



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina, Dermatología y Toxicología

TESIS DOCTORAL:

**BIOMARCADORES NO INVASIVOS DE ACTIVIDAD EN LUPUS
ERITEMATOSO SISTÉMICO**

Presentada por:

Dña. DÉBORA MARTÍN GARCÍA

Para optar al grado de:

DOCTORA DE LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Directores:

Dra. JULIA BARBADO AJO

Dr. JESÚS F. BERMEJO MARTÍN

2015



Dña. Julia Barbado Ajo, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

y

D. Jesús Francisco Bermejo Martín, Doctor en Medicina y Cirugía e Investigador Principal, Unidad de Investigación Médica en Infección e Inmunidad, HCUV-IECSCYL.

CERTIFICAN

Que han dirigido el trabajo titulado "**Biomarcadores no invasivos de actividad en Lupus Eritematoso Sistémico**", realizado por Doña Débora Martín García y que, habyéndose concluído, lo consideran apto para su pública defensa como tesis doctoral.

Para que conste donde convenga, firman en Valladolid a 9 de Octubre de 2015

Prof. Dra. Julia Barbado Ajo

Prof. Dr. Jesús Francisco Bermejo Martín

A mis padres, Donaciano y Maribel, porque ellos son mi modelo a seguir



Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración de la Fundación General de la Universidad de Valladolid.

Agradecimientos

Agradezco a los Doctores Doña Julia Barbado Ajo y Don Jesús Francisco Bermejo Martín, directores de esta tesis, por guiar mi sentido y orientar mi ímpetu en la realización de este trabajo de investigación, y por haberme ayudado a su realización, con su experiencia y acertado enfoque de la problemática de la actividad lúpica.

A Doña Julia Barbado, por su introducción al maravilloso mundo de las enfermedades autoinmunes sistémicas, por la gran confianza depositada en mí, su incondicional esfuerzo y por su dedicación a los pacientes.

A los pacientes de la consulta de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, por su colaboración y por ser el objetivo último de los logros de nuestra investigación.

A Paco, mi esposo, y a mi hijo Fran; mis dos tesoros, que con su amor, su ayuda y su apoyo, han sido como una brisa de aire fresco en los momentos más tensos.

A Luisa Vega y Sergio Calzada, quienes también y muy de cerca participaron y seguirán, cada uno en sus líneas, en el desarrollo de la prevención del brote lúpico.

A Nuria y Rosa, enfermeras del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, que colaboraron en la extracción de las muestras. A Verónica y Lucía, técnicos del Laboratorio de Inmunología, que las procesaron; sin ellas no hubiera sido posible. Y a Dña M^a Fé Muñoz Moreno, Bioestadística de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, por su vital ayuda con el cálculo estadístico.

A toda mi familia y amigos, quienes me mostraron siempre su apoyo durante este difícil tramo.

Índice

| | Página |
|---|---------------|
| Tablas | 19 |
| Figuras | 21 |
| Abreviaturas | 25 |
| 1. Resumen | 29 |
| 2. Introducción | 33 |
| 2.1 Generalidades | 35 |
| 2.2 Epidemiología | 39 |
| 2.3 Etiopatogenia: los grandes mecanismos de la auto-inmunidad | 40 |
| 2.3.1 Factores etiológicos | 41 |
| 2.3.2 Conceptos básicos | 45 |
| 2.3.3 Respuesta de auto-inmunidad | 51 |
| 2.4 Anticuerpos anti-nucleares | 54 |
| 2.4.1 Clasificación | 54 |
| 2.4.2 Estrategia y métodos de identificación | 56 |
| 2.4.3 Valor diagnóstico | 60 |
| 2.4.4 Valor pronóstico | 63 |
| 2.5 Diagnóstico | 64 |
| 2.6 Evaluación pronóstica | 72 |
| 2.6.1 "Scores" de actividad | 75 |
| 2.6.2 "Scores" de daño: SLICC/ACR DI | 78 |
| 2.7 Biomarcadores de lupus activo | 80 |
| 2.7.1 " <i>Chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2)/Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)</i> " | 82 |
| 2.7.2 Otros candidatos a biomarcador de lupus activo | 86 |
| 2.8 Interés clínico de los biomarcadores en la nefropatía lúpica | 96 |
| 2.8.1 Biomarcadores de nefropatía lúpica | 96 |
| 2.8.2 Correlaciones anatómo-clínicas | 101 |
| 3. Hipótesis de trabajo y objetivos | 107 |
| 3.1 Hipótesis de trabajo | 109 |
| 3.2 Objetivos | 111 |
| 4. Material y Métodos | 113 |
| 4.1 Diseño del estudio | 115 |

| | |
|---|-----|
| 4.2 Población de estudio | 115 |
| 4.3 Población control | 116 |
| 4.4 Comité de ética y consentimiento informado | 116 |
| 4.5 Criterios de inclusión y exclusión | 117 |
| 4.5.1 Criterios de inclusión | 117 |
| 4.5.2 Criterios de exclusión | 118 |
| 4.6 Metodología | 118 |
| 4.6.1 Recogida y transporte de muestras | 118 |
| 4.6.2 Determinación de veintisiete citoquinas en orina | 118 |
| 4.6.3 Analítica de control | 125 |
| 4.6.4 Consulta de revisión | 126 |
| 4.7 Variables recogidas | 132 |
| 4.7.1 Determinación de citoquinas en orina | 132 |
| 4.7.2 Seguimiento en consulta | 135 |
| 4.8 Método estadístico | 136 |
| 4.8.1 Análisis descriptivo | 137 |
| 4.8.2 Análisis de contraste | 137 |
| 4.8.3 Análisis de correlación y capacidad diagnóstica | 138 |
| 5. Resultados | 141 |
| 5.1 Análisis descriptivo | 143 |
| 5.1.1 Características clínicas de la población | 143 |
| 5.1.2 Afectación orgánica | 151 |
| 5.1.3 Nefropatía lúpica | 153 |
| 5.1.4 Determinación de citoquinas en orina | 156 |
| 5.2 Análisis de contraste | 158 |
| 5.2.1 Mediadores inmunológicos en orina en enfermos lúpicos y población sana | 158 |
| 5.2.2 Diferencias significativas halladas | 158 |
| 5.3 Análisis de correlación y capacidad diagnóstica | 160 |
| 5.3.1 Asociación entre citoquinas en orina y la clínica | 160 |
| 5.3.2 Capacidad diagnóstica de las citoquinas en orina | 164 |
| 5.4 Capacidad de predicción | 168 |
| 5.5 Puntos de corte para las curvas ROC con capacidad diagnóstica | 169 |
| 5.6 Otras citoquinas | 173 |

| | |
|---|-----|
| 5.7 Otros parámetros | 179 |
| 6. Discusión | 181 |
| 6.1 Justificación de la necesidad de biomarcadores en LES | 185 |
| 6.2 Principales hallazgos | 194 |
| 6.3 Medicina Personalizada y Medicina de Precisión | 212 |
| 6.4 Ventajas e importancia de nuestros hallazgos | 216 |
| 6.5 Limitaciones del estudio y Lineas futuras | 217 |
| 7. Conclusiones | 221 |
| 8. Rendimiento científico | 225 |
| 9. Anexos | 233 |
| Anexo 1: SLEDAI-2K (" <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000</i> ") | 235 |
| Anexo 2: BILAG (" <i>British Isles Lupus Assessment Group index</i> ") | 237 |
| Anexo 3: Consentimiento informado | 249 |
| Anexo 4: Algoritmo de actuación diagnóstica y terapéutica de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes de HCUV | 251 |
| 10. Bibliografía | 263 |

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.—Situaciones que pueden acompañarse de un screening positivo de ANA por Inmunofluorescencia indirecta

Tabla 2.—Principales aspectos en fluorescencia y su significado

Tabla 3.—Anticuerpos antinucleares: utilidad diagnóstica, sensibilidad y especificidad

Tabla 4.—Manifestaciones clínicas del LES

Tabla 5.—Criterios diagnósticos del LES de 1982, actualizados en 1997

Tabla 6.—Criterios diagnósticos del LES, "*The Systemic Lupus International Collaborating Clinics*" 2012

Tabla 7.—BILAG versus SLEDAI, fortalezas y debilidades

Tabla 8.- Biomarcadores en orina que han demostrado su utilidad en el diagnóstico y buena respuesta al tratamiento de la NL

Tabla 9.—Enfermedades asociadas a MCP-1 y su probable mecanismo

Tabla 10.—Clasificación histológica ISR/RPS 2003 de la Nefritis Lúpica

Tabla 11.—Correlaciones anatomo-clínicas (ISR/RPS 2003)

Tabla 12.—Índice de Austin

Tabla 13.—Límites de detección de las citoquinas estudiadas

Tabla 14.—Características clínicas de los pacientes

Tabla 15 .- Pacientes con nefropatía lúpica

Tabla 16 .- Citoquinas detectables en pacientes severos

Tabla 17.—Regresión logística con MCP-1 para detectar LES grave, hematuria, leucocituria y proteinuria de 24 horas

Tabla 18.—Regresión logística con MCP-1 para detectar LES grave y proteinuria de 24 horas

Tabla 19.—Regresión logística con IP-10 para detectar LES grave y proteinuria de 24 horas

Tabla 20 .- Puntos de corte de curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI \geq 8. Punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad

Tabla 21 .- Puntos de corte de curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI \geq 8 en pacientes sin proteinuria. Punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad

Tabla 22 .- Puntos de corte de curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI \geq 8 en pacientes con proteinuria \geq 0.5gr/24h. Punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad

Tabla 23.- Prevalencia de las principales manifestaciones clínicas detectadas en una serie de 1.000 pacientes europeos con LES

Tabla 24.- Capacidad de filtración de distintas sustancias en los capilares glomerulares en relación con su peso molecular

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.—Balance de las respuestas Th1/Th2

Figura 2.—Representación esquemática de la estructura tridimensional de las quimioquinas

Figura 3.—Estructura de MCP-1

Figura 4.—Microesferas de cien ratios diferentes de fluorescencia rojo-naranja

Figura 5.—Panel "*Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Bio-rad assay®*" ("*Hercules, CA, USA*")

Figura 6.—Instrumento analizador LX 200 ("*Austin, TX, USA*")

Figura 7.—Preparación de las muestras

Figura 8.—Principio de la detección en citometría de fase sólida (Luminex)

Figura 9.—Detección de los valores de citoquinas con ayuda del software Bioplex Manager 6.1

Figura 10.- Hoja de recogida de datos

Figura 11.—Sexo de los pacientes participantes

Figura 12.—Grupos por rango de edad, porcentajes

Figura 13.—Puntuación con SLEDAI-2K, porcentajes

Figura 14.—Grupos constituidos por SLEDAI-2K

Figura 15.—Tratamiento inmunosupresor, porcentajes

Figura 16.—Tratamiento anti-proteinúrico, porcentajes

Figura 17.—Afectación órgano por órgano, porcentajes

Figura 18.—BILAG para la afectación renal

Figura 19.—Niveles en orina de MCP-1 en LES inactivo, moderado, severo y controles sanos

Figura 20.—Niveles en orina de MCP-1 en pacientes con o sin proteinuria

Figura 21.—Análisis de correlación entre MCP-1 y SLEDAI-2K

Figura 22.—Análisis de correlación entre MCP-1 y C3

Figura 23.—Análisis de correlación entre MCP-1 y C4

Figura 24.—Análisis de correlación entre MCP-1 y Leucocitos

Figura 25.—Análisis de correlación entre MIP-1 β y SLEDAI-2K

Figura 26.—Análisis de correlación entre Il-8 y SLEDAI-2K

Figura 27.—Cálculo del área bajo la curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI ≥ 8

Figura 28.—Cálculo del área bajo la curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI ≥ 8 en pacientes sin proteinuria

Figura 29.—Cálculo del área bajo la curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI ≥ 8 en pacientes con proteinuria $\geq 0.5\text{gr}/24\text{h}$

Figura 30.- Cálculo del área bajo la curva COR con IP-10, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 31.-Cálculo de área bajo la curva COR con IL-1RA, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 32.- Cálculo de área bajo la curva COR con VEGF, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 33.- Cálculo de área bajo la curva COR con IL-8, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 34.- Cálculo de área bajo la curva COR con IL-7, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 35.- Cálculo de área bajo la curva COR con MIP-1 β , para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 36.- Cálculo de área bajo la curva COR con IL-12, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 37.- Cálculo de área bajo la curva COR con C3 y C4, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 38.- Cálculo de área bajo la curva COR con el leucograma, para detectar SLEDAI \geq 8

Figura 39.- Esquema del glomérulo y localización de la barrera de filtración glomerular

Figura 40.- Esquema de la barrera de filtración glomerular

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| Akt/PI3K: | Akt Kinase/Phosphoinositide 3-kinase complex |
| ACL: | Anticuerpos anti-cardiolipina |
| ACR: | American College of Rheumatology |
| ACV: | Accidente Cerebro-Vascular |
| ADN: | Ácido desoxirribonucleico |
| AFL: | Anticuerpos anti-fosfolípidos |
| ANA: | anticuerpos antinucleares |
| AR: | Artritis Reumatoide |
| ARA-II: | bloqueadores del receptor de la angiotensina II |
| ARN: | Ácido ribonucleico |
| AUROC: | Areas Under the Receiver Operating Characteristic |
| AZA: | Azatioprina |
| BAFF: | Factor activador de células B |
| BCR: | B cell receptor |
| BILAG: | British Isles Lupus Assessment Group index |
| CCL2/MCP-1: | Chemokine (C-C motif) ligand 2/Monocyte Chemotactic Protein-1 |
| CCR2: | C-C chemokine receptor type 2 |
| CD: | Cluster of differentiation |
| CD40L: | CD40 ligando |
| CDC: | Centers for Disease Control and prevention |
| CFM: | Ciclofosfamida |
| CI: | Complejos Inmunes |
| CMH: | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| CMV: | Citomegalovirus |
| COR: | Característica Operativa del Receptor |
| CPA: | Célula Presentadora de Antígenos |
| CPK: | Creatin fosfoquinasa |
| CREST: | Calcinosis, Raynaud's syndrome, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia |

| | |
|-----------------|---|
| EBV: | Epstein-Barr virus |
| ECG: | Electrocardiograma |
| ECLAM: | European Consensus Lupus Activity Measurement |
| EDTA: | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELISA: | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EMG: | Electromiograma |
| EMTC: | Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo |
| EPOC: | Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica |
| ERC: | Enfermedad Renal Crónica |
| ETN: | Etanercept |
| FG: | Filtrado Glomerular |
| FGF-b: | human Fibroblast Growth Factor-basic |
| FR: | Factor Reumatoide |
| G-CSF: | Granulocyte Colony-stimulating factor |
| GM-CSF: | Granulocyte Macrophage Colony-stimulating factor |
| HCUV: | Hospital Clínico Universitario de Valladolid |
| HLA: | Human Leukocyte Antigen |
| HTA: | Hipertensión Arterial |
| HSP: | Heat Shock Protein |
| HXCL: | Hidroxicloroquina |
| IC: | Índice de confianza |
| IECA: | Inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina |
| IFI: | Inmunofluorescencia indirecta |
| Ig: | Inmunoglobulina |
| IgIV: | Inmunoglobulinas intravenosas |
| IFN- α : | Interferon- α |
| IFN- γ : | Interferon- γ |
| IL2R: | Receptor de interleuquina-2 |
| IL: | Interleuquina |
| IL-1RA: | IL-1 receptor antagonist |
| IP-10: | IFN-inductible protein-10 |
| iTreg: | Linfocitos T reguladores inducibles |
| ISR/RPS: | International Society of Nephrology/Renal Pathology Society |
| LAI: | University of California, San Francisco/Johns Hopkins Lupus |

| | |
|------------------|--|
| | Activity Index |
| LES: | Lupus Eritematoso Sistémico |
| MAPK: | Mitogen-activated protein kinase |
| MBG: | Membrana Basal Glomerular |
| ME: | Microscopía electrónica |
| MFI: | Mean Fluorescence Intensity |
| MIP-1 α : | Macrophage inflammatory protein-1 α |
| MIP-1 β : | Macrophage inflammatory protein-1 β |
| MMF: | Micofenolato mofetil |
| MO: | Microscopía Óptica |
| MTX: | Metotrexato |
| NF: | Nefropatía Lúpica |
| NF κ B: | Nuclear Factor κ B |
| NK: | Natural Killer |
| nTreg: | Linfocitos T reguladores naturales |
| OMS: | Organización Mundial de la Salud |
| p38MAPK: | p38 Mitogen-Activated Protein Kinase |
| PCR: | Proteína-C reactiva |
| PDGF-BB: | Platelet-derived growth factor-BB |
| RANTES: | Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted protein |
| REEG: | Registro Español de Enfermedades Glomerulares |
| rho: | Coefficiente de correlación de Spearman |
| SAFL: | Síndrome anti-fosfolípido |
| SAPE: | Estreptavidina-ficoeritrina |
| SELENA-SLEDAI: | SLEDAI modifications 2004 |
| SLAM: | Systemic Lupus Activity Measure |
| SLEDAI: | Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index |
| SLEDAI-2K: | SLEDAI modifications 2000 |
| SLICC/ACR DI: | Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index |
| SRAA: | Sistema renina-angiotensina-aldosterona |
| SS: | Síndrome de Sjögren |
| STR: | Esteroides |

| | |
|--------|---|
| TCD4: | Linfocito T CD4 ⁺ |
| TCR: | T cell receptor |
| TGF-β: | Transforming Growth Factor-β |
| Th1: | T helper-1 |
| Th2: | T helper-2 |
| TNF-α: | Tumor Necrosis Factor-α |
| Tr1: | Linfocitos T reguladores productores de IL-10 |
| Treg: | Células T reguladoras Foxp3 ⁺ |
| UVA: | Ultra-Violet A |
| VEGF: | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VHB: | Virus de la Hepatitis B |
| VHC: | Virus de la Hepatitis C |
| VIH: | Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| VSG: | Velocidad de Sedimentación Globular |

1. Resumen

Ante las limitaciones del seguimiento clínico convencional respecto a su capacidad para detectar actividad grave y/o brote del Lupus Eritematoso Sistémico (LES), la cuantificación de los niveles de citoquinas en orina se muestra como una exploración prometedora. En el presente trabajo, mediante tecnología Luminex, medimos 27 citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en la orina de 48 pacientes, previamente diagnosticados de LES. Observamos que los niveles urinarios de MCP-1 (CCL2) fueron más elevados en los enfermos con actividad severa medida por la escala "*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000*" (SLEDAI-2 K) respecto a los que presentaban actividad moderada de la enfermedad, o a los que no presentaron actividad. Los niveles de MCP-1 urinarios fueron mayores en los enfermos que presentaban una proteinuria por encima o igual a 0.5 gr/24 horas. Encontramos que los niveles urinarios de MCP-1 guardan relación directa con la actividad medida por SLEDAI-2K e inversa con los niveles séricos de complemento C3 y C4, y con los linfocitos en sangre periférica. El análisis del área bajo la curva ROC (AUROC por sus siglas en inglés) demostró que los niveles en orina de MCP-1 poseen capacidad diagnóstica, con alta sensibilidad y especificidad, de actividad grave tanto en pacientes con proteinuria como sin proteinuria. Nuestros hallazgos pueden permitir el uso de MCP-1 como biomarcador de actividad lúpica.

2. Introducción

El Lupus Eritematoso Sistémico es una enfermedad autoinmune crónica, de etiología desconocida, con un componente inflamatorio muy importante. Cursa con períodos de remisión y exacerbación y se caracteriza por causar daño tisular mediado por mecanismos inmunológicos en diferentes órganos, aparatos y sistemas, siendo la nefropatía lúpica (NL) una de las mayores complicaciones de la misma. Esta manifestación aumenta tanto la morbilidad como la mortalidad de la enfermedad. La expresión clínica de esta enfermedad es muy variable, como resultado del compromiso sistémico y de que implica una serie de factores relacionados entre sí: genéticos, inmunológicos y ambientales.

Para la caracterización de esta enfermedad se utilizan los criterios diagnósticos del Colegio Americano de Reumatología (ACR por sus siglas en inglés) de 1971, revisados en 1997.

2.1 Generalidades [1]

Presenta una distribución mundial y afecta a todas las razas, aunque con mayor predilección y gravedad a la raza negra. Existe un predominio en el sexo femenino, especialmente en edad reproductiva, con un riesgo 9 veces más elevado respecto a los varones. Sin embargo, la enfermedad puede aparecer en cualquier edad, esta razón disminuye en las mujeres menores de 14 años y mayores de 64 años, en las que sólo es cuatro veces mayor respecto al sexo opuesto.

El LES es una enfermedad poligénica, caracterizada por la activación policlonal de células B en etapas precoces de la enfermedad y disminución de las células T citotóxicas y las células T supresoras. Existe un aumento de las células T helper-2 y defectos en la apoptosis

de células B. Ésto conduce a una vida más prolongada de los linfocitos B, con aumento de las señales intracelulares calcio-dependientes y la fosforilación de proteínas citosólicas, con hipofunción del factor nuclear κ B (NF κ B) y el aumento de la producción de citocinas Th2.

Se produce, por tanto, una exagerada respuesta inflamatoria multisistémica, caracterizada por la producción de auto-anticuerpos, especialmente IgG, teniendo como blancos habitualmente antígenos nucleares. Esta respuesta desproporcionada conlleva a la formación de inmunocomplejos, que son capaces de depositarse a nivel tisular cuando se sobrepasa el dintel de su depuración.

La influencia de la genética en el LES se ha reconocido en múltiples estudios. Inicialmente por la variabilidad del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y actualmente a través de los polimorfismos de otros genes relacionados con la inmunidad, como por ejemplo los genes de ciertas citoquinas.

A grandes rasgos, la fisiopatología del lupus puede resumirse en tres aspectos básicos:

1.- Existe un desbalance Th1/Th2, a favor de la respuesta Th2, aunque con predominio de la respuesta Th1 en los inicios.

2.- Se produce una activación persistente de células B, relacionada con el factor activador de células B (BAFF), es regulado positivamente por IFN- γ , que conduce a una hipergammaglobulinemia policlonal y explica en parte la producción de auto-anticuerpos. Debe mencionarse la interacción de CD40 con su respectivo ligando en las células B, que induce la proliferación y formación de centros germinales, y dentro

de éstos, la maduración de la afinidad de las inmunoglobulinas, cambio del isotipo, mutación somática y expansión clonal de células B específicas. El papel potencial de la unión CD40/CD40L en la patogenia del lupus se sustenta en modelos con animales, a los que la administración de un anticuerpo anti-CD40L, retrasa la enfermedad y disminuye la progresión de la nefritis lúpica.

3.- Existen defectos en la tolerancia de auto-antígenos, puestos de manifiesto por un aumento en la expresión de CMH de clase II, con participación de IL-18 que induce aumento de la expresión de IFN- γ . Éste a su vez actúa sinérgicamente con IL-1, lo cual favorece un aumento de la respuesta Th1, en relación directa con la actividad de la enfermedad.

Adicionalmente, se han descrito citoquinas asociadas con ciertas manifestaciones de la enfermedad. Como la asociación de TNF- α e IFN- γ con la nefritis lúpica o del polimorfismo de un solo nucleótido para IL-6 174G/C con el lupus discoide cutáneo. Se ha observado, en varios estudios, que citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento juegan un rol importante en la patogénesis del LES. Ésto ha llevado a postular una gran diversidad de hipótesis para explicar la dis-regulación de citoquinas en el lupus, adquiriendo especial énfasis el desbalance Th1/Th2, considerando a estas moléculas mediadores pro- y anti-inflamatorios que, con toda probabilidad, se encuentran involucrados con determinadas presentaciones y estadios de la enfermedad. Es posible que el estudio del patrón de producción de citoquinas pueda ser relevante para la toma de decisiones respecto a las opciones terapéuticas y sus modificaciones, así como para conocer el pronóstico de la enfermedad.

Por ejemplo, en numerosos estudios se han investigado los niveles séricos del receptor de interleuquina-2 (IL2R) como marcador de actividad. Muchos de estos estudios revelan niveles elevados de dicho receptor en los pacientes con enfermedad activa. Además, se ha mostrado el incremento de IL2R durante los brotes y su posterior descenso tras el tratamiento y la mejoría clínica. Estos resultados sugieren que IL2R puede ser considerado como un prometedor biomarcador sanguíneo de actividad del LES, especialmente en aquellos pacientes con afectación renal.

Otros estudios han detectado niveles séricos de IL-6 elevados en los brotes de serositis lúpica. Los niveles de esta citoquina en plasma, se relacionan con la actividad de la enfermedad y los niveles elevados en orina con la actividad renal en presencia de sedimento patológico.

Últimamente se ha puesto en evidencia, tanto en modelos animales como en humanos, la participación de diversas citoquinas, muy en particular de quimiocinas en la glomerulonefritis lúpica. Se ha estudiado que las concentraciones urinarias de algunas de estas quimiocinas se encuentran aumentadas en los pacientes con LES e incluso descienden con la remisión de la misma, tras la instauración y respuesta al tratamiento. De manera no invasiva sería posible, por tanto, detectar actividad de la enfermedad renal lúpica mediante el estudio de los niveles de estas citoquinas. Siendo de gran utilidad conocer la clase de nefritis lúpica y su gravedad.

