



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”

TÍTULO:
ANÁLISIS DEL PERFIL CUANTITATIVO DE TLR8 INTRACITOPLÁSMICOS Y
MYD88 EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN PACIENTES CON
NEFROPATÍA LÚPICA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA

PRESENTA:
MICHELLE PATRICIA LOEZA URIBE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN

COTUTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ JIRAM TORRES RUIZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.
AGOSTO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



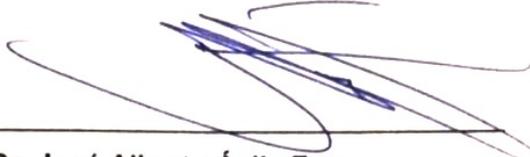
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

**ANÁLISIS DEL PERFIL CUANTITATIVO DE TLRs INTRACITOPLÁSMICOS Y
MYD88 EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN PACIENTES CON
NEFROPATÍA LÚPICA**



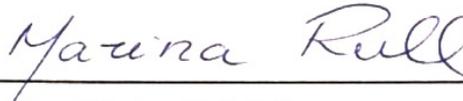
Dr. José Alberto Ávila Funes

Dirección de enseñanza

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA



Dra. Marina Rull Gabayet

Profesor titular del curso de especialización en reumatología

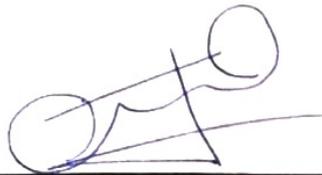
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



Dra. Diana Gómez Martín

Tutor de tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



Michelle Patricia Loeza Uribe

Tesista

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Materiales y métodos	9
Resultados	12
Discusión	17
Conclusiones	20
Referencias	21
Tablas y figuras	26
Anexos	34

RESUMEN

Título: Análisis del perfil cuantitativo de TLRs intracitoplásmicos y MyD88 en subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con nefropatía lúpica. **Objetivo:** Evaluar la expresión de TLRs intracitoplásmicos (TLR 7 y 9) y MyD 88 en diferentes subpoblaciones de linfocitos B (LB) en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) con y sin nefropatía lúpica (NL). **Materiales y métodos:** Estudio de casos y controles. Se incluyeron pacientes adultos con LEG acorde los criterios del ACR 1997 y/o SLICC 2012. En los casos se incluyeron pacientes con NL activa documentada histológicamente (GMN III o IV +/- V) o por variables bioquímicas (índice proteinuria/creatinuria >500mg/día, sedimento urinario activo o deterioro de la función renal no atribuible a otra etiología). En los controles se incluyeron pacientes con LEG activo (SLEDAI 2K ≥ 6) pero sin antecedente de actividad renal en los últimos 5 años. Mediante citometría de flujo se midió la expresión de TLRs 7, 9 y MyD88 en subpoblaciones de LB. La comparación entre variables cuantitativas de dos grupos se realizó mediante prueba de Student o U de Mann-Whitney. La evaluación de la correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman. **Resultados:** Se incluyeron 45 participantes: 30 casos con LEG y NL (66.6%) y 15 controles con LEG activo sin NL (33.3%). El 86.6% en el grupo de los casos fueron mujeres y en el grupo control 93.3%. La mediana de edad en los casos fue de 30 años (24 – 39) y en los controles de 38 años (34 – 45). A 19 pacientes (63.3%) del grupo de LEG con NL se les realizó biopsia renal como parte de su abordaje diagnóstico. El 26.3% tuvieron NL clase III + V y 73.6% tuvieron una clase IV + V. Para cada subpoblación se evaluó la expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en: porcentaje, número absoluto e intensidad media de fluorescencia (IMF). Las subpoblaciones de LB estudiadas fueron: totales, vírgenes, de memoria clásica, atípicos, transicionales, secretores de anticuerpos (LBSA), asociados a la edad (LBAE) y dobles negativos (DN). Se documentó: mayor expresión de MyD88 en LBSA: 0.77% (0.33 – 2.07) vs 0.56% (0.28 – 1.56) [$P:0.045$] y de TLR 7 en LB DN en el grupo de estudio en comparación con el control: 3.56 (1.31 – 13.55) vs 2.86 (0.56 – 6.54) ($P: 0.08$). Los pacientes con NL tuvieron menor expresión de TLR 9 en LBAE (IMF) en comparación con los controles: 1977 (1872 – 2165 UA) vs 2074 UA (2006 – 2330 UA). En los pacientes con NL se encontró una correlación positiva entre la expresión de MyD88 en LB de memoria clásica y: la fibrosis intersticial (FI) [$\rho: 0.3$], atrofia tubular (AT) [$\rho: 0.31$] e índices de actividad (IA) [$\rho: 0.3$] y cronicidad (IC) [$\rho: 0.38$]. Se encontró una correlación inversa entre: expresión de TLR 9 en LB de memoria clásica y AT ($\rho: - 0.3$) e IC ($\rho: - 0.36$). **Conclusiones:** Los pacientes con NL tuvieron mayor expresión de TLR7 en LB DN y de MyD 88 en LBSA, pero menor expresión de TLR9 en LBAE. Se documentó una correlación positiva entre la expresión de MyD 88 y las variables histopatológicas (FIAT, IA e IC). Se observó una correlación inversa entre la expresión de TLR9 y las mismas variables histopatológicas.

INTRODUCCIÓN:

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune, sistémica y crónica caracterizada por: hiperactividad de las células B, activación anormal de las células T, formación de autoanticuerpos y eliminación alterada de células apoptóticas y complejos inmunes^{1,2}. La formación de autoanticuerpos y el depósito de inmunocomplejos conducen a la inflamación y al daño de los diferentes órganos, siendo el riñón uno de los más frecuentemente afectados. La nefropatía lúpica (NL) es una de las formas más graves de actividad de la enfermedad y confiere un valor pronóstico. Entre el 25 – 50% de pacientes con LEG debutan con algún grado de afección renal y hasta el 60% tendrán actividad renal a lo largo de su evolución³.

Los linfocitos B (LB) autorreactivos, al ser células productoras de autoanticuerpos son fundamentales en la fisiopatogenia del LEG y de la nefropatía lúpica. Los mecanismos propuestos para el desarrollo de estas células abarcan: anomalías en la señalización de supervivencia/apoptosis que impiden la selección negativa, disfunción de los receptores inhibitorios, pérdida de tolerancia periférica por activación de células dendríticas (CD) y pérdida de tolerancia por activación de CD plasmocitoides productoras de interferón (IFN) tipo I⁴.

Los receptores tipo Toll (TLRs) son un grupo de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) pertenecientes al sistema inmune innato. Estos receptores suelen expresarse tanto en células del sistema inmune (macrófagos, CD y LB) como en otros tipos celulares (células renales epiteliales y mesangiales). Fisiológicamente desempeñan un papel crucial en la defensa de primera línea del huésped contra moléculas extrañas, conocidas como: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y actúan como ligandos. Los TLRs también pueden reconocer y responder a ligandos endógenos que se producen durante la inflamación y el daño tisular, lo que deriva en fenómenos de autoinmunidad⁵. Al momento se han descrito 11 TLRs en humanos. Estos pueden expresarse tanto a nivel extracelular (membrana plasmática): TLR-1,2,4,5,6 y 10; como a nivel intracelular (membrana endosómica o lisosómica): TLR-3, 7, 8 y 9. Las alteraciones en la señalización de TLRs intracitoplásmicos (particularmente TLR-7 y 9) se han asociado al desarrollo de patología autoinmune, tanto en modelos animales como en humanos con LEG⁵.

Además, se ha reportado que algunos polimorfismos genéticos de TLR-7 y 9 se han asociado a un mayor riesgo de LEG en población asiática⁶. Un estudio de casos y controles publicado por Zhang y colaboradores en 2014, tuvo por objetivo investigar los efectos de 4 polimorfismos genéticos de nucleótido único (SNPs) del gen de TLR-9 en el desarrollo de LEG en población del norte de China. Inicialmente se genotificaron 4 SNPs de TLR-9 (rs187084, rs5743836, rs352139 y rs 352140) por método SNaPshot. Posteriormente se comparó la presencia de dichos SNPs en 430 pacientes con LEG (casos) y 426 sujetos sanos (controles). La frecuencia del alelo rs352140 T fue mayor en los casos que en los controles, mientras que la frecuencia del rs352140 CC fue menor en los casos que en los controles sanos ($p < 0.005$). No se encontró diferencia significativa entre los otros genotipos. El genotipo CC del rs351240 y el haplotipo H2 resultaron ser factores protectores para el desarrollo de LEG (OR: 0.621; IC del 95%: 0.469 –0.822 para el CC; OR: 0.664; IC del 95%: 0.540–0.816 para el H2; $p < 0,05$). Por el contrario, se observó que el genotipo TT del rs351240, el alelo menor T y el haplotipo H3 aumentaban la susceptibilidad para el desarrollo de LEG (OR: 1.538; IC del 95%: 1.080 – 2.191 para TT; OR: 0.621; IC del 95%: 0.469 –0.822 para el alelo T y OR: 2.372; IC del 95%: 1.165 –4.832 para H3, $P < 0,05$)⁷.

Eloumi y colaboradores llevaron a cabo un estudio de casos y controles con el objetivo de determinar la asociación de los polimorfismos de los genes TLR-9 y TLR-5 con la susceptibilidad al LEG y su posible implicación en la afección renal. Se incluyeron 106 pacientes con LEG (casos) de los cuales 37 tenían NL documentada histológicamente y 200 sujetos sanos (controles). Todos los participantes fueron genotipados para rs187084 y rs352140 en TLR-9 y rs5744168 en TLR-5. Se documentó una asociación entre el genotipo TLR-9 rs352140 con la presencia de LEG (OR 1.53, IC95% 1.093 – 2.147, $p=0.013$) y NL (OR 2.06 IC95% 1.251 – 3.415, $p=0.004$). Se encontró mayor nivel de transcripción de TLR-9 en las biopsias renales de pacientes con NL en comparación con los controles sanos ($p < 0.05$), particularmente a nivel tubulointersticial. Además, se documentó positividad para TLR-9 a nivel glomerular mediante inmunohistoquímica en las biopsias de pacientes con afectación⁸.

En modelos animales, se ha reportado un papel divergente de TLR-7 y TLR-9 en la inducción de LEG. En diversas cepas se ha demostrado que la sobreexpresión de TLR-7 es capaz de inducir esta patología y su delección la inhibe; mientras que la delección de TLR-9 se ha asociado a la inducción de LEG y NL en diversos modelos murinos⁵. Cellhar y su grupo cruzaron ratones *Sle1* propensos al lupus con ratones deficientes de TLR-9 para generar ratones *Sle1*TLR-9^{-/-}. En estos ratones se evaluó la presencia de autoinmunidad grave mediante la evaluación de esplenomegalia, glomerulonefritis, autoanticuerpos, función de CD y expresión de proteínas TLR-7. Este modelo murino se asoció tanto a enfermedad grave como a mayor producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a ARN. El desarrollo de NL se asoció a una mayor infiltración por CD, las cuales mostraron una respuesta exacerbada a la presentación de antígenos dependiente de TLR-7, que a su vez se relacionó con una mayor expresión de este receptor a nivel tisular⁹.

