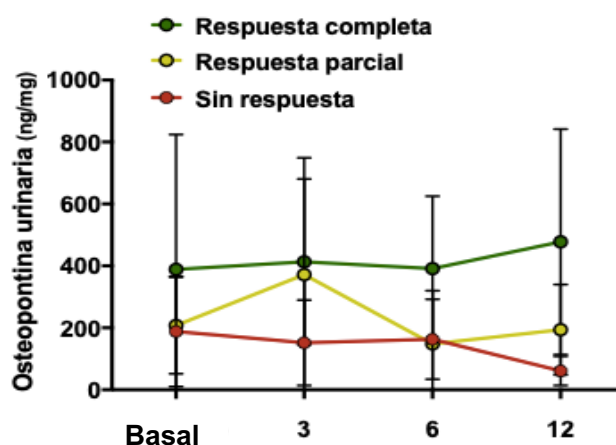


TABLA 8: Concentraciones de osteopontina urinaria (medias estimadas e intervalo de confianza al 95%) de pacientes con nefritis lúpica con seguimiento a los 3, 6 y 12 meses.

OPN urinaria (ng/mg)	Respuesta completa n=13	Respuesta parcial n=9	Sin respuesta n=14
Basal media (IC 95%)	389 (236.46-463.47)	298 (191.91-305.76)	188 (93.240-348.88)
3 meses media (IC 95%)	413 (145.68-525.28)	372 (246.30-738.92)	152 (72.28-270.48)
6 meses media (IC 95%)	391 (141.40-458.64)	148 (112.37-337.12)	163 (67.57-252.84)
12 meses media (IC 95%)	478 (197.86-713.44)	194 (95.38-286.16)	61 (24.61-92.12)

Los niveles elevados de OPN en plasma correlacionaron con los niveles del puntaje SLEDAI-2K ($r = 0.51$, $p < 0.001$), SLICC/ACR índice de daño ($r = 0.24$, $p = 0.003$), con la clase histológica del ISN/RPS de IV ($r = 0.24$, $p = 0.03$), con el índice histopatológico de actividad ($r = 0.46$, $p < 0.001$), con TGF α < 60 ml/min/1.73m 2 ($r = 0.35$, $p < 0.001$) y con los niveles de proteinuria ($r = 0.407$, $p < 0.001$). Sin embargo, no se encontró ninguna correlación de las variables clínicas, laboratoriales, o histopatológicas con los niveles urinarios de OPN. **(Tabla 9)**

TABLA 9. Correlación lineal de osteopontina sérica.

CORRELACIONES OSTEOPONTINA PLASMÁTICA		
VARIABLES	SPEARMAN r	P
Actividad renal (Si)	0.308	<0.001
Actividad serosas (Si)	0.189	0.020
SLEDAI 2K (Puntos)	0.519	<0.001
SLICC DI (Puntos)	0.242	0.003
ISN/RPS Clase III	-0.289	0.011
ISN/RPS Clase IV	0.246	0.031
Hemoglobina (g/dL)	-0.499	<0.001
Plaquetas (k/μl)	-0.173	0.035
C3 bajo (<87)	0.462	<0.001
C4 bajo (<19)	0.269	0.001
DNAdc (>9.6)	0.255	0.002
TGFα <60 ml/min/1.73m^2	0.357	<0.001
Índice Proteinuria/CrU (gr/gr)	0.459	<0.001
Proteinuria	0.407	<0.001
Índice de actividad	0.469	<0.001

8.2.2 ENSAYOS DE CD44 EN PLASMA Y ORINA

Los ensayos de CD44 en suero y plasma se realizaron con el del kit de inmunoensayo ligado a enzima de R&D Biosystems (*Human CD44s DuoSet ELISA, Minneapolis, MN, [DY7045]*), siguiendo las instrucciones del fabricante. La medición del biomarcador presentó un coeficiente de variación intra/inter-ensayo menor del 10%. Los niveles de CD44 obtenidos de las muestras urinarias se normalizaron a la concentración de creatinina urinaria y se expresaron en ng/mg de creatinina.

Los niveles de CD44 en orina fueron más altos en aquellos pacientes que presentaban nefritis lúpica crónica (104.22ng/mg, RIQ 11.449-377.61), mientras que los niveles más bajos se encontraron en los grupos de LEG inactivo (22.57 ng/mg, RIQ 16.22-39.6) y nefritis lúpica activa (25.70 ng/mg, RIQ 13.02-53.09). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.002$).

Los niveles de CD44 plasmático fueron más bajos en los pacientes con actividad sistémica (41.64 ng/mg, RIQ 29.71-65.08), con diferencia estadísticamente significativa ($p<0.001$). (**Tabla 11**)

TABLA 11. Concentración de CD44 en orina y plasma.

	Total población (n=131)	Pacientes con Nefritis lúpica activa (n=52)	Pacientes con LEG y actividad sistémica (n=5)	Pacientes con Nefritis lúpica crónica (n=15)	Pacientes con LEG inactivos (n=60)	p
Concentración ajustada CD44 orina (ng/mg) [IQR]	31.693 (18.605-53.092)	25.704 (13.023-38.066)	42.373 (30.319-62.464)	104.226 (11.449-377.610)	22.577 (16.226-39.600)	0.002
	(n=129)	(n=49)	(n=5)	(n=15)	(n=60)	p
Concentración CD44 en plasma (ng/ml) [IQR]	58.782 (34.036-94.263)	76.807 (44.445-116.958)	41.647 (29.705-65.089)	76.386 (46.727-199.595)	74.762 (47.766-115.712)	<0.001

Los niveles de CD44 en plasma correlacionaron positivamente con el puntaje del SLEDAI-2K ($r=0.396$, $p<0.001$), el puntaje de índice de daño SLICC/ACR ($r=0.23$, $p=0.007$), con la TFGe <60 ml/min/1.73m² ($r=0.30$, $p=0.001$), la proteinuria ($r=0.29$, $p=0.001$) y con los niveles de OPN en plasma ($r=0.34$, $p<0.001$). (Tabla 12)

TABLA 12. Correlación de CD44 en plasma con diversos parámetros.