2.2 Epidemiología [2]

El LES afecta esencialmente a las mujeres (sex-ratio 9/1) en período de actividad sexual, debutando habitualmente en la tercera década de la vida. Su prevalencia es aproximadamente del orden de 50/100.000 habitantes, pero es muy variable en función de las etnias; por orden de frecuencia decreciente: negros, amarillos, blancos (riesgo relativo de 5, 3 y 1 respectivamente). Su incidencia anual está comprendida entre 1 a 10 por 100.000 habitantes. En Europa la mayor incidencia y prevalencia se observa en Suecia, Islandia y España.

Entre los factores desencadenantes que mejor se han descrito están la luz ultravioleta y las infecciones virales.

El estudio Nurses' Health mostró que en las mujeres con menarquia precoz el tratamiento con estrógenos (terapia hormonal sustitutiva) y el empleo de anticonceptivos orales se asocian a un incremento significativo del riesgo de LES. Factores relacionados con el cromosoma X (IRAK1, MECP2, TLR7) pueden traducirse en una importante predisposición a padecer lupus, de la misma manera que el síndrome de Klinefelter (XXY) se asocia a mayor riesgo de padecer la enfermedad.

Por otra parte, se han descrito factores que se asocian con un peor curso clínico de la enfermedad. Es conocida la mala evolución del LES y la mayor prevalencia de nefritis lúpica en mujeres de raza negra o hispanas, que además responden mal al tratamiento con ciclofosfamida. También, el bajo nivel cultural y socio-económico contribuyen a un limitado acceso a los servicios sanitarios, lo que se ha asociado a una mala evolución de la

enfermedad. El LES cuando afecta al sexo masculino, presenta manifestaciones de mayor gravedad, siendo más frecuente la implicación renal, serositis y la presencia de vasculitis. Los lupus infantiles suelen ser más severos que los adultos, contrariamente al que padecen los ancianos, en quienes las manifestaciones cutáneas son la regla.

Las características de esta enfermedad: sistémica, curso en brotes, crónica, con factores externos e internos desencadenantes y que afecta en gran parte a personas en edad laboral, hace que la misma implique un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, repercutiendo a nivel social en unos altos costes sanitarios y una pérdida de productividad. El paciente lúpico incurre, por tanto, en una gran carga para la sociedad.

2.3 Etiopatogenia: los grandes mecanismos de la auto-inmunidad

Hablamos de auto-inmunidad cuando existen linfocitos B (anticuerpos) y/o linfocitos T (células citotóxicas) dirigidas contra componentes propios. Sin embargo, la auto-inmunidad, en ella misma, es un proceso perfectamente fisiológico cuya significación se desconoce. Esta constatación sobrepasa el concepto establecido de auto-anticuerpos naturales, puesto que se admite que existen linfocitos T y B que reconocen auto-antígenos pero que son regulados por numerosos sistemas de control [3]. La situación no es patológica, salvo cuando estas células escapan a todo control y es en este contexto en el que se desarrollan las enfermedades auto-inmunes.

Tradicionalmente, se clasifican en afecciones específicas de órgano (miastenia, anemia perniciosa, tiroiditis de Hashimoto, etc) y en afecciones no específicas de órgano (LES, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, etc). Esta distinción es fundamental y se cree, probablemente de forma errónea, que el órgano afectado interviene como el detonante para el primer grupo de desórdenes. Por otra parte, se considera al sistema inmune la causa indiscutible del segundo grupo [4]. En el ámbito de la Inmunología todo es posible, desde las situaciones intermedias, los cuadros incompletos, pasando por las combinaciones de varios mecanismos, al igual que pueden existir en la clínica sólo algunos síntomas o hasta síndromes.

En todo caso se deben cumplir tres condiciones para el desarrollo de una enfermedad auto-inmune. Deben combinarse una o varias de entre las posibles causas (etiología), cuyos efectos deben prolongarse en el tiempo (fisiopatología), ocasionando daño (patogenia). Dado que los factores causales resultan muy numerosos, darles jerarquía quizás no tenga ningún sentido, aunque debemos distinguir entre factores innatos e influencias adquiridas. Fisiopatológicamente, ocurre una ruptura de la tolerancia inmunológica, lo que nos invita a estudiar y entender los mecanismos activados y las razones por las que justamente este estado de tolerancia no se rompe en otras circunstancias. Respecto al desarrollo de lesiones, la lógica plantea la mayoría de veces la presencia de ciertos patógenos, sin que se haya demostrado con certeza, a día de hoy, esta relación.

2.3.1 Factores etiológicos

Dentro de los factores etiológicos se distinguen factores innatos y factores adquiridos. A continuación explicaremos los más destacados de cada grupo.

Factores innatos:

1.- Observaciones familiares: respecto al lupus, la prevalencia es de 1/100 en sujetos emparentados de primer grado, siendo de 1/2.000 en la población general. Esta diferencia explica en parte el carácter familiar del LES. Un artículo publicado en 2001 en Medicine [5] reunía 125 familias y exponía la existencia de un modo de transmisión dominante en una familia, autosómico dominante en otras seis familias e indeterminado en el resto. De hecho, en gemelos la concordancia sobrepasa el 60% si son monocigóticos, pero cae al 10% si son dicigóticos. Debe señalarse además, que es posible que la enfermedad sufrida por el familiar no sea la misma del paciente, pero si éste último padece una afectación no específica de órgano, es muy probable que la enfermedad del familiar, si llega a desarrollarla, sea también no específica de órgano. De igual manera, si el antecedente familiar consiste en una afectación específica de órgano, existen muchas posibilidades de que, si algún pariente presenta una afección auto-inmune, sea ésta específica de órgano. Por ejemplo, en numerosas familias se han descrito casos de LES, con antecedentes en otros miembros de la misma familia de artritis reumatoide, anemia perniciosa o tiroiditis de Hashimoto.

Los parientes podrían no padecer una verdadera enfermedad auto-inmune, pero presentar sus equivalentes serológicos, como por ejemplo la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA). En grado de severidad, podría calificarse de inferior, pero deben considerarse a estos resultados analíticos como la prueba de la existencia de un estado de auto-inmunidad.

Respecto a las inmunoglobulinas, ninguna es igual a la otra (idiotipos), y aunque un idiotipo pueda pertenecer a un clon específico (idiotipo privado), por lo general, los idiotipos son compartidos por muchos clones (idiotipos públicos). Para una enfermedad dada, la

proporción de un auto-anticuerpo con un idiotipo público puede preponderar respecto a los otros [4]. Por ejemplo, es posible producir anti-ADN hibridando los linfocitos de sujetos con células mielomatosas, para después fabricar otros anticuerpos monoclonales frente al idiotipo de ese auto-anticuerpo. Por último, uno de los idiotipos cruzados más conocido y frecuente de auto-anticuerpos, pertenecientes a los anti-ADN nativo, es el 16/6, que se encuentra presente en los lupus familiares.

2.- Asociaciones con el sistema HLA: Existen múltiples asociaciones entre enfermedades auto-inmunes y alelos HLA. El LES se asocia a los haplotipos DR2 ó DR3, el síndrome de Sjögren (SS) con la combinación A1 B8 DR3 y la diabetes mellitus tipo 1 al DR3 y DR4. Hay que destacar que existen variaciones regionales, por ejemplo, en las artritis reumatoideas (AR) europeas el antígeno DR4 está presente en el 60-80% de los casos, mientras que en otras partes del mundo éste es reemplazado por el DR1.

3.- Déficit de complemento: los déficits hereditarios de componentes del complemento son infrecuentes. El déficit de complemento puede ser de dos tipos: 1.- los que afectan a los componentes una vez formado C3 (infecciones de repetición) y 2.- la afectación de los componentes que intervienen en la formación de C3 (enfermedades auto-inmunes). La carencia de C2 es la más rara de todas, se estima que el 40% de los sujetos homocigotos para el gen anormal de C2 desarrollan lupus y, al revés, el 6% de los pacientes lúpicos presentan esta anomalía, al menos en su estado heterocigoto. Los alelos silenciosos C4AQO y C4BQO predisponen igualmente al lupus, pero probablemente sea el desequilibrio de la unión de los haplotipos HLA A, B y DR la verdadera causa. En cuanto al déficit de receptores eritrocitarios de complemento, no se sabe si podría considerarse como causa de LES, se ha observado que lo presentan frecuentemente los padres del enfermo y que quizás en la

actividad de la enfermedad puedan jugar el rol de exagerar las consecuencias de la inflamación.

Factores adquiridos

Dentro del grupo de los factores adquiridos considerados como desencadenantes de actividad lúpica, podemos nombrar como más importantes:

1.- Micro-organismos: desde hace tiempo, existen indicios acerca de la responsabilidad de los retrovirus en la auto-inmunidad, como por ejemplo en la infección por el VIH [6]. La mayoría se tratan de hipótesis sin pruebas claras de la responsabilidad de éste y de otros virus, a pesar de haberse encontrado los genes *gag* o *pol* del VIH-1 en los sueros de pacientes lúpicos, o reactividad de los sueros de pacientes con SS frente a la proteína p24 del VIH-1 ó p17 del VIH-2. También pueden estar implicados otros, como el virus de la hepatitis C (VHC), virus sialotropos como el Citomegalovirus (CMV) o el virus de Epstein-Barr (EBV). Responsables quizás, sobre todo el último, de una exagerada proliferación de linfocitos B, mecanismo que se lleva a cabo para evadir la respuesta citotóxica dirigida contra él.

2.- Medicamentos: un número creciente de drogas son susceptibles de favorecer la producción de auto-anticuerpos (por ejemplo, ANA positivos), generando un auténtico LES. Es el caso de la alfa-metil-Dopa, Procainamida y D-penicilamina; entre otros.

3.- Radiación ultravioleta: se sabe que dispara la producción de IL-1 por parte de las células Langerhans de la piel. Por acción directa de la misma se produce una translocación de

proteínas desde el núcleo hasta la membrana plasmática, alterando el ADN del núcleo. Todo esto induce a la apoptosis de los keratinocitos.

4.- Hormonas: como ya se ha comentado anteriormente, las enfermedades auto-inmunes son mucho más frecuentes en las mujeres que en los varones, no sólo por razones de diferencias genéticas, sino también por la propia impregnación hormonal. El embarazo juega un rol determinante en la evolución de estas enfermedades, exacerbando al LES y, curiosamente, moderando la AR. En un modelo murino, se ha observado que la castración de ratas hembras retrasa la aparición del LES, pero todo lo contrario ocurre tras la inyección de estrógenos.

2.3.2 Conceptos básicos

Procesamiento del antígeno antes de su presentación

El escenario es el mismo, se trate de un exo-antígeno o de un auto-antígeno [7]. La proteína es presentada a los linfocitos T por moléculas del CMH. Destaca el extraordinario polimorfismo de la familia de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, de las que existen dos clases: clase I, presentes en la totalidad de las células del organismo, y clase II, que constituyen el instrumento de comunicación de las células presentadoras de antígeno (CPA). La estructura de las moléculas HLA de clase I asocia de manera no covalente una glucoproteína-alfa formada de 3 dominios extracelulares y β 2-microglobulina, ésta última inmutable. El polimorfismo de este complejo se limita a una o varias zonas de hipervariabilidad situadas preferentemente en el dominio más externo de la cadena alfa. Las moléculas HLA de clase II consisten estructuralmente en un heterodímero que acopla una

cadena alfa y otra beta, cada una provista de dos dominios, la primera es relativamente constante, la segunda extremadamente variable.

En cristalografía se ha estudiado la estructura de la molécula HLA-A2. Su unidad funcional es una cavidad rodeada por los dominios alfa-1 y alfa-2, cerrada por un alineamiento antiparalelo de hojas plegadas beta. Se aprecia que los residuos variables se encuentran dispuestos de manera que puedan entrar lo más fácilmente en contacto con el residuo al cual se tiene previsto acoger. El polimorfismo HLA es determinante en la selección del péptido que será presentado. De esta manera, las proteínas que siguen la vía de la exocitosis (auto-antígenos y productos virales) son reducidos a péptidos de 8 a 10 aminoácidos en el citosol. Por efecto de las bombas TAP1 y TAP2 llegan al retículo endoplásmico, donde las moléculas HLA de clase II los esperan. Todos estos antígenos son captados por endocitosis y fragmentados en el interior de la vesícula formada por la unión del fagosoma con el lisosoma, para que en el interior del retículo endoplásmico se una a la molécula HLA que les corresponda, por sus cadenas invariantes. Ésto, que se llama "chaperonaje", tiene por objetivo impedir que las moléculas HLA intercepten moléculas propias. Una vez cargadas las moléculas HLA correspondientes con sus respectivos antígenos, éstas se encuentran listas para entrar en contacto con los linfocitos T.

Tres nociones importantes deben tenerse en cuenta:

- Un linfocito B capta antígenos por medio de sus inmunoglobulinas de membrana, por lo que en caso de tratarse de auto-péptidos, éstos se presentarán por moléculas HLA de clase II y no por moléculas HLA de clase I como normalmente se esperaría.

- La hiperexpresión de moléculas HLA de clase II, características de una enfermedad auto-inmune dada, desincronizan la síntesis de moléculas HLA de clase II de aquella de las cadenas invariantes que aseguran su control, emancipándolas y por lo tanto permitiendo que puedan éstas captar auto-péptidos.
- Si existe reacción para una glucoproteína de membrana A, y ésta se expresa conjuntamente con una proteína B, ambas serán susceptibles de presentarse a través de una molécula HLA de clase II como antígenos ("*linked activation*").

Por último, respecto a la presentación de antígenos, debe saberse que las CPA pueden ser "profesionales" como los macrófagos y células dendríticas, "ocasionales" como los linfocitos B y células endoteliales, o "accidentales" como los fibroblastos y células epiteliales.

Presentación de auto-antígenos

En la reacción inmune desencadenada tras la presentación del antígeno hay que tener una serie de consideraciones:

1.- La activación de linfocitos T: tras la presentación del antígeno por parte de la CPA al linfocito T, el relevo lo toman los linfocitos T llamados "auxiliares" (o helper en inglés), e independientemente del tipo de célula presentadora de antígenos que lo ha solicitado, el resultado es siempre el mismo: las moléculas HLA de clase II transmiten un péptido al receptor de antígenos de linfocitos T o *T cell receptor* (TCR). Son necesarias doscientas copias de este péptido para movilizar a un sólo linfocito T. La activación del mismo conduce a su diferenciación y, siguiendo a ésta, a su proliferación. Tras la presentación del antígeno, la activación de linfocitos T ocurre sólo bajo el efecto de dos señales. La

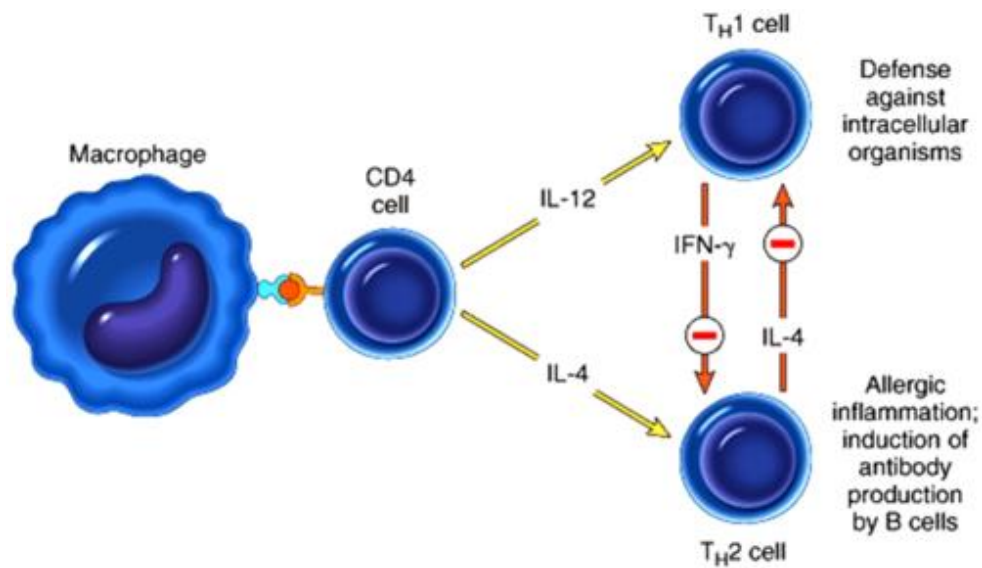
primera es específica del péptido que inserta el HLA en el TCR y la segunda, inespecífica, la constituyen una verdadera salva de citoquinas [8], dirigidas a linfocitos T (IL-2, INF- α ...), linfocitos B (IL-4, IL-6...) y macrófagos (IFN- γ , IL-5...). Cuando la presentación de antígenos la realiza el linfocito B, la respuesta inmunológica es diferente. Cuando los linfocitos B capturan auto-péptidos mediante sus receptores de antígenos o *B cell receptor* (BCR), los antígenos pueden transmitirse a otra célula B o ser presentados a un linfocito T, normalmente mediante moléculas HLA de clase I.

2.- Transmisión del mensaje antigénico: tras la recepción del mensaje antigénico, los linfocitos T nativos o Th0 se diferencian en Th1, que secretan IL-2, TNF- α e IFN- γ principalmente, favoreciendo una respuesta a mediación celular, o en Th2, que secretan IL-4, IL-6 e IL-10 y favorecen una respuesta a mediación humoral. Ambas respuestas se encuentran en un equilibrio (**Figura 1**), que se rompe en el lupus, donde la secreción de IL-4 (T helper-2) contrarresta con mayor fuerza la secreción de IFN- γ (T helper-1).

3.- Cascada de reacciones: tras la recepción del mensaje por el TCR de los linfocitos T, se produce una secuencia de activación de segundos mensajeros para conseguir la plena activación del linfocito T (vías MAPK y Akt/PI3K). Ésta es transmitida hasta el núcleo, donde inducirá las modificaciones respectivas de la expresión de ciertos genes, sobre todo aquellos vinculados con la respuesta efectora. El antiguo concepto de "*punte antigénico*" (mimetismo molecular), en el que la CPA sujeta al antígeno por su segmento hapteno y el linfocito T por su segmento portador, permite entender la cascada de reacciones que se lleva a cabo a ambos lados de la sinapsis inmunológica, como un ejemplo de respuesta coordinada frente a un antígeno determinado propio o extraño.

4.- Sistemas reguladores, que regulan la respuesta efectora frente a un antígeno. Básicamente son tres: 1) apoptosis de linfocitos T por privación citoquínica en ausencia de segunda señal [9]; 2) linfocitos T reguladores Foxp3^+ [10] y 3) red de idiotipos [11].

Figura 1.—Balance de las respuestas Th1/Th2



Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press

Inmunotolerancia

Básicamente cuando se habla de tolerancia inmunológica se hace referencia a los linfocitos T reguladores Foxp3^+ (Treg) [10]. Se trata de dos subpoblaciones ontogénicamente diferentes pero fenotípicamente similares, cuyo papel crucial es la regulación de toda respuesta inmune. Actualmente se sabe que detrás de toda respuesta de auto-inmunidad se encuentra un déficit en número y/o funcional de estas células.

- **Linfocitos T reguladores naturales (nTreg)**, procedentes del timo, su acción depende de su interacción con células dendríticas por medio del TCR y CD28 en los tejidos a donde acuden.
- **Linfocitos T reguladores inducibles (iTreg)**, que incluyen las células Th3 y Tr1, procedentes de linfocitos T nativos al diferenciarse éstos en condiciones determinadas (inflamación, algunas infecciones, inhibidores de mTOR, tumores...) y por lo general en presencia de TGF- β . También necesitan del contacto HLA-TCR o del efecto de IL-10.

Normalmente, aunque de manera errónea, se entiende como tolerancia B, una serie de mecanismos en la ontogénesis de linfocitos B llevados a cabo en el timo, que incapacitan a linfocitos B CD5⁺ para reconocer auto-antígenos [6, 12], mediante la re-edición de sus inmunoglobulinas, o no permitiendo la amplificación de la respuesta de sus BCR unidos a antígenos. También, en esta mal llamada tolerancia B, entra a formar parte la anulación funcional de linfocitos B que expresan CD22 y CD32 [13].

Anticuerpos naturales anti-idiotipo

El sistema de receptores de antígenos (Ig, pero igualmente TCR) evoluciona bajo el control de la red de idiotipos, considerando a un idiotipo como un antígeno más [11] contra el que puede responder agresivamente el sistema inmune. Cada anticuerpo producido por un clon posee un idiotipo, y contra ese idiotipo existe un anticuerpo natural anti-idiotipo. Como parte de la organización de la respuesta humoral, se eliminaría o quedaría programada la

eliminación de todos aquellos idiotipos que corresponden a anticuerpos reactivos contra componentes propios.

2.3.3 Respuesta de auto-inmunidad

Activación policlonal de linfocitos B

A pesar del filtro al que son sometidos los linfocitos B, persisten muchos con capacidad para reconocer auto-antígenos, que suelen ser inoperantes al no encontrar asistencia T. Esta contención se anularía si apareciese un mitógeno durante la presentación del antígeno. En presencia de cualquier mitógeno ocurre una activación de linfocitos B, policlonal y no específica. Muchos agentes infecciosos actuarían de esta manera, por ejemplo el virus de Epstein Barr, induciendo la formación de auto-anticuerpos por activación policlonal de linfocitos B. Es interesante, al mismo tiempo, señalar la excesiva reacción que puede desarrollarse, secundaria también a agentes infecciosos, en centros germinales ectópicos, como en sinovias, serosas, glándulas exocrinas, etc [14].

El concepto de "*superantígeno*" [15,16] permite también entender que la activación policlonal de linfocitos B no es exclusivamente dependiente de una asistencia T. El superantígeno es totipotencial y establece un puente entre las moléculas HLA y las regiones constantes de los TCR, sin pasar por ningún tratamiento previo. Se estima que uno de cada 10 linfocitos T activados lo hacen por esta vía. Esta activación multiplica las posibilidades de despertar un linfocito T autorreactivo, más aún si se trata de un auto-antígeno. A título de ejemplo, la enterotoxina del estafilococo es un superantígeno para las células T.

Hiperrespuesta T frente a auto-antígenos

Se sospecha que los auto-antígenos por si solos juegan un rol determinante en la producción de auto-anticuerpos [17]. Su influencia es evidente en las enfermedades auto-inmunes específicas de órgano, pero es también relevante en las enfermedades auto-inmunes sistémicas.

Se han propuesto tres mecanismos que incrementan la atracción antigénica y la respuesta de linfocitos T autorreactivos:

- **Anomalía bioquímica del antígeno**, por ejemplo de las IgG en la AR para generar Factor Reumatoide (FR). Estas IgG parece ser que se encuentran desprovistas de galactosa por un déficit de galactosil transferasa. Esta galactosa ocultaría sitios inmunógenos de la inmunoglobulina.
- **Reemplazo del portador autólogo de un auto-antígeno**: un portador exógeno moviliza a un linfocito T que ya había sido movilizado previamente por un portador inicial diferente y eliminado en el timo. Este portador exógeno puede ser la superficie de una bacteria, de una célula o de un medicamento.
- **Mimetismo molecular**: cualquier bacteria o virus puede parecerse a un auto-antígeno cualesquiera, respondiendo el sistema inmune frente a éste, como si respondiera frente a la bacteria o al virus. La analogía entre ciertos estreptococos y muchos antígenos miocárdicos es un ejemplo conocido. La homología entre secuencias de aminoácidos del virus herpes tipo 1 con cadenas del receptor de la acetilcolina es otro ejemplo.

Las moléculas HLA intervienen también en la hiperrespuesta T frente a auto-antígenos. Dos son las hipótesis que se postulan. Por una parte, puede darse una adecuación ideal entre la estructura de la molécula HLA y el péptido resultante de la degradación fisiológica del auto-antígeno. Y por otra parte, puede que la secuencia de aminoácidos del dominio de contacto de la molécula HLA sea idéntica a la de la superficie de un agente infeccioso, por ejemplo, como ocurre con Dw4, Dw14 y Dw15 del DR4, que son iguales a una de las glucoproteínas de la cápside de EBV. En cualquiera de los dos casos, no debería existir reacción, puesto que en todos dicha reacción es posterior a la "*tolerización tímica*", pero la reacción ocurre.

De manera aberrante, las moléculas HLA de clase II pueden aparecer en la superficie de células, en las cuales, en condiciones normales no aparecen [7]. Se sugiere que ésto ocurre por desvelar auto-antígenos que no se llegaron a presentar durante el desarrollo de tolerancia y que tras una infección viral banal se presentan. Al respecto, algunas moléculas de la familia del interferón y los factores de necrosis tumoral pueden inducir esta expresión inapropiada de moléculas HLA, lo que se ha observado en el síndrome de Sjögren, la cirrosis biliar primaria y en la tiroiditis de Hashimoto.