Un estudio publicado en 2017 por Yuan et al, tuvo el objetivo de evaluar la existencia de la vía TLR9/TGF-β1/PDGF-B en sujetos sanos vs pacientes con LEG y su posible implicación en NL. Se incluyeron 112 pacientes con LEG y 56 sujetos sanos. Los autores encontraron que, en comparación con los controles sanos, los niveles de: TLR-9 (p=0.0048), TGF-β1 (p < 0.0001) y PDGF-B (p=0.0084) fueron mayores en pacientes con LEG. La activación in vitro de TLR-9 se asoció a la inducción de TGF-β1 y PDGF-B en cultivos primarios, siendo este último capaz de inducir proliferación de células mesangiales, como un mecanismo de daño en pacientes con NL¹⁰.

En un trabajo realizado en población mexicana se evaluó la expresión de: TLR-7 (en linfocitos T y B) y MyD88 y NF-kBp65 en linfocitos B de 100 mujeres Mayas con LEG en comparación con 100 controles sanos. La edad promedio de las pacientes con LEG fue de 39.7 años ± 12.8 (18–69) y el tiempo de duración de la enfermedad en años fue de 8.11 ± 6.91 (0.01–29). Al momento del reclutamiento el 54% de las pacientes tenía enfermedad activa (SLEDAI > 4), mientras que el 46% se encontraban sin actividad (SLEDAI < 4). Los investigadores encontraron mayor expresión de TLR-7 en LB totales CD19⁺ de pacientes con LEG en comparación con los controles sanos (p < 0.0001). La intensidad relativa de fluorescencia (rFI) de

TLR-7 en LB fue significativamente mayor en los casos con LEG que en los controles; sin embargo, la diferencia no tuvo significancia estadística ($p=0.1882$). Además, se observó mayor expresión en porcentaje de TLR-7 en linfocitos T CD4⁺ en los pacientes respecto a los controles ($p < 0.0001$), de igual forma el rFI fue mayor en el primer grupo. No se observó correlación alguna entre la expresión de TLR-7 en LB CD19⁺ y la actividad de la enfermedad (SLEDAI >4)¹¹. Sin embargo, cabe destacar que la expresión de TLR-7 solo fue evaluada en poblaciones totales de linfocitos B y no se evaluó en subpoblaciones relevantes para la fisiopatogenia de la enfermedad ni tampoco se evaluó su potencial asociación con el fenotipo clínico.

En el año 2022 Brown G, et al publicaron la existencia de una variante de novo con ganancia de función de TLR-7 asociada al desarrollo de LEG en una paciente con enfermedad de inicio juvenil. La variante fue corroborada en otro grupo de pacientes adultos y fue capaz de inducir LEG en un modelo murino (C57BL6, alelo kika). La variante TLR7^{Y264H} se asoció a un incremento en la afinidad a guanosina y 2',3'-cGMP, lo cual se relacionó con incremento en la sobrevivencia de linfocitos B activados, así como a la acumulación de células B asociadas a la edad (ABCs, por sus siglas en inglés) extrafoliculares, linfocitos B de centros germinales y producción de autoanticuerpos; lo cual era dependiente de la presencia de MyD88, predominantemente en LB y CD plasmocitoides¹².

La mayoría de los LB maduros pueden dividirse en cuatro subtipos en función de la expresión de los marcadores de superficie IgD y CD27: IgD⁺CD27⁻ o células B vírgenes, IgD⁺CD27⁺ o células B de memoria con cambio de isotipo e IgD⁻CD27⁻ o células B dobles negativas (DN)¹³. Los LB DN están presentes en pacientes con LEG y su sobreexpresión se correlaciona con actividad global de la enfermedad y manifestaciones renales¹⁴. Jenks SA y sus colaboradores, reportaron expansión de células B dobles negativas (IgD⁻CD27⁻), particularmente la subpoblación DN2 (CXCR5⁻CD11c⁺) en pacientes con LEG. Esta subpoblación tiene origen extra folicular y se caracteriza por un perfil transcripcional diferente, con incremento en la expresión de T-bet y activación de TLR-7. Los LB DN son capaces de diferenciarse a células plasmáticas con producción de anticuerpos dependiente de TLR-7 e IL-

21. El grupo de investigación demostró que la expansión de LB DN fue especialmente mayor en pacientes con LEG de origen afro-americano, con mayor actividad de la enfermedad, nefropatía lúpica y con títulos altos de anti-Sm¹⁵.

Maravillas JL et al en 2022, llevaron a cabo un estudio en pacientes mexicanos con el objetivo de analizar la expresión de moléculas (CD11c, T-bet y CD21) que definen la subpoblación de células B asociadas a la edad (ABCs) mediante citometría de flujo en pacientes con LEG con y sin NL. Se incluyeron 10 pacientes con LEG sin NL en los últimos 5 años, 17 pacientes con NL activa y 10 controles sanos. Se realizó un seguimiento de los pacientes con NL activa tras 6 meses del tratamiento de inducción. Se encontró presencia de expansión periférica de ABCs (CD11c⁺Tbet⁺CD21^{hi}) en pacientes con NL, en comparación con los sujetos sanos. La presencia de LB CD21^{hi} se correlacionó negativamente con el puntaje SLEDAI (p=0.0004) y los títulos de antiDNAc (p= 0.0005). Adicionalmente, la frecuencia de ABCs disminuyó posterior a la terapia de inducción de NL en pacientes que presentaron remisión completa o parcial. Por otro lado, los pacientes que tuvieron remisión parcial o completa tuvieron un aumento en la frecuencia de la subpoblación CD21^{hi}. El mismo comportamiento se observó al analizar los números absolutos de ABCs y de células CD21^(hi) ¹⁶.

A pesar de que el papel de los TLRs intracitoplásmicos 7 y 9, así como de moléculas adaptadoras clave para su señalización como MyD88 ha sido demostrado en LEG, su caracterización en uno de los blancos celulares más relevantes, que incluyen a subpoblaciones de linfocitos B, como ABCs y su asociación con la presencia de nefropatía lúpica no han sido evaluadas, lo cual es el objetivo principal del presente trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La señalización intrínseca de TLRs intracitoplásmicos (7 y 9) y MyD88 en los linfocitos B, desempeña un papel importante en el desarrollo y la patogenia de LEG. En los pacientes con LEG hay una mayor expresión de TLRs 7, 9 y MyD88 en sus células mononucleares, en comparación con sujetos sanos. Existe poca información sobre dicha expresión en subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con nefropatía

lúpica, la cual es una causa importante de morbi-mortalidad en pacientes con LEG. y particularmente en pacientes latinoamericanos.

JUSTIFICACIÓN:

En la cohorte GLADEL (Grupo Latinoamericano del Estudio del Lupus) conformada por pacientes de 34 centros de 9 países latinoamericanos se incluyó población: mestiza (44%), blanca (42%) y afrolatinoamericana (13%). Se observó que la actividad renal se presentó en 43.6% de la población blanca y 58.3% de la población mestiza ($p:<0.0001$). Algunas complicaciones relacionadas a nefropatía lúpica, como enfermedad renal crónica e hipertensión fueron más frecuentes en mestizos que en blancos. Se encontraron puntajes SLEDAI (actividad de la enfermedad) mayores en población mestiza: 13.5 puntos (DE: 8.5) que en población blanca: 12 puntos (DE: 7.9), $p:0.0033$. En población mestiza y afrolatinoamericana, la enfermedad inició a una edad más temprana en comparación con los blancos. Todo lo anterior traduce un espectro clínico más agresivo y de curso crónico de la enfermedad en nuestra población^{17,18}.

Un estudio retrospectivo transversal y descriptivo publicado por Etchegaray y sus colaboradores en abril de 2022, analizó las principales causas de muerte en mujeres en México entre los años 2000 al 2020. Se encontraron 12, 114 muertes relacionadas a lupus, siendo el grupo etario más comunmente afectado el comprendido entre los 25 – 44 años. Importante mencionar que el lugar que ocupó el LEG como causa de muerte fue el 15º en el grupo comprendido entre 15 – 24 años y el 16º tanto en el grupo de 25 – 34 años como en el de 35 – 44 años¹⁹. El hecho de que el LEG se encuentre dentro de las primeras 20 causas de mortalidad en este grupo poblacional vulnerable (mujeres en edad reproductiva) traduce un importante problema de salud pública.

A la fecha aun existe un vacío en el conocimiento en relación a la existencia de biomarcadores de suficiente capacidad diagnóstica que al mismo tiempo traduzcan parte de la patogenia de esta enfermedad. Por lo anterior el presente estudio, busca comparar la expresión TLRs 7, 9 y MyD88 en pacientes con LEG con

y sin nefropatía lúpica para evaluar su potencial correlación con diferentes variables clínicas, bioquímicas e histopatológicas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Existen alteraciones en la expresión de TLRs intracitoplásmicos (TLR-7 y 9) y MyD88 en diferentes subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con nefropatía lúpica?

HIPÓTESIS:

Los pacientes con LEG y nefropatía lúpica tendrán una mayor expresión de TLRs intracitoplásmicos (TLR-7 y 9) y MyD88 en diferentes subpoblaciones de linfocitos B en comparación con pacientes sin actividad renal.

OBJETIVOS:

EL objetivo principal de este trabajo fue evaluar la expresión de TLRs intracitoplásmicos (TLR 7 y 9) y MyD 88 en diferentes subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con LEG con y sin nefropatía lúpica. Los objetivos secundarios fueron:

1.-Describir las características demográficas, clínicas, bioquímicas y serológicas de la población estudiada.

2.-Evaluar la correlación entre la expresión de TLRs 7,9 y MyD 88 en subpoblaciones de LB en pacientes con LEG con o sin NL y:

- Actividad de la enfermedad medida por SLEDAI 2K.
- Presencia de actividad extra renal (constitucional, mucocutánea, hematológica, serosas, neuropsiquiátrica y/o articular).
- Variables bioquímicas (creatinina, TFG, PCR, globulinas)
- Variables serológicas (complemento y títulos de antiDNAdc).
- Variables urinarias (sedimento urinario e índice de proteinuria/creatinuria).
- Variables histopatológicas: clases de NL, índices de actividad/cronicidad y porcentajes de fibrosis intersticial y atrofia tubular.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Diseño

Se realizó un estudio de casos y controles. Se incluyeron 45 pacientes con diagnóstico de LEG: 30 con NL (casos) y 15 sin NL (controles), del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) de marzo a agosto de 2023.

Cálculo de muestra

Se realizó el cálculo del tamaño de muestra para estimar la diferencia entre medias con base en la expresión de TLR9 en CMN de pacientes con LEG con una media (DE) 2.79 (± 1.91) vs 1.47 (± 1.88) en controles sanos, demostrada en un estudio publicado por Komatsuda et al²⁰. Se calculó una d de Cohen de 0.69, con un poder de 80%, nivel de significancia de 0.05, con un total de 27 sujetos por grupo

Pacientes

Para los **casos** los **criterios de inclusión** fueron: pacientes >18 años con el diagnóstico de LEG acorde los criterios del ACR 1997 y/o SLICC 2012, con nefropatía lúpica activa documentada por biopsia renal percutánea (GMN III o IV +/- V) o por variables bioquímicas [índice proteinuria/creatinuria >500mg/día, sedimento urinario activo (acantocitos $\geq 5\%$, cilindros eritrocitarios y/o leucocitarios) o deterioro de la función renal no atribuible a otra etiología] que aceptaran participar en el estudio mediante la firma de consentimiento informado.

Para los **controles** los **criterios de inclusión** fueron: pacientes >18 años con el diagnóstico de LEG acorde los criterios del ACR/SLICC 2012, con actividad global con SLEDAI ≥ 6 pero sin antecedente de actividad renal en los últimos 5 años que aceptaran participar en el estudio mediante la firma de consentimiento informado.