CORRELACIONES CD44 PLASMÁTICA		
VARIABLE	SPEARMAN r	P
Actividad renal (Si)	0.199	0.024
SLEDAI 2K (Puntos)	0.396	<0.001
SLICC (Puntos)	0.235	0.007
Hemoglobina (g/dL)	-0.251	0.004
Linfocitos (%)	-0.292	0.001
C3 bajo (<87)	0.237	0.007
C4 bajo (<19)	0.244	0.005
DNA _{dc} (>9.6)	0.196	0.026
TFGe <60 ml/min/1.73m ²	0.303	0.001
Índice Proteinuria/CrU (gr/gr)	0.337	<0.001
Proteinuria (gr)	0.291	0.001
Osteopontina plasmática (ng/dL)	0.349	<0.001

Los niveles de CD44 en orina correlacionaron negativamente con el puntaje de SLEDAI-2K ($r=-0.23$, $p=0.006$), la TFGe <60 ml/min/1.73m² ($r=-0.314$, $p<0.001$), la proteinuria ($r=-0.26$, $p=0.002$) y con el índice histopatológico de cronicidad ($r=-0.287$, $p=0.028$). (Tabla 13)

TABLA 13. Correlación de CD44 en plasma con diversos parámetros.

CORRELACIONES CD44 URINARIA		
VARIABLE	SPEARMAN r	P
Actividad renal (Si)	-0.240	0.006
SLEDAI 2K (Puntos)	-0.237	0.006
TFGe <60 ml/min/1.73m ²	-0.314	<0.001
Índice Proteinuria/CrU (gr/gr)	-0.229	0.009
Proteinuria (gr)	-0.262	0.002
Índice de cronicidad (Puntos)	-0.287	0.028

8.3 CURVAS ROC DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS

8.3.1 LOS NIVELES DE OPN PLASMÁTICA DIFERENCIARON A PACIENTES CON NEFRITIS ACTIVA DE INACTIVA

Se construyeron curvas ROC para evaluar el rendimiento diagnóstico OPN plasmática en los grupos predefinidos de pacientes con nefritis lúpica activa y sin nefritis. El área bajo la curva ROC (ABC) de OPN plasmática fue de 0.937 (IC 95% 0.76-0.90). Se estableció un punto de corte de >58 ng/ml, con el cual se obtuvo una sensibilidad de 72% (IC 95% 0.60-0.82) y especificidad de 81% (IC 95% 0.71-0.88) para diferenciar nefritis lúpica activa de pacientes inactivos. El ABC de CD44 plasmática fue de 0.685 (IC 0.58-0.78). Un punto de corte >40 ng/ml tuvo una sensibilidad de 87% (IC 95% 0.75-0.94) y una especificidad de 44% (IC 95% 0.33-0.55) para diferenciar nefritis lúpica activa de pacientes inactivos. (**Figura 6, Tabla 14**)

FIGURA 6. Curva ROC de biomarcadores plasmáticos

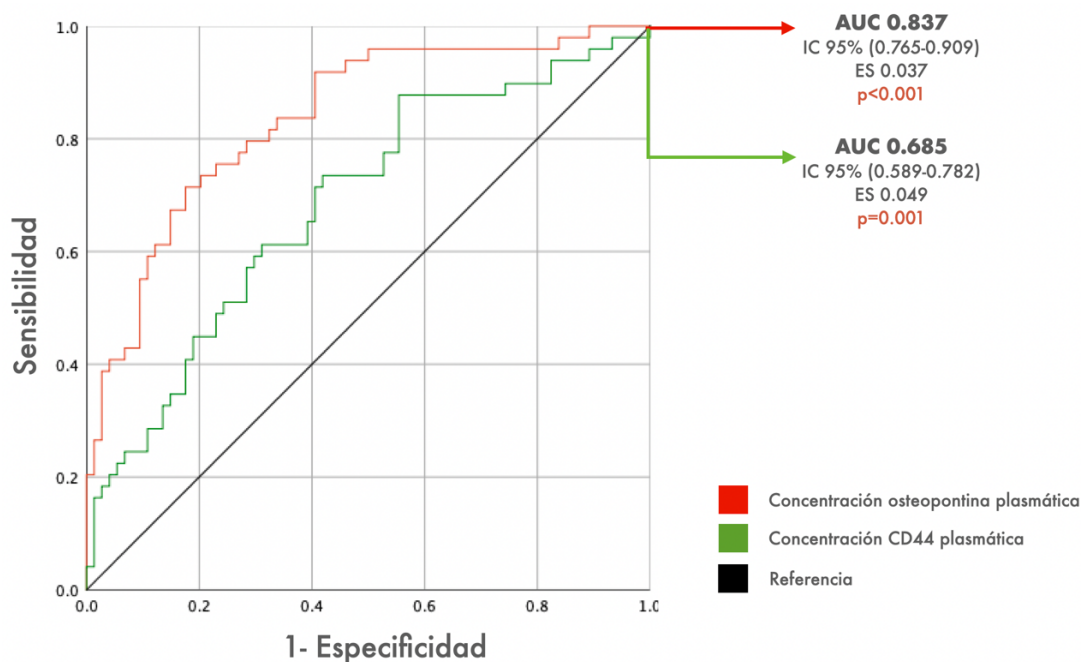


TABLA 14. Área bajo la curva de los distintos biomarcadores para detección de nefritis lúpica activa.

	PUNTO DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	LH(+)	LH(-)
OPN plasmática	58.295 IY= 0.539	72% ES 0.041 IC 95% (0.60-0.82)	81% ES 0.041 IC 95% (0.71-0.88)	3.96 ES= 0.041 IC 95%(2.44-6.42)	0.33 ES=0.041 IC 95% (0.22-0.51)
CD44 plasma	40.436 IY=0.323	87% ES=0.043 IC 95%(0.75-0.94)	44% ES=0.043 IC95% (0.33-0.55)	1.56 ES= 0.041 IC95% (1.25-1.96)	0.278 ES= 0.041 IC95% (0.12-0.61)

8.3.2 LOS NIVELES DE OPN URINARIA NO DIFERENCIARON A PACIENTES CON NEFRITIS ACTIVA DE INACTIVA

Se construyeron las curvas ROC para evaluar los biomarcadores urinarios OPN y CD44 para diferenciar a los pacientes predefinidos como nefritis lúpica activa y sin nefritis. El rendimiento de la OPN urinaria no presentó utilidad para diferenciar a los pacientes con nefritis lúpica activa y sin nefritis, con un área bajo de 0.48 (IC 95% 0.37-0.58). Por el otro lado el área bajo la curva de CD44 fue de 0.67 (IC 95% 0.58-0.77). Con el punto de corte <30 ng/mg se obtuvo una sensibilidad de 63% (IC 95% 0.49-0.75) y especificidad del 69% (0.58-0.78) para diferenciar pacientes inactivos de aquellos con nefritis lúpica activa. **(Figura 6 y Tabla 15)**

FIGURA 6. Curva ROC de biomarcadores OPN y CD44 plasmáticos.