La respuesta T eficaz frente a auto-antígenos se puede mantener de múltiples formas. La reacción auto-inmune que se produce en un momento determinado no es deletérea, si ésta es rápidamente suprimida, como normalmente ocurre por medio de los linfocitos Treg. Es por esta razón que se acepta actualmente, que esté presente en la auto-inmunidad una anomalía numérica o en la calidad de la supresión de los linfocitos T reguladores Foxp3⁺ (como ocurre en el lupus y en las demás enfermedades autoinmunes). Otro hecho es el aumento de la

afinidad de los auto-anticuerpos, como ocurre tras la activación policlonal de linfocitos B, sobre todo respecto a las IgG. Y por último, cabe destacar el papel que juegan determinadas citoquinas como detonantes y/o en el mantenimiento de una reacción de auto-inmunidad [18]. Su acción se entiende cada día mejor, destacando su papel regulando las diferentes respuestas efectoras en un exquisito equilibrio.

2.4 Anticuerpos antinucleares

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son auto-anticuerpos no específicos de órgano dirigidos contra constituyentes del núcleo de las células. Los blancos más frecuentes de estos anticuerpos son constituyentes macromoleculares, bien conformados únicamente por proteínas o bien por la asociación de ácidos nucleicos y proteínas.

El interés clínico de estos anticuerpos antinucleares radica en su valor diagnóstico [19] y pronóstico [20] en las diferentes conectivopatías.

2.4.1 Clasificación

A efectos de discernir entre los diferentes anticuerpos antinucleares, resulta conveniente hacer mención de los componentes del núcleo celular contra los que éstos pueden reaccionar [21]:

- **Cromosomas**, constituidos por ADN bicatenario, denominado también nativo, y proteínas básicas (histonas), que asociados (desoxirribonucleoproteínas insolubles) forman los nucleosomas.
- **Nucleoplasma**, es la fracción soluble o baño de la cromatina, contiene numerosas proteínas inmunógenas solubles, muchas de ellas ligadas a moléculas de ARN de bajo peso molecular ricas en uridina (U-ARN). Así, en mención de sus blancos, los anti-Sm reconocen las proteínas B y B' (20 kDa) y D (19 kDa) ligadas a U-ARN y los anti-U₁RNP reconocen la proteína de 70 kDa y las proteínas A (31 kDa) y C (21 kDa) ligadas a U₁-ARN.
- **Nucleolos**, carecen de membrana propia, se tratan de verdaderas organelas nucleares ricas en ARN precursor de ARN ribosomal (snARN), que unido a proteínas forman los snRNP, de los que forma parte la fibrilarina (U₃RNP).
- **Matriz nuclear**, ciertas proteínas del esqueleto nuclear se ligan al ARN, en especial a los hnARN, precursores de los ARN mensajeros, formando los hnRNP.
- **Membrana nuclear**, donde se encuentran ancladas diferentes estructuras del núcleo que son ribosomas intracitoplasmáticos, ARN de transferencia, diferentes enzimas y sintetetas y ribonucleoproteínas de diferente peso molecular, llamadas scRNP. Estas estructuras macromoleculares son antigénicas y dan lugar a la producción de auto-anticuerpos. De manera general se cree que son las proteínas y no los ácidos nucleicos los que juegan el rol de antígeno.

2.4.2 Estrategia y métodos de identificación

La detección y caracterización de los anticuerpos antinucleares constituyen una prueba determinante frente a toda manifestación clínica y dato analítico que sugiera enfermedad autoinmune sistémica. Tomando en consideración la multiplicidad de anticuerpos antinucleares que existen y de los que se tiene conocimiento, es importante por consiguiente establecer una estrategia jerárquica para las peticiones al laboratorio (habitualmente realizadas en cascada).

Screening

Se utiliza todavía la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando células HEp-2, con ayuda de un anti-suero poli-específico constituido por anti-inmunoglobulinas humanas IgG, IgA e IgM. La técnica detecta la inmensa mayoría de anticuerpos antinucleares, así como una amplia gama de anticuerpos anti-citoplasma. Si alguno de estos resultase positivo, se procede entonces a titular y a precisar el patrón en fluorescencia del mismo. En sujetos normales se encuentra presente un "ruido de fondo" en el 10-15% a la dilución de 1/40 y en 3% a la dilución 1/320. Esta frecuencia se incrementa en el sexo femenino, y aumenta con la edad, sobre todo después de la séptima década de la vida. En estos últimos, un resultado positivo en el despistaje obliga a descartar cualquier proceso infeccioso oculto, neoplasias, hepatopatía crónica, y consumo de ciertos medicamentos como beta-bloqueantes, derivados de la quinina, D-penicilamina, clorpromazina, anti-TNF- α , etc (**Tabla 1**).

La inmunofluorescencia es una prueba semicuantitativa que permite conocer el título correspondiente a la inversa de la última dilución del suero del enfermo con la que da positivo para determinado anticuerpo antinuclear. Históricamente ha sido también importante el patrón

de la fluorescencia obtenida (**Tabla 2**), que pueden ser de 4 tipos: homogéneo, moteado, nucleolar y periférico.

Tabla 1.—Situaciones que pueden acompañarse de un screening positivo de ANA por Inmunofluorescencia indirecta

| Situación | Ejemplos |
|--------------------------------|---|
| Conectivopatías | Lupus Eritematoso Sistémico Artritis Reumatoide Polimiositis, dermatomiositis Esclerodermia sistémica Síndrome de Sjögren Síndrome de Sharp |
| Otras situaciones ^a | Embarazo Infecciones crónicas: hepatitis virales, VIH, endocarditis Leucemia linfoide crónica y otros linfomas Medicamentos: por ejemplo beta-bloqueantes Mononucleosis infecciosa Edad avanzada |

^aEn estas situaciones no estaría indicado efectuar una búsqueda de ANA. Sin embargo, esta lista es útil para interpretar un resultado positivo en términos de diagnóstico diferencial.

Sin embargo, se trata de una prueba cuyo resultado depende del observador. También deben considerarse en la variabilidad de los resultados al fabricante de los portas y del microscopio de medición utilizado en laboratorio.

Para la detección de antígenos que se expresan sólo en mitosis, la generalización del screening utilizando células HEp-2 ha constituido un gran aporte. De igual manera, la recomendación actual de emitir los resultados en ambas diluciones (1/40 y 1/160) ha hecho real un screening con una prueba que puede concebirse fiable y reproducible.

Tabla 2.—Principales aspectos en fluorescencia y su significado

| Aspecto de la fluorescencia | Interpretación |
|------------------------------------|---|
| Homogéneo | Anti-ADN desnaturalizado, frecuente, no específico Anti-histonas Anti-nucleosomas |
| Moteado | Anti-antígenos nucleares solubles, sin prejuizar de su especificidad (Sm, RNP, SS-B...) |
| Periférico | Anti-ADN nativo |
| Placas ecuatoriales | Anti-centrómero |
| Nucleolar | Sugere de esclerodermia sistémica si fluorescencia exclusiva |

Aunque desde hace poco contamos, además, con la posibilidad de un screening por ELISA, lo poco difundido de esta técnica y las mayores carencias respecto a la inmunofluorescencia, la hacen poco atractiva para un uso rutinario de la misma [22].

Caracterización de los anticuerpos anti-nucleares

Si durante el screening se determina frente a qué antígenos reaccionan los ANA y el patrón de fluorescencia de esta reacción, en la etapa de caracterización (**Tabla 3**), los métodos utilizan antígenos purificados (ADN, histonas, antígenos nucleares solubles, etc), o sustratos que contengan exclusivamente al antígeno frente al que reaccionan los ANA detectados (ADN nativo de kinetoplasto de *Crithidia luciliae*), o antígenos obtenidos por ingeniería genética.

Tabla 3.—Anticuerpos antinucleares: utilidad diagnóstica, sensibilidad y especificidad

| Anticuerpos | Interés diagnóstico ^a | Sensibilidad ^b | Especificidad |
|---|--|---|--|
| ANA (screening) | Lupus Eritematoso Sistémico Artritis Reumatoide Polimiositis, Dermatomiositis Síndrome de Sjögren Síndrome de Sharp (EMTC) Esclerodermia sistémica Controles sanos | 95-99% 32-72% 5-74% 13-100% 100% 13-90% 0-31% | No específico |
| Anti-ADN nativo | Lupus Eritematoso Sistémico | 40-98% | Específico |
| Anti-histonas | LES medicamentoso | >90% | No específico |
| Anti-U ₁ -RNP | Síndrome de Sharp | 100% | No específico |
| Anti-Sm | Lupus eritematoso Sistémico | 5-30% | Muy específico |
| Anti-SS-A (o anti-Ro) ^c | Síndrome de Sjögren primario Síndrome de Sjögren secundario Ciertas formas de LES | 40-100% 10-50% | No específico |
| Anti-SS-B (o anti-La) ^c | Síndrome de Sjögren (sobre todo primario) | 20-80% | No específico, pero más específico que los anti-SS-A para el diagnóstico de los SS primarios |
| Anti-Jo-1 (o anti-sintetasa) | Polimiositis complicada con neumonía intersticial | 10-30% | Muy específico |
| Anti-topoisomerasa 1 (o anti-Scl-70) | Esclerodermia sistémica, forma difusa | 15-75% | Muy específico |
| Anti-centrómero | Esclerodermia sistémica (Síndrome CREST) | 20-40% | Específico |

^aLas enfermedades indicadas en esta tabla son aquellas para las cuales la indicación de buscar anticuerpos antinucleares es adecuada. Dicho de otra manera, no hay que buscar éstos si los datos semiológicos no enfocan estas enfermedades.

^bLa sensibilidad de la prueba depende mucho de la técnica utilizada, del nivel de positividad establecido y del tipo de población estudiada (etnia, edad y sexo en particular), lo que explica el amplio margen de porcentajes, por lo que los valores indicados son sólo orientativos.

^cLos antígenos Ro/SS-A y La/SS-B son de distribución nuclear y citoplásmica.

A día de hoy contamos con la posibilidad de realizar una correcta calibración con casi nulas probabilidades de artefactos, gracias a la utilización de anticuerpos controles positivos desarrollados por la OMS y la CDC de Atlanta.

Cada pareja antígeno-anticuerpo tiene un método de caracterización preferente, aunque históricamente han sido varios los métodos utilizados.

- Inmunofluorescencia indirecta en kinetoplasto de *Crithidia luciliae*.
- Test radio-inmunológico en fase líquida de Farr.
- Contra-inmunolectroforesis de Ouchterlony (doble difusión en gel).
- Enzimo-inmunoanálisis (ELISA).
- Dot-blot con antígenos purificados o recombinantes.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, con posibilidad de transferencia a Western-blot.
- Inmunoprecipitación de antígenos radiomarcados (con Azufre 35 para proteínas y Fósforo 32 para ARN) seguida de electroforesis en gel y autorradiografía.

A efectos de la práctica habitual de laboratorio, existe una predilección por la caracterización de los anti-ADN nativos por IFI en *Crithidia luciliae* o por test de Farr, preferentemente por este último al ser más específico detectando anticuerpos de mayor afinidad. Cabe mencionar además que pueden existir discordancias entre los distintos métodos de hasta un 30%, sobre todo si se comparan con ELISA, técnica con la que sólo debieran considerarse los anti-ADN nativo muy positivos y de isotipo IgG.

2.4.3 Valor diagnóstico [1]

Es necesario distinguir entre, por una parte, el valor diagnóstico de los diferentes tipos de anticuerpos antinucleares y, por otra, la incidencia de determinados ANA en una conectivopatía dada. Ninguna de estas dos situaciones es excluyente, puesto que en la primera

se parte de un grupo de sueros que contienen un mismo anticuerpo antinuclear y hay que definir los valores para los que éstos son diagnósticos. Y en la segunda, se estudia una conectivopatía en particular y establece la frecuencia de los diferentes anticuerpos antinucleares en el curso de dicha afección. Por ejemplo, los principales diagnósticos que se plantearían frente a un resultado positivo para un grupo de sueros respecto a los anticuerpos anti-SS-A(Ro) serían el síndrome de Sjögren y el LES, pero también se deben tener en cuenta las conectivopatías indiferenciadas.

Por esta razón, en lo que respecta al significado clínico de los diferentes tipos de ANA y anticuerpos anti-citoplasma, es necesario saber que sólo algunos de estos auto-anticuerpos tienen verdaderamente una fuerte especificidad y por lo tanto se debe tener en cuenta para el diagnóstico de las enfermedades auto-inmunes (**Tabla 3**). Los anti-ADN bicatenario o nativo, o los anti-Sm son específicos del lupus, los anti-SS-B(La) son específicos del síndrome de Sjögren, los anti-centrómero lo son de la variedad CREST de la esclerodermia sistémica, los anti-topoisomerasa 1 son específicos de la esclerodermia difusa, los anti-Jo1 de la polimiositis y los anti-U₁-RNP de la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC). Deben prestarse especial atención también a los títulos elevados de estos ANA o si son positivos en Western-blot ciertas especificidades, como por ejemplo los anticuerpos dirigidos contra la proteína de 70 kDa (en la EMTC).

Los demás anticuerpos son menos específicos, los anti-SS-A(Ro) detectados por inmunodifusión en gel se encuentran presentes en el 35% de los LES, sobre todo cutáneos, en el 65% de los déficits congénitos de complemento, en todos los casos de síndromes de solapamiento y también en casi todos los casos de lupus neonatales con bloqueo auriculo-

ventricular congénito, lo mismo que en los lupus después de los 55 años y en los lupus "seronegativos".

Respecto a los anticuerpos anti-histonas, si bien no son específicos del lupus medicamentoso, se encuentran presentes a título elevado en aquellos casos etiquetados como lupus inducidos, principalmente por fármacos. Y también en el síndrome de Felty y en la artritis juvenil.

Un resultado positivo en el screening no debe interpretarse siempre como indicativo de enfermedad mediada por anticuerpos (**Tabla 1**). Los ANA pueden aparecer también en el curso de infecciones virales (EBV, VHB, VHC, VIH...), bacterianas (endocarditis infecciosa) o por parásitos, asociados a hemopatías (anemias hemolíticas congénitas, linfomas), en las reacciones injerto contra huésped y en ciertos cánceres post-radioterapia.

Ya se ha mencionado que existen variaciones entre laboratorios, principalmente por la técnica utilizada (por ejemplo ELISA es más sensible que Ouchterlony), aunque también pueden observarse cuando se utiliza la misma técnica, dependiendo de la raza (las especificidades frente antígenos solubles son por lo general más frecuentes y ostentan mayores niveles en negros y asiáticos).

Existen estudios [23] que muestran cómo los auto-anticuerpos están elevados en pacientes antes de desarrollarse la clínica y de confirmarse el diagnóstico de una enfermedad autoinmune sistémica. Por ejemplo, madres que al embarazarse, su hijo presenta un bloqueo cardiaco congénito y es entonces cuando se las estudia para el despistaje de Lupus Eritematoso Sistémico o Síndrome de Sjogren. La madre estaba libre de manifestaciones

clínicas, aunque con anticuerpos anti-SSA (Ro) presentes. Años después, la madre puede desarrollar una de las dos enfermedades. Lo mismo ocurre con aquellas mujeres asintomáticas que al quedar embarazadas presentan abortos de repetición y en el estudio se observa la presencia de Anticuerpos antifosfolípido. Estos hechos hacen pensar en la susceptibilidad personal para el desarrollo de una enfermedad autoinmune sistémica, condicionado por la base genética más las agresiones del ambiente.

2.4.4 Valor pronóstico [1]

En una enfermedad auto-inmune ciertos ANA pueden asociarse a un tipo particular de manifestación o expresión clínica, lo que puede significar un mejor o peor pronóstico. Por ejemplo, en el síndrome de Sjögren primario los anti-SS-A(Ro) y anti-SS-B(La) se presentan frecuentemente asociados a manifestaciones extraglandulares del tipo de la vasculitis cutánea, visceral o neurológica. Ante una sospecha de lupus, la ausencia de anticuerpos anti-ADN bicatenario y la presencia de títulos elevados de anti-histonas debe hacer suponer una causa medicamentosa, de mejor pronóstico. Contradictoriamente, con Sulfasalazina, Minociclina y anti-TNF- α , pueden encontrarse anticuerpos anti-ADN nativo, lo que no implica peor pronóstico. La presencia exclusiva de anti-U₁-RNP se observa en los lupus "benignos" sin afectación renal.

Interesa también conocer la cantidad circulante de anticuerpo antinuclear, principalmente de los anticuerpos anti-ADN nativo, que a día de hoy son considerados como el parámetro evolutivo y de seguimiento más fidedigno para el LES. Se señala a la evolución de sus títulos y no al valor elevado aislado de estos anticuerpos, sobre todo con apoyo de los niveles de las fracciones C3 y C4 del complemento, como útil en la predicción del brote. La

persistencia de anti-ADN nativo a títulos elevados en un enfermo lúpico estable, sin cambios en sus valores, no tiene por consiguiente ninguna utilidad para la valoración del riesgo de un nuevo brote.

Está claro que los anticuerpos antinucleares constituyen un elemento analítico esencial en el diagnóstico y pronóstico de las principales enfermedades auto-inmunes no específicas de órgano, encabezando el lupus a todas éstas, pero todo resultado debe interpretarse en el contexto clínico, edad, raza, tratamiento instaurado, etc.

2.5 Diagnóstico [18,24-25]

El lupus puede revestir múltiples presentaciones. Para poder hacer un diagnóstico, se necesita de la historia clínica del paciente, antecedentes familiares y personales, las manifestaciones clínicas en el momento de la evaluación (**Tabla 4**) [18] y el apoyo e información que aportan los datos analíticos. (**Tabla 5**).

En 1982 el Colegio Americano de Reumatología establece los Criterios para el Diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico. Dicho criterios fueron revisado en 1997 (**Tabla 5**).

Tabla 4.- Manifestaciones clínicas del LES

| Manifestaciones | Frecuencia | |
|--|-------------------|------------|
| Sistemáticas | | 95% |
| Fatiga, malestar, fiebre, anorexia, náuseas, pérdida de peso | | |
| Musculoesqueléticas | | 95% |
| Artralgias/mialgias | 95% | |
| Poliartritis no erosiva | 60% | |
| Deformidades en manos | 10% | |
| Miopatía / miositis | 40% / 5% | |
| Necrosis ósea isquémica | 15% | |
| Cutáneas | | 80% |
| Erupción malar | 50% | |
| Erupción discoide | 15% | |
| Fotosensibilidad | 70% | |
| Úlceras bucales | 40% | |
| Otras erupciones: maculopapulosa, urticariana, ampollosa, lupus cutáneo subagudo | 40% | |
| Alopecia | 40% | |
| Vasculitis | 20% | |
| Paniculitis | 5% | |
| Hematológicas | | 85% |
| Anemia (en la enfermedad crónica) | 70% | |
| Anemia hemolítica | 10% | |
| Leucopenia (<4000/mm ³) | 65% | |
| Linfopenia (<1500/mm ³) | 50% | |
| Trombocitopenia (<100 000/mm ³) | 15% | |
| Anticoagulante circulante | 10-20% | |
| Esplenomegalia y/o linfadenopatía | 15-20% | |
| Neurológicas | | 60% |
| Disfunción cognitiva | 50% | |
| Trastorno del estado de ánimo | 40% | |
| Cefaleas | 25% | |
| Convulsiones | 20% | |
| Mono o polineuropatía | 15% | |
| Enfermedad cerebrovascular | 10% | |
| Síndrome desmielinizante | 8% | |
| Estado confusional agudo | 5% | |
| Trastorno del movimiento | 2% | |
| Meningitis aséptica | <1% | |
| Mielopatía | <1% | |
| Otras (neuritis óptica, hemorragia subaracnoidea, pseudotumor cerebral, disfunción hipotalámica) | 5% | |
| Cardiopulmonares | | 60% |

| | | |
|---|-------|------------|
| Pleuresía | 50% | |
| Pericarditis | 30% | |
| Miocarditis | 10% | |
| Endocarditis (Libman-Sachs) | 10% | |
| Insuficiencia valvular | 2% | |
| Coronariopatía | 8% | |
| Derrames pleurales | 30% | |
| Neumonitis lúpica | 10% | |
| Fibrosis intestinal | 5% | |
| Hipertensión pulmonar | <5% | |
| Síndrome de Distress respiratorio del adulto / hemorragia | <5% | |
| Renales | | 50% |
| Proteinuria>0.5 gr/24 horas | 50% | |
| Cilindros celulares | 50% | |
| Síndrome nefrótico | 25% | |
| Insuficiencia renal | 5-10% | |
| Gastrointestinales | | 45% |
| Inespecíficas (anorexia, náuseas, dolor leve, diarrea) | 30% | |
| Vasculitis con hemorragia o perforación | 5% | |
| Ascitis | <5% | |
| Alteración de las enzimas hepáticas | 40% | |
| Trombosis | | 15% |
| Venosa | 10% | |
| Arterial | 5% | |
| Abortos | | 30% |
| Oculares | | 15% |
| Vasculitis retiniana | 5% | |
| Conjuntivitis / epiescleritis | 10% | |
| Síndrome seco | 15% | |

Tabla 5.—Criterios diagnósticos del LES de 1982, actualizados en 1997

| | |
|---------------------------------------|--|
| 1.- Eritema malar | Eritema fijo, plano o elevado sobre los pómulos |
| 2.- Eritema discoide | Placas elevadas de eritema con descamación queratósica adherente y taponamiento folicular, a veces se observan cicatrices atróficas |
| 3.- Fotosensibilidad | La exposición a la luz UVA causa erupción cutánea |
| 4.- Úlceras bucales | Úlceras bucales y nasofaríngeas observadas por el médico |
| 5.- Artritis | Artritis no erosiva con afectación de dos o más articulaciones periféricas, que se caracteriza por dolor, tumefacción o derrame |
| 6.- Serositis | Pleuritis o pericarditis confirmadas mediante ECG, roce o signos de derrame pericárdico |
| 7.- Enfermedad renal | Proteinuria mayor de 0.5 gr/24 horas o de 3+ o cilindros celulares o hemáticos en sedimento |
| 8.- Enfermedad neurológica | Convulsiones sin ninguna otra causa o psicosis sin ninguna otra causa conocida |
| 9.- Enfermedad hemotológica | Anemia hemolítica o leucopenia (menos de 4000/mm ³), linfopenia (menos de 1500/mm ³), o trombocitopenia (menos de 100000/mm ³), después de descartar daño iatrogénico por medicamentos |
| 10.- Trastornos inmunitarios | Anti-ADN nativo, anti-Sm, anti-fosfolípido o cualquier combinación de ellos |
| 11.- Anticuerpos antinucleares | Título anormal de ANA mediante IFI o técnica equivalente en cualquier momento, después de descartar daño por medicamentos que inducen ANA |

Para decir que una persona tiene LES se requiere que reúna 4 ó más de estos 11 criterios en serie o simultáneamente, durante cualquiera de los periodos de observación.

El LES es una enfermedad de gran polimorfismo clínico, evolucionando típicamente por periodos de brote, a los que siguen otros de remisión, que dejan usualmente lesiones (secuelas) que con el tiempo se van haciendo cada vez más abundantes.

De manera general, opuestas a las formas benignas cutáneo-articulares, la afectación visceral y sobre todo renal, marcan una diferencia en cuanto al pronóstico de una enfermedad que al momento del diagnóstico puede ser incierto. Sin embargo, los síntomas constitucionales, las lesiones dérmicas y músculo-esqueléticas son los más frecuentes.

La presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (AFL) ocurre en el 40% de los lupus de reciente diagnóstico. Por lo general se trata de anticoagulante lúpico o de anticuerpos anti-cardiolipina, siendo un VDRL positivo con un TPHA negativo lo que habitualmente incita a su búsqueda. Un Síndrome de anti-fosfolípidos (SAFL) puede definir un lupus severo.

"*The Systemic Lupus International Collaborating Clinics*" (SLICC) es un grupo internacional dedicado a la investigación en la clínica del LES. Este grupo produce herramientas que forman la base de los estudios en relación con LES, igual que la escala de daño SLICC/ACR/ID. En 2012 publicaron una revisión en relación con los criterios de clasificación de LES [26], con el objetivo de mejorar las limitaciones de los criterios elaborados en 1982.

Se evalúan 18 criterios asociados con el diagnóstico de LES. Están divididos en dos grupos: criterios clínicos e inmunológicos. No es preciso que los criterios se presenten simultáneamente, y el paciente debe presentar por lo menos 4 criterios, incluyendo al menos un criterio clínico y un criterio inmunológico. El diagnóstico de LES se establece si el paciente tiene una biopsia renal para el diagnóstico de nefritis lúpica en la presencia de anticuerpos antinucleares o anti-DNAs, sin necesidad de presentar más criterios (**tabla 6**).

En ocasiones, la diferenciación de otras enfermedades auto-inmunes sistémicas se complica por la existencia en un mismo paciente con varias de ellas. Algunas manifestaciones clínicas del LES son comunes o pueden aparecer en otras entidades clínicas, lo que puede dificultar de forma importante el diagnóstico de esta enfermedad. Otro hecho que dificulta el proceso diagnóstico es la progresión a lo largo del tiempo de una entidad a otra. Actualmente

existen casos descritos de pacientes con SAFL que a lo largo de los años desarrollan manifestación clínicas y serológicas de LES.