Los **criterios de exclusión** fueron: pacientes con síndromes de sobreposición, embarazadas o en puerperio, pacientes con antecedente de tratamiento con fármacos antiCD20 o inmunoglobulina (IgIV), aquellos con diagnóstico de infección bacteriana aguda o viral crónica, diagnóstico de COVID –

19 en los últimos 3 meses, pacientes con diagnóstico de cáncer, usuarios de drogas y aquellos con diagnóstico de nefropatía preexistente no relacionada a LEG.

Los **criterios de eliminación** comprendieron: pacientes que retiraran voluntariamente su consentimiento, aquellos con muestra insuficiente para la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos B y pacientes cuyo expediente (físico y/o electrónico) no contara con la información requerida (variables: demográficas, clínicas, paraclínicas y de tratamiento).

Procedimientos

Tras identificar a un paciente como potencial participante (caso o control) se le invitaba a formar parte del estudio, después de una explicación detallada de los riesgos/beneficios y resolución de dudas respecto a su participación. En caso de aceptar, se procedía primero a la firma de consentimiento informado (aprobado por el comité de Investigación y Ética del INCMNSZ) y posteriormente a la extracción de 10 ml de sangre venosa periférica. Las muestras se identificaron mediante un código numérico secuencial y único, mismo con el cual fueron registrados en una base de datos. Para cada participante se llevó a cabo: revisión clínica exhaustiva (interrogatorio y exploración), revisión del expediente clínico para obtener y cotejar resto de variables (demográficas, clínicas, paraclínicas y de tratamiento) y cálculo de SLEDAI 2K (Anexo 1). Lo anterior se llevó a cabo en las áreas de consulta externa de Reumatología, hospitalización y urgencias durante el periodo comprendido entre marzo – agosto 2023.

Detección de subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica

Para la evaluación de la expresión de TLR-7, 9 y MyD88 en subpoblaciones de linfocitos B, se llevó a cabo una serie de pasos para cada uno de los participantes. A cada sujeto se le extrajeron 10 ml de sangre venosa periférica anticoagulada con EDTA mediante venopunción. Se separaron las células mononucleares por centrifugación a través de gradientes de densidad (Ficoll-Hypaque). Se realizó tinción de dichas células mediante el siguiente panel de anticuerpos conjugados: CD11c- PE/DAZZLE 594, CD19-BV496, CD21 APC Fire750, CD24 PerCP, CD38

PeCy7, CD27 BV510, IgD AF 700, T-bet BV421, TLR-9 APC, TLR-7 PE, MyD88 FITC. Las subpoblaciones de linfocitos B evaluadas fueron: Tr1, Tr2, res N, actN, ASC, UswM, SwM, MCD27nl, MCD27nlgDn, MCD27neglgDpos, ABC, DN1, DN2, DN3 y DN4 (Anexo 2). Para las tinciones intracitoplásmicas, las células mononucleares se permeabilizaron y fijaron mediante el uso del Buffer BD Cytotfix/Cytoperm, acorde a las instrucciones del proveedor. La estrategia de gating utilizada se muestra en el Anexo 3. La expresión de TLR-7, 9 y MyD88 se evaluó en todas las subpoblaciones de linfocitos B mediante porcentaje de células positivas e inmunofluorescencia (IMF). Todas las muestras fueron adquiridas en un citómetro BD LSR Fortessa, con 4 láseres y se analizaron con apoyo del software Flow-Jo. En el Anexo 4 se observa una imagen representativa de la citometría de flujo que muestra el porcentaje de expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en las subpoblaciones de LB estudiadas.

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

Nuestro estudio se apegó a los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se consideró una investigación de riesgo mínimo para el paciente de acuerdo con la Ley General de Salud contenida en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos en materia de investigación para la salud en seres humanos, título segundo, capítulo I, artículo 17, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 1987.

Todos los participantes firmaron un formato de consentimiento informado. El Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” aprobaron el estudio en marzo de 2023, con número de referencia 4403 (Anexo 5).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La comparación entre variables cuantitativas de dos grupos se realizó mediante prueba t de Student o U de Mann-Whitney acorde a la distribución de la muestra. La evaluación de la correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante el

coeficiente de correlación de Pearson, en caso de tener una distribución normal y el coeficiente de Spearman en caso contrario.

RESULTADOS:

1.- Características poblacionales:

Se incluyeron un total de 45 participantes: 30 casos con LEG y actividad renal (66.6%) y 15 controles con LEG activo sin compromiso renal (33.3%). El 86.6% en el grupo de los casos fueron mujeres y en el grupo control 93.3%. La mediana de edad en los casos fue de 30 años (24 – 39) y en los controles de 38 años (34 – 45). El tiempo de evolución de la enfermedad para el grupo de estudio fue de 60 meses (24 – 93) y de 80 meses (5.5 – 138) para el grupo control. Al momento del reclutamiento, la mediana del puntaje SLEDAI 2K fue de 14 puntos (9 – 16) para el grupo con LEG con actividad renal y de 12 puntos (7 – 12.5) para el grupo sin actividad renal. Ninguna de estas características mostró diferencia significativa entre ambos grupos.

Se evaluó la frecuencia de actividades extrarrenales entre ambos grupos. Las actividades incluidas fueron: constitucional, mucocutánea, hematológica, neuropsiquiátrica, articular y en serosas. En el grupo control hubo mayor frecuencia de actividad mucocutánea en comparación con el grupo de estudio con 93.3% y 23.3% respectivamente ($P: < 0.0001$). Adicionalmente en el grupo control también se documentó mayor frecuencia de actividad articular (53.3%) que en el grupo de LEG con actividad renal (23.3%), dicha diferencia mostró significancia estadística ($P: 0.04$). Se documentó actividad neuropsiquiátrica en 2 pacientes (6.66%) del grupo de LEG con NL y en 4 (26.6%) en el grupo de LEG sin NL ($P: 0.071$). Solo 2 pacientes en el grupo de LEG sin actividad renal tuvieron manifestaciones graves de la enfermedad no incluidas en el puntaje SLEDAI y fueron: anemia hemolítica autoinmune y miocarditis. La frecuencia del resto de actividades se muestra en la Tabla 1.

En cuanto a las variables terapéuticas incluimos frecuencia y dosis en miligramos de: prednisona (PDN) o equivalente, azatioprina (AZA), micofenolato de mofetilo (MMF), ciclofosfamida (CYC), hidroxicloroquina (HCQ), metotrexato (MTX) y tacrolimus (FK). En el grupo de LEG con NL 19 pacientes (63.3%) se encontraban en tratamiento con MMF con una mediana de dosis de 1227mg/día (0 – 3000 mg), mientras que el grupo de LEG sin NL solo 3 pacientes (20%) [*P*: 0.004] se encontraban en tratamiento con MMF con una mediana de dosis de 266.7mg/día (0 – 2000) [*P*:0.006]. Referente al uso de HCQ: 16 pacientes (53.3%) en el grupo de actividad renal se encontraban con dicho tratamiento y en el grupo control solo 4 (26.6%) [*P*: 0.08]. La mediana de dosis de HCQ en el grupo de los casos fue de 146.7 mg/día (0 – 400 mg/día) y para el grupo de los controles fue de 66.6mg/día (0 – 400 mg/día) [*P*: 0.038]. La frecuencia y dosis del resto de fármacos se muestra en la Tabla 1.

En cuanto a las características bioquímicas, como era esperado los niveles de creatinina fueron mayores y la tasa de filtración glomerular (TFG) menor en el grupo de los casos en comparación con los controles: 1.07 vs 0.67 mg/dL (0.39 – 1.77 vs 0.34 – 0.78mg/dL) [*P*: 0.001] y 73 vs 113.2 ml/min/1.73m² (100.5 – 127.5 ml/min/1.73m²) [*P*: 0.004]. La mediana del índice de proteinuria/creatinuria en los pacientes con NL fue de 3.77g/24horas (2.48 – 5.96 g/24 horas) y la frecuencia de sedimento urinario activo fue de 76.6%. En cuanto los parámetros de actividad serológica, los niveles de complemento y los títulos de anti DNAdc fueron similares entre ambos grupos. El resto de variables bioquímicas se muestran a detalle en la Tabla 2.

A un total de 19 de 30 pacientes (63.3%) del grupo de LEG con NL se les realizó biopsia renal percutánea (BRP) como parte de su abordaje diagnóstico. El 26.3% tuvieron nefritis lúpica clase III + V, mientras que el 73.6% tuvieron una clase IV + V. La mediana del índice de actividad (IA) fue de 3 puntos (2 – 6.5) y la del índice de cronicidad (IC) de 6.5 puntos (4.25 – 8). La mediana del grado de fibrosis intersticial (FI) fue de 30% (20 – 50%) y la de atrofia tubular de 20% (15 – 40%). Los

resultados completos sobre los hallazgos histopatológicos se muestran en la Tabla 2.

2.- Expresión de TLR 7, 9 y MyD88 en subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con Nefropatía Lúpica

Para cada una de las subpoblaciones estudiadas se evaluó la expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en: porcentaje (%), número absoluto de células e intensidad media de fluorescencia (IMF). Las subpoblaciones estudiadas fueron: linfocitos B (LB) totales, LB vírgenes, LB de memoria clásica, LB atípicos, LB transicionales, LB secretores de anticuerpos (LBSA), LB asociados a la edad (LBAE) y LB dobles negativos.

En el grupo de los pacientes con LEG y NL en comparación con sus controles (LEG sin NL) se documentó mayor expresión de MyD88 en LBSA tanto en porcentaje: 0.77 (0.33 – 2.07) vs 0.56 (0.28 – 1.56) [$P:0.045$] (Figura 1) como en número absoluto de células: 0.72 (0.38 – 2.18) vs 0.32 (0.12 – 1.00) [$P:0.07$]. Un comportamiento similar se encontró para el número absoluto de LB dobles negativos con positividad para TLR 7, el cual fue de 3.56 (1.31 – 13.55) para el grupo de actividad renal vs 2.86 (0.56 – 6.54) para el grupo control ($P: 0.08$).

De forma contraria los pacientes del grupo de LEG con NL tuvieron menor expresión de TLR 9 en LBAE (medida por IMF) en comparación con los pacientes del grupo con LEG sin NL: 1977 (1872 – 2165 UA) vs 2074 UA (2006 – 2330 UA). La expresión de TLR 7, 9 y MyD88 en el resto de las subpoblaciones linfocitarias que no mostraron diferencias estadísticamente significativas se muestran en la Tabla 3.

3.- Correlación entre expresión de TLRs intracitoplásmicos y MyD88 con variables histopatológicas de pacientes con NL:

En los pacientes con NL se encontró una correlación positiva con significancia estadística entre la expresión de MyD88 en LB de memoria clásica en número celular absoluto y: el grado de fibrosis intersticial ($\rho: 0.3$), el grado de atrofia tubular ($\rho: 0.31$) así como los índices de actividad ($\rho: 0.3$) y cronicidad ($\rho: 0.38$) respectivamente. Las otras correlaciones positivas significativas fueron el porcentaje de LB positivos para MyD88 con el IA ($\rho: 0.3$) e IC ($\rho: 0.32$); así como,

el número absoluto de LBSA positivos para MyD 88 y el IA ($\rho: 0.33$). Por el contrario; se encontró una correlación negativa o inversa significativa, entre la expresión de TLR 9 en LB de memoria clásica medida por IMF y el grado de AT ($\rho: -0.3$) y el IC ($\rho: -0.36$). En la Figura 2 se muestra la matriz de correlación descrita.