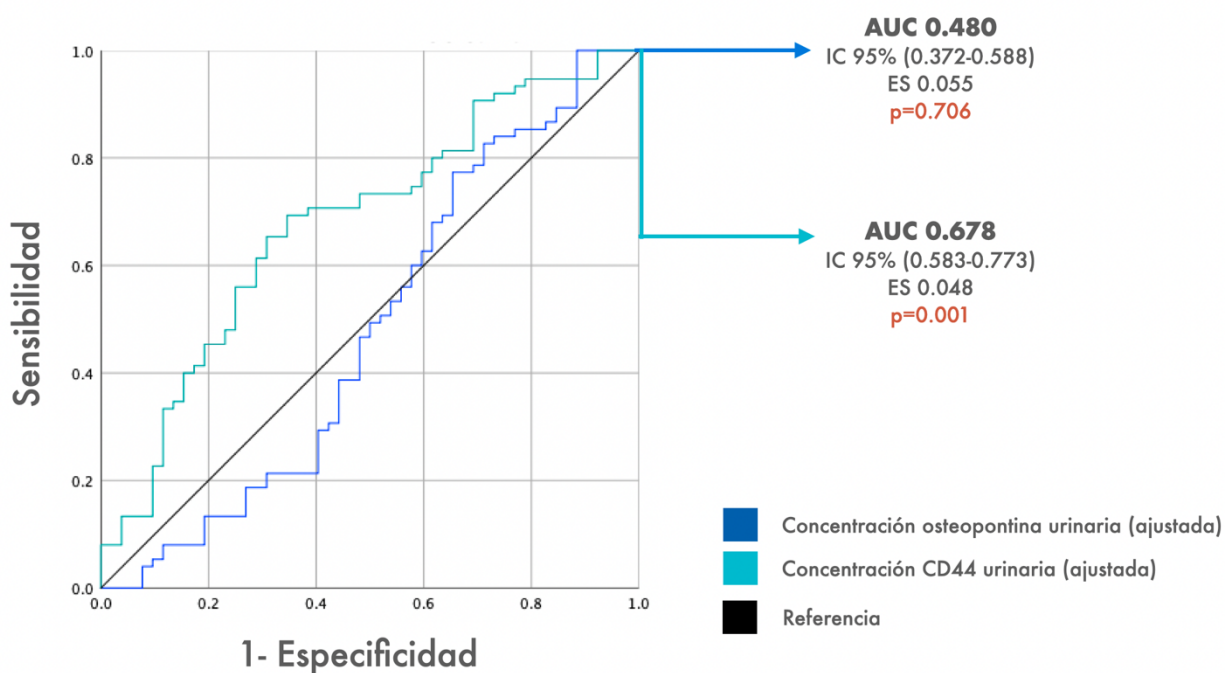


TABLA 15. Área bajo la curva de los biomarcadores OPN y CD44 urinarios para detección de nefritis lúpica activa.

	PUNTO DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	LH(+)	LH(-)
CD44 urinario	30.332 IY= 0.013	63% ES= 0.04 IC 95%(0.49-0.75)	69% ES= 0.04 IC 95% (0.58-0.78)	2.06 ES=0.04 IC95% (1.39-3.08)	0.52 ES= 0.04 IC 95% (0.35-0.77)
OPN urinaria	590.996 IY=0.145	37% ES= 0.041 IC 95% (0.26-0.50)	77% ES=0.041 IC 95%(0.67-0.85)	1.69 ES=0.038 IC 95% (1.03-2.14)	0.80 ES=0.03 IC95% (0.63-1.00)

Finalmente, se construyeron curvas ROC para evaluar la combinación de los biomarcadores OPN plasmática (OPNp), CD44 plasmática (CD44p), y CD44 urinaria (CD44u) en los grupos predefinidos de los pacientes con nefritis lúpica activa y sin nefritis.

La combinación de OPNp y CD44p tuvo una ABC de 0.84 (IC 95% 0.77-0.91). Con los puntos de corte previamente definidos por el índice de Youden de OPNp >58 ng/ml y CD44 >40 ng/ml tuvo una sensibilidad de 63% (IC 95% 0.49-0.75) y especificidad de 85% (IC 95% 0.75-0.91). (**Figura 7, Tabla 16**)

FIGURA 7. Curva ROC de la combinación de los biomarcadores plasmáticos OPN y CD44.

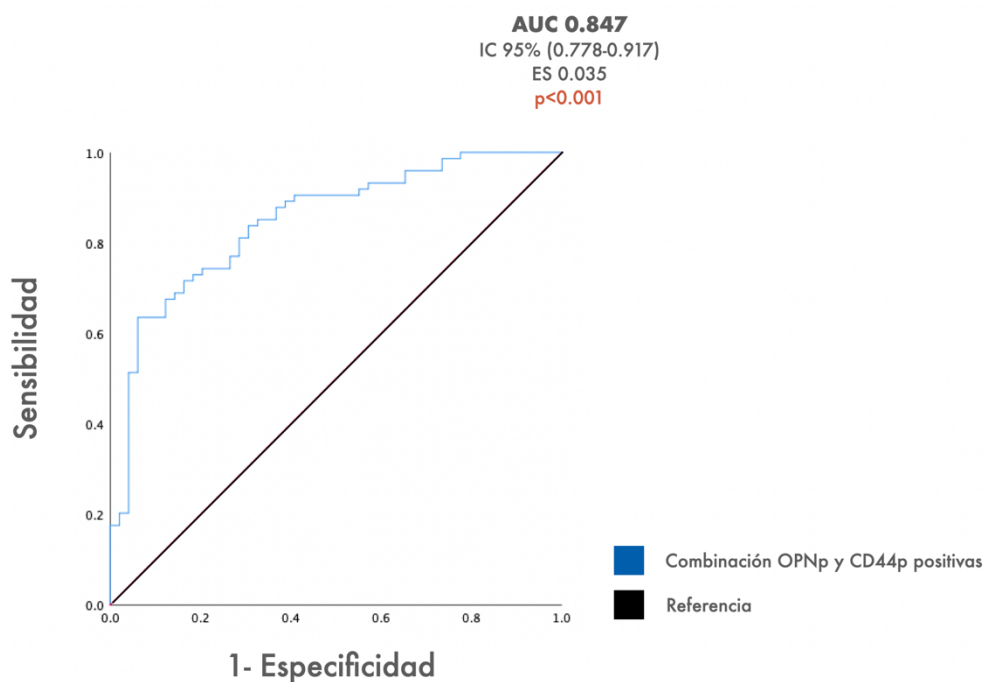


TABLA 16. Área bajo la curva de combinación de los biomarcadores OPN y CD44 plasmáticos para detección de nefritis lúpica activa.