Tabla 6.—Criterios diagnósticos del LES, "The Systemic Lupus International Collaborating Clinics" 2012.

| Criterios Clínicos | |
|--|--|
| 1.-Lupus cutáneo agudo* | Eritema malar, lupus buloso, eritema maculo-papilar, Eritema lúpico fotosensible (en ausencia de dermatomiositis), lesiones lúpicas subagudas |
| 2.- Lupus cutáneo crónico* | Clásico eritema discoide (localizado, generalizado), hipertroficadas, paniculitis, ... |
| 3.- Úlceras orales* | Paladar, cavidad oral, lengua y úlceras nasales |
| 4.-Alopecia* | Cuero cabelludo fino y frágil, |
| 5.-Sinovitis* | Afectadas dos o más articulaciones, con inflamación y flogosis o rigidez matutina de 30 minutos o más |
| 6.- Serositis* | Derrame pleural, roce pleural de más de un día, dolor torácico de más de un día en relación con derrame pericárdico, roce y alteraciones en el ECG |
| 7.- Renal* | Proteinuria ≥ 0.5 gr/24 h o cilindros hemáticos |
| 8.- Neurológica* | Convulsiones, pscosis, mononeuritis múltiple, mielitis, neuropatía central o periférica, estado confusional agudo |
| 9.- Anemia hemolítica* | |
| 10.-Leucopenia* | < 4000/mm ³ , al menos una vez |
| Linfopenia* | < 1000/mm ³ , al menos una vez |
| 11.- Trombocitopenia* | < 100.000/mm ³ , al menos una vez |
| Criterios Inmunológicos | |
| 1.- ANA | nivel por encima del rango de referencia de laboratorio |
| 2.- Anticuerpos anti-dsDNA | nivel por encima del rango de referencia de laboratorio o mayor de 2 veces el rango de referencia en caso de determinación con ELISA |
| 3.-Anticuerpos Anti-Sm | |
| 4.-Ac antifosfolípido positivos | Anticoagulante lúpico. Título medio alto de Ac anticardiolipina (IgA, IgG o IgM) o Ac anti- β 2glicoproteína 1 (IgA, IgG o IgM) |
| 5.- Complemento bajo | C3, C4 o CH50 |
| 6.- Test de Coombs directo positivo | En ausencia de Anemia Hemolítica |

*en ausencia de otras causas de enfermedad primaria

La correcta identificación e interpretación de las manifestaciones clínicas que constituyen los criterios diagnósticos aceptados hoy en día es un desafío, sobre todo para los clínicos no especializados o con poca experiencia. Por ejemplo, el *eritema en vespertilio* resulta en ocasiones difícil de diferenciar de otras afecciones cutáneas como la rosácea o las telangiectasias faciales. El compromiso neurológico pone también dificultades a un correcto diagnóstico de LES, a pesar del consenso que existe para definir correctamente las manifestaciones neurológicas y psiquiátricas de esta enfermedad.

En lo que respecta a la afectación renal, la presencia de cilindros en el sedimento urinario, requisito de la ACR para la clasificación del LES, puede no ser objetivable en todos los casos, mientras que sí lo es la microhematuria y/o proteinuria.

Otro problema en el proceso diagnóstico del LES viene dado por la diferente presentación clínica en subgrupos específicos de pacientes según la edad o el sexo de los enfermos afectados en el debut. Numerosos estudios han demostrado una mayor prevalencia del sexo masculino en pacientes con LES de debut por encima de los 50 años. Este hecho apoyaría el papel de las hormonas femeninas en la etiopatogenia de esta entidad. Además, en este grupo de edad, las manifestaciones clínicas suelen aparecer de forma insidiosa o atípica, con menor prevalencia del eritema malar, la artritis y la afectación renal. Otro grupo de pacientes con características diferenciales es el formado por aquellos en los que la enfermedad debuta en la infancia. Los estudios sitúan el límite en los 14 ó 16 años, no siendo las manifestaciones clínicas por sexos muy diferente, pero siendo frecuente la afectación renal, la fiebre y las poliadenopatías como forma inicial de presentación, mientras que durante la evolución aparecen el eritema malar y la corea.

En cuanto al sexo, la presentación de la enfermedad en varones se ha asociado a una frecuencia menor de artritis como manifestación inicial y, contrariamente, son más frecuentes la serositis y las lesiones de lupus discoide. Además, la presencia de proteinuria, leucopenia, linfopenia y trombocitosis es aproximadamente tres veces más frecuente en varones.

Un último aspecto a tener en cuenta es el hecho de que numerosos fármacos pueden inducir lupus, que puede aparecer después del tratamiento prolongado (meses o años) con un determinado fármaco. En el diagnóstico diferencial es útil el hecho de la práctica ausencia en estos enfermos de anticuerpos anti-ADN nativo, o de aquellos dirigidos frente a antígenos nucleares solubles, mientras que la mayoría presentan anticuerpos anti-histonas.

En el LES, la presencia de anticuerpos antinucleares es casi constante y confirma la sospecha clínica de esta enfermedad. Sin embargo, los títulos elevados de los anti-ADN nativo y anti-Sm apartarán las posibilidades de un lupus inducido y harán más probable el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico.

Hecho el diagnóstico de LES, es importante identificar los periodos de exacerbación de la enfermedad. Para esto, la información que aportan los demás datos analíticos no es despreciable, fundamentalmente los marcadores inflamatorios (VSG, proteína-C reactiva, fibrinógeno, γ -globulinas, factor reumatoide, etc) los cuales suelen aumentar durante los brotes. Ciertos datos, además, pueden caracterizar ciertas situaciones susceptibles de aparecer durante la evolución de todo lupus, como la leucopenia asociada a neutropenia y/o linfopenia, lo que puede sugerir un síndrome de Evans si además aparece asociada una trombopenia, aunque esta leucopenia es por lo general inflamatoria. La presencia de anemia aparece

también en la mitad de los casos, pudiendo ser inflamatoria, o de causa hemolítica si un test de Coombs resultase positivo (5%).

2.6 Evaluación pronóstica [27]

Una vez hecho el diagnóstico de LES, el siguiente paso es definir el pronóstico. Es decir, hay que conocer la cadencia de la afectación orgánica y la repercusión esperable en la supervivencia del paciente.

Pero el ritmo de la afectación de órganos vitales puede no depender del estado de inflamación subyacente. Por lo tanto, "riesgo de brote" no debe entenderse como "grado de actividad", aunque esta analogía se haga habitualmente.

Debe saberse además que la posibilidad de presentar un brote marca de manera importante el pronóstico de un lupus que permanecía "quiescente" hasta el momento mismo de la "exacerbación".

Es importante definir lo que entendemos por actividad clínica y brote, para una adecuada planificación del tratamiento. Actividad clínica y brote son dos conceptos relacionables pero no superponibles [28]. Conceptualmente, se entiende por actividad un escenario clínico en el que la enfermedad no está adecuadamente controlada, lo que se traduce en diferentes manifestaciones clínicas y/o analíticas. Por su parte, brote se refiere a la reaparición de actividad clínica, en un momento concreto, en un paciente previamente controlado. Se trata de un incremento medible de actividad en uno o más órganos con

empeoramiento o aparición de nuevos signos y síntomas, y/o anomalías en los parámetros de laboratorio. Se entiende que es un cambio clínico o biológico, potencialmente reversible que lleva a considerar un incremento en el tratamiento. Por tanto, actividad es un concepto de carácter más estático, en cuanto que es algo que está persistiendo de forma más o menos continuada en el tiempo, mientras que brote tiene un carácter más dinámico, ya que es un cambio que se produce en un momento concreto.

Aunque el concepto de actividad nos informa de la situación clínica del paciente, es necesario además realizar una categorización de una forma objetiva. Ésto es más complicado y se ha realizado siempre de forma arbitraria. Para ello, se han utilizado definiciones basadas en los distintos índices de actividad que se describirán a continuación. Lo más utilizados han sido la escala de SLEDAI (del inglés "*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*") y BILAG (del inglés "*British Isles Lupus Assessment Group Index*").

El aporte de la clínica es en este sentido fundamental. La aparición de nuevos signos o síntomas en relación con la afectación de un nuevo órgano u órganos es probablemente lo más sensible para hablar de brote. Sin embargo, es importante estar siempre alerta a la aparición de nuevas alteraciones en la analítica, en lo concerniente, sobre todo, a la modificación de los parámetros inflamatorios y de los datos de función del órgano que sospechamos que se encuentra afectado "de novo". Cabe destacar que la presencia de una afectación importante de un órgano no implica necesariamente la presencia de más inflamación. Por ejemplo, la existencia de proteinuria y/o de un Filtrado Glomerular (FG) disminuido pueden ser consecuencia tanto de la inflamación activa como de las cicatrices glomerulares, testigos de la lesión crónica a ese nivel. La habilidad para diferenciar entre una situación u otra es extremadamente importante ya que de ello depende la puesta en marcha de un tratamiento inmunosupresor adecuado.

La presencia de títulos altos de anti-ADN bicatenario y bajos niveles de complemento no significa en todos los casos que exista brote, no distingue entre actividad o infección, ni tampoco sirve para determinar qué órgano se encuentra afectado. Interesa por lo tanto el patrón evolutivo de los valores de los mismos, aunque la clínica será la que confirme finalmente la sospecha de un empeoramiento y no el conjunto de datos de laboratorio anormales.

Respecto a la periodicidad del seguimiento, no existe una frecuencia establecida ni para las visitas en consulta ni para el control de los parámetros de laboratorio. Es recomendable en todos los casos individualizar. Frecuentemente, la afectación de un órgano vital dicta la pauta de los controles a seguir y las pruebas a solicitar, diferentes de las inmunológicas. Por ejemplo, en los pacientes lúpicos con antecedentes de afectación renal es obligado solicitar en cada revisión el cálculo del FG y la determinación de la proteinuria de 24 horas.

Desde los años 80 existen multitud de estrategias que intentan conjugar datos clínicos y analíticos con fines pronósticos. Las primeras iniciativas, fundamentadas la mayoría sólo en la búsqueda de actividad de la enfermedad, priorizaron el desarrollo de "*scores*" clínico-analíticos, que no han dejado de perfeccionarse y que actualmente son de uso universal. Hoy en día se recomienda el empleo de un mínimo de dos "*scores*" diferentes. Si fuera posible uno de ellos ha de ser capaz de medir daño, para la apreciación correcta del grado de actividad y en consecuencia del pronóstico de la enfermedad. La medición del impacto sobre la calidad de vida forma también parte de las recomendaciones en términos de evaluación pronóstica.

No obstante, el empleo de biomarcadores ha representado un gran avance. El seguimiento del estatus inmunológico de estos pacientes tiene mucho que aportar a la predicción del brote. Modificaciones evolutivas en los niveles de estas moléculas que son el reflejo de los cambios en la intensidad de la respuesta inflamatoria frente a los auto-antígenos, llegarían incluso a alertar de la llegada de un nuevo brote antes de que se produzca el mismo. Multitud de moléculas se presentan como candidatas a convertirse en el biomarcador ideal del lupus. Pero la definición del pronóstico a largo plazo solo podrá efectuarse con la ayuda de marcadores poco o nada invasivos, utilizables en la práctica clínica habitual (confrontación con scores de riesgo) y, sobre todo, validados de manera adecuada por estudios prospectivos.

2.6.1 "Scores" de actividad

"Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)" [29-31]

Creado en 1992, este "score" (**Anexo 1**) permite realizar una evaluación global de la actividad de la enfermedad con las manifestaciones de 9 órganos en 24 ítems. El peso atribuido a cada uno de estos ítems se ha determinado por análisis de regresión multivariante a partir de datos obtenidos de los enfermos. Cada uno de estos ítems se responde con un sí o un no, para obtener una puntuación que va de cero a 105. Se tienen en cuenta las manifestaciones descritas el día de la consulta o bien aquellas presentes en los diez días que precedieron a la misma.

Un equipo canadiense [31] realizó un estudio longitudinal en 41 pacientes, en diferentes grados de actividad de la enfermedad. Compararon los resultados obtenidos cuando se aplicaba la escala SLEDAI-2K para el periodo de los diez días previos a la consulta y por

otro lado cuando se preguntaba por información clínica de los treinta días previos a la consulta. Dicha escala se aplicó de forma mensual durante un año de seguimiento. Los resultados obtenidos confirman que la escala SLEDAI-2K puede ser utilizada en la práctica clínica y en los estudios clínicos para describir la actividad de la enfermedad en los 30 días previos a la consulta.

Este "score" aporta la ventaja de un uso cómodo a la hora de decidir cambios en el tratamiento y para aumentar la frecuencia del ritmo de revisiones de los pacientes, pudiendo emplearse conjuntamente con otras escalas, sobre todo si se intenta descartar el brote (**Tabla 7**).

En 2002, hace su aparición SLEDAI 2000 (SLEDAI-2K), la primera versión corregida del original. Apareció posteriormente SELENA-SLEDAI en 2004, con nuevas modificaciones. No obstante, son realmente pocas las diferencias entre estas tres versiones de SLEDAI, poseyendo todas un mismo grado de recomendación para su uso en el seguimiento de los pacientes.

"British Isles Lupus Assessment Group Index (BILAG)" [32-34]

Presentado en 1988, se construyó en base a la opinión de expertos.

BILAG (**Anexo 2**) evalúa la actividad lúpica órgano por órgano (signos generales, muco-cutáneos, neurológicos, músculo-esqueléticos, aparato cardiovascular y respiratorio, vasculitis, renal, y hematológico) en ítems que se responden con: mejoría, igual, peor, nuevo.

Se utiliza con la sola intención de tratar como fin último. Se prefiere para la detección de los brotes (especificidad del 87% y sensibilidad del 99%).

Desde 2004 contamos con una nueva versión del BILAG original aunque ambas se usan indistintamente. BILAG es complementario, junto a cualquiera de las tres versiones de SLEDAI, en la evaluación pronóstica del paciente lúpico (**Tabla 7**). No obstante, el rendimiento de su empleo con escalas de actividad, que no sea SLEDAI, se encuentra pendiente de confirmar.

Otras escalas de actividad [35]

Cabe mencionar la escala LAI (en inglés, "*University of California, San Francisco/Johns Hopkins Lupus Activity Index*"), que en cinco ítems recoge sólo las manifestaciones atribuibles a LES activo durante las dos semanas previas a la visita. Destacando por su capacidad para otorgar un mayor peso a la afectación de órganos vitales como el riñón o el pulmón.

La escala SLAM (en inglés, "*Systemic Lupus Activity Measure*"), utiliza las manifestaciones de la enfermedad que se recogen en la literatura, a condición que correspondan a aquellas que fueron redefinidas en 1983 por miembros de la ARA Council on SLE. Se evalúa 24 manifestaciones clínicas y 8 parámetros de laboratorio diferentes de los inmunológicos que ocurren más frecuentemente y son susceptibles de ser medidos.

Por último, la escala ECLAM (en inglés, "*European Consensus Lupus Activity*") que recoge por análisis estadístico uni y multivariante los datos clínicos y de laboratorio que

mejor se correlacionan con la valoración global de la actividad de la enfermedad en pacientes europeos.

Tabla 7.—BILAG versus SLEDAI, fortalezas y debilidades

| BILAG | SLEDAI |
|--|--|
| Fortalezas | Debilidades |
| Puede detectar la mejoría o empeoramiento órgano por órgano | No permite un análisis preciso órgano por órgano (dos pacientes con un mismo score pueden tener afectaciones de órganos diferentes). |
| Adaptado a la detección de brotes | Menos sensible en la detección de brotes |
| Debilidades | Fortalezas |
| No debiera usarse solo por sus dificultades en detectar la mejora parcial | De fácil utilización y adaptada a los cambios en el tiempo |
| Complejidad | Fácil de realizar |
| Limitado a la sola intención de tratar, con una validez limitada al progreso de los tratamientos | La evaluación es global |
| Basada en la opinión de expertos | Desarrollado en base a los datos de los enfermos (análisis de regresión multivariante) |

2.6.2 Escala de daño: "Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SLICC/ACR/DI)" [36]

En el paciente lúpico, también es importante conocer los cambios irreversibles (secuelas) y clínicamente relevantes, no relacionados con la inflamación activa, atribuibles al LES, a los tratamientos empleados o a las complicaciones asociadas. Ésto nos permitirá un ajuste más exquisito del tratamiento, con la doble finalidad de mantener inactiva la enfermedad y limitar la toxicidad de las diferentes drogas utilizadas.

La escala de daño SLICC/ACR/DI fue creada en 1996 y es el único índice de lesión que se ha mostrado reproducible por diferentes equipos en múltiples poblaciones. Cabe mencionar que en la aplicación del mismo, de entre todas las secuelas, quizás sea la afectación renal la que presente el valor predictivo más elevado, por lo que los enfermos con dicha afectación se considerarán siempre gravemente afectados en este "*score*", más que otro enfermo con cualquier otra afectación catalogada como severa.

Destacar las limitaciones que se citan a continuación, comunes para todas las escalas de actividad. Se debe tener en cuenta que se precisa cierto grado de entrenamiento por parte del facultativo que realiza el interrogatorio, para una correcta valoración de la clínica y la exploración física. Por otra parte, los "*scores*" hacen una valoración del momento actual e incluso en lo sucedido en los 30 días anteriores. La situación clínica, en cuanto a la intensidad del síntoma, puede variar en el tiempo y no ser bien interpretada por el entrevistador, por lo que no se discrimina el peso de la actividad. Por otra parte se encuentra el sesgo ocasionado por la susceptibilidad de cada paciente a padecer un síntoma determinado, por ejemplo, la cefalea que se manifiesta con distinta intensidad e influye en la calidad de vida del paciente de forma diferente. Así como los parámetros de laboratorio (trombocitopenia o leucopenia) acotado su límite superior de normalidad en las escalas, pero luego no se cuantifica la gravedad de la situación (mayor o menor número de plaquetas o leucocitos) dentro de este nivel superior establecido.

2.7 Biomarcadores de lupus activo

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*"The US National Institutes of Health (NIH)"*), define el término biomarcador [37] como una característica que se mide y evalúa como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas objetivables. Los biomarcadores son usados como herramientas en el diagnóstico de enfermedades, detección precoz, establecimiento del estadio, pronóstico o predicción de respuesta al tratamiento. Pueden guiar en la individualización del tratamiento y mejorar la atención al paciente. Además, los biomarcadores pueden ser útiles en el diseño, la seguridad y eficacia y en explicar los resultados de estudios clínicos.

El desarrollo de estrategias de inmuno-vigilancia para el LES, basadas en el seguimiento de los niveles de los mediadores producidos por la reacción inflamatoria que pueden usarse como biomarcadores (citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento), constituye un objetivo a alcanzar. A este respecto, el aporte de la clínica, con un papel importante de las escalas pronósticas, es indispensable. El fin último es la detección de actividad de la enfermedad y la prevención del brote, en definitiva, la mejoría del pronóstico. No obstante, el conocimiento de la dinámica de los niveles de cada uno de estos mediadores y la sensibilidad y especificidad de los mismos, es muy importante. Como en otros contextos [38] un biomarcador pronóstico de actividad lúpica debe cumplir con las siguientes características: una detección inocua (en sangre, en orina, en saliva, etc), y la posibilidad de ser reproducible en amplias poblaciones (distintas razas, ambos sexos y cualquier edad).

Existen multitud de publicaciones que indagan sobre la molécula o moléculas que reúnan todas las condiciones necesarias para ser consideradas como biomarcador(es) ideal(es) de lupus activo (IL-1 β , IL2R, IL-6, IL-10...) [35, 36]. Fisiopatológicamente, no puede descartarse a ninguna de ellas.

En los últimos tiempos, los biomarcadores urinarios han mostrado su utilidad en la detección de pacientes con nefritis lúpica [39]. La fácil obtención de las muestras de orina para determinar los biomarcadores la hacen muy atractiva. Se han estudiado diferentes tipos de moléculas: las citoquinas, las quimiocinas y sus receptores, las lipocalinas, los factores de transcripción, las moléculas de adhesión, las enzimas, las glicoproteínas, los receptores de integrinas o factores del complemento sérico.

Tabla 8.- Biomarcadores en orina que han demostrado su utilidad en el diagnóstico y buena respuesta al tratamiento de la NL.

| Biomarcadores de utilidad | | | |
|---|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| | Despistaje | Diagnóstico | Respuesta al tratamiento |
| MCP-1 | + | +++ | Sí |
| M-CSF | + | + | Sí |
| TGF- β | - | ++ | Sí |
| VCAM-1 | | ++ | Sí |
| Adiponectina | + | + | Sí |
| NGAL | | ++ | Sí |
| T-bet | | + | Sí |
| Biomarcadores de escasa utilidad | | | |
| IL-2, IL-4, IL-6, IL-8. GATA-3 | | | |

MCP-1: proteína quimiotáctica de macrófagos, M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos, TGF- β : Factor β de crecimiento y transformación celular. VCAM-1: Molécula celular de adhesión vascular, NGAL: Lipocalina asociada a la gelatinasa de los neutrófilos. T-bet y GATA-3: Factores de transcripción celular.

Entre todas ellas, destacan las citocinas y quimiocinas, por su importante papel en la fisiopatología del daño renal en la NL. Por el contrario, algunas sustancias no han demostrado su utilidad como biomarcadores en orina de la NL (**Tabla 8**) y muchas más han sido poco estudiadas, por ejemplo la TWEAK, una citocina de la superfamilia TNF, IP-10 o proteína inducible por interferón gamma, MIP-1 o proteína 1 inflamatoria de los macrófagos o RANTES, ..., y así hasta un total de 20 proteínas de al menos 50 ligandos.

2.7.1 "Chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2)/Monocyte Chemotactic protein-1 (MCP-1)" [40-49]

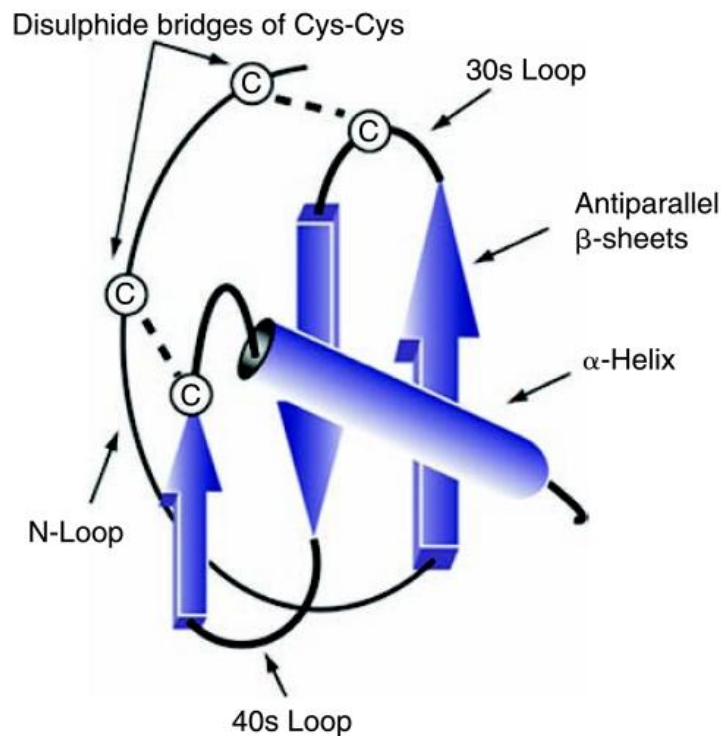
Esta molécula constituye de momento, el primer candidato "formal" a biomarcador del lupus activo. Se trata de una citoquina del tipo de las quimiocinas (citoquinas quimioatrayentes), una gran familia de péptidos constituidos por no más de 60-100 aminoácidos, que fijan heparina, y que conforman cuatro subfamilias diferentes en base al número y localización de los residuos de cisteína N-terminales: C, CC, CXC y CX₃C

La estructura de las quimiocinas (**Figura 2**) comprende tres dominios: 1) N-terminal, muy flexible, albergando dos residuos de cisteína cerrados por un puente disulfuro que establecen con otras dos cisteínas en el centro de la molécula una y próxima al extremo C-terminal la otra, y que es el responsable de la interacción con el receptor correspondiente; 2) un bucle largo que conduce a tres hojas plegadas beta anti-paralelas, y 3) una alfa-hélice por delante del dominio de hojas plegadas beta.

A grandes rasgos, deben diferenciarse las quimiocinas C, con un solo puente disulfuro, del resto de quimiocinas que poseen cuatro residuos de cisteína y por lo tanto dos puentes

disulfuro. MCP-1 es una quimiocina CC (β -quimiocinas) con dos puentes disulfuro pero sin aminoácidos separando las cisteínas N-terminales.