4.- Correlación entre expresión de TLRs intracitoplásmicos y MyD88 con variables serológicas:

-Expresión de TLR 7:

Se encontró una correlación inversa entre la expresión de TLR 7 en LB transicionales ($\rho: -0.32$), LBSA ($\rho: -0.4$), LBAE ($\rho: -0.34$), LB dobles negativos ($\rho: -0.41$) y LB de memoria clásica ($\rho: -0.44$) y los niveles de C3. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre la expresión de TLR 7 en LBSA ($\rho: 0.43$), LBAE ($\rho: 0.35$) y LB de memoria clásica ($\rho: 0.38$) con los títulos de antiDNA_{dc}.

-Expresión de TLR 9:

En nuestro estudio se observaron correlaciones negativas entre la expresión de TLR 9 en: LBSA con los niveles de C3 ($\rho: -0.32$); LB atípicos con los títulos de antiDNA_{dc} ($\rho: -0.44$) y en LB dobles negativos con los niveles de C4 ($\rho: -0.3$). Únicamente se encontró una correlación positiva entre la expresión de TLR 9 en LB atípicos y los niveles de C3.

-Expresión de MyD88:

Se evidenció una correlación positiva entre los niveles de C3 y la expresión de la proteína adaptadora MyD 88 en LB transicionales ($\rho: 0.5$), LB vírgenes ($\rho: 0.37$) y LB dobles negativos ($\rho: 0.37$). Por el contrario, se encontró una correlación inversa entre los títulos de antiDNA_{dc} y la expresión de MyD88 en LB transicionales ($\rho: -0.43$), LB vírgenes ($\rho: -0.37$) y LB dobles negativos ($\rho: -0.38$).

En la Figura 3 se muestra la matriz de correlación previamente descrita.

5.- Expresión de TLR 7, 9 y MyD88 en subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con actividad extrarrenal:

- Actividad neuropsiquiátrica:

En el diagrama de caja y bigote (Figura 4) observamos como los pacientes que tuvieron actividad neuropsiquiátrica tuvieron una menor expresión de TLR 9 (medida por IMF) en LB que aquellos que no presentaron esta manifestación: 1355 UA (1143 – 1533 UA) vs 1726 UA (1536 – 1795 UA) $P: 0.045$.

- Actividad constitucional:

En el caso de la actividad constitucional: se documentó una menor expresión de TLR 7 en LBSA: [0.87 % (0.32 – 1.92 %) vs 3.04 % (2.32 – 3.69%) $P: 0.036$], LBAE [1.55 % (0.54 – 3.24 %) vs 3.24 % (1.75 – 12.5%) $P: 0.036$] y LB de memoria clásica [733 UA (628 – 854 UA) vs 874 UA (731 – 1013 UA) $P: 0.048$], así como de TLR 9 en linfocitos B totales [1326 UA (1128 – 1523 UA) vs 1556 UA (1369 – 1717 UA) $P: 0.032$], y en LB de memoria clásica [1522 UA (1198 – 1642 UA) vs 1691 UA (1561 – 1889 UA) $P: 0.035$], en aquellos pacientes que tuvieron dicha manifestación en comparación con aquellos que no la presentaron. Lo anterior se plasma en la Figura 5.

- Actividad articular:

Los pacientes que presentaron actividad articular tuvieron un aumento de los LB atípicos y LB dobles negativos que expresan TLR 7, en comparación con aquellos que no presentaron dicha actividad [6.7 (1.4 – 15.9) vs 1.09 (0.11 – 4.72) $P: 0.020$] y [5.43 (1.97 – 13.68) vs 2.36 (0.98 – 3.35) $P: 0.035$]. La presencia de actividad articular se caracterizó por mayor expresión TLR 9 en LB atípicos y LB dobles negativos [0.93% (0.46 – 2.94%) vs 0.37% (0.13 – 1.02%) $P: 0.022$] y [0.62 (0.30 – 2.2) vs 0.26 (0.08 – 0.44) $P: 0.024$]. Finalmente, la expresión de MyD 88 fue mayor en los LB y LB vírgenes de pacientes con actividad articular que en aquellos sin manifestaciones articulares [59.3% (30.4 – 76.3%) vs 36.84% (2.46 – 53.94%) $P: 0.033$] y [8.86% (4.84 – 18.55%) vs 1.54% (0.51 – 10.2%) $P: 0.028$]. El mismo comportamiento de expresión de MyD 88 se observó en LB transicionales, LB de memoria clásica, LB atípicos y LB dobles negativos. Para más detalles ver la Figura 6.

DISCUSIÓN:

Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer trabajo que brinda una caracterización detallada del perfil cuantitativo de TLRs intracitoplásmicos (7 y 9) y MyD88 en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y su relación con el fenotipo clínico en pacientes con LEG.

En nuestro estudio encontramos mayor expresión de TLR 7 en LB dobles negativos y de MyD 88 en LBSA en los pacientes con nefritis lúpica. En concordancia con estos resultados, tenemos los trabajos de Christensen S (2006) y Sadanaga A (2007) respectivamente.

Por una parte para un modelo murino de lupus, Christensen ²¹ y sus colaboradores desarrollaron ratones MRL/Mp^{lpr/lpr} deficientes de TLR 7 y observaron que éstos desarrollaban: menor producción de auto anticuerpos, menor crecimiento ganglionar, menor esplenomegalia y glomerulonefritis menos grave. Lo anterior sugiere que los ratones propensos a lupus, pero deficientes en TLR7 tenían cierto factor protector. Por el contrario, una mayor expresión de TLR 7, similar a nuestros hallazgos, podría relacionarse al desarrollo de NL. Interesantemente, nosotros encontramos una correlación negativa entre la expresión de TLR 7 con los niveles de C3 y una correlación positiva entre la expresión de TLR 7 y los títulos de aDNA_{dc}, lo cual sugiere que la actividad serológica puede regularse por la expresión de estos TLRs, particularmente TLR7.

En otro modelo murino de nefritis lúpica desarrollado por Sadanaga ²² y sus colaboradores, encontraron que ratones MyD88-KO MRL//*lpr* en comparación con los salvajes tenían mayor sobrevida y ausencia de glomerulonefritis. Bajo ese razonamiento, en nuestro trabajo encontramos que los pacientes con NL tuvieron mayor expresión de MyD88 específicamente en los LBSA (Figura 1). Interesantemente, documentamos una correlación positiva entre la expresión de MyD88 en LB de memoria clásica y hallazgos histopatológicos tales como los grados de FI/AT, IA e IC. Tanto TLR7 como TLR9 señalizan a través de la molécula adaptadora MyD88, la cual ha demostrado ser esencial para el desarrollo de nefritis

en el modelo murino de lupus MRL/lpr. Por lo tanto, el aumento de células secretoras de anticuerpos MyD88 positivas, apunta hacia un papel fundamental de esta molécula adaptadora en el desarrollo de nefritis lúpica en humanos, en concordancia con nuestros hallazgos.

En nuestro estudio encontramos menor expresión de TLR 9 en LBAE en pacientes con NL. En concordancia con este hallazgo, tenemos los trabajos de Bosaller L (2016) ²³ y Tilstra (2020) ²⁴.

Para un modelo murino de lupus inducido por pristanos, un grupo de investigadores desarrolló ratones BALB/c deficientes de TLR 9 ²³. Se observó que estos ratones presentaban: mayores títulos de auto anticuerpos, aumento en la incidencia y gravedad de glomerulonefritis y menor supervivencia. Tilstra ²⁴ y sus colaboradores probaron, que la deficiencia global de TLR9 resultaba en un mayor grado de actividad de la enfermedad en un modelo murino de lupus. Específicamente la deficiencia de TLR9 en LB se asoció al desarrollo de NL grave; de manera contraria, la sobreexpresión de TLR9 se vinculó a NL de menor gravedad. Interesantemente, en nuestro trabajo, documentamos una correlación negativa entre la expresión de TLR 9 en LB de memoria clásica y: el grado de atrofia tubular e índice de cronicidad. Otras correlaciones inversas que documentamos fueron: la expresión de TLR 9 en LB de memoria clásica con el IPC así como la expresión de TLR9 en LB atípicos con los títulos de anticuerpos anti DNAdc. Vale la pena mencionar que en pacientes con actividad neuropsiquiátrica observamos menor expresión de TLR 9 en LB, en comparación con aquellos que no presentaron dicha manifestación. Los datos anteriores sugieren que una menor expresión de TLR 9 resulta en un fenotipo clínico más grave como lo vimos en nuestros resultados tanto para actividad renal como para actividad neuropsiquiátrica. La menor expresión de TLR9 en LB, favorece la estimulación de TLR7 y agrava el fenotipo de LEG.

Con respecto al resto de los marcadores de actividad de lupus, decidimos evaluar la expresión diferencial de TLRs 7, 9 y MyD88 en LB en actividades constitucional, articular y neuropsiquiátrica porque fueron aquellas en donde no hubo efecto del

tratamiento inmunosupresor sobre las diferencias encontradas. Observamos que los pacientes con actividad neuropsiquiátrica y constitucional tuvieron una menor expresión de TLR9 en células B, lo cual coincide con estudios previos²⁵ en donde la disminución de la expresión de TLR9 agrava el fenotipo y aumenta la actividad de la enfermedad.

Dentro de las manifestaciones extra renales documentamos mayor expresión de TLR9 en LB atípicos y en LB DN en pacientes con actividad articular. En concordancia con estos hallazgos, está lo observado por Fischer A (2018)²⁶. Este grupo de estudio desarrolló un modelo murino de artritis. Ellos encontraron que la inhibición de TLR 9 en ratas con artritis inducida por pristanos, redujo la artritis y abolió la erosión ósea. Además, en un modelo de artritis inducido por pared celular estreptocócica en ratones deficientes de TLR 9 observaron que a los días 23 y 28, estos ratones tuvieron menor grado de inflamación en comparación con los salvajes. Todo esto sugiere que la expresión de TLR9 resulta en inflamación articular y su inhibición la evita, lo cual concuerda con nuestros resultados. Es importante tomar con cautela estos hallazgos, ya que en la fisiopatogenia de la artritis reumatoide predomina la respuesta celular (linfocitos T) y en la del LEG la respuesta humoral (LB).

Estamos conscientes de las fortalezas y limitaciones de nuestro estudio. Dentro de las fortalezas consideramos se trata de un estudio novedoso por el hecho de que el grupo celular evaluado fueran subpoblaciones de LB y que se hayan establecido comparaciones entre fenotipos clínicos y variables histopatológicas. Dentro de las limitaciones encontramos: el pequeño tamaño de muestra, el hecho de que solo se haya evaluado a población de un solo centro, así como su carácter transversal.

CONCLUSIONES:

Los pacientes con NL tuvieron una mayor expresión de TLR7 en LB DN y de MyD 88 en LBSA. Por otro lado, hubo una menor expresión de TLR9 en LBAE en pacientes con NL. Se documentó una correlación positiva entre la expresión de MyD 88 y las variables histopatológicas (FIAT, IA e IC). De forma contraria se observó una correlación inversa entre la expresión de TLR9 y las variables histopatológicas (FIAT, IA e IC). Nuestros hallazgos sugieren que la expresión estas moléculas potencialmente podrán plantearse como surrogados de la actividad o daño tisular en nefritis lúpica. Se requieren estudios prospectivos para analizar si la expresión de TLRs intracitoplásmicos y su molécula adaptadora MyD 88 varía a lo largo del tiempo y en función de la respuesta al tratamiento de inducción a la remisión de nefritis lúpica.