	PUNTO DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	LH(+)	LH(-)
OPN plasmática	> 58.295	63% ES 0.044	85% ES 0.032	4.256 ES= 0.579	0.431 ES=0.042
CD44 plasma	> 40.436	IC 95% (0.49-0.75)	IC 95% (0.75-0.91)	IC 95%(2.377.64-1.136)	IC 95% (0.29-0.63)

Al realizar la combinación de OPNp >58 ng/ml, CD44 >40 ng/ml, y CD44u <30 ng/mg se obtuvo una AUC de 0.90 (IC 95% 0.84-0.95), con una sensibilidad de 36% (IC 95% 0.24-0.50) y especificidad 94% (IC 95% 0.85-0.98). **(Figura 8)**

FIGURA 8. Curva ROC de la combinación de los biomarcadores plasmáticos OPN y CD44.

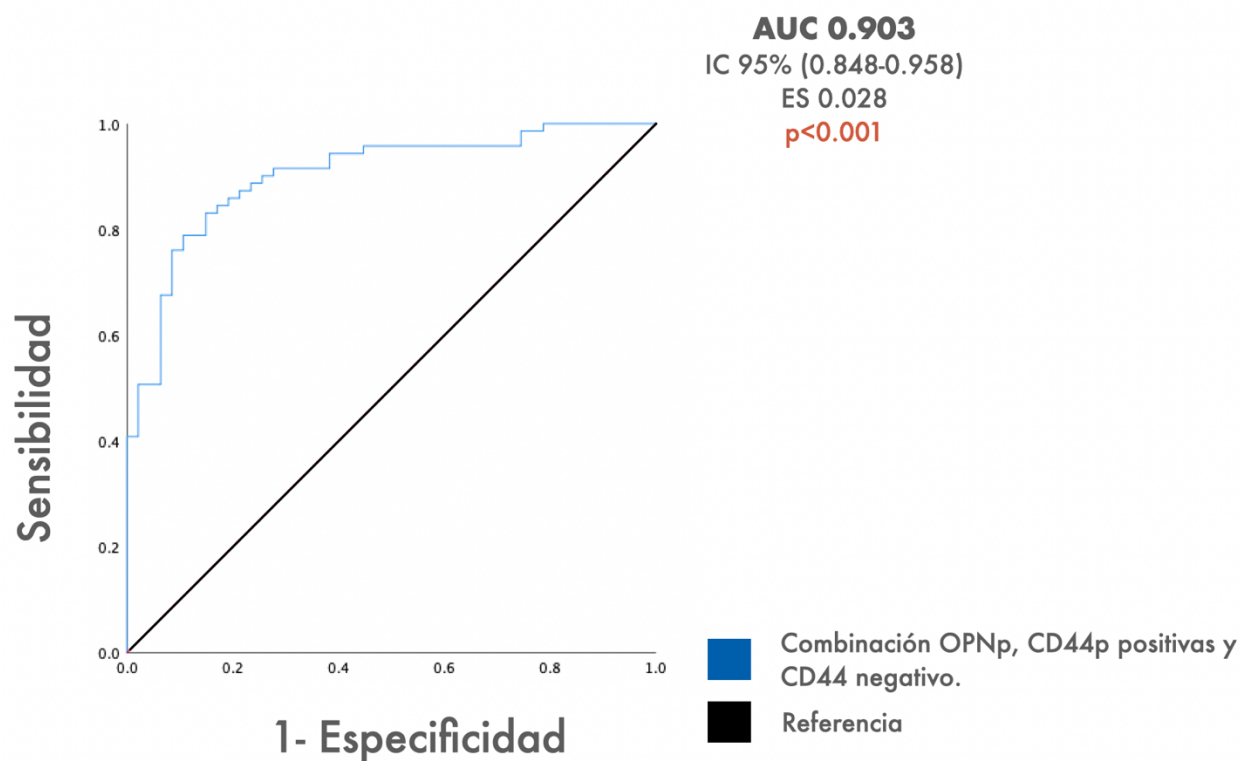


TABLA 17. Área bajo la curva de combinación de los biomarcadores OPN y CD44 plasmáticos y CD44 urinario para detección de nefritis lúpica activa.

	PUNTO DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	LH(+)	LH(-)
OPN plasmática	> 58.295	36% ES 0.045	94% ES 0.021	6.420 ES= 0.413	0.616 ES=0.035
CD44 plasma	> 40.436	IC 95% (0.24-0.50)	IC 95% (0.85-0.98)	IC 95%(2.30-17.79)	IC 95% (0.54-0.84)
CD44 urinario	< 30				

Sin embargo, al comparar las curvas ROC de OPNp y las curvas de los modelos de combinaciones de los biomarcadores por medio de la prueba de DeLong, no se detectó una diferencia significativa entre ellas como lo muestra la Tabla 18-19. Por tanto, la combinación de diversos biomarcadores no aumenta significativamente el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores individuales.

TABLA 18. Comparación de áreas bajo la curva de OPNp y modelo 1 de combinación de biomarcadores (OPNp, CD44p).

	DeLong Test
Diferencia entre las áreas	-0.01
Diferencia del ES	0.049
Z	-0.202
p no direccional (dos colas)	0.839
p direccional (una cola)	0.41