Figura 2.—Representación esquemática de la estructura tridimensional de las quimiocinas

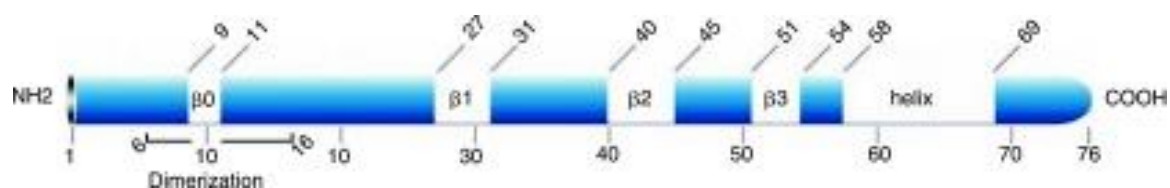


Todas las quimiocinas comparten una estructura en "llave griega" típica que se estabiliza por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. **Deshmane SL et al, 2007**

MCP-1 fue la primera quimiocina en descubrirse, y a día de hoy la que cuenta con más estudios. Su gen se encuentra localizado en el cromosoma 17 (Chr 17, q 11-2). La molécula la componen 76 aminoácidos, con un peso total de 13 kDa. Su estructura tridimensional presenta una homología de hasta el 60-70% con otros miembros de la familia de las quimiocinas CC, aunque consta de cuatro hojas plegadas beta en vez de tres y una interface de dimerización de los residuos 6 a 16 que es característico de esta molécula (**Figura 3**).

Las quimiocinas tienen por función la regulación del tráfico celular y son secretadas en respuesta a señales pro-inflamatorias dependientes de otras citoquinas. MCP-1 es producida por células endoteliales, macrófagos, monocitos y fibroblastos en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento y estrés oxidativo. Realiza su acción quimioatrayente primordialmente sobre los monocitos y linfocitos por gradiente de concentración, es decir, mediante el reclutamiento de estas células hacia los sitios donde ésta se produce, tras unirse a su respectivo receptor, CCR2, que acopla una proteína G para la consecución de la quimiotaxis celular y la propagación de su efecto pro-inflamatorio. Así, esta quimiocina regula la migración de monocitos y la formación de infiltrados de monocito/macrófagos, linfocitos T memoria y células Natural Killer (NK). Estos hechos confirman el papel importante que juega en la patogénesis de la sinovitis de la artritis reumatoide, su participación en la progresión de la aterosclerosis y la complicación de las placas de ateroma, su capacidad para inducir insulinoresistencia y su responsabilidad en la activación de la microglía tras la migración de monocitos circulantes hacia el neuro-eje con depósito de sustancia β -amiloide y daño neuronal directo (**Tabla 9**). Resulta sorprendente el nexo que existe entre esta molécula y las enfermedades neurológicas, como el caso de la enfermedad de Alzheimer, y en las infecciones por virus neurotrópicos como el VIH, con un peor pronóstico sobre todo en niños. Impresiona además, sus nexos con la carcinogénesis, básicamente por la estimulación de la secreción de VEGF.

Figura 3.—Estructura de MCP-1



La molécula contiene cuatro hojas plegadas beta en vez de tres, una de éstas contenida en la interface de dimerización que caracteriza a esta quimiocina CC en particular. **Deshmane SL et al, 2007**

MCP-1 es responsable de la polarización T helper-2, que aporta aún más argumentos para explicar la progresión y peor pronóstico de las infecciones por virus neurotropos, y de los cuadros agresivos en ciertas infecciones por gérmenes intra-celulares (tuberculosis, brucelosis, etc), que se combaten fundamentalmente por medio de una respuesta T helper-1. La responsabilidad de esta quimiocina de un desbalance Th1/Th2 podría hacer sospechar su vinculación con ciertas enfermedades auto-inmunes como el LES, donde prima característicamente una respuesta humoral. En la literatura, sin embargo, de manera inconstante se han podido relacionar los títulos elevados en sangre con la actividad de la enfermedad, sobre todo a nivel renal, lo que plantea dudas por la relación descrita y ya conocida con la afectación renal por otras causas (inmunológicas y no inmunológicas).

Se han identificado mutaciones, principalmente de deleciones, que afectan los dominios N-terminal y de hojas plegadas beta, asociados a decrementos en su función. Existen polimorfismos, aunque menos frecuentemente, en la base de ciertos casos de tuberculosis muy agresivas (genotipos AG, GG y AA), relacionados con un aumento del grosor íntima-media en casos de aterosclerosis generalizada infantil (alelos G-927C y A-2578G), y asociados a la afectación neurológica agresiva por el VIH (homocigotos para el alelo 2578G).

Tabla 9.—Enfermedades asociadas a MCP-1 y su probable mecanismo

| Efecto | Probable mecanismo |
|--|---|
| Formación de trombos (infarto de miocardio) | Generación de factor tisular |
| Tuberculosis | Bajos niveles de IL-2 |
| Endometriosis | Apoptosis de linfocitos T |
| Abortos recurrentes | Efectos de IL-1 β |
| Neotropismo viral | Incremento de los infiltrados de linfocitos T |
| Esclerosis múltiple | Daño axonal directo de MCP-1 |
| Alteración de la nocicepción en la Esclerosis Múltiple progresiva secundaria | Despolarización dependiente de MCP-1 |
| Complicación neurológica del VIH | Consecuencia de MCP-1 y de otras citoquinas como TNF α e IL-1 β , con activación de la microglía |
| Retinopatía de la oxígeno terapia | Activación de la microglía |
| Desórdenes cognitivos asociados al VIH | Efecto directo de MCP-1 y de otras citoquinas pro-inflamatorias |
| Neovascularización tumoral | MCP-1 procedente de infiltrados de monocito/macrófagos |
| Desensibilización a opioides y cannabinoides | Comunicación intracelular e interacción entre sistemas de neurotransmisores dependientes de quimioquinas |
| Nefropatía | Fosforilación de p38 MAPK |
| Enfermedad inflamatoria intestinal | Diferenciación de macrófagos intestinales mediada por MCP-1 |
| Asma alérgica | Secreción de IL-4 e IL-13 por el epitelio bronquial mediada por MCP-1 |
| Insulinorresistencia | Mediada por MCP-1, TNF α e IL-6 |
| Artritis reumatoide | Incremento de los niveles de MCP-1 antes de la sinovitis |
| Muerte neuronal isquémica | Producción astrocitaria de MCP-1 y de otras quimioquinas |
| Injuria neuronal excitotóxica (NMDA) | Producción astrocitaria de MCP-1 |

2.7.2 Otros candidatos a biomarcador de lupus activo

A continuación, se detallan de forma no exhaustiva un ejemplo de 27 moléculas candidatas a biomarcador de actividad del LES.

Antagonista de receptores de IL-1 [50]

La interleuquina-1 es una citoquina clave de la respuesta inflamatoria. Se encuentra codificada en el cromosoma 2. Cualquier célula puede producirla, pero es liberada principalmente por macrófagos activados, monocitos y células dendríticas en respuesta a TNF- α .

La proteína antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) impide la unión de IL-1 α y β a sus respectivos receptores, por lo que se ha postulado la posibilidad de su empleo como anti-inflamatorio y en el tratamiento de ciertos tumores que crecerían más lentamente bajo su efecto.

Interleuquina 9

Con un peso molecular de 14 kDa, es secretada principalmente por células T CD4⁺ activadas, habiéndose observado in vitro que promueve el crecimiento de mastocitos. También es capaz de co-estimular a las células T junto con IL-2 o IL-4, y facilitar la salida de progenitores hematopoyéticos.

Estudios genéticos en ratones han demostrado que es un factor determinante en la hiperrespuesta bronquial en el asma [51].

Interleuquina 15 [52]

Se trata de un citoquina mediadora del crecimiento de las células T CD8⁺ de memoria y de la proliferación de células Natural Killer.

Eotaxina

La Eotaxina o CCL11 es una citoquina quimiotáctica de eosinófilos, que pertenece a la familia de las quimiocinas CC. Presenta un peso molecular comprendido entre 6 y 16 kDa. Teóricamente sólo tendría un efecto quimioatractivo sobre los eosinófilos, por lo que no debiera mostrar efecto atrayente alguno sobre los neutrófilos ni sobre otras células. Sin embargo los estudios se contradicen respecto a ésto último y parece que podría participar en otros tipos de respuesta diferentes de la alérgica.

La Eotaxina juega un papel importante en el asma, así como en enfermedades caracterizadas por presentar un componente inflamatorio en el que participan activamente los eosinófilos, como por ejemplo en la rinitis o el eccema alérgico.

Sin embargo, el receptor de Eotaxina no es específico de la misma, por lo que puede unirse por ejemplo a MIP-1 α , RANTES u otras quimiocinas que a su vez no necesariamente tendrían que ser atrayentes de eosinófilos [53].

Factor básico de crecimiento de fibroblastos [52]

Los factores de crecimiento de fibroblastos conforman una familia de 20 miembros. El factor básico de crecimiento de fibroblastos, junto a los factores ácidos son los mejor caracterizados. Transducen señales de crecimiento a través de receptores con actividad tirosina kinasa, contribuyendo a las respuestas de cicatrización, con un gran vínculo con la angiogénesis.

Proteína-10 inducida por IFN- γ [54]

IP-10 (en inglés, "*Interferon gamma-induced protein-10*") o CXCL10 es una quimiocina CXC (quimiocinas γ), una pequeña proteína de 9 kDa, cuyo gen se localiza en el cromosoma 4. Es secretada por monocitos, células endoteliales y fibroblastos en respuesta a IFN- γ . Se han descrito para esta quimiocina una actividad antitumoral, anti-angiogénica [55], e inhibidora de la producción de factores estimulantes de colonias.

Observaciones clínicas asocian a esta quimiocina con la infección crónica por el virus de la hepatitis C genotipos 1 y 4, y con una mediocre respuesta a la terapia antiviral con IFN- α pegilado y ribavirina [56,57]. Una reciente comunicación propone inclusive su utilización como biomarcador de lupus activo [58].

Proteína inflamatoria de los macrófagos de tipo-1 α

La MIP-1 α o proteína inflamatoria de los macrófagos de tipo-1 α es una β -quimiocina (CCL3), atrayente de macrófagos, aunque también se le atribuyen efectos quimiotácticos y

proadhesivos sobre otros tipos celulares. Presenta funciones moduladoras en la producción de citoquinas (IL-1 e IL-6, principalmente) y es un pirógeno endógeno.

Experimentalmente, aparece tras la administración de lipopolisacáridos tanto in vitro como in vivo. Recientemente, De Pablo [59] ha observado que los niveles séricos de esta quimiocina guardaban relación con la coagulopatía del shock séptico, y que aunque son escasos los trabajos sobre este tema, apuntaría a MIP-1 α como posible biomarcador de la coagulopatía de origen infeccioso.

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas-BB

El PDGF-BB es un homodímero compuesto de dos cadenas B de 14 kDa y 140 aminoácidos cada una, sintetizado por los megacariocitos y almacenado en los gránulos alfa, de donde salen tras la activación plaquetaria, estimulada por trombina frecuentemente. Se ha vinculado específicamente la expresión aberrante de esta molécula con desórdenes vasculares proliferativos como la aterosclerosis. En la angiogénesis induce la formación de estructuras tubulares a partir de células endoteliales y el crecimiento vascular. Posee un efecto mitógeno en células musculares lisas y pericitos. Los ratones que no poseen PDGF-BB o el receptor de PDGF-BB mueren por edema y hemorragia en el periodo perinatal, debido a la ausencia de células murales, lo cual indica que PDGF-BB es esencial en el proceso de estabilización de los vasos sanguíneos. PDGF-BB, estimula la síntesis de DNA en tumores cerebrales tipo meningiomas [60].

RANTES [61]

RANTES (en inglés, "*Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted protein*") es una β -quimiocina (CCL5), una proteína de 8 kDa, con propiedades quimioatrayentes principalmente sobre eosinófilos y basófilos.

Se cree que junto CCL2(MCP-1) juega un rol importante en la hiperreactividad bronquial del asma [55]. Sin embargo, recientemente se ha estudiado el papel que podría desempeñar en el mantenimiento de una respuesta T CD8 específica contra virus [62] y sus nexos fisiopatológicos con el lupus [63].

VEGF

El VEGF (en inglés, "*vascular endothelial growth factor*") es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis. No sólo presenta efectos sobre el endotelio, sino también sobre otros tipos celulares que incluyen las neuronas. Presenta un efecto quimioatrayente sobre los monocito/macrófagos, principalmente durante la inflamación crónica. Se conoce además un importante efecto proliferativo sobre las células tumorales de extirpe epitelial (cáncer de mama).

Recientemente, se ha propuesto su utilidad como marcador pronóstico de la nefritis lúpica aunque los mecanismos fisiopatológicos no queden completamente claros [64].

IL-1 β

Se trata de un tipo de IL-1 que es secretada durante la reacción inflamatoria, en respuesta a TNF- α . Se han descrito polimorfismos en el gen de esta citoquina que pueden relacionarse con la etiopatogenia del LES [65].

Interleuquina-6

Se trata de una glucoproteína secretada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su gen se encuentra localizado en el cromosoma 7, su liberación es inducida por IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF α . Sus nexos con la nefritis lúpica son bastante conocidos.

Interleuquina-8

Se trata de una quimiocina CXC producida por fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos que regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos, con el fin de amplificar la respuesta inflamatoria local. Hace no mucho tiempo, se describió la asociación entre un polimorfismo de esta quimiocina y la nefritis lúpica severa [66].

Interleuquina-7 [52]

Esta interleuquina es producida por las células del estroma de la médula ósea y por los fibroblastos. Actúa sobre los progenitores linfoides inmaduros, induciendo su desarrollo.

Interleuquina-17

Se trata de la interleukina de la respuesta Th17. Parece jugar un rol central en la patogénesis de diversas enfermedades auto-inmunes, con un gran número de estudios en el lupus [67]. Permite sospechar la participación de patógenos, como detonantes de los procesos de auto-inmunidad, dejando además entrever el fracaso de la respuesta T reguladora en el control de los mismos [68-69].

Factor estimulante de colonias de granulocitos

El interés del estudio de los niveles circulantes de G-CSF (en inglés, "*Granulocyte colony-stimulating factor*") en el lupus y otras enfermedades auto-inmunes, radica en la inducción de granulopoyesis dependiente de IL-17, en el seno de una respuesta por receptores "Toll" [70,71].

Proteína inflamatoria de los macrófagos-1 β

MIP-1 β (en inglés, "*Macrophage inflammatory protein-1 β* ") o CCL4 tiene propiedades quimioatrayentes principalmente sobre células NK y sobre monocitos. Se la ha relacionado junto con otras quimiocinas con el daño orgánico en el lupus [72].

Interleuquina-2

Esta citoquina muy vinculada a la respuesta alorreactiva y contribuye a la diferenciación de las respuestas T auxiliares (polarización). Presenta un efecto dual (efector y

supresor) sobre la respuesta inmune. Constituye además uno de los objetivos de la terapia antitumoral frente al melanoma y el cáncer renal metastásicos [73]. Se han descrito anomalías en la transcripción de componentes de las vías de señalización de esta citoquina (NFAT y NFκB) relacionadas fisiopatológicamente con el lupus [74].

Interleuquina-4 [52]

Es una glucoproteína de 20 kDa producida por los linfocitos polarizados Th2. Bloquea la síntesis de IL-1, TNFα, IL-6 y las proteínas inflamatorias del macrófago. Su papel más importante lo desempeña en la rinitis alérgica, el asma y la dermatitis atópica.

Interleuquina-5 [52]

Producida por linfocitos T y mastocitos, estimula el crecimiento y proliferación de eosinófilos, y sus niveles guardan relación con el de la inmunoglobulina E.

Interleuquina-10

Se trata de la citoquina de la respuesta reguladora y confiere a los dos tipos de linfocitos Treg la propiedad de inhibir la respuesta inmune a distancia (efecto "*bystander*") [75].

Interleuquina-12

Es producida en los macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígenos. Activa la respuesta Th1, pudiendo estimular además las células NK, con un efecto sinérgico con TNF α e IFN- γ . Fisiopatológicamente existen vínculos con el LES [76].

Interleukina-13 [52]

Estimula la síntesis de colágeno por los fibroblastos y la producción de moco por las células epiteliales.

Factor estimulante de colonias de macrófagos

GM-CSF (en inglés, "*Ganulocyte macrophage colony-stimulating factor*") es una proteína secretada por macrófagos, células T, células NK y por el endotelio.

Se ha descrito una disminución en la secreción de esta molécula por parte de las células mononucleares circulantes, en relación con un menor título de los anticuerpos anti-ADN nativo después del tratamiento con inmunoadsorción, lo que demuestra el papel inmunomodulador de la plasmaféresis [77].

Interferon-gamma

Producida por los linfocitos T y células NK, tiene por función la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitarias innata como en la adaptativa.

Fisiopatológicamente se postula la relación con el lupus y muchas otras enfermedades auto-inmunes [76,78,79,80].

Factor de necrosis tumoral-alfa

Los factores de necrosis tumoral desempeñan una variedad de efectos estimulantes de la respuesta inmune. Respecto al lupus, juegan un rol como iniciadores y como responsables del mantenimiento de la respuesta de auto-inmunidad, lo que se ha puesto de manifiesto desde hace ya bastante tiempo con el bloqueo farmacológico de estas moléculas [1,81].

2.8 Interés clínico de los biomarcadores en la nefropatía lúpica

2.8.1 Biomarcadores de nefropatía lúpica [1,43,47,82,83]

La Nefritis Lúpica (NL) es la afectación orgánica más frecuente del LES. Aunque clínicamente aparece, según estudios prospectivos, en el 39% de todos los pacientes lúpicos, puede revestir alteraciones histológicas a nivel mesangial hasta en el 90% de los pacientes. Según el Registro Español de Enfermedades Glomerulares (REEG), la NL representa la tercera entidad más biopsiada, con una incidencia del 12%, siendo considerada como el elemento individual más representativo para establecer un pronóstico global nefasto de la enfermedad.

La nefropatía lúpica es responsable de un tercio de las muertes en los pacientes con LES y condiciona por si sola una disminución significativa de la supervivencia a 10 años.

Hasta hace unas décadas, el 40% de los pacientes con formas graves de afectación renal lúpica evolucionaba hacia la muerte o hacia la Enfermedad Renal Crónica Avanzada (ERCA) en el lapso de cinco años. Hoy en día, este pronóstico tan pésimo ha mejorado notablemente gracias a un diagnóstico más precoz y a los nuevos enfoques clínico-terapéuticos.

La presencia de anticuerpos antinucleares, principalmente de anticuerpos anti-ADN bicatenario y de complejos inmunes (CI) circulantes, se considera característica de la nefropatía lúpica. Sabemos que los anticuerpos anti-ADN bicatenario provocan daño renal directo, citotóxico o dependiente del receptor Fc, siendo los componentes de la membrana basal glomerular sus principales blancos (laminina, colágeno IV y heparín-sulfato). Puede que antígenos circulantes se depositen a nivel glomerular, formándose complejos inmunes in-situ con ADN, histonas, nucleolos, etc, o bien, que estos complejos inmunes se formen en circulación, para luego depositarse en la membrana basal glomerular.

Los complejos inmunes formados en exceso, al ver disminuir su eliminación, se depositan además en diferentes órganos. Estos complejos inmunes son capaces de activar la vía clásica del complemento, donde se depositan (sobre todo a nivel renal), lo que conlleva a daño glomerular inflamatorio.

Respecto a los anticuerpos anti-ADN, a algunos se les ha atribuido propiedades nefritogénicas. Estos auto-anticuerpos son capaces de reconocer estructuras glomerulares o

tubulares e iniciar el proceso inflamatorio con alteración de la función celular, lo que se perpetúa con la proliferación y apoptosis de células glomerulares o tubulares. Se ha demostrado la existencia de reacciones cruzadas entre los anticuerpos anti-ADN y heparin-sulfato. También se han relacionado ciertos componentes del núcleo con la afectación renal, tal es el caso de la histona H2B, por lo sería lógico considerar, que los enfermos con niveles altos de anticuerpos dirigidos frente a esta histona desarrollan formas más graves de nefritis lúpica.

Los anticuerpos anti-fosfolípidos (anticoagulante lúpico, anti-cardiolipina y anti-β2 glucoproteína 1) están presentes en el 10% de los casos de NL. Se asocian con una mayor prevalencia de trombos capilares, lesiones necrotizantes y, particularmente, con la microangiopatía trombótica, empeorando todos ellos, el pronóstico de la nefropatía lúpica.

Es posible observar lesiones histológicas aisladas a nivel de túbulos, intersticio y vasos. Los casos definidos como nefritis lúpica grave presentan glomerulonefritis necrotizante y proliferación endocapilar en más del 50% de los glomérulos, con o sin glomerulonefritis membranosa asociada.

La biopsia renal percutánea con control ecográfico en tiempo real es un procedimiento bastante seguro y actualmente imprescindible para confirmar el diagnóstico del tipo de afectación renal, cuantificar la gravedad de la afectación intersticio-vascular, establecer un pronóstico y decidir la intensidad, tipo y duración del tratamiento. Nos ubica, además, en un punto de partida para decidir si se necesitan biopsias adicionales, fundamentalmente en los casos de inadecuada respuesta terapéutica o ausencia total de respuesta o en los casos de recidiva tras una remisión prolongada. Para los casos de ERC establecida (proteinuria,

sedimento patológico o disminución del FG) con sospecha de LES, la biopsia facilita el diagnóstico diferencial con otras afecciones auto-inmunes.

No existen cambios patognomónicos de nefropatía lúpica, aunque sí lesiones habituales, como la proliferación de células del mesangio, endotelio o epitelio. La hiper celularidad focal o difusa en la microscopía óptica (MO) es una de las características más sobresalientes de las formas graves, observándose en ocasiones grandes semilunas ocupando todo el espacio de la cápsula del Bowman (proliferación celular epitelial). La necrosis capilar se identifica por la presencia de un material eosinófilo muy afín por la fibrina y, a veces, por la existencia de auténticos trombos capilares de fibrina. Menos frecuentes son los llamados cuerpos hematoxilínicos, que aparecen como signos de inflamación o necrosis. Los depósitos inmunes se localizan en el mesangio, subendotelio y subepitelio. En fases avanzadas pueden ser muy gruesos y responsables de rigidez capilar, identificándose por el característico patrón en "*asas de alambre*". Con técnicas de inmunofluorescencia se ha demostrado que el material depositado está compuesto por inmunoglobulinas, en la mayoría de los casos IgG 98%, IgM 90%, IgA 82%; aunque también es frecuente encontrar fracciones de complemento C3 y C1q, así como fibrinógeno. En microscopía electrónica (ME), los depósitos llamados electrodensos se caracterizan por su estructura granular, en ocasiones se observan las llamadas imágenes en "*huella dactilar*" que, si alguna vez se creyeron asociadas a mixovirus, hoy en día se sabe que se tratan de componentes celulares degenerados.

Además de las lesiones referidas, se pueden observar alteraciones intersticiales y enfermedad vascular (microangiopatía trombótica y vasculitis, fundamentalmente). La frecuencia de estas lesiones va en aumento, en relación con la fase de la glomerulopatía y la actividad histológica de la misma. Constituyen un daño histológico de trascendencia

terapéutica y significación pronóstica que no deben subestimarse. La presencia de trombos capilares, en las formas graves, es un marcador precoz de evolución hacia la esclerosis glomerular. Se trata de pacientes que, característicamente, presentan títulos elevados de anticuerpos anti-cardiolipina. Existe una asociación evidente entre glomerulonefritis necrotizante con formación de semilunas epiteliales, microangiopatía trombótica y SAFL.

No debe olvidarse el impacto de otras medicaciones diferentes de la medicación inmunosupresora, como los anti-inflamatorios no esteroideos, los cuales pudieran estar detrás de una afectación intersticial. De igual manera, no deben menospreciarse los casos de auténticas nefritis lúpicas en el contexto de lupus inducidos.

Siendo la afectación renal la que mayor gravedad reviste, el apoyo en biomarcadores que específicamente alerten del desarrollo de esta complicación frecuente y grave permitirá la prevención de la misma. El aporte de la clínica es evidentemente fundamental, sobre todo para entender los cambios en la concentración de estas moléculas en los compartimentos que se juzgue pertinentes, por ejemplo en orina en los casos de nefritis lúpica.

Se define actividad renal cuando existe una respuesta parcial al tratamiento con proteinuria basal ≥ 3.5 gr/24 horas y descenso de la proteinuria a < 3.5 gr/24horas [84]. O en pacientes con proteinuria basal < 3.5 gr/24 horas si existe una reducción de la proteinuria $> 50\%$ en comparación con la inicial [84]. En ambas situaciones ha existido una estabilización ($\pm 25\%$) o mejoría del filtrado glomerular respecto a valores iniciales, pero persiste la actividad.

Existe brote renal cuando se produce una recidiva de la afectación renal en aquellos pacientes que habían alcanzado una respuesta parcial o total. Con aparición de proteinuria, aumento de creatinina, cambios en el sedimento urinario y presencia de actividad inmunológica en las determinaciones de laboratorio. De acuerdo con la escala de BILAG, se define brote por la presencia de una hipertensión arterial acelerada, junto con proteinuria mayor de 1 gr/24 horas, o creatinina sérica mayor de 1.1 mg/dl en mujeres y mayor de 1.3 mg/dl en hombres (aclaramiento de creatinina < 50 ml/min), o sedimento urinario alterado (con más de 5 hematias/campo o más de 5 leucocitos/campo, o por la presencia de células epiteliales descamativas o cilindros hemáticos).