REFERENCIAS:

1. Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., Touma, Z., Urowitz, M. B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., & Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16039.
2. Durcan, L., O'Dwyer, T., & Petri, M. (2019). Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. *Lancet (London, England)*, 393(10188), 2332–2343.
3. Anders, H. J., Saxena, R., Zhao, M. H., Parodis, I., Salmon, J. E., & Mohan, C. (2020). Lupus nephritis. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 7.
4. Nie, Y., Zhao, L., & Zhang, X. (2022). B Cell Aberrance in Lupus: the Ringleader and the Solution. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 62(2), 301–323.
5. Fillatreau, S., Manfroi, B., & Dörner, T. (2021). Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. *Nature reviews. Rheumatology*, 17(2), 98–108.
6. Zhang, Y., Liu, J., Wang, C., Liu, J., & Lu, W. (2021). Toll-Like Receptors Gene Polymorphisms in Autoimmune Disease. *Frontiers in immunology*, 12, 672346.
7. Zhang, J., Zhu, Q., Meng, F., Lei, H., & Zhao, Y. (2014). Association study of TLR-9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus in northern Chinese Han population. *Gene*, 533(1), 385–388.
8. Elloumi, N., Fakhfakh, R., Abida, O., Ayadi, L., Marzouk, S., Hachicha, H., Fourati, M., Bahloul, Z., Mhiri, M. N., Kammoun, K., & Masmoudi, H. (2017). Relevant genetic polymorphisms and kidney expression of Toll-like receptor (TLR)-5 and TLR-9 in lupus nephritis. *Clinical and experimental immunology*, 190(3), 328–339.
9. Celhar, T., Yasuga, H., Lee, H. Y., Zharkova, O., Tripathi, S., Thornhill, S. I., Lu, H. K., Au, B., Lim, L. H. K., Thamboo, T. P., Akira, S., Wakeland, E. K., Connolly, J. E., & Fairhurst, A. M. (2018). Toll-Like Receptor 9 Deficiency Breaks Tolerance to RNA-Associated Antigens and Up-Regulates Toll-Like

- Receptor 7 Protein in Sle1 Mice. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.), 70(10), 1597–1609.
10. Yuan, Y., Yang, M., Wang, K., Sun, J., Song, L., Diao, X., Jiang, Z., Cheng, G., & Wang, X. (2017). Excessive activation of the TLR9/TGF- β 1/PDGF-B pathway in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 70.
 11. Pacheco, G. V., Novelo Noh, I. B., Velasco Cárdenas, R. M., Angulo Ramírez, A. V., López Villanueva, R. F., Quintal Ortiz, I. G., Alonso Salomón, L. G., Ruz, N. P., & Rivero Cárdenas, N. A. (2016). Expression of TLR-7, MyD88, NF- κ B, and INF- α in B Lymphocytes of Mayan Women with Systemic Lupus Erythematosus in Mexico. *Frontiers in immunology*, 7, 22.
 12. Brown, G. J., Cañete, P. F., Wang, H., Medhavy, A., Bones, J., Roco, J. A., He, Y., Qin, Y., Cappello, J., Ellyard, J. I., Bassett, K., Shen, Q., Burgio, G., Zhang, Y., Turnbull, C., Meng, X., Wu, P., Cho, E., Miosge, L. A., Andrews, T. D., Vinuesa, C. G. (2022). TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature*, 605(7909), 349–356.
 13. Szelinski, F., Lino, A. C., & Dörner, T. (2022). B cells in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*, 34(2), 125–132.
 14. Chung, M. K. Y., Gong, L., Kwong, D. L., Lee, V. H., Lee, A. W., Guan, X. Y., Kam, N. W., & Dai, W. (2023). Functions of double-negative B cells in autoimmune diseases, infections, and cancers. *EMBO molecular medicine*, e17341. Advance online publication.
 15. Jenks, S. A., Cashman, K. S., Zumaquero, E., Marigorta, U. M., Patel, A. V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M. C., Simon, Z., Bugrovsky, R., Blalock, E. L., Scharer, C. D., Tipton, C. M., Wei, C., Lim, S. S., Petri, M., Niewold, T. B., Anolik, J. H., Gibson, G., Lee, F. E., ... Sanz, I. (2018). Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, 49(4), 725–739.e6.
 16. Sosa-Hernández, V. A., Romero-Ramírez, S., Cervantes-Díaz, R., Carrillo-Vázquez, D. A., Navarro-Hernandez, I. C., Whittall-García, L. P., Absalón-Aguilar, A., Vargas-Castro, A. S., Reyes-Huerta, R. F., Juárez-Vega, G.,

- Meza-Sánchez, D. E., Ortiz-Navarrete, V., Torres-Ruiz, J., Mejía-Domínguez, N. R., Gómez-Martín, D., & Maravillas-Montero, J. L. (2022). CD11c+ T-bet+ CD21hi B Cells Are Negatively Associated With Renal Impairment in Systemic Lupus Erythematosus and Act as a Marker for Nephritis Remission. *Frontiers in immunology*, 13, 892241.
17. Pons-Estel, B. A., Catoggio, L. J., Cardiel, M. H., Soriano, E. R., Gentiletti, S., Villa, A. R., Abadi, I., Caeiro, F., Alvarellos, A., Alarcón-Segovia, D., & Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus (GLADEL) (2004). The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine*, 83(1), 1–17.
18. Reátegui-Sokolova, C., Ugarte-Gil, M. F., Harvey, G. B., Wojdyla, D., Pons-Estel, G. J., Quintana, R., Serrano-Morales, R. M., Sacnun, M. P., Catoggio, L. J., Soriano, E. R., García, M. A., Saurit, V., Alvarellos, A., Caeiro, F., Berbotto, G. A., Sato, E. I., Borba Neto, E. F., Bonfa, E., de Oliveira E Silva Montandon, A. C., Da Silva, N. A., ... GLADEL (2020). Predictors of renal damage in systemic lupus erythematosus patients: data from a multiethnic, multinational Latin American lupus cohort (GLADEL). *RMD open*, 6(3), e001299.
19. Etchegaray-Morales, I., Mendoza-Pinto, C., Munguía-Realpozo, P., Osorio-Peña, Á. D., Ibañez-Ovando, S., Pineda, C., & García-Carrasco, M. (2022). Systemic lupus erythematosus, a leading cause of death in young Mexican females: a nationwide population-based study, 2000-2020. *Rheumatology international*, 42(10), 1715–1720.
20. Komatsuda, A., Wakui, H., Iwamoto, K., Ozawa, M., Togashi, M., Masai, R., Maki, N., Hatakeyama, T., & Sawada, K. (2008). Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology*, 152(3), 482–487.
21. Christensen, S. R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R. A., & Shlomchik, M. J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody

- specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*, 25(3), 417–428.
22. Sadanaga, A., Nakashima, H., Akahoshi, M., Masutani, K., Miyake, K., Igawa, T., Sugiyama, N., Niino, H., & Harada, M. (2007). Protection against autoimmune nephritis in MyD88-deficient MRL/lpr mice. *Arthritis and rheumatism*, 56(5), 1618–1628.
23. Bossaller, L., Christ, A., Pelka, K., Nündel, K., Chiang, P. I., Pang, C., Mishra, N., Busto, P., Bonegio, R. G., Schmidt, R. E., Latz, E., & Marshak-Rothstein, A. (2016). TLR9 Deficiency Leads to Accelerated Renal Disease and Myeloid Lineage Abnormalities in Pristane-Induced Murine Lupus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 197(4), 1044–1053.
24. Tilstra, J. S., John, S., Gordon, R. A., Leibler, C., Kashgarian, M., Bastacky, S., Nickerson, K. M., & Shlomchik, M. J. (2020). B cell-intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus. *The Journal of clinical investigation*, 130(6), 3172–3187.
25. Nickerson, K. M., Christensen, S. R., Shupe, J., Kashgarian, M., Kim, D., Elkon, K., & Shlomchik, M. J. (2010). TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(4), 1840–1848.
26. Fischer, A., Abdollahi-Roodsaz, S., Böhm, C., Niederreiter, B., Meyer, B., Yau, A. C. Y., Lönnblom, E., Joosten, L. A. B., Koenders, M., Lehmann, C. H. K., Dudziak, D., Krönke, G., Holmdahl, R., & Steiner, G. (2018). The involvement of Toll-like receptor 9 in the pathogenesis of erosive autoimmune arthritis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(9), 4399–4409.
27. Devarapu, S. K., & Anders, H. J. (2018). Toll-like receptors in lupus nephritis. *Journal of biomedical science*, 25(1), 35.
28. Ma, K., Li, J., Fang, Y., & Lu, L. (2015). Roles of B Cell-Intrinsic TLR Signals in Systemic Lupus Erythematosus. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 13084–13105.

29. Weidenbusch, M., Kulkarni, O. P., & Anders, H. J. (2017). The innate immune system in human systemic lupus erythematosus. *Clinical science (London, England : 1979)*, 131(8), 625–634.
30. Yokogawa, M., Takaishi, M., Nakajima, K., Kamijima, R., Fujimoto, C., Kataoka, S., Terada, Y., & Sano, S. (2014). Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(3), 694–706.
31. Pawar, R. D., Ramanjaneyulu, A., Kulkarni, O. P., Lech, M., Segerer, S., & Anders, H. J. (2007). Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(6), 1721–1731.
32. Yap, D. Y. H., & Chan, T. M. (2019). B Cell Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis-Role in Pathogenesis and Effect of Immunosuppressive Treatments. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6231.
33. Gregersen, J. W., & Jayne, D. R. (2012). B-cell depletion in the treatment of lupus nephritis. *Nature reviews. Nephrology*, 8(9), 505–514.

TABLAS Y FIGURAS:

Tabla 1. Características demográficas, clínicas y terapéuticas de la población.

	LEG con NL n=30 (66.6%)	LEG sin NL n=15 (33.3%)	P
Edad (años)	30 (24 - 39)	38 (34 - 45)	0.11
Mujeres Nº (%)	26 (86.6)	14 (93.3)	0.65
Tiempo de evolución (meses)	60 (24 - 93)	80 (5.5 - 138)	0.91
SLEDAI 2K	14 (9 - 16)	12 (7 - 12.5)	0.12
Activ. renal	30 (100%)	0	
Activ. constitucional	4 (13.3)	1 (6.66)	0.28
Activ. mucocutánea	7 (23.3)	14 (93.3)	<0.0001
Activ. Hematológica	10 (33.3)	5 (33.3)	1
Activ. Neuropsiquiátrica	2 (6.66)	4 (26.6)	0.071
Activ. articular	7 (23.3)	8 (53.3)	0.04
Activ. serosas	3 (10)	3 (20)	0.36
Manifestaciones no SLEDAI	0	2 (13.3)	
Tratamiento:			
PDN nº (%)	26 (86.6)	13 (86.6)	1
- Dosis (mg)	354.5 (0 - 1250)	346.3 (0 - 1250)	0.68
AZA nº (%)	0	1 (6.6)	0.13
- Dosis (mg)	0	6.6 (0 - 100)	0.31
MMF nº (%)	19 (63.3)	3 (20)	0.004
- Dosis (mg)	1227 (0 - 3000)	266.7 (0 - 2000)	0.006
CYC nº (%)	2 (6.6)	2 (6.6)	1
- Dosis (mg)	53.3 (0 - 1000)	53.3 (0 - 800)	0.84
HCC nº (%)	16 (53.3)	4 (26.6)	0.08
- Dosis (mg)	146.7 (0 - 400)	66.6 (0 - 400)	0.038
MTX nº (%)	1 (3.3)	1 (6.6)	0.61
- Dosis (mg)	0.5 (0 - 15)	1.6 (0 - 25)	0.77
Tacrolimus nº (%)	2 (6.6)	0	0.19
- Dosis (mg)	0.26 (0 - 6)	0	0.55

Tabla 2. Variables bioquímicas, urinarias e histopatológicas.