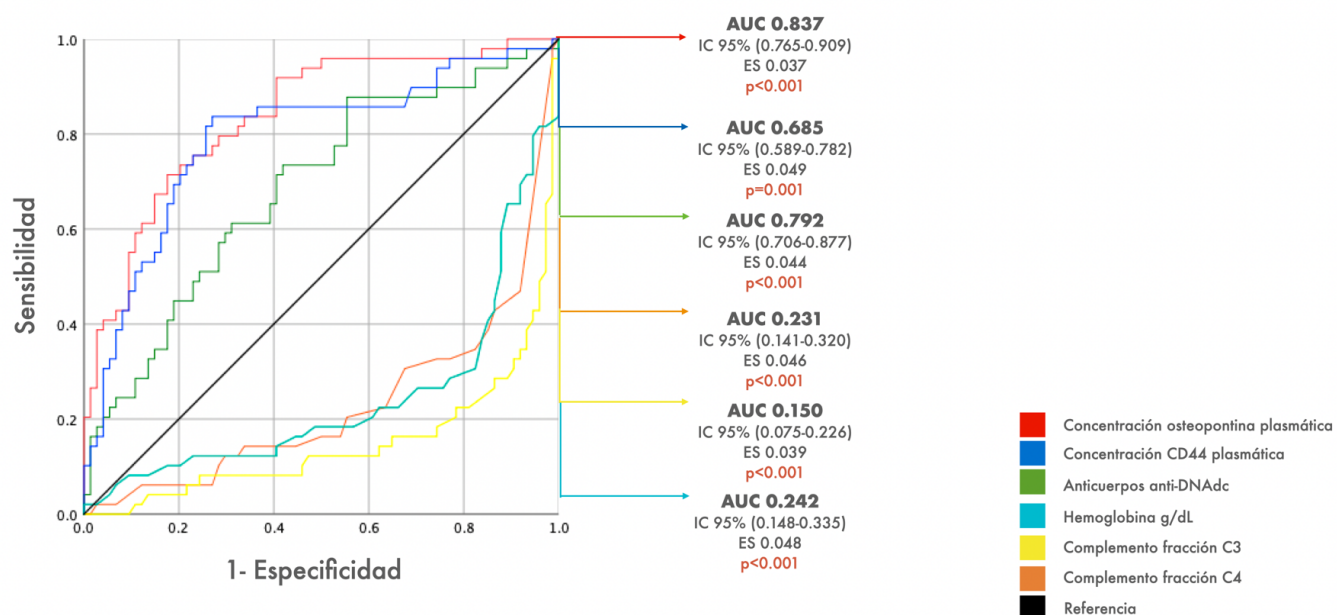
TABLA 19. Comparación de áreas bajo la curva de OPNp y modelo 2 de combinación de biomarcadores (OPNp positivo, CD44p positivo, y CD44u negativo).

	DeLong Test
Diferencia entre las áreas	-0.066
Diferencia del ES	0.045
Z	-1.443
p no direccional (dos colas)	0.148
p direccional (una cola)	0.07

8.3.3 COMPARACIÓN DE OPNp y CD44p CON LOS BIOMARCADORES CLÍNICOS CLÁSICOS DE NEFRITIS LÚPICA

Como último paso se construyó una curva ROC para comparar las diferentes áreas bajo la curva de nuestros biomarcadores con los biomarcadores séricos ya conocidos para la detección de nefritis lúpica activa. Los mejores biomarcadores obtenidos fueron OPNp (AUC 0.85, [IC 95% 0.76-0.90]), anticuerpos contra DNA doble cadena (DNAdc) (AUC 0.79, [IC 95% 0.70-0.87]) y CD44p (AUC 0.68, [IC 95% 0.58-0.78]. (**Figura 8**)

FIGURA 8. Curvas ROC de biomarcadores séricos para detección de nefritis lúpica.



8.4 FASE LONGITUDINAL AÚN EN ESTUDIO

Al encontrar estos datos, actualmente nos encontramos realizando una segunda fase del estudio de característica longitudinal, dónde se vigila de manera trimestral a los pacientes con nefropatía lúpica activa que recibieron tratamiento inmunosupresor. Se obtienen muestras de plasma, suero y orina en los meses 3, 6 y 12 del seguimiento. Sin embargo estos datos no son parte de la propuesta de tesis de maestría.

9. DISCUSIÓN

Hasta el momento la biopsia renal continúa siendo el estándar de oro para el diagnóstico de la nefritis lúpica. Los biomarcadores clínicos convencionales de actividad de la enfermedad o función renal tienen un valor diagnóstico y pronóstico pobre, por lo que se necesitan nuevos biomarcadores que ayuden al manejo de la NL. En este estudio de prueba diagnóstica de abordaje transversal evaluamos una población de nefritis lúpica activa y 3 grupos control. Encontramos que la OPN plasmática se presenta a títulos elevados en aquellos pacientes con nefritis lúpica activa y se asocia al puntaje de actividad de la enfermedad SLEDAI-2K, al índice daño acumulado SLICC/ACR DI, a clases proliferativas de nefritis lúpica, al índice histopatológico de actividad y a parámetros laboratoriales como la proteinuria y la TFGe bajas. Un punto de corte de 58 ng/ml, mostró una adecuada sensibilidad y especificidad para diferenciar nefritis lúpica activa de inactiva. El desempeño de este biomarcador único fue mejor que el de los biomarcadores clínicos convencionales. En contraste, la concentración de OPN urinaria no logró diferenciar entre los diversos grupos y no mostró utilidad para detectar la presencia de NL activa. Para reforzar los resultados, se estudió adicionalmente uno de los ligandos de OPN, la proteína CD44, la cual, con un punto de corte >40ng/ml presenta de manera similar a la OPN plasmática, una alta sensibilidad para detectar NL activa. Al combinar la medición de ambos biomarcadores plasmáticos su rendimiento para la detección de nefritis lúpica activa fue numéricamente superior. Este es uno de los primeros estudios que proponen la medición conjunta de estos dos biomarcadores que forman parte de una de las vías inflamatorias más importantes en pacientes con NL, la vía del interferón.

En la actualidad los estudios relacionados a osteopontina urinaria y nefritis lúpica son escasos. A diferencia de nuestros hallazgos, un estudio de 60 pacientes adultos encontró que la OPN urinaria completa se encontraba significativamente elevada en comparación con la medida en plasma en pacientes con nefritis lúpica y LEG sistémico. En nuestro estudio encontramos niveles más altos de OPNu en pacientes con LEG inactivos y niveles bajos de OPNu en pacientes con nefritis lúpica activa. ^[41] Este es un hallazgo contrastante, sin embargo, el hallazgo que los niveles de la proteína CD44, el receptor de unión de OPN, tuvo un comportamiento similar, sugiere que nuestros resultados reflejan el estado de este biomarcador en plasma.

Un estudio evaluó la asociación de OPNu con el daño estructural por biopsia renal y la capacidad de predecir disminución de la función renal en población pediátrica con nefritis lúpica.