De tal manera, que en las situaciones con presencia de actividad de la enfermedad o si aparece un brote renal, es posible que un candidato a biomarcador aumente en sangre u orina antes o durante el brote. Estos biomarcadores deben ser altamente sensibles y específicos para que, junto a la clínica, orienten los ajustes en la inmunosupresión. Será requisito indispensable su validación en grandes poblaciones, como etapa previa a la implementación de estrategias de inmuno-vigilancia clínicas destinadas a tratar la actividad de la enfermedad y prevenir el brote de nefropatía lúpica.

2.8.2 Correlaciones anatomo-clínicas

Actualmente la clasificación ISR/RPS ("*International Society of Nephrology/Renal Pathology Society*") de 2003 [85] ha sustituido a la clasificación de la OMS de 1995, por la explicación más detallada de los hallazgos histológicos (**Tabla 10**), y por ser la primera en relacionar éstos con la clínica (**Tabla 11**), permitiendo una mayor precisión diagnóstica. No obstante aunque utilicemos la clasificación anterior, resulta de interés la cuantificación de las

lesiones, que puede realizarse con los índices de actividad y cronicidad propuestos por Austin (**Tabla 12**) [84,86,87]. Debe tenerse en cuenta, para toda decisión de intensificación del tratamiento, la ausencia de respuesta previsible por parte de las lesiones crónicas, lo que debe saber valorarse sea cual sea el índice biópsico que utilicemos, para lo que cuenta decisivamente la experiencia del equipo médico. [88].

La clínica de la nefritis lúpica es muy variable dado que la afectación renal se presenta de forma muy diversa. En general, la frecuencia y gravedad de la nefropatía lúpica parecen ser inversamente proporcionales a la edad. En jóvenes con edades inferiores a los 14 años se puede observar que, tras el estudio de sus biopsias renales, presentan afectación renal el 46%, mientras que sólo el 25% de los casos de lupus diagnosticados después de los 50 años presenta tal afectación.

Como ocurre con otras glomerulonefritis, no existe una correlación exacta entre la clase histológica de NL y la clínica del paciente, aunque son habituales ciertos patrones clínicos de presentación que sugieren una o otra clase de afectación glomerular, lo que ayuda a predecir la evolución (hacia la insuficiencia renal) y la respuesta terapéutica. Una proteinuria persistente inferior a 1 gr/día puede observarse incluso en la remisión prolongada, siendo en estos casos la tensión arterial y el FG normales y raras una acidosis tubular renal, hipokaliemia o hipomagnesemia. No obstante, la proteinuria podría alcanzar el rango nefrótico (60% de los casos), y podría afectarse la función renal, aumentando las probabilidades de evolucionar hacia enfermedad renal crónica avanzada (ERCA) si las alteraciones persisten tras el tratamiento inmunosupresor.

Tabla 10.—Clasificación histológica ISR/RPS 2003 de la Nefritis Lúpica

| |
|--|
| <p>Clase I. Nefritis lúpica mesangial mínima: glomérulos normales con microscopia óptica, pero mínimos depósitos mesangiales en inmunofluorescencia.</p> |
| <p>Clase II. Nefritis lúpica proliferativa mesangial^a: hipercelularidad y expansión mesangial leve, en la microscopia óptica, con depósitos mesangiales en la inmunofluorescencia; puede haber depósitos subepiteliales o subendoteliales en inmunofluorescencia o en microscopia electrónica.</p> |
| <p>Clase III. Nefritis lúpica focal: lesiones en <50% de los glomérulos con lesiones de tipo endocapilar o extracapilar, con depósitos subendoteliales, con o sin afectación del mesangio. Pueden existir lesiones activas (A) o crónicas (C), por lo que se subdividen en :</p> <p>Clase III (A): lesiones activas (nefritis lúpica proliferativa focal). Clase III (A/C): lesiones activas y crónicas (nefritis lúpica proliferativa focal y esclerosante). Clase III (C): lesiones crónicas inactivas con cicatrices (nefritis lúpica esclerosante focal).</p> |
| <p>Clase IV. Nefritis lúpica difusa^b: lesiones en ≥50% de los glomérulos, con depósitos difusos subendoteliales, con o sin alteraciones mesangiales. Pueden tener lesiones A o C. Además, las lesiones pueden ser segmentarias (S: cuando ≥50% de los glomérulos afectados tienen menos de la mitad del ovillo con lesiones) o globales (G: cuando ≥50% de los glomérulos afectados tienen más de la mitad del ovillo con lesiones). En esta clase se incluyen los depósitos “en asas de alambre”. Se subdivide en:</p> <p>Clase IV-S (A): lesiones segmentarias activas (nefritis lúpica proliferativa segmentaria difusa). Clase IV-G (A): lesiones globales activas (nefritis lúpica proliferativa global difusa). Clase IV-S (A/C): lesiones segmentarias activas y crónicas (nefritis lúpica esclerosante y proliferativa segmentaria difusa). Clase IV-G (A/C): lesiones globales activas y crónicas (nefritis lúpica esclerosante y proliferativa global difusa). Clase IV-S (C): lesiones segmentarias crónicas (nefritis lúpica esclerosante segmentaria difusa). Clase IV-G (C): lesiones globales crónicas (nefritis lúpica esclerosante global difusa).</p> |
| <p>Clase V. Nefritis lúpica membranosa: engrosamiento de la membrana basal glomerular con depósitos inmunes de forma global o segmentaria en la vertiente subepitelial de la membrana basal; se puede asociar con expansión mesangial. Puede aparecer en combinación con las clases III ó IV. También puede tener un avanzado grado de esclerosis. Muy similar a las formas idiopáticas en las fases iniciales.</p> |
| <p>Clase VI. Nefritis lúpica esclerosada: con afectación de más del 90% de los glomérulos, sin actividad residual.</p> |
| <p>^aPorporción de glomérulos con lesiones activas o esclerosadas. ^bPorporción de glomérulos con semilunas y/o necrosis fibrinoide.</p> |

El estudio histológico requiere técnicas de microscopía óptica e inmunofluorescencia, y se recomienda la microscopia electrónica.

Se deberían incluir datos cuantificados de actividad y cronicidad y describir lesiones vasculares e intersticiales de manera concomitante.

Tabla 11.—Correlaciones anatomo-clínicas (ISN/RPS 2003)

| | | | |
|------------|---|--|--|
| I | Glomérulos normales | | Asintomático o mínima proteinuria |
| | A | Normales en todas las técnicas | |
| | B | Normales en microscopía óptica, pero depósitos en inmunohistología o microscopía electrónica | |
| II | Anomalías mesangiales aisladas | | Anomalías urinarias: 40% |
| | A | Espesamiento mesangial o hiper celularidad moderada | |
| | B | Proliferación mesangial | |
| III | Glomerulonefritis segmentaria y focal | | Proteinuria constante Síndrome nefrótico: 30%. Hematuria y leucocituria si actividad Insuficiencia renal moderada HTA: 30% |
| | A | Lesiones necrosantes activas | |
| | B | Lesiones activas y esclerosantes | |
| | C | Lesiones esclerosantes | |
| IV | Glomerulonefritis difusa | | Proteinuria constante Síndrome nefrótico: 60%. Hematuria y leucocituria constantes Insuficiencia renal moderada HTA: 40% |
| | A | Con lesiones segmentarias | |
| | B | Lesiones necrosantes activas | |
| | C | Lesiones activas y esclerosantes | |
| | D | Lesiones esclerosantes | |
| V | Glomerulonefritis membranosa difusa | | Proteinuria importante, nefrótica en el 50% de los casos Insuficiencia renal rara |
| | A | Pura | |
| | B | Asociada a anomalías mesangiales | |
| VI | Glomerulonefritis esclerosante avanzada | | Insuficiencia renal |

La NL podría presentarse como una glomerulonefritis aguda, con pérdida rápida del FG de grado variable, proteinuria moderada e hipertensión arterial (HTA). El fallo renal es de temer en cualquier momento y se podría necesitar de tratamiento renal sustitutivo, siendo

obligatorio un tratamiento inmunosupresor energético. Habitualmente este tipo de presentación se encuadra en la clase IV, la más frecuente y la más grave. La necesidad de biopsia podría juzgarse innecesaria, pero la posibilidad de encontrar otras lesiones además de la propias de este tipo de glomerulonefritis, como una necrosis tubular aguda, vasculitis o fenómenos trombóticos, obliga a completar el estudio. La microangiopatía trombótica del síndrome antifosfolípido, que puede sospecharse por una HTA de mal manejo, puede manifestarse con estenosis aguda de ambas arterias renales, incluso producirse un SAFL catastrófico, donde la afectación también puede ser de las arterias de menor calibre. No hay que olvidar que la huella de un SAFL se manifiesta también en trombosis de repetición, como a nivel de los accesos vasculares y del propio injerto renal.

Tabla 12.—Índice de Austin

| Actividad* | Cronicidad* |
|--|--|
| Hiper celularidad Necrosis fibrinoide/cariorexis** Semilunar epiteliales** Trombos hialinos Asas de alambre Infiltrado leucocitarios Infiltrado de células mononucleares | Glomérulo-esclerosis Semilunas fibrosas Fibrosis intersticial Atrofia tubular |

*Puntuación: 0-3 en cada apartado (puntuación máxima: actividad: 24; cronicidad: 12)

**Puntuación doble

La ERCA es el destino final al que llevan la suma de lesiones glomerulares e intersticiales, y la actividad inflamatoria propia de la enfermedad. Es habitual que, conforme vaya disminuyendo el FG, la actividad de la enfermedad vaya disminuyendo, aunque un pequeño porcentaje de pacientes pueden presentar manifestaciones extrarrenales incluso en diálisis. La supervivencia de los pacientes lúpicos sometidos a tratamiento renal sustitutivo es,

sin embargo, similar a la observada en pacientes con otras causas de ERC. De cara al trasplante y en la actualidad, gracias a los avances de la inmunología, es menos frecuentemente que exista incertidumbre para trasplantar a un paciente con LES, ya que el Flow-PRA (test de laboratorio basado en la tecnología Luminex, para la detección de alo-anticuerpos IgG, IgM o IgA) permite distinguir adecuadamente entre alo- y auto-anticuerpos en las pruebas cruzadas. La supervivencia del injerto puede llegar a ser similar a la de enfermos con otras causas de ERC, siendo rara la actividad de la enfermedad en el seguimiento postrasplante y esporádica la recurrencia, esto último en relación con tratamiento inmunosupresor que previene el rechazo.

El hecho de que se pueda contar con biomarcadores "preventivos" para la afectación renal lúpica, no quiere decir que el aporte de la anatomía-patológica pase a un segundo plano [89], puesto que en cualquiera de los casos la valoración que pueda tenerse con estos efectores inflamatorios es indirecta, poco relevante sin el aporte de la clínica, y susceptible de ser influido por factores no inmunológicos que podrían llevar a errores.

Por todo lo anterior y las limitaciones descritas que se presentan en la asistencia diaria a este tipo de pacientes, tanto a nivel de laboratorio, como la clínica, como las escalas de valoración de actividad y brote lúpico, creemos necesaria la búsqueda de biomarcadores en orina para detectar precozmente actividad en el LES, y si es posible, la afectación renal activa.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis de trabajo

La enorme complejidad de la fisiopatología del lupus eritematoso sistémico y las limitaciones en las herramientas actualmente disponibles para el seguimiento clínico, ponen de manifiesto la necesidad de seguir investigando en nuevas formas de detectar actividad de la enfermedad para optimizar el tratamiento y pronóstico de estos pacientes.

Según la evidencia científica existente, las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento pueden comportarse como buenos biomarcadores de actividad en lupus eritematoso sistémico. La determinación de estas moléculas en orina nos permiten la evaluación de la actividad de la enfermedad de forma no invasiva.

3.2 Objetivo principal

Analizar la utilidad de la cuantificación en orina de los niveles de determinadas citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento para la detección de actividad en el Lupus Eritematoso Sistémico.

3.3 Objetivos secundarios

- (1) Reclutar pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, revisados en la Consulta de Enfermedades Autoinmunes del HCUV, y recoger orina, datos clínicos y de laboratorio mediante una encuesta normalizada.
- (2) Evaluar cual(es) citoquina(s) en orina son capaces de detectar actividad global en el Lupus Eritematoso Sistémico medida por las escalas de actividad.
- (3) Investigar qué citoquinas, quimiocinas o factores de crecimiento pueden detectar actividad lúpica a nivel renal.
- (4) Evaluar si existe relación entre la(s) citoquina(s) detectada(s) en orina y el consumo de complemento, niveles de linfocitos, proteinuria u otros parámetros de laboratorio.

4. Material y Métodos

4.1 Diseño del estudio

Estudio observacional prospectivo en el que se recogieron datos demográficos, clínicos, analíticos y muestras biológicas de la cohorte de pacientes estudiada.

Los pacientes incluidos fueron reclutados entre los meses de febrero y agosto de 2010, analizándose los niveles en orina de 27 citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento correspondientes al día que acudían a revisión, los cuales fueron confrontados su vez con los resultados obtenidos en los "*scores*" de actividad SLEDAI-2K y BILAG, utilizados habitualmente en consulta.

Las mismas citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento fueron analizadas también en las muestras de orina proporcionadas por 10 voluntarios sanos, para comprobar si existían diferencias respecto a los niveles de estas moléculas entre pacientes con LES y población sana sin LES.

4.2 Población de estudio

Pacientes diagnosticados de LES y seguidos en la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV).

Los pacientes fueron reclutados de acuerdo con su visita programa a la consulta. El reclutamiento fue por tanto, aleatorio.

Se incluyeron un total de 48 pacientes que colaboraron voluntariamente para la realización de la determinación en orina planificada.

4.3 Población control

Prestaron también su colaboración 10 controles sanos, reclutados entre los trabajadores del HCUV, de edad y sexo similares a los pacientes, sin signos de infección o inflamación alguna en el momento de proporcionar la muestra de orina requerida.

4.4 Comité de ética y consentimiento informado

Los pacientes participantes en el estudio acudían a su visita médica programada de revisión. Se comprobó que cumplían los criterios de inclusión y no cumplían los criterios de exclusión. Tras la información verbal y explicación de las características del estudio diseñado, accedieron a participar y otorgaron el consentimiento informado respectivo, bien ellos o en su defecto su representante legal (**Anexo 3**).

El protocolo de estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación y el Comité de Ética de Investigación Clínica del HCUV.

Los datos fueron tratados de manera confidencialidad y anónima, según lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Caracter Personal (LOPD) y la Ley de Biomedicina del 2007.

Toda la información del estudio fue centralizada en una base de datos localizada en el HCUV, controlada y custodiada por la investigadora principal.

4.5 Criterios de inclusión y exclusión

Los 48 pacientes seleccionados cumplían los requisitos para poder ser incluidos, exigidos en el diseño del estudio.

4.5.1 Criterios de inclusión

- 1.- Pacientes adultos (≥ 18 años).
- 2.- Pacientes de ambos sexos.
- 3.- Diagnosticados de LES según los criterios del Colegio Americano de Reumatología [24].
- 4.- Sin otra enfermedad conocida y sin enfermedad renal de otra etiología.
- 5.- Estar en la visita de revisión de la consulta de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, consulta de evaluación de actividad de la enfermedad y detección precoz de brote.
- 6.- Ortorgar el consentimiento informado.

4.5.2 Criterios de exclusión

- 1.- Pacientes con signos clínicos o analíticos de infección en el momento de la toma de la muestra.
- 2.- Pacientes con enfermedad renal de otra etiología.
- 3.- No firmar el consentimiento informado.

4.6 Metodología

4.6.1 Recogida y transporte de las muestras

Se tomó una muestra de orina de cada paciente. Las muestras se conservaron a 4°C y se transportaron directamente al laboratorio de Investigación Médica en Infección e Inmunidad del HCUV, donde fueron centrifugadas para eliminar el sedimento y rápidamente congeladas a -80°C, para realizar en un segundo tiempo el análisis de citoquinas planificado.

4.6.2 Determinación de veintisiete citoquinas en orina

La técnica

Se analizaron diferentes citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en las muestras de orina mediante el sistema Luminex[®].

Basada en el principio de la citometría de flujo, el sistema Luminex[®] utiliza microesferas fluorescentes que pasan por una corriente de flujo. Cada una de estas microesferas fluorescentes es clasificada de acuerdo al ratio de su marcaje fluorescente interno (100 ratios rojo-naranja diferentes) por lo que su espectro de emisión es único (**Figura 4**), lo que posibilita la identificación simultánea de todas ellas. Estas microesferas de poliestireno son partículas de elevada inestabilidad térmica y física, por lo que es imprescindible protegerlas de la luz y de elevadas temperaturas para asegurar su estabilidad. Los reactivos de los ensayos (anticuerpos, oligonucleótidos, sustratos, etc) van anclados a la superficie de estas microesferas. Una doble lectura tras la excitación por dos láseres permite identificar la reacción o ensayo que se está llevando a cabo en la superficie de cada una de éstas, además de la fluorescencia propia de las microesferas que no presentan reacción alguna.

Se utilizó el panel "*Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Bio-rad assay*[®] – Hercules, CA, USA" (**Figura 5**). El instrumento analizador fue un LX 200 – Austin, TX, USA (**Figura 6**), que se compone de dos láseres: uno para la identificación de las microesferas y otro para la identificación de la presencia o ausencia de reacción sobre las microesferas. El análisis de los datos se realizó con el programa informático Bioplex Manager 6.1. Los ajustes se comprobaron diariamente.

Figura 4.—Microesferas de cien ratios diferentes de fluorescencia rojo-naranja

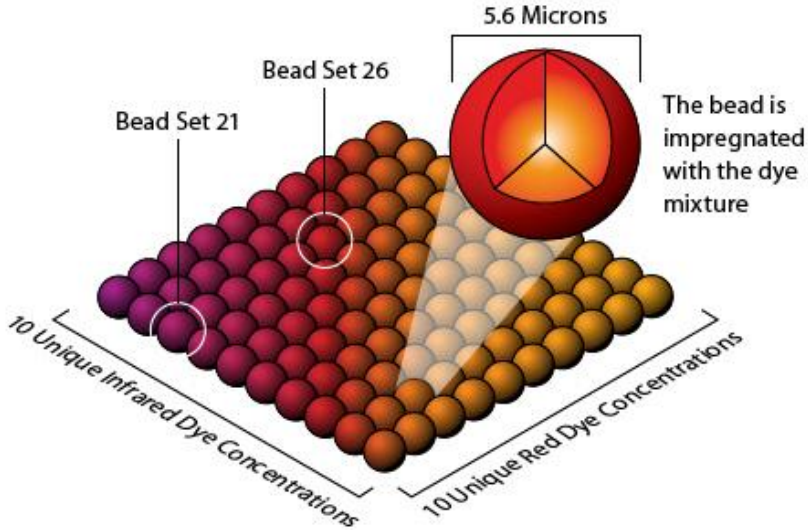


Figura 5.—Panel "Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Bio-rad assay®" ("Hercules, CA, USA")



Figura 6.—Instrumento analizador LX 200 ("Austin, TX, USA")



Preparación de las muestras (Figura 7)

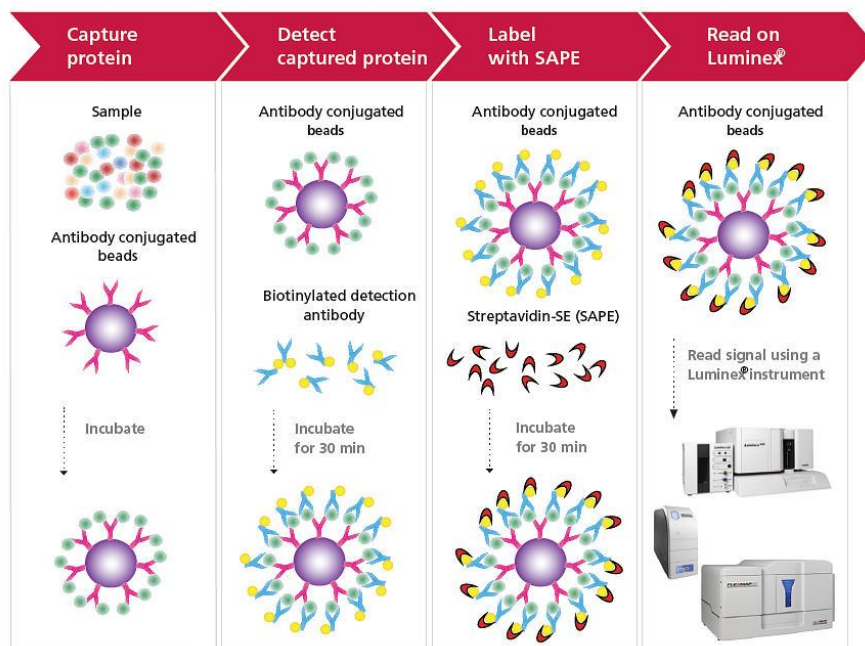
Previo al análisis propiamente dicho, se prepararon los estándares, las muestras y la placa. Los estándares se prepararon realizando diluciones seriadas (1/4) de un estándar suministrado con el kit resultando 8 estándares que se analizaron por duplicado. Como control negativo se utilizó diluyente del estándar. Para la preparación de las muestras, se realizaron diluciones 1/4. Una vez preparados los estándares, controles y muestras, se procedió a humidificar la placa con la adición manual de 150 μL del tampón y la eliminación de dicho tampón mediante filtración por vacío.

Preparada la placa, se agregaron las microesferas que llevaban incorporado el anticuerpo dirigido frente a las diferentes citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. El volumen final fue de 6000 μL (240 μL de solución 25x "*Stock Beads*" y 5760 μL de "*Assay Buffer*"). Se realizaron dos lavados de los micro pocillos y seguidamente, se añadieron los

estándares, controles y muestras en el pocillo correspondiente (50 μ L). La placa se incubó temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos.

Después de incubar las muestras, se realizaron 3 lavados y se añadieron 25 μ L del anticuerpo de detección (marcado con biotina) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Hasta aquí, el resultado era la formación de un "sandwich" de anticuerpos alrededor de la citoquina, quimiocina o factor de crecimiento.

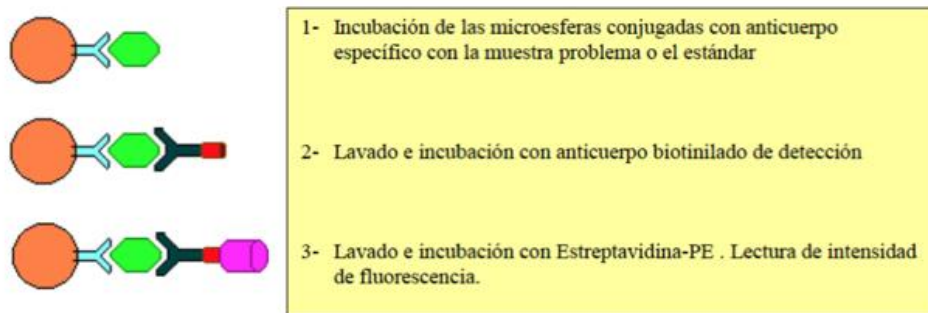
Figura 7.—Preparación de las muestras



Tras 3 lavados, se agregó 50 μ L de la solución de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) previamente diluida (60 μ L de solución SAPE y 5940 μ L de Assay Buffer) a cada pocillo, y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. El SAPE se une al

anticuerpo de detección biotinilado en la superficie de la microesfera (**Figura 8**).

Figura 8.—Principio de la detección en citometría de fase sólida (Luminex)



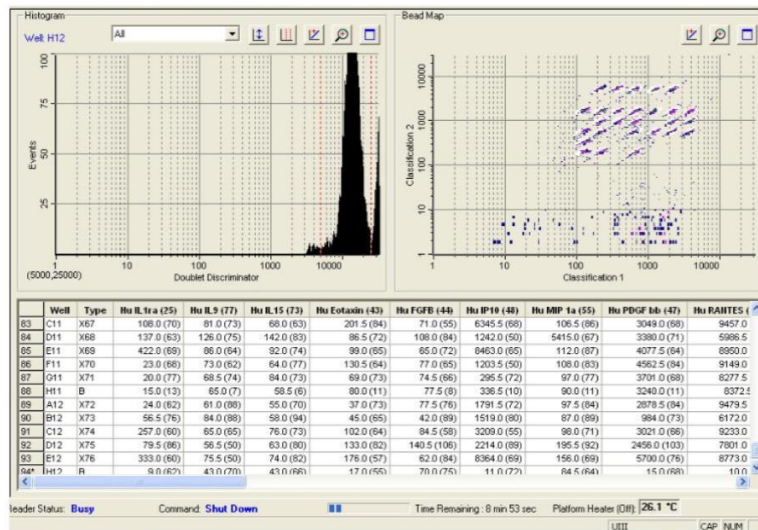
Detección y análisis de datos

Antes de proceder a la lectura de la placa, ésta se mantuvo en agitación a 1100 rpm durante 30 segundos. Posteriormente, la placa se introdujo en la plataforma Luminex y mediante el software suministrado por el fabricante se procedió al análisis de los datos (**Figura 9**). Los valores del último estándar fueron considerados como los límites de detección para cada mediador, según recomendaciones del fabricante. Los valores por debajo del nivel de detección se equipararon al nivel de detección (**Tabla 13**).