	LEG con NL n=30 (66.6%)	LEG sin NL n=15 (33.3%)	P
Variables bioquímicas:			
Hemoglobina, g/dL	12.1 (10.85 – 13.07)	12.6 (10.6 – 13.45)	0.79
Leucocitos, X 10 ³ /μL	6.15 (4.77 – 7.37)	1.4 (0.4 – 6.45)	0.21
Neutrófilos, X 10 ³ /μL	4.88 (3.48 – 6.79)	3.69 (2.78 – 4.74)	0.12
Linfocitos, X 10 ³ /μL	10.6 (0.647 – 1.59)	0.96 (0.79 – 1.19)	0.77
NLR	5.3 (3.62 – 7.7)	4.49 (2.93 – 5.13)	0.20
Plaquetas, X 10 ³ /μL	290 (175 – 375)	186 (129.5 – 257)	0.12
Creatinina, mg/dL	1.07 (0.39 – 1.77)	0.67 (0.34 – 0.78)	0.001
TFG, ml/min/1.73m ²	73 (37.5 – 111)	113.2 (100.5 – 127.5)	0.004
PCR, mg/dL	0.48 (0.21 – 1.73)	1.165 (0.322 – 2.4)	0.10
Globulinas, g/dL	2.6 (2.41 – 2.81)	3.2 (3.12 – 3.77)	0.005
AntiDNAdc, UI/mL	23.3 (8.3 – 300.9)	21.95 (8.42 – 167.1)	0.84
Anti nucleosomas, U/mL	498.5 (326.2 – 892.3)	292.9 (170 – 791.9)	0.41
C3, mg/dL	82 (47.25 – 113.5)	89 (51.5 – 104.5)	0.85
C4, mg/dL	12 (8 – 30)	8 (8 – 15)	0.64
Serología SAF positiva	18/26 (69.2)	6/13 (46.1)	0.10
Variables urinarias			
IPC, g/24hrs	3.77 (2.48 – 5.96)	0.19 (0.140 – 0.370)	<0.0001
Sedimento urinario activo	23 (76.6)	0	<0.0001
Variables histopatológicas			
BRP	19 (63.3)	-	
NL III + V	5/19 (26.3)	-	
NL IV + V	14/19 (73.6)	-	
Índice de actividad	3 (2 – 6.5)	-	
Índice de cronicidad	6.5 (4.25 – 8)	-	
Fibrosis intersticial, %	30 (20 – 50)	-	
Atrofia tubular, %	20 (15 – 40)	-	

Tabla 3. Expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en subpoblaciones de LB.

	LEG con NL (n=30)	LEG sin NL (n=15)	P	
Linfocitos B	TLR 7 en Linf B, %	72.35 (57.92 – 86.5)	75.3 (58.25 – 86.85)	0.68
	TLR 7 en Linf B, abs	67.22 (26.1 – 121.54)	49.67 (19.91 – 87.51)	0.24
	TLR 7 en Linf B, IMF	685.5 (582 – 836.8)	736 (579.5 – 862)	0.62
	TLR 9 en Linf B, %	7.6 (2.9 – 16.47)	6.04 (4.32 – 15.5)	0.60
	TLR 9 en Linf B, abs	6.35 (2.81 – 17.38)	4.69 (3.05 – 11.09)	0.41
	TLR 9 en Linf B, IMF	1363 (1136 – 1523)	1343 (1252 – 1712)	0.87
	MyD88 en Linf B, %	52.25 (23.95 – 71.3)	41.9 (6.29 – 74.4)	0.23
	MyD88 en Linf B, abs	43.55 (9.62 – 87.03)	22.45 (6.44 – 53.67)	0.13
	MyD88 en Linf B, IMF	1186 (1145 – 1378)	1204 (1108 – 1398)	0.47
LB vírgenes	TLR 9 en Virg, %	0.51 (0.19 – 1.01)	0.47 (0.25 – 0.66)	0.27
	TLR 9 en Virg, abs	0.51 (0.21 – 1.35)	0.31 (0.1 – 0.48)	0.15
	TLR 9 en Virg, IMF	1504 (1271 – 1619)	1482 (1336 – 1776)	0.66
	TLR 7 en Virg, %	18.55 (6.23 – 36.27)	12.8 (3.61 – 34.6)	0.40
	TLR 7 en Virg, abs	11.09 (4.41 – 46.85)	6.77 (1.82 – 36.72)	0.23
	TLR 7 en Virg, IMF	617 (544.2 – 758)	624 (558.5 – 727)	0.61
	MyD88 en Virg, %	8.54 (2.46 – 18.55)	6.46 (0.98 – 12.8)	0.12
	MyD88 en Virg, abs	7.25 (1.72 – 27.89)	5.16 (1.17 – 14.92)	0.24
	MyD88 en Virg, IMF	1172 (1095 – 1390)	1181 (1064 – 1313)	0.27
LB memoria clásica	TLR 9 en Mem clásica, %	1.54 (0.94 – 6.74)	2.95 (1.3 – 4.24)	0.74
	TLR 9 en Mem clásica, abs	2.01 (0.56 – 4.33)	2.03 (1.05 – 3.52)	0.43
	TLR 9 en Mem clásica, IMF	1515 (1190 – 1637)	1611 (1342 – 1836)	0.93
	TLR 7 en Mem clásica, %	12.95 (7.56 – 30.6)	19.5 (10.32 – 40.0)	0.80
	TLR 7 en Mem clásica, abs	11.24 (4.41 – 40.87)	13.41 (6.35 – 19.03)	0.48
	TLR 7 en Mem clásica, IMF	735.5 (644.5 – 846.8)	741 (615 – 921.5)	0.67
	MyD88 en Mem clásica, %	9.02 (3.91 – 28.27)	7.72 (1.96 – 24.25)	0.34
	MyD88 en Mem clásica, abs	8.42 (3.54 – 24.19)	6.77 (1.49 – 13.07)	0.14
	MyD88 en Mem clásica, IMF	1208 (1123 – 1484)	1258 (1104 – 1485)	0.52
LB atípicos	TLR 9 en LB atípicos, %	0.77 (0.29 – 2.29)	0.66 (0.35 – 1.18)	0.41
	TLR 9 en LB atípicos, abs	0.69 (0.21 – 2.15)	0.56 (0.17 – 1.05)	0.31
	TLR 9 en LB atípicos, IMF	1080 (998.2 – 1184.2)	1060 (996.5 – 1141.5)	0.41
	TLR 7 en LB atípicos, %	5.27 (1.41 – 10.65)	5.98 (1.35 – 9.51)	0.56
	TLR 7 en LB atípicos, abs	10.69 (0.80 – 16.03)	3.94 (1.17 – 8.03)	0.35
	TLR 7 en LB atípicos, IMF	691 (642.2 – 810.8)	740 (651.5 – 847.5)	0.71
	MyD88 en LB atípicos, %	4.81 (1.28 – 11.67)	1.88 (0.81 – 13.7)	0.35
	MyD88 en LB atípicos, abs	2.79 (0.84 – 10.57)	2.32 (0.49 – 6.14)	0.20
	MyD88 en LB atípicos, IMF	1174 (1134 – 1417)	1165 (1088 – 1330)	0.33
LB transicionales	TLR 9 en TrC, %	0.05 (0.01 – 0.28)	0.02 (0 – 0.61)	0.35
	TLR 9 en TrC, abs	0.06 (0.01 – 0.75)	0.11 (0 – 0.48)	0.38
	TLR 9 en TrC, IMF	768 (671 – 880)	763 (0 – 785.8)	0.24
	TLR 7 en TrC, %	0.6 (0.17 – 1.79)	0.51 (0.11 – 4.52)	0.57
	TLR 7 en TrC, abs	0.44 (0.14 – 2.34)	0.71 (0.14 – 2.95)	0.45
	TLR 7 en TrC, IMF	738 (664 – 825)	694.5 (643.8 – 783.5)	0.21
	MyD88 en TrC, %	1 (0.29 – 2.18)	0.31 (0.06 – 3.5)	0.22
	MyD88 en TrC, abs	0.8 (0.19 – 4.47)	0.45 (0.01 – 2.42)	0.15
	MyD88 en TrC, IMF	1047 (938 – 1343)	995 (918 – 1263)	0.27

Abs: absoluto, %: porcentaje, IMF: intensidad media de fluorescencia.

(Continúa)

Tabla 3. Expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en subpoblaciones de LB.

	LEG con NL (n=30)	LEG sin NL (n=15)	P	
LB secretores de Ac	TLR 9 en LBSA, %	0.32 (0.10 – 0.77)	0.37 (0.13 – 1)	0.58
	TLR 9 en LBSA, abs	0.22 (0.11 – 0.94)	0.31 (0.13 – 0.52)	0.53
	TLR 9 en LBSA, IMF	668.5 (625.8 – 751.8)	652 (553 – 697)	0.10
	TLR 7 en LBSA, %	1.16 (0.36 – 2.63)	1.02 (0.39 – 3.5)	0.64
	TLR 7 en LBSA, abs	0.97 (0.25 – 2.8)	0.96 (0.32 – 2.36)	0.43
	TLR 7 en LBSA, IMF	984 (779.8 – 1163)	967 (817.5 – 1123.5)	0.40
	MyD88 en LBSA, %	0.77 (0.33 – 2.07)	0.57 (0.28 – 1.56)	0.045
	MyD88 en LBSA, abs	0.72 (0.38 – 2.18)	0.32 (0.12 – 1.0)	0.07
	MyD88 en LBSA, IMF	1339 (1236 – 1695)	1383 (1258 – 1617)	0.64
LB asociados a la edad	TLR 9 en LBAE, %	1.76 (0.35 – 3.69)	1.64 (0.99 – 2.58)	0.71
	TLR 9 en LBAE, abs	1.14 (0.54 – 3.68)	1.71 (0.43 – 3.44)	0.51
	TLR 9 en LBAE, IMF	1977 (1872 – 2165)	2074 (2006 – 2330)	0.036
	TLR 7 en LBAE, %	1.86 (0.51 – 6.41)	1.72 (1.03 – 2.86)	0.60
	TLR 7 en LBAE, abs	1.61 (0.66 – 5.67)	1.89 (0.50 – 3.63)	0.35
	TLR 7 en LBAE, IMF	1266 (1011 – 1217)	1283 (1126 – 1543)	0.84
	MyD88 en LBAE, %	1.38 (0.34 – 2.91)	0.84 (0.41 – 1.97)	0.23
	MyD88 en LBAE, abs	1.36 (0.41 – 2.89)	0.65 (0.28 – 2.09)	0.15
	MyD88 en LBAE, IMF	1313 (1184 – 1700)	1310 (1135 – 1533)	0.35
LB dobles negativos	TLR 9 en dobles neg, %	0.54 (0.25 – 1.73)	0.51 (0.41 – 0.69)	0.34
	TLR 9 en dobles neg, abs	0.42 (0.19 – 2.19)	0.35 (0.15 – 0.9)	0.16
	TLR 9 en dobles neg, IMF	1577 (1210 – 1819)	1637 (1416 – 1855)	0.78
	TLR 7 en dobles neg, %	3.75 (1.92 – 10.68)	4.2 (1.87 – 5)	0.24
	TLR 7 en dobles neg, abs	3.56 (1.31 – 13.55)	2.86 (0.56 – 6.54)	0.08
	TLR 7 en dobles neg, IMF	713 (613 – 871)	716 (621.5 – 889)	0.59
	MyD88 en dobles neg, %	2.87 (0.87 – 6.33)	2.23 (0.41 – 4.0)	0.12
	MyD88 en dobles neg, abs	2.22 (0.65 – 8.72)	0.74 (0.33 – 3.18)	0.14
	MyD88 en dobles neg, IMF	1196 (1105 – 1372)	1250 (1080 – 1465)	0.58

LBSA: Linfocitos B secretores de anticuerpos, LBAE: Linfocitos B asociados a la edad.