Reportaron que los niveles altos de OPNu predicen daño estructural renal en pacientes con NL y en los pacientes control. Un hallazgo importante fue que los niveles de OPN eran más bajos en aquellos pacientes con un daño estructural importante en comparación con aquellos pacientes con un daño mínimo o nulo. Por lo que, proponen que esto pudiera ser secundario al estado de cronicidad de la NL. Este hallazgo coincide con lo observado en nuestro estudio, ya que el grupo con nefritis lúpica crónica presentó los niveles más bajos de OPNu.^[42]

Uno de los estudios más fuertes de OPNu y el único que ha estudiado ambas isoformas de OPN en la orina, su forma completa y fragmentada, es el grupo de Kitagori y colaboradores.^[38] En este estudio no se encontraron diferencias con respecto a la OPN completa entre los grupos de estudio, sin embargo, la concentración de OPN fragmentada en orina fue significativamente mayor en pacientes con NL comparado con los controles sanos. Así mismo los niveles de OPN fragmentada urinaria correlacionaron con el grado de proteinuria, no así con los índices de actividad SLEDAI-2K. También realizaron la medición de trombina en orina, la cual se encontraba elevada en pacientes con NL. En nuestro estudio realizamos la medición de OPN completa en orina. Se observaron niveles más bajos de OPN en la población con nefritis lúpica y en aquellos pacientes que no alcanzaron respuesta al tratamiento. Por lo que una de las hipótesis del estudio es que, al persistir con la inflamación en el tejido renal, se encontrará hay una mayor actividad de la trombina que escinde a la OPN completa, y por tanto, sus concentraciones se encuentran disminuidas en orina. En caso de evaluar OPN fragmentada, se esperarían niveles elevados en nuestros pacientes. Una solución para sustentar esta hipótesis sería medir directamente la proteína fragmentada por Western Blot o por espectrometría de masas en las muestras de orina, y evaluar directamente el peso molecular de la proteína secretada.

Cabe resaltar que nuestra población de pacientes con NL activa se encontraba con una disminución de la TFGe, por lo que una segunda hipótesis que proponemos es que habría una disminución de la depuración de la OPN al haber un daño renal mediado por la inflamación. Como ya se ha mencionado previamente, la OPN mantiene un estado pro-inflamatorio gracias a la estimulación de macrófagos e interleucinas inflamatorias, por lo que a largo plazo se desarrolla una inflamación crónica y posteriormente fibrosis intersticial, que se ve reflejado con un deterioro de función renal. Sin embargo, en nuestro estudio no se documentaron niveles de fibrosis o atrofia intersticial importante y no hubo diferencias en estas variables en comparación con el grupo de daño crónico.^[43-45]

Se ha demostrado previamente que los títulos elevados de OPNp correlacionan con la nefritis lúpica. En la cohorte de *Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) Inception Cohort* se encontró que la OPNp correlacionaba con el índice de actividad con un puntaje de SLEDAI-2K >5 puntos, con una de concentración promedio de OPN de 56.6 ng/ml en el grupo activo. Además, encontraron niveles plasmáticos más elevados en pacientes con nefritis lúpica y disminución de la TFG con una media de 63.7 ng/ml. Dichos hallazgos concuerdan con lo encontrado en nuestro estudio. En el seguimiento a 5 años los títulos altos de OPN plasmática correlacionaron con la persistencia de la enfermedad con una mediana de 53.7 ng/ml, en comparación con los pacientes que alcanzaron una respuesta que presentaron un promedio de 38.5 ng/ml. ^[34]

Actualmente, muchos biomarcadores no han llegado a la práctica clínica, debido a la metodología de los diseños de estudio transversales con un tamaño de muestra pequeño o la ausencia de un grupo control. Ciertamente esta primera fase del estudio es transversal y en ella detectamos diferencias en las concentraciones y comportamiento de OPN plasmática y urinaria. Por lo que actualmente estamos por finalizar la parte de seguimiento de nuestra población de nefritis lúpica activa que completará 12 meses de seguimiento posterior al tratamiento, sin duda esto dará fuerza al uso de este par de biomarcadores sobre todo para establecer su comportamiento con respecto a la respuesta al tratamiento de inducción a la remisión de la enfermedad.

Una de las limitantes de este estudio, fue el diseño transversal, así como el sesgo de selección al ser un estudio unicéntrico, de población únicamente hispana. Uno de los mayores retos a los que nos enfrentamos fue el reclutamiento de los pacientes, debido a la consecuencia de la contingencia por la pandemia de SARS-CoV2 y el ingreso limitado que hubo a paciente dentro del Instituto. Además, no nos fue posible poder adquirir el kit del biomarcador de OPN fraccionada, por situaciones ajenas a los investigadores, por lo que esto implicó una de las grandes limitaciones del estudio.

En conclusión, los hallazgos de este estudio demuestran que los niveles de la proteína OPN urinaria no reflejan la actividad de la nefritis lúpica. No obstante, la presencia de títulos elevados de OPN plasmática promete ser un biomarcador con adecuada sensibilidad y especificidad, que refleja el estado inflamación en pacientes con nefritis lúpica activa. Sin embargo, aún se requiere de los resultados de la fase longitudinal para poder comprender el comportamiento de esta molécula.

10. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO

Inicialmente el estudio estaba dirigido a detectar únicamente la eficacia del biomarcador osteopontina urinario en pacientes con nefritis lúpica, sin embargo, decidimos añadir otro biomarcador (CD44, el receptor de OPN) que diera sustento a la teoría de la fisiopatogenia de la firma del interferón en la NL.

Si bien, la concentración de la OPN urinaria no logró diferenciar la presencia de NL activa, se logró identificar un biomarcador prometedor que correlaciona con la inflamación renal, la OPN plasmática, cuyo efecto se potencia con la presencia de CD44. Sin embargo, para tener un impacto en la práctica clínica aún se requieren los resultados del análisis de la fase longitudinal del estudio. Así se podrá establecer si el biomarcador es adecuado para predecir recaídas renales, respuesta a tratamiento y desenlaces renales.

Estos biomarcadores logran explicar tan solo una vía implicada en la fisiopatología de la nefropatía lúpica, en un futuro el uso de biomarcadores específicos de las diferentes vías de inflamación podrá explicar cuál predomina en los pacientes con nefritis lúpica y así poder individualizar una terapia de tratamiento.