Tabla 13.—Límites de detección de las citoquinas estudiadas

| Citoquinas | Límites de detección (pg/ml) | PM |
|--|-------------------------------------|-----------|
| IL-1RA | 2.06 - 51837.3 | 65 kDa |
| IL-9 | 1.58 - 26447.2 | 14 kDa |
| IL-15 | 1.96 - 11900.8 | 13 kDa |
| Eotaxina (CCL11) | 1.51 - 25057.0 | 8.3 kDa |
| FGF-b | 0.66 - 8839.7 | 17.2 kDa |
| IP-10 | 2.51 - 41274.8 | 8.5 kDa |
| MIP-1α (CCL3) | 0.99 - 4207.0 | 7.8 kDa |
| PDGF-BB | 1.33 - 21802.4 | 24.3 kDa |
| RANTES (CCL5) | 1.27 - 2502.0 | 7.8 kDa |
| VEGF | 4.77 - 31623.9 | 38.2 kDa |
| IL-1β | 1.8 - 4219.5 | 17.3 kDa |
| IL-6 | 1.96 - 25069.5 | 20.9 kDa |
| IL-8 | 1.4 - 25130 | 8-9 kDa |
| IL-7 | 1.68 - 27537.1 | 17.4 kDa |
| IL-17 | 0.54 - 22242.5 | 15.5 kDa |
| G-CSF | 2.18 - 12648.4 | 18.7 kDa |
| MCP-1 (CCL2) | 1.16 - 2881.7 | 8.6 kDa |
| MIP-1β (CCL4) | 1.26 - 1637.4 | 8 kDa |
| IL-2 | 1.46 - 7645.8 | 15.5 kDa |
| IL-4 | 0.14 - 3415.7 | 14.9 kDa |
| IL-5 | 1.83 - 19532.1 | 26 kDa |
| IL-10 | 1.71 - 24304 | 18.6 kDa |
| IL-12 | 3.83 - 36459.8 | 70 kDa |
| IL-13 | 2.34 - 11943.7 | 12.5 kDa |
| GM-CSF | 0.84 - 13823.7 | 14.6 kDa |
| IFN-γ | 1.44 - 24564.7 | 16.7 kDa |
| TNF-α | 4.75 - 77755 | 17.4 kDa |

Figura 9.—Detección de los valores de citoquinas con ayuda del software TDAS RVP-I



4.6.3 Analítica de control

En paralelo, se obtuvo sangre por venopunción, que se recogió en tubos de suero y EDTA ("Ethylene Diamine Tetra Acetique Acid"), para el análisis bioquímico (glucemia, uremia, creatinemia, natremia y kalemia), hemograma y fórmula leucocitaria rutinarios respectivos, que se analizaron según el procedimiento habitual en el Servicio de Análisis Clínicos del HCUV.

Las mediciones de inmunoglobulinas y complemento se solicitaron al laboratorio de Microbiología en Inmunología del HCUV. Éstos se midieron por nefelometría ("Dade Behring N-II System – Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA"). Se solicitó la detección y caracterización de los anticuerpos antinucleares, lo cual se realizó por inmunofluorescencia indirecta en células HEP-2 y sobre *Crithidia luciliae* (Euroimmune, Lübeck, Germany), salvo para las especificidades dirigidas frente a antígenos nucleares solubles, que se evalúan en el

HCUV a través del sistema INNO-LIA (immunoblot). Finalmente, los anticuerpos anti-fosfolípidos fueron detectados y cuantificados mediante ELISA (anti-cardiolipina a efectos del presente estudio).

Recogida de orina de 24 horas y primera orina de la mañana, para estudio del sedimento urinario, microalbuminuria y proteinuria, procesado en el Servicio de Análisis Clínicos del HCUV.

4.6.4 Consulta de revisión

La Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del HCUV sigue y trata a los pacientes que participaron en este estudio, a los cuales se revisa cada 4-6 meses en caso de tratarse de enfermedad estable. Se presta especial atención a cualquier signo clínico y analítico de actividad, sobre todo si éstos hacen sospechar de afectación renal, que en caso de ocurrir, activa un protocolo de actuación para la toma de decisiones guiadas por algoritmos (**Anexo 4**) [84], para la puesta en marcha de un tratamiento de rescate. Superado un evento agudo, las revisiones se acortan a una visita mensual, y en caso de haberse tratado de un brote con afectación renal, no se deja de hacer un seguimiento de los parámetros de función renal en ninguna revisión posterior.

Consulta de detección de actividad y brote en LES

La consulta de Medicina Interna del HCUV (consulta de detección de actividad y brote en Enfermedades Autoinmunes Sistémicas) tiene las cualidades que se citan a continuación.

Actividades desarrolladas en la consulta

1.- Evaluar a aquellos pacientes en primera visita. Se trata de pacientes remitidos desde otras especialidades (Reumatología, Nefrología, Dermatología,...) con la sospecha de una Enfermedad Autoinmune Sistémica (basándose en la clínica y los hallazgos de la analítica). Estos pacientes precisan una valoración con historia clínica, exploración física, analítica y pruebas complementarias. En algunos de los casos, si es preciso por la clínica y/o de enfermedad sospechada el paciente necesitará ingreso para un estudio más rápido y la instauración de tratamiento precoz.

2.- Por otra parte, se realiza el seguimiento de aquellos pacientes que ya son conocidos en la Consulta de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del HCUV y que acuden, de acuerdo con su plan de visitas establecido. Se trata por tanto de una visita médica de revisión para de evaluación de actividad de la enfermedad y detección precoz de brote.

3.- Atención de pacientes con patología urgente.

4.-Consulta especializada, los jueves, en la que se realiza Capilaroscopias.

5.- Prescripción de fármacos intravenosos para su administración en el Hospital de Día.

6.- Consulta de enfermería diaria, en horario de mañanas.

Personal sanitario que compone la consulta

La consulta consta de un médico internista, que desempeña el trabajo de organización del equipo de profesionales que trabajan en esta unidad, y que es el que realiza la valoración directa de los pacientes, así como la decisión de la actitud diagnóstica y terapéutica.

Además, consta de médicos con diferentes actividades de acuerdo con su grado de responsabilidad: un médico internista con una beca de investigación, varios residentes de Medicina Interna y otras especialidades (Neurología, Nefrología,...) en distintos años de formación. Y durante el periodo académico, al tratarse de un Hospital Universitario que está vinculado a la Facultad de Medicina de Valladolid, se cuenta con la presencia de estudiantes, bien en prácticas de 3^{er} y 6^o curso de Medicina y/o Alumnos internos.

Por último, destacar la importante labor desempeñada por la Enfermera. Como en todas las actividades sanitarias la enfermera realiza una labor de asistencia con el médico y una atención directa al paciente. Sus actividades son las siguientes:

- Extracción de muestras de laboratorio a primera hora de la mañana.
- Organizar la consulta día a día.
- Informar a los pacientes, cada uno de acuerdo con su patología, en las normas higiénico-dietéticas necesarias para mejorar la calidad de vida, por ejemplo las medidas para mejorar el sabor, la textura,... y salvar las limitaciones en las comidas en pacientes con Síndrome de Sjögren o la protección frente a los cambios de temperatura de los pacientes con Enfermedad de Raynaud o

Esclerodermia, así como las medidas de protección solar y de otros factores desencadenantes de un brote lúpico.

- Ser la persona de referencia y consulta, bien por teléfono o bien en persona, para solucionar dudas clínicas o logísticas y valorar su derivación a una atención más especializada por parte del médico.
- Realizar pruebas complementarias en situación de urgencia: extracción de muestras de laboratorio, realización de ECG,....
- Administrar de medicación subcutánea, intramuscular o intravenosa, prescrita por el médico de la unidad.

¿Qué se realiza en una visita médica de revisión?

La consulta de revisión consiste en la valoración por parte del médico de la situación actual en la que se encuentra el paciente. A los pacientes se les realiza un interrogatorio exhaustivo siguiendo los items de las escalas de actividad, brote y lesión crónica, además de la realización de una exploración física y la revisión de las pruebas complementarias solicitadas en la visita anterior.

- Se debe evaluar el grado de actividad de la enfermedad para lo que se aplica de forma sistemática la escala de SLEDAI-2K.
- Por otra parte, se detecta la presencia de brote, aplicando la escala de BILAG.
- Finalmente, se realiza la escala de detección de daño crónico (evaluación anual): SLICC/ACR/DI.

De acuerdo con los resultados obtenidos el paciente puede tener tres tipos de seguimiento distintos:

- No estar en brote y el grado de actividad de la enfermedad ser nulo, con lo que la periodicidad de las revisiones será más separada.
- No estar en brote y de acuerdo con el grado de actividad de la enfermedad se realiza un ajuste de tratamiento y se programa una nueva visita con pruebas complementarias.
- Estar en brote y necesitar estudios más amplios y tratamiento más enérgico, para lo que se realizará ingreso.

Habitualmente, puesto que todos los pacientes participantes se habían mantenido estables hasta el momento de su inclusión, los datos clínicos y analíticos recogidos se introdujeron en la versión corregida de SLEDAI del año 2000, conformándose de esta manera tres grupos de acuerdo a la puntuación obtenida: sin actividad (SLEDAI-2K=0), actividad moderada (SLEDAI-2K=1-7) y actividad severa con afectación orgánica importante (SLEDAI-2K \geq 8).

Al aplicar SLEDAI-2K la puntuación que se puede obtener total va de cero a 105, no obstante la manifestación de uno o dos signos en uno de los capítulos, por ejemplo, uno de los seis síntomas mayores (con puntuación de 8), se catalogará automáticamente como actividad severa [90], aunque esta puntuación sea baja y los síntomas restantes se ubiquen en categorías más bajas, ya que prima la importancia de los signos mayores sobre la puntuación y demás signos menores presentes. Éste es el motivo de la división de los pacientes, establecida de

acuerdo con el grado de actividad. Ésta clasificación clínica se traduce en una actitud terapéutica:

- Actividad leve: tratamiento de base con prednisona 10 mg/24 h ó 5 mg/24h, con dosis mínima para evitar el efecto acumulativo de la medicación y mantener el estado de remisión de la enfermedad.
- Actividad moderada: se aumenta al doble la dosis de prednisona, no mayor de 0,5 mg/kg/día, conjuntamente con citotóxicos.
- Actividad severa: determinada por la presencia de uno de los seis signos mayores o incremento de la puntuación obtenida (≥ 8) y exacerbación o signos mayores (lesiones del SNC, vasculitis, nefritis lúpica, miositis, psicosis, ...). Se recomienda duplicar la dosis de prednisona de 0,5 mg/kg/día a 1 mg/kg/día o más, hospitalización, agregar citotóxicos o iniciar la terapia con pulsos de metilprednisolona o ciclofosfamida.

Se decidió aplicar BILAG para aquellas puntuaciones con SLEDAI indicando actividad severa y moderada, para indagar órgano por órgano los posibles focos de un potencial brote.

Los valores de las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizados en orina se compararon entre cada uno de los tres grupos constituidos de acuerdo a la puntuación que arrojó SLEDAI-2K.

Las decisiones que se tomaron y las acciones que se llevaron a cabo respecto de cada paciente participante, fueron anotadas en su historia clínica para, en un segundo tiempo poder analizarlas en futuros estudios.

4.7 Variables recogidas (Figura 10)

4.7.1 Determinación de citoquinas en orina

Se trató de variables cuantitativas continuas y correspondieron al valor de cada una de las 27 citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizados en orina.

Figura 10.- Hoja de recogida de datos

| HOJA DE RECOGIDA DE DATOS | | | | | |
|---|-------|------------------|---------------------------|-------|------------|
| Nº de caso: | | Fecha de visita: | | NºHª: | |
| Iniciales del nombre y los dos apellidos (sólo una letra). | | | | | |
| Sexo: | Edad: | años | Peso: | Kg | Talla: cms |
| ANTECEDENTES PERSONALES: | | | | | |
| HIPERTENSIÓN ARTERIAL | SI | NO | CARDIOPATÍA: | SI | NO |
| HEPATOPATÍA: | SI | NO | ENFERMEDAD RENAL | SI | NO |
| OBESIDAD: | SI | NO | TABACO: | SI | NO |
| ALCOHOL: | SI | NO | DIABETES MELLITUS: | SI | NO |
| CIRUGIAS PREVIAS: | SI | NO | | | |

DATOS DE LES:

1. **Año de diagnóstico**
2. **Criterios ACR 1997** que cumple:
 - Eritema facial
 - Lupus Discoide
 - Fotosensibilidad
 - Úlceras orales
 - Artritis no erosiva
 - Serositis (pleuritis o pericarditis)
 - Enfermedad renal (proteinuria >0.5gr/24 horas o presencia de cilindros celulares o hemáticos en el sedimento)
 - Alteraciones neurológicas (convulsiones o psicosis)
 - Alteraciones hematológicas (Anemia hemolítica o Leucopenia <4000 en 2 ó más ocasiones o Linfopenia < de 1500 en 2 ó más ocasiones o trombocitopenia <100.000)
 - Alteraciones inmunológicas (anticuerpos anti-DNA a título elevado. ac anti-Sm, Ac. antifosfolípido (ACA, LA) o serología luética falsamente positiva)
 - Ac antinucleares positivos
3. **Número de brotes** desde el diagnóstico de LES hasta la toma de la muestra.
4. **Número de ingresos** por LES.
5. **SLEDAI-2K (Índice de actividad del Lupus) (ANEXO 2)**. Clasificación:
 - SLEDAI-2K: 0
 - SLEDAI-2K: 1-8
 - SLEDAI-2K: ≥ 8
6. **BILAG (ANEXO 3)**:
 - BILAG C, D, E: igual
 - BILAG B: peor
 - BILAG A: brote

CONSIDERACIONES EN BILAG

Esquema de puntuación:

- **Categoría A.** Enfermedad lo suficientemente activa como para cambiar el tratamiento: Prednisolona > 20 mg/día y/o inmunosupresores.
- **Categoría B.** Enfermedad con menor actividad que en la categoría A; síntomas o signos reversibles con tratamiento sintomático como antimaláricos, antiinflamatorios no esteroideos o Prednisolona < 20 mg/día.
- **Categoría C.** Enfermedad estable o con baja actividad.
- **Categoría D.** Sistema previamente afectado pero en la actualidad inactivo.
- **Categoría E.** Sistema nunca afectado.

Criterios de respuesta:

- **Brote mayor:** nuevo score A.
- **Brote moderado:** paso de un C, D o E a un B.
- **Respuesta completa:** desaparición (sin reaparición) de todos los A y B.
- **Respuesta parcial:** desaparición de los A pero persistencia de por lo menos un nuevo B.

LABORATORIO (valores de referencia):

1. **Glucemia basal:** (tras 12 horas de ayuno) 65-110 mg/dl:
2. **Urea:** 25-50 mg/dl:
3. **Creatinina:** 0.7-1.4 mg/dl:
4. **Aclaramiento de creatinina MDRD**, calculado por el laboratorio del HCUV:
5. **Perfil lipídico:** Colesterol (120-220), Triglicéridos (36-165), HDL-c (41-72), LDL-c (90-150) mg/dl:
6. **Proteínas Totales:** 6.0-8.4 mg/dl:
7. **Albúmina:** 3.5-5.0 mg/dl:
8. **Proteinograma en sangre.**
9. **Hemoglobina:** en mujeres 12.01-14.5 mg/dl, en hombres: 13.8-16.9 mg/dl:
10. **Leucocitos:** 4.00-10.00 x 10³/ µl:
11. **Linfocitos:** 20.0-51.0 %:
12. **Neutrófilos:** 42.0-76.0 %:
13. **Monocitos:** 2.0-12.0 %:
14. **Plaquetas:** 150-400 x 10³/ µl:
15. **VSG:** mujeres < 30 mm y hombres < 50mm:
16. **Estudio de coagulación básico:**
17. **TSH:** 0.27-4.2 µIU/ml:
18. **T4 libre:** 0.93-1.71 ng/dl:
19. **Sedimento Urinario:** (patológico si > 3 hematíes/campo, 5 leucocitos/campo o algún cilindro por campo):
20. **Microalbuminuria:** 3-30 mg/L:
21. Auto- anticuerpos: **ANA:** (título positivo a partir de 1/40, en ausencia de drogas que pueden inducir lupus):
22. **Ac anti-DNA:** (título positivo a partir de 1/8):
23. **Ac anti-SM:** Título positivo:
24. **Ac anti-SS-A(Ro):**
25. **Ac anti SS-B(La):**
26. **Ac anti-nucleosomas:**
27. **C3:** 83-177 mg/dl:
28. **C4:** 15-45 mg/dl:
29. **IgG:** 870-2180 mg/dl:
30. **IgA:** 117-420 mg/dl:
31. **IgM:** 60-220 mg/dl:
32. **ACA IgG:** 0-15 U/ml:
33. **ACA IgM:** 0-13 U/ml:
34. **aCL:** positivo o negativo:
35. **Ac Anti beta 2 glicoproteína 1:** positivo o negativo (U/ml):

TRATAMIENTO:

1. **Tratamiento actual del LES:**
2. **Dosis acumuladas de Corticoides:** en mg (desde el diagnóstico hasta la actualidad).
3. **Pulsos de Corticoides** SI NO NS
4. **Pulsos de Ciclofosfamida:** SI NO NS
5. **Hidroxicloroquina:** SI NO NS
6. **Otros fármacos inmunosupresores iv** (Rituximab): SI NO NS
7. **Otros fármacos inmunosupresores vo:** Mofetil Micofenolato, Azatioprida, Metotrexato,....
SI NO NS
8. **Fármacos inhibidores del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (RAAS):** Inhibidores del Enzima convertidora de la Angiotensina (IECA), Antagonista de los receptores de la Angiotensina II (ARAI), Ahorradores de potasio (Espironolactona / Eplerenona):
SI NO NS.
- 9.- **Otros inmunomoduladores:** pentoxifilina: SI NO NS

CITOQUINAS EN ORINA (valores de referencia):

1. IL-1RA (2.06, 51837.3 pg/ml):
2. IL-9 (1.58, 26447.2 pg/ml):
3. IL-15 (1.96, 11900.8 pg/ml):
4. Eotaxina (1.51, 25057.0 pg/ml):
5. FGF-b:(0.66, 8839.7 pg/ml):
6. IP-10:(2.51, 41274.8 pg/ml):
7. MIP-1 α (0.99, 4207.0 pg/ml):
8. PDGF-BB (1.33, 21802.4 pg/ml):
9. RANTES (1.27, 2502.0 pg/ml):
10. VEGF (4.77, 31623.9 pg/ml):
11. IL-1 β (1.8, 4219.5 pg/ml):
12. IL-6 (1.96, 25069.5 pg/ml):
13. IL-8 (1.4, 25130 pg/ml):
14. IL-7 (1.68, 27537.1 pg/ml):
15. IL-17 (0.54, 22242.5 pg/ml):
16. G-CSF (2.18, 12648.4 pg/ml):
17. CCL2 (MCP-1) (1.16, 2881.7 pg/ml):
18. MIP-1 β (1.26, 1637.4 pg/ml):
19. IL-2 (1.46, 7645.8 pg/ml):
20. IL-4 (0.14, 3415.7 pg/ml):
21. IL-5 (1.83, 19532.1 pg/ml):
22. IL-10 (1.71, 24304 pg/ml):
23. IL-12 (3.83, 36459.8 pg/ml):
24. IL-13 (2.34, 11943.7 pg/ml):
25. GM-CSF (0.84, 13823.7 pg/ml):
26. IFN- γ (1.44, 24564.7 pg/ml):
27. TNF- α (4.75, 77755 pg/ml):

4.7.2 Seguimiento en consulta

La edad de los pacientes fue considerada como una variable cuantitativa discreta. El sexo se tomó como una variable cualitativa dicotómica (hombre y mujer).

La actividad global medida con SLEDAI-2K permitió construir las siguientes variables cualitativas de tipo ordinal: inactivo, moderado, severo.

Los datos clínicos y algunos de los datos analíticos requeridos por SLEDAI-2K se consideraron como variables cualitativas dicotómicas (sí o no). Estas variables correspondieron a: anti-ADN, anti-SS-A(Ro), anti-SS-B(La), anti-Sm, anti-nucleosomas, anti-cardiolipina IgG, anti-cardiolipina IgM, inmunosupresión diferente de los corticoides y afectación renal.

Se consideraron como variables cuantitativas continuas el valor de los siguientes parámetros de laboratorio analizados (en sus respectivas unidades y de acuerdo a sus márgenes de normalidad) y requeridos por SLEDAI-2K: leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrofilos, VSG, urea, IgG, IgA, IgM, complemento C3 y C4.

4.8 Método estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Excel de Microsoft y la versión 15.0 del programa SPSS Inc.® (Chicago, IL, USA) para Windows.

Para las pruebas de contraste se consideró un nivel de significación estadística el valor- $p \leq 0.05$.

4.8.1 Análisis descriptivo

Las variables cuantitativas correspondientes a la edad, los niveles de los mediadores inmunológicos medidos en orina, leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrofilos, VSG, urea, IgG, IgA, IgM, y complemento C3 y C4, se describieron por su media y desviación estándar.

Presentando la población de estudio una distribución de frecuencias para las 27 citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento analizados (variables de la determinación de citoquinas) que no seguía la ley de Laplace-Gauss, según lo indicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnovb y Shapiro-Wilk, se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis estadístico.

Por último, todas las variables cualitativas se describieron por sus frecuencias absolutas y relativas (porcentajes).

4.8.2 Análisis de contraste

Teniendo en cuenta el número importante de citoquinas motivo de este estudio, sólo se sometieron al análisis de contraste, y posteriormente al análisis de correlación y de capacidad diagnóstica, aquellas que resultaron detectables por el método que utilizamos.

Se utilizaron la prueba del Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher para la comparación de la repartición de frecuencias de las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento detectables entre sanos y enfermos.

Se utilizó la prueba no paramétrica de la U de Mann-Withney para comparar los niveles de estos mediadores inmunológicos entre cada uno de los grupos de pacientes definidos por SLEDAI-2K (inactivo, moderado y severo). Previamente, con la prueba de la H de Kruskal-Wallis, se compararon controles sanos y enfermos, enfermos inactivos y moderados, enfermos moderados y severos, y enfermos severos y controles sanos. Con el mismo estadístico se compararon enfermos severos sin y con afectación renal por la presencia de proteinuria (establecido el límite ≥ 0.5 gr/24 horas).

4.8.3 Análisis de correlación y capacidad diagnóstica

El coeficiente de correlación de Spearman se empleó para medir la asociación entre los niveles de las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento detectables y la actividad global de la enfermedad según SLEDAI-2K, siendo necesario aplicar la corrección de Bonferroni.

También se midió la asociación, con el mismo estadístico, entre estos mediadores y los siguientes parámetros de laboratorio requeridos por SLEDAI: leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrofilos, VSG, urea, IgG, IgA, IgM, complemento C3 y C4.

Por último, se analizó la capacidad diagnóstica de aquellas citoquinas que se sometieron al análisis de correlación, hallándose los puntos de corte más precisos respecto a su sensibilidad y especificidad para detectar una puntuación de grado severo o mayor con SLEDAI-2K, y para detectar proteinuria (establecido el límite ≥ 0.5 gr/24 horas), mediante el cálculo del área bajo la curva COR (Característica Operativa del Receptor).

Por regresión logística se discriminó respecto a la cuantificación del riesgo, entre aquellas citoquinas con una curva COR buena (MCP-1 e IP-10) y parámetros de actividad de enfermedad renal como son la hematuria, leucocituria y proteinuria.

5. Resultados

5.1 Análisis descriptivo

5.1.1 Características clínicas de la población

Los pacientes participantes en este estudio ($n = 48$) presentaron una media de edad de 40.36 años. Se incluyeron un total de 41 mujeres, por lo que quedó claro el predominio del sexo femenino sobre el masculino (**Figura 11**). Agrupados por rango de edad, 19 pacientes fueron menores de 35 años, veintiocho presentaron una edad comprendida entre 35 y 65 años, y sólo uno era mayor de 65 años (**Figura 12**).