Figura 1. Diagrama de caja y bigote: porcentaje de expresión de MyD 88 en LBSA en casos y controles.

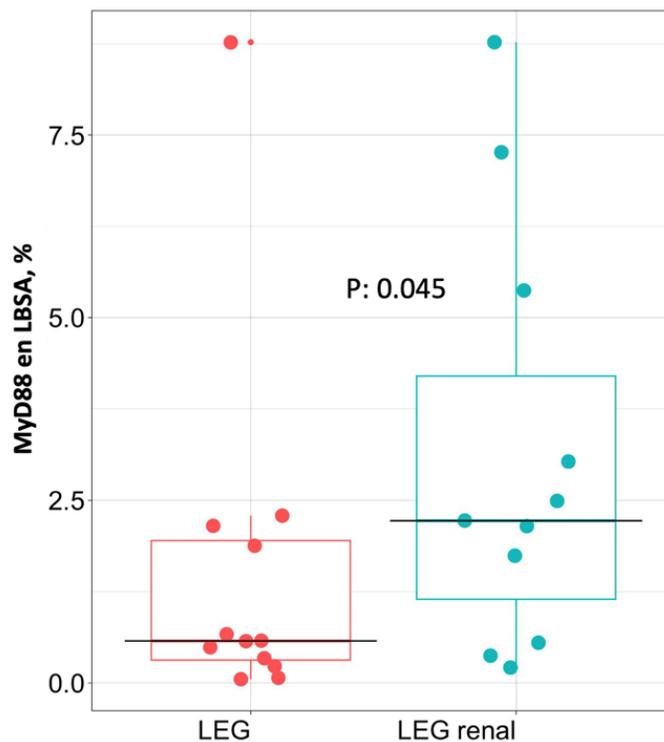


Figura 2. Matriz de correlación entre expresión de TLRs intracitoplásmicos y MyD88 con variables histopatológicas de pacientes con LEG y NL.

	TLR 9 en LBAE, IMF	TLR9 en Mem clás, IMF	MyD88 en Mem clás, abs	MyD88 en linf B, por	MyD88 en LBSA, abs
FI	-0.32		0.3		
AT		-0.3	0.31		
IA			0.3	0.3	0.33
IC		-0.36	0.38	0.32	
IPC		-0.31			

Figura 3. Matriz de correlación entre expresión de TLRs intracitoplásmicos y MyD88 con variables serológicas:

	TLR9 en ASC, IMF	TLR9 en mem no clas, abs	TLR9 dobles neg, IMF	TLR7 en Tr, IMF	TLR7 en ASC, por	TLR7 en ABC; IMF	TLR7 en dobles neg, por	TLR7 en mem clas, por	MyD88 en Tr, abs	MyD88 en Virg, abs	MyD88 en ASC, abs	MyD88 en dobles neg, abs
C3	-0.32	0.33		-0.32	-0.4	-0.34	-0.41	-0.44	0.5	0.37		0.37
C4			-0.3					-0.3			0.3	
Anti DNAdc		-0.44			0.43	0.35		0.38	-0.43	-0.37		-0.38

Figura 4. Expresión de TLR 9 en LB (IMF) en pacientes con y sin actividad neuropsiquiátrica.

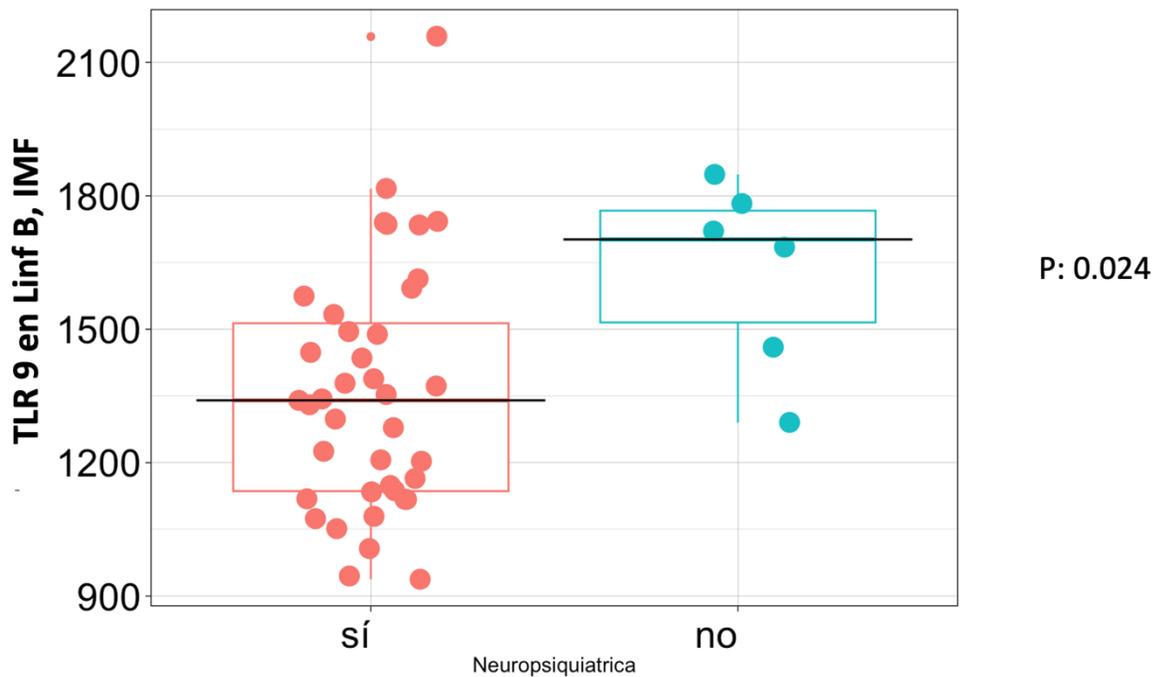


Figura 5. Expresión de TLR 7 y 9 en subpoblaciones de LB en pacientes con y sin actividad constitucional.

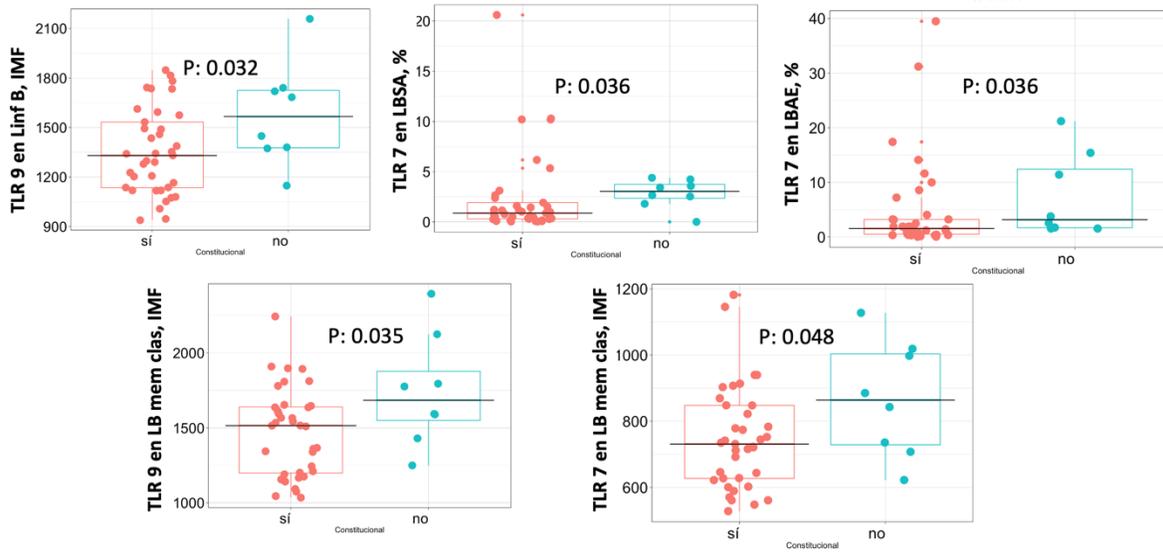
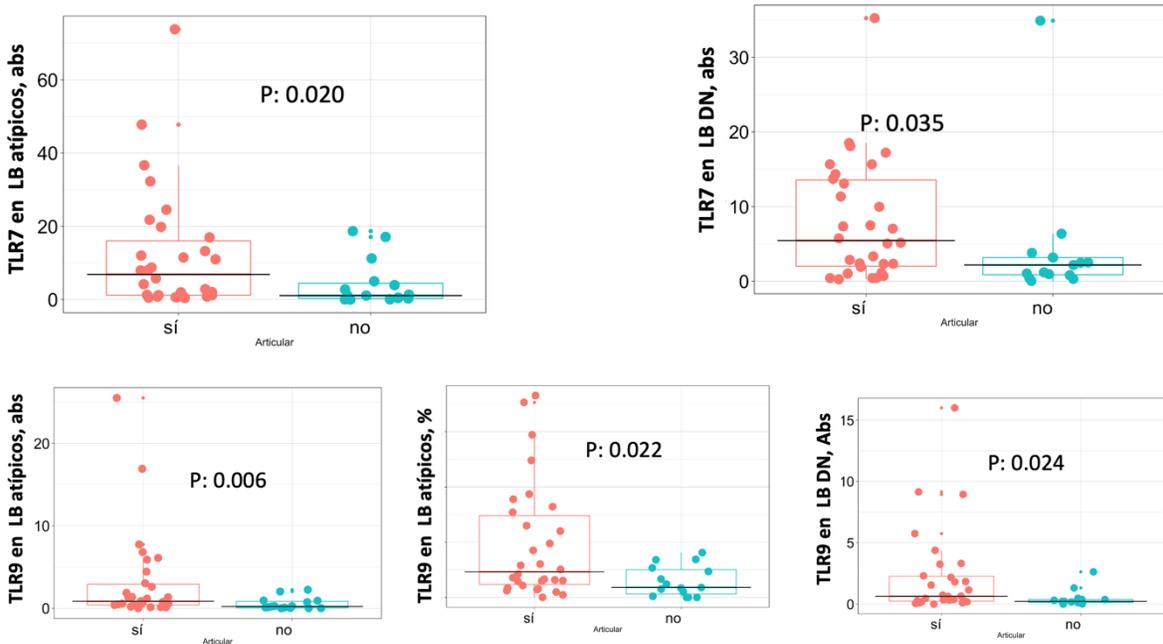
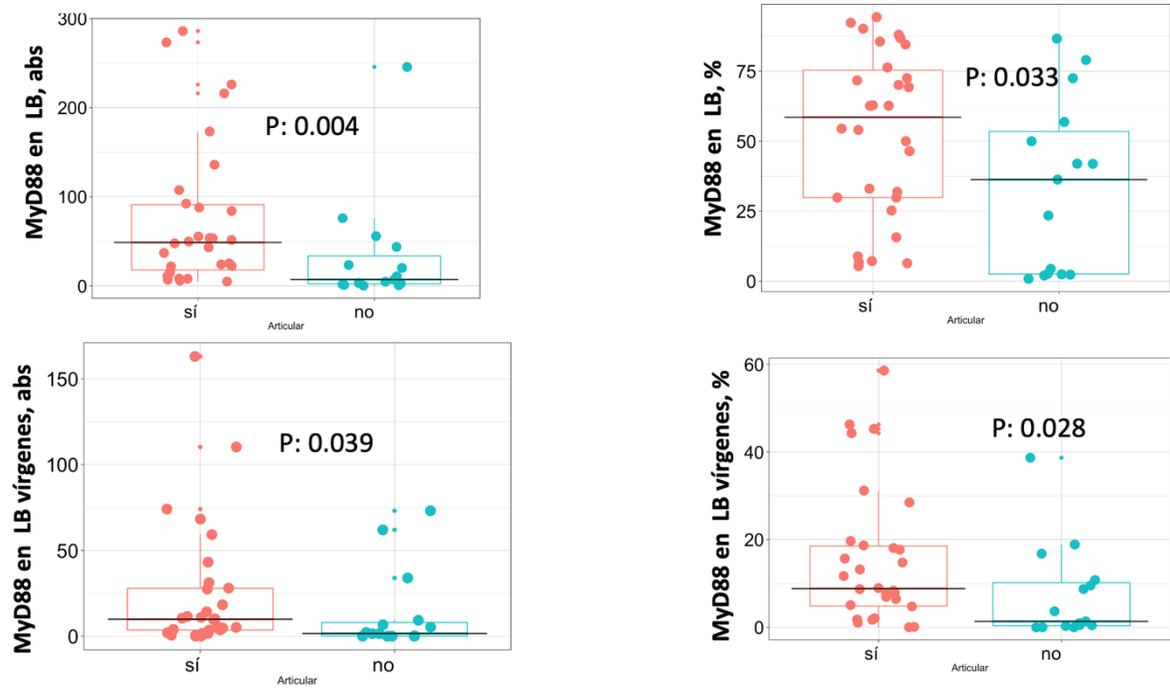