11.ABREVIACIONES

- Nefritis lúpica (NL)
- Lupus eritematoso generalizado (LEG)
- Enfermedad renal crónica terminal (ERCT)
- Osteopontina (OPN)
- OPN plasmática (OPNp)
- OPN urinaria (OPNu)
- CD44 plasmática (CD44p)
- CD44u (urinario)
- OPN fraccionada (OPNf)
- Área bajo la curva (ABC)
- Anti-DNA doble cadena (DNA_{dc}).
- Tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe)
- Células dendríticas (CD)
- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)
- Interferón (IFN),
- OPN intracelular (iOPN),
- Receptores tipo Toll (TLR).
- Nefropatía por IgA (IgAN)
- Vasculitis asociada a anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (VAA)

12. REFERENCIAS

1. Maria, N.I., Davidson, A. Protecting the kidney in systemic lupus erythematosus: from diagnosis to therapy. *Nat Rev Rheumatol* **16**, 255–267 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0401-9>
2. Rönnblom L, Leonard D. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Science & Medicine* 2019;**6**:e000270. <https://doi:10.1136/lupus-2018-000270>
3. Tsokos, G., Lo, M., Reis, P. *et al.* New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 716–730 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.186>
4. Zavala-Miranda, M. F., Pérez-Arias, A. A., Márquez-Macedo, S. E., Comunidad-Bonilla, R. A., Romero-Díaz, J., Morales-Buenrostro, L. E., & Mejía-Vilet, J. M. (2022). Characteristics and Outcomes of a Hispanic Lupus Nephritis Cohort from Mexico. *Rheumatology (Oxford, England)*, keac407. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keac407>
5. Birmingham, D. J., Merchant, M., Waikar, S. S., Nagaraja, H., Klein, J. B., & Rovin, B. H. (2017). Biomarkers of lupus nephritis histology and flare: deciphering the relevant amidst the noise. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 32(suppl_1), i71–i79. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw300>
6. Kaleta B. (2019). The role of osteopontin in kidney diseases. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 68(2), 93–102. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1200-5>
7. Kaleta B. (2014). Role of osteopontin in systemic lupus erythematosus. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 62(6), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0294-x>
8. O'Regan, A., & Berman, J. S. (2000). Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *International journal of experimental pathology*, 81(6), 373–390. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00163.x>
9. Xu, C., Wu, Y., & Liu, N. (2022). Osteopontin in autoimmune disorders: current knowledge and future perspective. *Inflammopharmacology*, 30(2), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-00932-0>

10. Xie, Y., Sakatsume, M., Nishi, S., Narita, I., Arakawa, M., & Gejyo, F. (2001). Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney international*, 60(5), 1645–1657. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00032.x>
11. Sodek, J., Ganss, B., & McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 11(3), 279–303. <https://doi.org/10.1177/104544411000110030101>
12. Thibault, D. L., Chu, A. D., Graham, K. L., Balboni, I., Lee, L. Y., Kohlmoos, C., Landrigan, A., Higgins, J. P., Tibshirani, R., & Utz, P. J. (2008). IRF9 and STAT1 are required for IgG autoantibody production and B cell expression of TLR7 in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), 1417–1426. <https://doi.org/10.1172/JCI30065>
13. Forton, A. C., Petri, M. A., Goldman, D., & Sullivan, K. E. (2002). An osteopontin (SPP1) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Human mutation*, 19(4), 459. <https://doi.org/10.1002/humu.9025>
14. Salimi, S., Noora, M., Nabizadeh, S., Rezaei, M., Shahraki, H., Milad, M. K., Naghavi, A., Farajian-Mashhadi, F., Zakeri, Z., & Sandoughi, M. (2016). Association of the osteopontin rs1126616 polymorphism and a higher serum osteopontin level with lupus nephritis. *Biomedical reports*, 4(3), 355–360. <https://doi.org/10.3892/br.2016.589>
15. Xu, A. P., Bai, J., Lü, J., Liang, Y. Y., Li, J. G., Lai, D. Y., Wan, X., & Huang, H. H. (2007). Osteopontin gene polymorphism in association with systemic lupus erythematosus in Chinese patients. *Chinese medical journal*, 120(23), 2124–2128.
16. Metwally, R. M., Hasan, A. S., & R, E. G. (2022). Association of Osteopontin gene single nucleotide polymorphism with lupus nephritis. *International journal of rheumatic diseases*, 25(5), 571–575. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.14308>
17. Yokosaki, Y., Tanaka, K., Higashikawa, F., Yamashita, K., & Eboshida, A. (2005). Distinct structural requirements for binding of the integrins alphavbeta6, alphavbeta3, alphavbeta5, alpha5beta1 and alpha9beta1 to osteopontin. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(6), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.05.005>
18. Green, P. M., Ludbrook, S. B., Miller, D. D., Horgan, C. M., & Barry, S. T. (2001). Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with alpha(4) integrins. *FEBS letters*, 503(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02690-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02690-4)
19. Ito, K., Kon, S., Nakayama, Y., Kurotaki, D., Saito, Y., Kanayama, M., Kimura, C., Diao, H., Morimoto, J., Matsui, Y., & Uede, T. (2009). The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and

- migration. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 28(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.10.002>
20. Martín-Márquez, B. T., Sandoval-García, F., Corona-Meraz, F. I., Petri, M. H., Gutiérrez-Mercado, Y. K., & Vázquez-Del Mercado, M. (2022). Osteopontin: another piece in the systemic lupus erythematosus immunopathology puzzle. *Clinical and experimental rheumatology*, 40(1), 173–182. <https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/x2g7rp>
 21. Agnihotri, R., Crawford, H. C., Haro, H., Matrisian, L. M., Havrda, M. C., & Liaw, L. (2001). Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *The Journal of biological chemistry*, 276(30), 28261–28267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103608200>
 22. Gimba, E. R. P., Brum, M. C. M., & Nestal De Moraes, G. (2019). Full-length osteopontin and its splice variants as modulators of chemoresistance and radioresistance (Review). *International journal of oncology*, 54(2), 420–430. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4656>
 23. Yu, X. Q., Nikolic-Paterson, D. J., Mu, W., Giachelli, C. M., Atkins, R. C., Johnson, R. J., & Lan, H. Y. (1998). A functional role for osteopontin in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 110(1), 50–64.
 24. Qu, W. M., Miyazaki, T., Terada, M., Lu, L. M., Nishihara, M., Yamada, A., Mori, S., Nakamura, Y., Ogasawara, H., Yazawa, C., Nakatsuru, S., & Nose, M. (2000). Genetic dissection of vasculitis in MRL/lpr lupus mice: a novel susceptibility locus involving the CD72c allele. *European journal of immunology*, 30(7), 2027–2037. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200007\)30:7<2027:AID-IMMU2027>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200007)30:7<2027:AID-IMMU2027>3.0.CO;2-S)
 25. Patarca, R., Wei, F. Y., Singh, P., Morasso, M. I., & Cantor, H. (1990). Dysregulated expression of the T cell cytokine Eta-1 in CD4-8- lymphocytes during the development of murine autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine*, 172(4), 1177–1183. <https://doi.org/10.1084/jem.172.4.1177>
 26. Shinohara, M. L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M. B., Kobayashi, K. S., Glimcher, L. H., & Cantor, H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nature immunology*, 7(5), 498–506. <https://doi.org/10.1038/ni1327>
 27. Wong, C. K., Lit, L. C., Tam, L. S., Li, E. K., & Lam, C. W. (2005). Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus

- erythematosus. *Rheumatology* (Oxford, England), 44(5), 602–606.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh558>
28. Aringer, M., & Smolen, J. S. (2004). Tumour necrosis factor and other proinflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: a rationale for therapeutic intervention. *Lupus*, 13(5), 344–347. <https://doi.org/10.1191/0961203303lu1024oa>
 29. Masutani, K., Akahoshi, M., Tsuruya, K., Tokumoto, M., Ninomiya, T., Kohsaka, T., Fukuda, K., Kanai, H., Nakashima, H., Otsuka, T., & Hirakata, H. (2001). Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism*, 44(9), 2097–2106. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200109\)44:9<2097:AID-ART360>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200109)44:9<2097:AID-ART360>3.0.CO;2-6)
 30. Wong, C. K., Ho, C. Y., Li, E. K., Tam, L. S., & Lam, C. W. (2002). Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology*, 130(2), 345–351. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01989.x>
 31. Afify MF, Mohamed GB, El-Maboud MA et al (2009) Plasma concentration of osteopontin (OPN) in children with systemic lupus erythematosus: relationship with disease activity. *Open Autoimmun J* 1:59–63. doi:10.2174/1876894600901010059]
 32. Rullo, O. J., Woo, J. M., Parsa, M. F., Hoftman, A. D., Maranian, P., Elashoff, D. A., Niewold, T. B., Grossman, J. M., Hahn, B. H., McMahon, M., McCurdy, D. K., & Tsao, B. P. (2013). Plasma levels of osteopontin identify patients at risk for organ damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 15(1), R18. <https://doi.org/10.1186/ar4150>
 33. Wirestam, L., Frodlund, M., Enocsson, H., Skogh, T., Wetterö, J., & Sjöwall, C. (2017). Osteopontin is associated with disease severity and antiphospholipid syndrome in well characterised Swedish cases of SLE. *Lupus science & medicine*, 4(1), e000225. <https://doi.org/10.1136/lupus-2017-000225>
 34. Wirestam, L., Enocsson, H., Skogh, T., Padyukov, L., Jönsen, A., Urowitz, M. B., Gladman, D. D., Romero-Diaz, J., Bae, S. C., Fortin, P. R., Sanchez-Guerrero, J., Clarke, A. E., Bernatsky, S., Gordon, C., Hanly, J. G., Wallace, D., Isenberg, D. A., Rahman, A., Merrill, J., Ginzler, E., ... Sjöwall, C. (2019). Osteopontin and Disease Activity in Patients with Recent-onset Systemic Lupus Erythematosus: Results from the SLICC Inception Cohort. *The Journal of rheumatology*, 46(5), 492–500. <https://doi.org/10.3899/jrheum.180713>

35. Okada, H., Moriwaki, K., Konishi, K., Kobayashi, T., Sugahara, S., Nakamoto, H., Saruta, T., & Suzuki, H. (2000). Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 36(3), 498–506. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2000.9790>
36. Ma, R., Jiang, W., Li, Z., Sun, Y., & Wei, Z. (2016). Intrarenal macrophage infiltration induced by T cells is associated with podocyte injury in lupus nephritis patients. *Lupus*, 25(14), 1577–1586. <https://doi.org/10.1177/0961203316646861>
37. Mejia-Vilet, J. M., Parikh, S. V., Song, H., Fadda, P., Shapiro, J. P., Ayoub, I., Yu, L., Zhang, J., Uribe-Uribe, N., & Rovin, B. H. (2019). Immune gene expression in kidney biopsies of lupus nephritis patients at diagnosis and at renal flare. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 34(7), 1197–1206. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy125>
38. Kitagori, K., Yoshifuji, H., Oku, T., Sasaki, C., Miyata, H., Mori, K. P., Nakajima, T., Ohmura, K., Kawabata, D., Yukawa, N., Imura, Y., Murakami, K., Nakashima, R., Usui, T., Fujii, T., Sakai, K., Yanagita, M., Hirayama, Y., & Mimori, T. (2016). Cleaved Form of Osteopontin in Urine as a Clinical Marker of Lupus Nephritis. *PloS one*, 11(12), e0167141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167141>
39. Austin, H. A., 3rd, Muenz, L. R., Joyce, K. M., Antonovych, T. A., Kullick, M. E., Klippel, J. H., Decker, J. L., & Balow, J. E. (1983). Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. *The American journal of medicine*, 75(3), 382–391. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)90338-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)90338-8)
40. Weening, J. J., D'Agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B., Balow, J. E., Bruijn, J. A., Cook, T., Ferrario, F., Fogo, A. B., Ginzler, E. M., Hebert, L., Hill, G., Hill, P., Jennette, J. C., Kong, N. C., Lesavre, P., Lockshin, M., Looi, L. M., ... Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus Nephritis (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney international*, 65(2), 521–530. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x>
41. Spinelli, F. R., Garufi, C., Truglia, S., Pacucci, V. A., Morello, F., Miranda, F., Perricone, C., Ceccarelli, F., Valesini, G., & Conti, F. (2019). The role of osteopontin as a candidate biomarker of renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology*, 37(6), 899–905.
42. Brunner, H. I., Gulati, G., Klein-Gitelman, M. S., Rouster-Stevens, K. A., Tucker, L., Ardoin, S. P., Onel, K. B., Mainville, R., Turnier, J., Aydin, P. O. A., Witte, D., Huang, B., Bennett, M. R., & Devarajan, P. (2019). Urine biomarkers of chronic kidney damage and

renal functional decline in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 34(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4049-5>

43. Cho, H. J., Cho, H. J., & Kim, H. S. (2009). Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Current atherosclerosis reports*, 11(3), 206–213. <https://doi.org/10.1007/s11883-009-0032-8>
44. Okada, H., Moriwaki, K., Kalluri, R., Takenaka, T., Imai, H., Ban, S., Takahama, M., & Suzuki, H. (2000). Osteopontin expressed by renal tubular epithelium mediates interstitial monocyte infiltration in rats. *American journal of physiology. Renal physiology*, 278(1), F110–F121. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.1.F110>
45. Yu, X. Q., Wu, L. L., Huang, X. R., Yang, N., Gilbert, R. E., Cooper, M. E., Johnson, R. J., Lai, K. N., & Lan, H. Y. (2000). Osteopontin expression in progressive renal injury in remnant kidney: role of angiotensin II. *Kidney international*, 58(4), 1469–1480. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00309.x>