Figura 6. Expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en subpoblaciones de LB en pacientes con y sin actividad articular



(continúa)

Figura 6. Expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en subpoblaciones de LB en pacientes con y sin actividad articular



ANEXOS:

Anexo 1. Índice de actividad de LEG: SLEDAI 2K

Fecha: ____ / ____ / ____

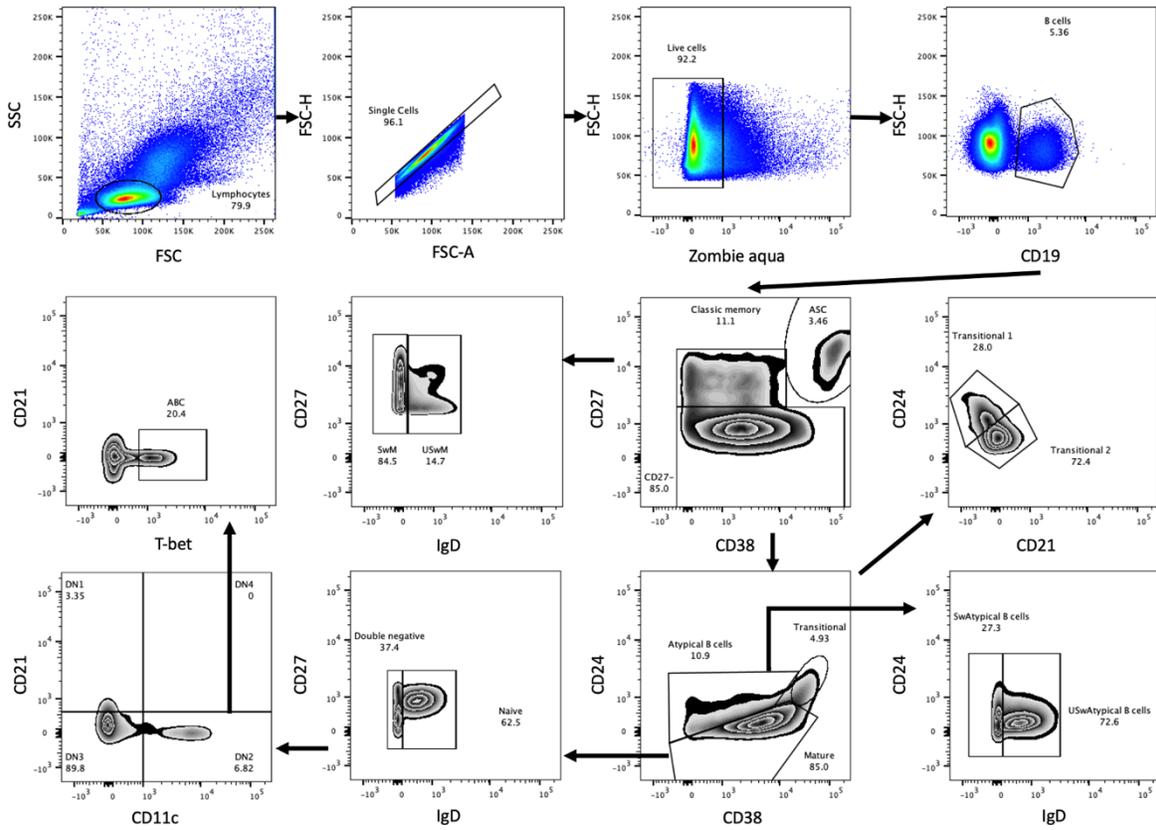
NOMBRE: _____

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 I. 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 granuloso.
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>	

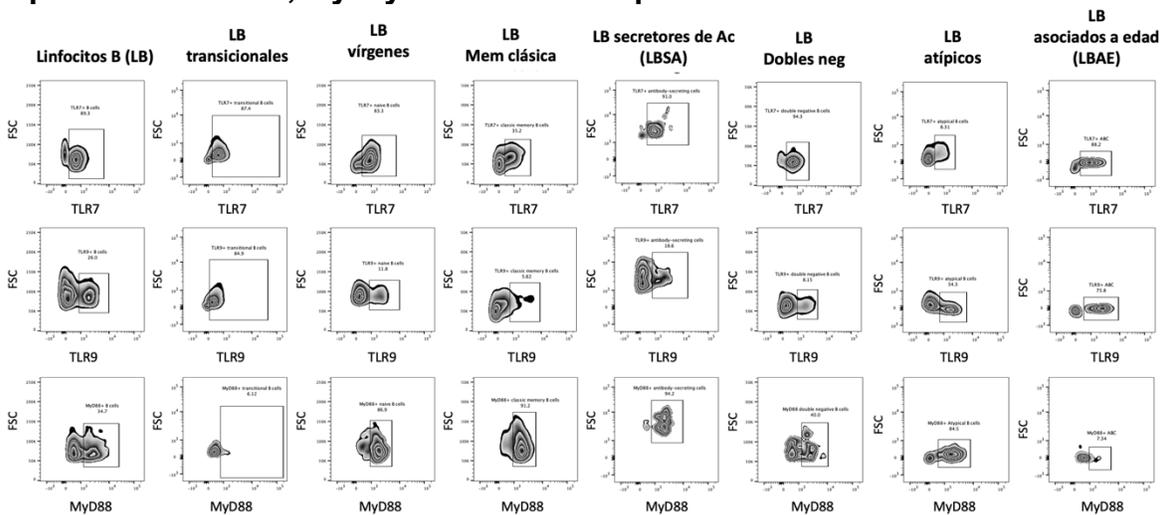
Anexo 2. Subpoblaciones de LB evaluadas y sus respectivos marcadores.

Población Parental	Definiciones de subpoblación y Fenotipo
Transicionales 1/2	Transicional CD21 ^{neg/lo} (TrCD21 ^{neg/lo})
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} CD38 ^{hi} CD24 ^{hi} CD21 ^{neg/lo}
	Transicional CD21 ^{pos} (TrCD21 ^{pos})
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} CD38 ^{hi} CD24 ^{hi} CD21 ^{pos}
Vírgenes	Vírgenes en reposo (resN)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{pos} CD38 ^{pos} CD24 ^{neg} CD11c ^{neg}
	Vírgenes activadas (actN)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{pos} CD38 ^{neg} CD24 ^{neg} CD11c ^{pos}
Células secretoras de anticuerpos	Plasmablastos (ASC)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{hi} CD38 ^{hi}
Memoria clásica	Memoria clásica sin cambio de isotipo (USwM)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{pos} IgD ^{pos}
	Memoria clásica con cambio de isotipo (SwM)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{pos} IgD ^{neg}
Memoria no clásica (CD27 ^{neg})	Memoria no clásica CD27 ^{neg} IgD ^{neg} (M CD27 ^{neg} IgD ^{neg})
	CD19 ^{pos} CD38 ^{neg/lo} CD24 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{neg}
	Memoria no clásica CD27 ^{neg} IgD ^{pos} (M CD27 ^{neg} IgD ^{pos})
	CD19 ^{pos} CD38 ^{neg/lo} CD24 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{pos}
Dobles Negativas (CD27 ^{neg} IgD ^{neg})	Dobles Negativas 1 (DN1)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{neg} CD38 ^{neg/pos} CD24 ^{neg} CD21 ^{pos} CD11c ^{neg}
	Dobles Negativas 2 (DN2)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{neg} CD38 ^{neg} CD24 ^{neg} CD21 ^{neg} CD11c ^{pos}
	Dobles Negativas3 (DN3)
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{neg} CD38 ^{neg/pos} CD24 ^{neg} CD21 ^{neg} CD11c ^{neg}
Dobles Negativas4 (DN4)	
	CD19 ^{pos} CD27 ^{neg} IgD ^{neg} CD38 ^{neg} CD24 ^{neg} CD21 ^{pos} CD11c ^{pos}

Anexo 3. Estrategia de gating.



Anexo 4. Imagen representativa de la citometría de flujo: porcentaje de expresión de TLR 7, 9 y MyD 88 en las subpoblaciones de LB.



Anexo 5. Carta de aprobación del comité de Investigación y Comité de Ética en investigación



Ciudad de México a 14 marzo de 2023
No. OFICIO MCONTROL-350/2023
REG. CONBIOETICA-09-CEI-011-20160627

DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN
INVESTIGADORA PRINCIPAL
DEPTO. DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
AV. VASCO DE QUIROGA No. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
CIUDAD DE MEXICO, C.P. 14080
P R E S E N T E

Por este medio, nos permitimos informarle que el Comité de Investigación, así como el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, han revisado y aprobado el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

"Análisis del perfil cuantitativo y funcional de TLRs intracitoplásmicos y MyD88 en subpoblaciones de linfocitos B en paciente con nefropatía lúpica"

Versión marzo 2023

REF. 4403

La vigencia de aprobación termina el día 14 de marzo de 2024. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

POR FAVOR CUANDO TERMINE EL PROTOCOLO DEBÉRA ENVIAR CARTA DE AVISO DE CONCLUSIÓN.

Sin más por el momento, quedemos de usted.

ATENTAMENTE,

DR. CARLOS A. HINOJOSA BECERRIL
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

DR. SERGIO C. HERNÁNDEZ JIMÉNEZ
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



CAHB/SHJ/mrg

Avenida Vasco de Quiroga No. 15 Colonia Belisario Domínguez Sección XVI Alcaldía Tlalpan
C.P. 14080 Ciudad de México Tel. 55 54 87 09 00 www.incmnsz.mx