Figura 11.—Sexo de los pacientes participantes

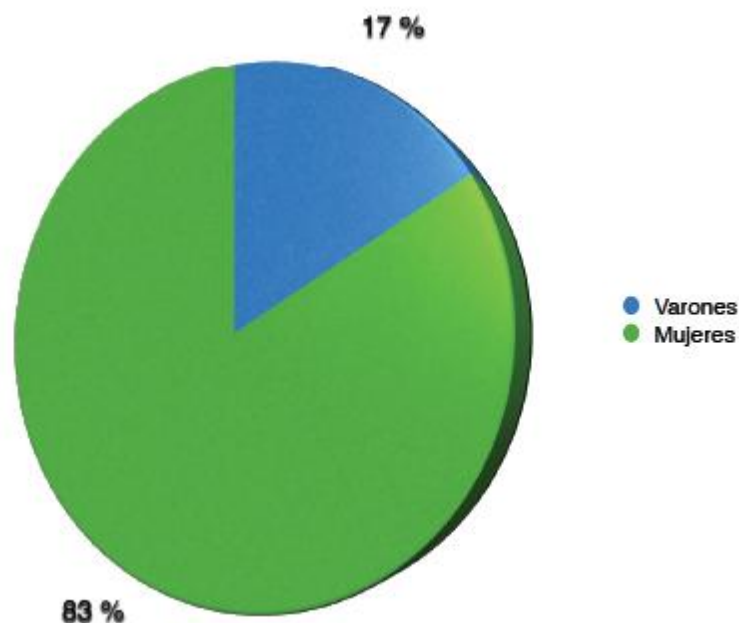
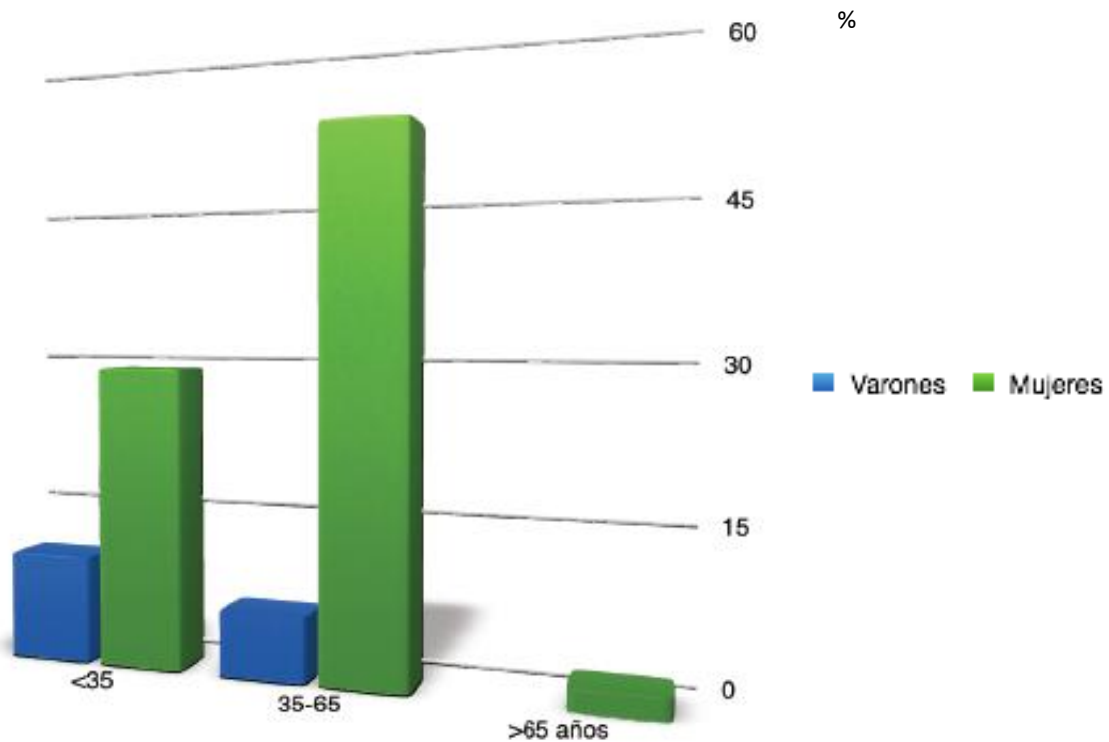
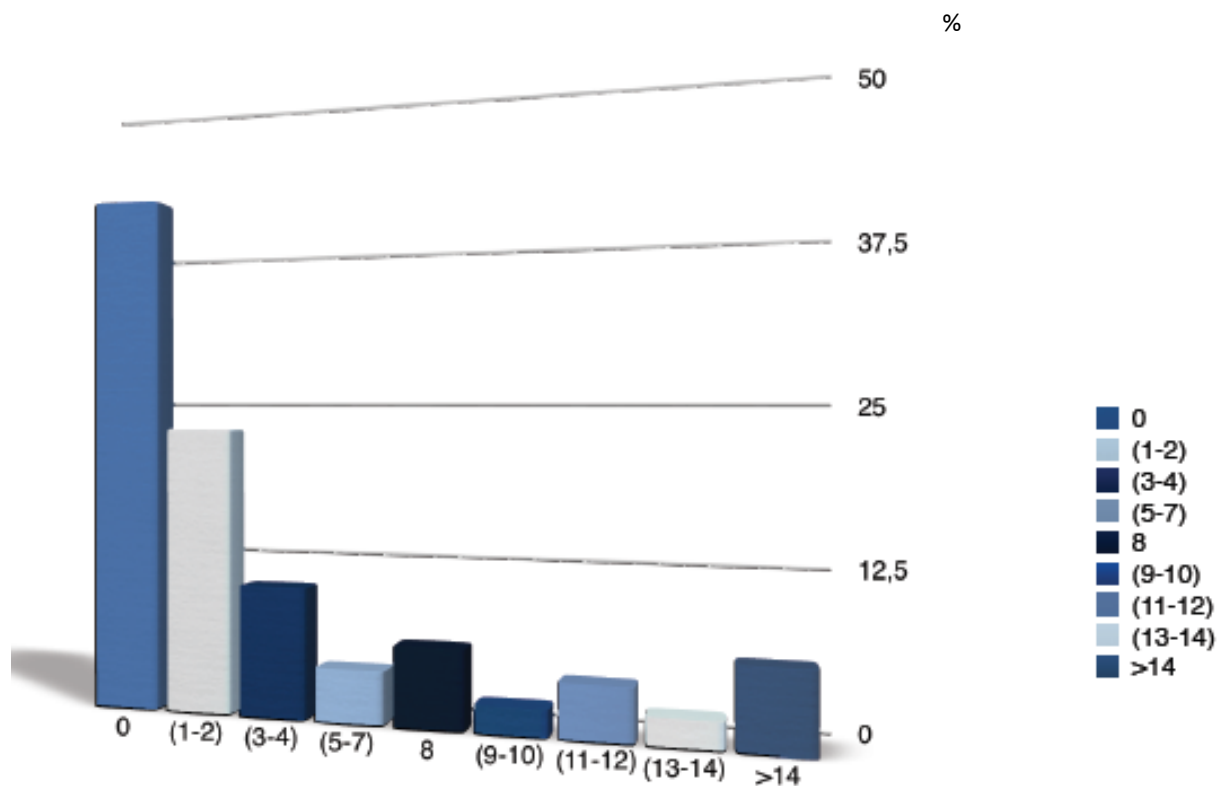


Figura 12.—Grupos por rangos de edad, porcentajes



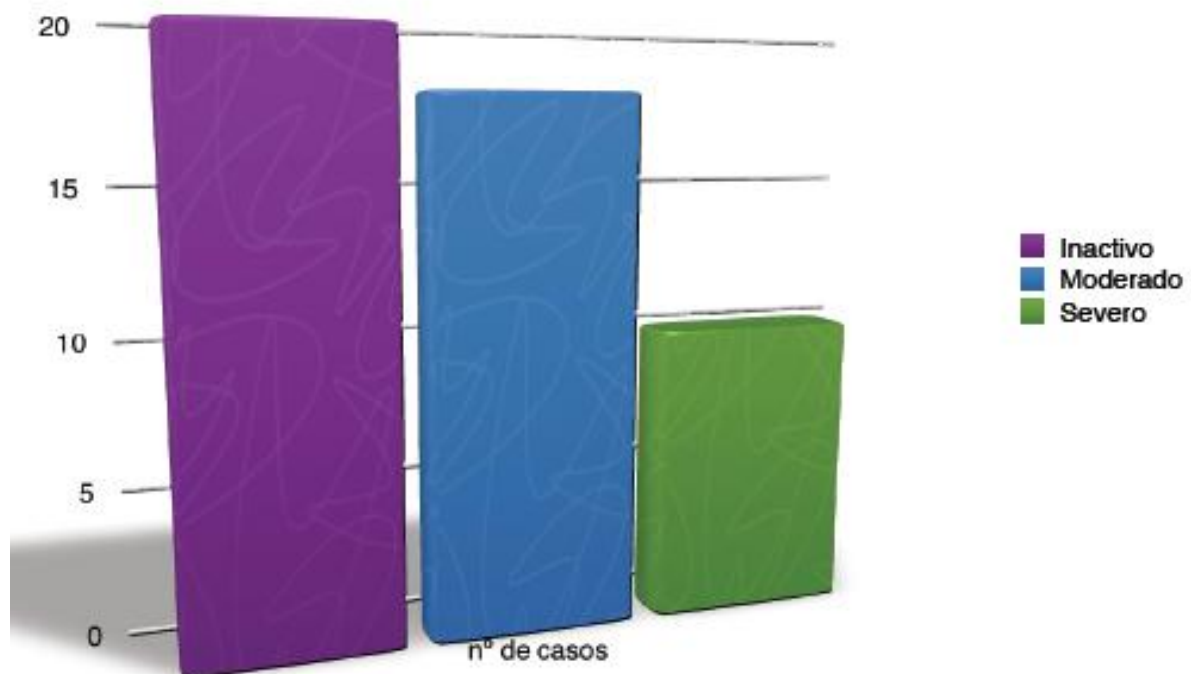
Aplicando SLEDAI-2K (**Figura 13**), veinte pacientes obtuvieron cero puntos, once pacientes entre 1 y 2 puntos, cinco pacientes 3-4 puntos, dos pacientes 5-7 puntos, tres pacientes 8 puntos, un paciente 10 puntos, dos pacientes 11-12 puntos, otro paciente obtuvo 14 puntos, y finalmente tres pacientes más de 14 puntos. Conformados los tres grupos, tal cual se menciona en Material y Métodos (**Figura 14**), los pacientes sin actividad (n=20), con actividad moderada (n=18), y con actividad severa de la enfermedad (n=10), no mostraron grandes diferencias respecto a la edad, aunque debe destacarse una media de 36 años en el grupo con actividad severa, al igual que el predominio del sexo femenino en los tres grupos (**Tabla 14**).

Figura 13.—Puntuación con SLEDAI-2K, porcentajes



Al respecto de los datos aportados por la analítica de rutina, los pacientes del grupo con actividad severa presentaron un recuento más bajo de linfocitos en sangre periférica que los pacientes del grupo con enfermedad inactiva o moderada. El grupo con actividad grave mostró, unos niveles más bajos de complemento C3 y C4 séricos que los pacientes sin actividad de la enfermedad. No obstante, cabe destacar que el perfil de auto-anticuerpos fue similar en los tres grupos, con excepción de los anticuerpos anti-SS-A(Ro) que predominaron en los inactivos (**Tabla 14**).

Figura 14.—Grupos constituidos por SLEDAI-2K



Respecto a los antecedentes personales, destaca la existencia de:

- Dos varones con LES inactivo, dos varones y una mujer con actividad moderada según SLEDAI, y una mujer con enfermedad severamente activa que habían presentado Síndrome Antifosfolípico.
- Una mujer sin actividad lúpica que había sufrido en el pasado de una sífilis secundaria, el tratamiento había sido apropiado y durante el estudio no mostró ni signos ni síntomas de la enfermedad.
- Otra mujer, con enfermedad inactiva, que presentó una Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) moderada.

- Serología positiva frente a *Trypanosoma cruzi* en ausencia de síntomas en otra mujer sin actividad lúpica.
- Otra mujer, con enfermedad inactiva, que presentó de forma concomitante una rosácea.
- Una mujer, con enfermedad inactiva, en la que la determinación de citoquinas se realizó estando embarazada de 6 meses.
- Una mujer, con actividad moderada de la enfermedad, que había superado un cáncer de mama y se encontraba libre de enfermedad neoplásica activa en el momento de la toma de la muestra.
- Una mujer con actividad moderada que había superado una tuberculosis renal y no presentó insuficiencia renal en el momento del estudio.
- Otra mujer con un lupus severamente activo que presentó como antecedentes personales cardiopatía isquémica e insuficiencia valvular mitral.
- Finalmente, otra mujer, con actividad severa, que padecía diabetes mellitus tipo 1 e hipotiroidismo.

El resto de pacientes incluidos en el estudio no presentaron antecedentes personales relevantes.

Tabla 14.—Características clínicas de los pacientes

| | Sin actividad (SLEDAI-2K cero) (n = 20) | Actividad moderada (SLEDAI-2K 1-7) (n=18) | Actividad severa (SLEDAI-2K ≥8) (n=10) |
|----------------------------------|---|--|--|
| Edad | 42.5[11.8] | 41.6[9.4] | 36.0[14.6] |
| Sexo (M/V) | 17/3 | 15/3 | 8/2 |
| Leucocitos (n/mm ³) | 7254.0[2343.9] | 6720.0[1988.5] | 5800.0[2524.8] |
| Linfocitos (n/mm ³) | 2041.0[825.6] | 2202.8[949.9] | 1385.0[906.8]*† |
| Monocitos (n/mm ³) | 425.5[139.7] | 446.1[157.1] | 387.0[198.8] |
| Neutrófilos (n/mm ³) | 4407.5[1987.8] | 3897.8[1427.1] | 3923.0[1789.7] |
| Velocidad de sedimentación | 13.6[11.6] | 21.1[15.4] | 20.7[22.1] |
| Urea (suero) | 39.6[23.9] | 41.1[20.1] | 40.4[23.2] |
| IgG (suero) | 1198.4[669.0] | 1548.7[861.9] | 1209.4[541.5] |
| IgA (suero) | 265.2[181.1] | 242.7[177.3] | 196.2[148.5] |
| IgM (suero) | 100.6[83.6] | 112.3[92.4] | 135.3[107.5] |
| C3 (suero) | 119.6[32.0] | 101.1[36.4] | 80.3[23.0]* |
| C4 (suero) | 20.7[6.0] | 14.2[7.8]* | 13.4[15.0]* |
| Ac anti-ADN(no/sí) | 16/4 | 15/3 | 6/4 |
| Ac anti-SS-A(Ro) (no/sí) | 10/10 | 10/8 | 9/1* |
| Ac anti-SS-B(La) (no/sí) | 14/6 | 15/3 | 9/1 |
| Ac anti-Sm (no/sí) | 19/1 | 18/0 | 10/0 |
| Ac anti-nucleosoma (no/sí) | 14/6 | 14/4 | 6/4 |
| Ac anti-cardiolipina IgM (no/sí) | 20/0 | 17/1 | 9/1 |
| Ac anti-cardiolipina IgG (no/sí) | 20/0 | 16/2 | 8/2 |
| Corticoides sólo (sí/no) | 15/5 | 13/5 | 5/5 |
| Afectación renal (no/sí) | 17/3 | 13/5 | 4/6* |

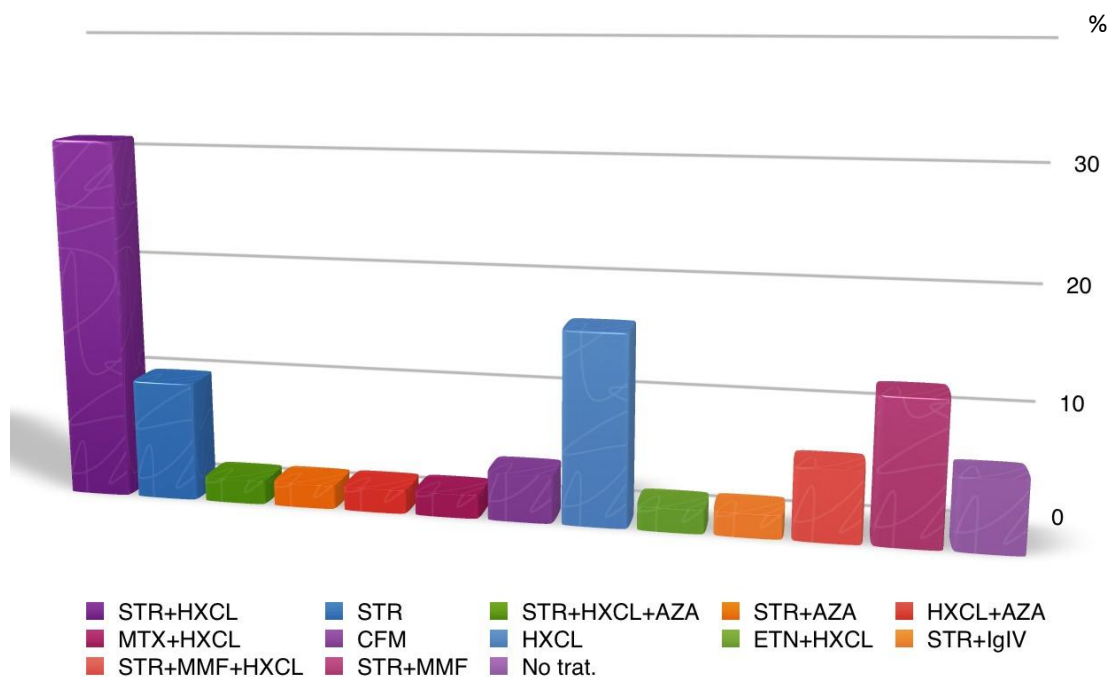
Las variables cuantitativas se muestran de la siguiente forma: media [desviación estándar]. *más frecuente respecto al grupo con enfermedad inactiva. †más frecuente respecto al grupo con actividad moderada de la enfermedad

Respecto al tratamiento inmunosupresor de los pacientes participantes al momento de su inclusión en el estudio (**Figura 15**), el 31% de los pacientes mantenían un tratamiento con prednisona e hidroxiquina, el 17% sólo con hidroxiquina, el 12% con MMF (Micofenolato mofetil) asociado a corticoides, y el 11% con corticoides solos. Tres pacientes

seguían un tratamiento con MMF, hidroxicloroquina y esteroides. Un paciente en tratamiento con etanercept e hidroxicloroquina, para tratamiento de sus manifestaciones articulares. Otro paciente era tratado con inmunoglobulinas intravenosas. Se recogió el uso de azatioprina combinada con esteroides y/o hidroxicloroquina. También se recogió el uso de metotrexato asociado a hidroxicloroquina.

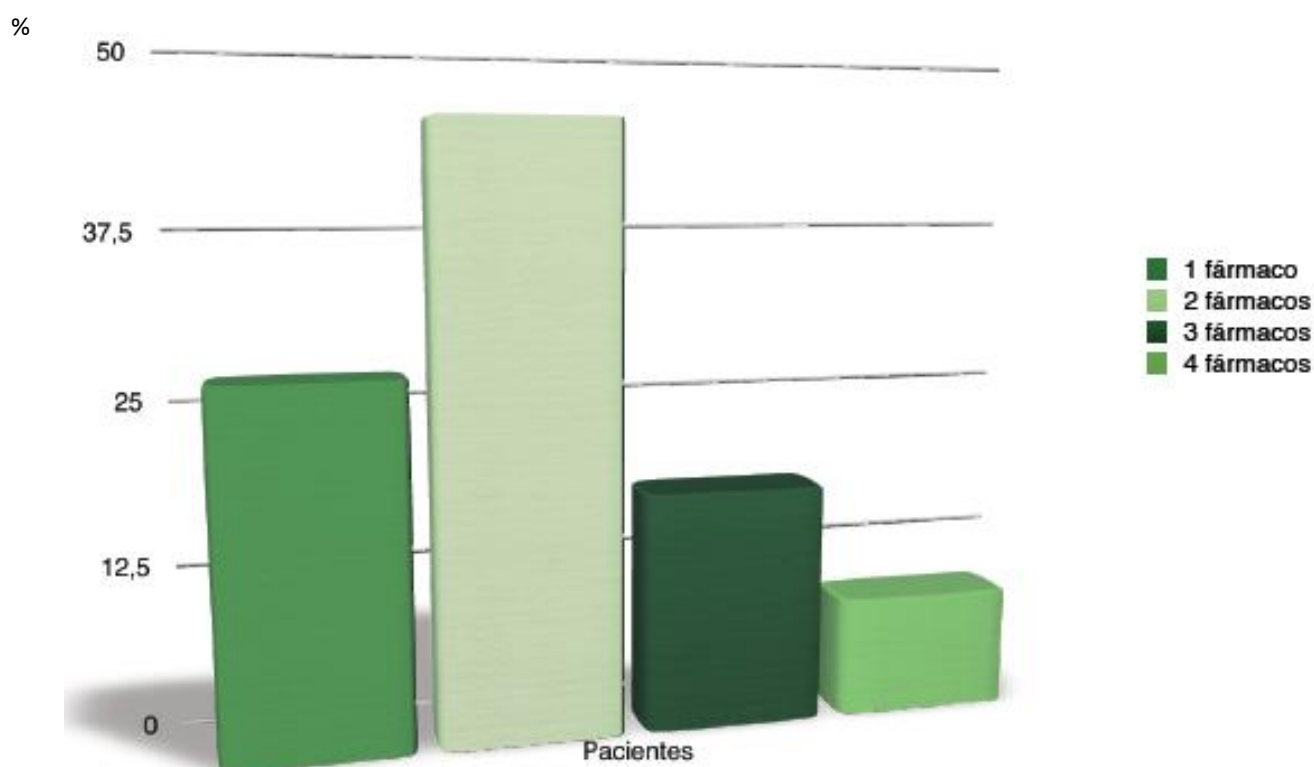
Un paciente había sido tratado con una pauta estándar de seis ciclos mensuales de ciclofosfamida (500 mg/m² superficie corporal) después de una dosis total de 3gr de 6-metilprednisolona administrados en 6 días. Este paciente seguía un tratamiento sólo con esteroides cuando se le incluyó en el estudio. Finalmente, otro paciente, que también fue tratado con ciclofosfamida, mantenía un tratamiento con MMF y corticoides.

Figura 15.—Tratamiento inmunosupresor, porcentajes



Cabe destacar además que, de los 48 pacientes incluidos, trece recibían tratamiento con algún fármaco con actividad sobre el SRAA (Sistema renina-angiotensina-aldosterona) (**Figura 16**). Solo dos pacientes de estos trece tomaban IECA, y/o ARA-II, y/o inhibidores de la renina, y/o antagonistas de la aldosterona, como tratamiento de una hipertensión arterial. Estos medicamentos se indicaron como tratamiento de la proteinuria, recogándose principalmente en los pacientes con historia de afectación renal lúpica. Lo más frecuente fue el tratamiento con dos de estos fármacos, seguido de la monoterapia.

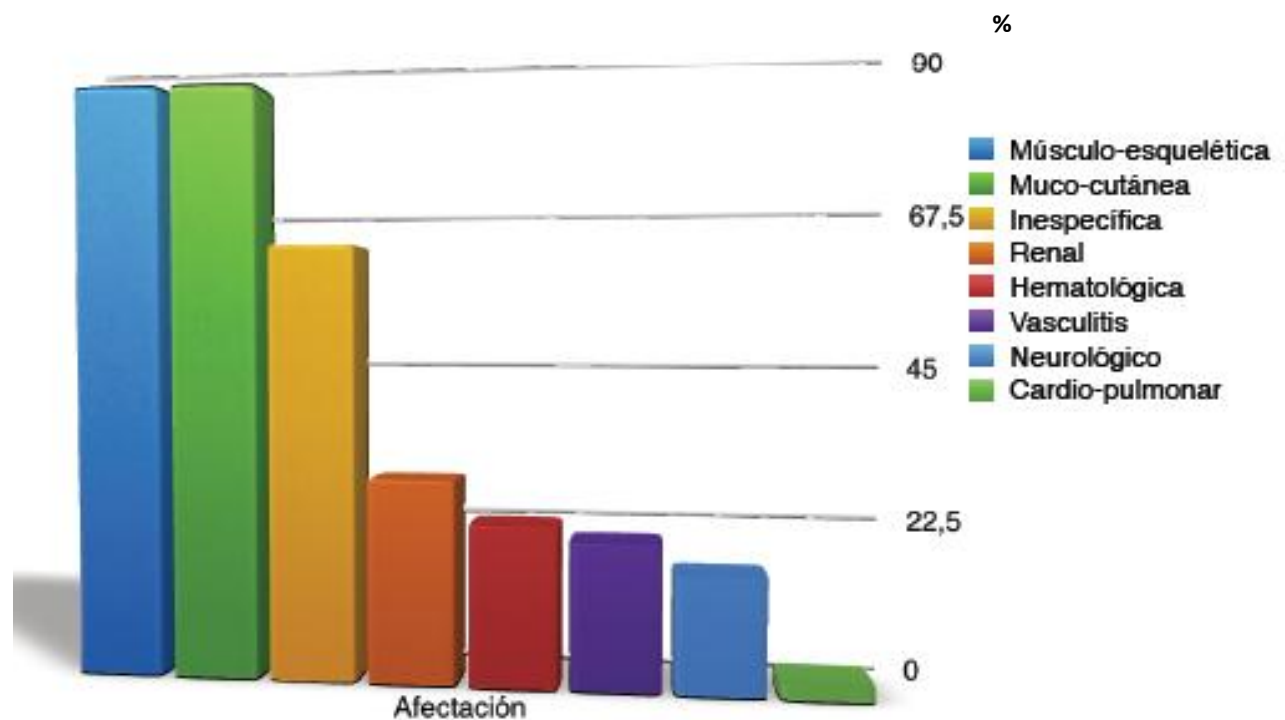
Figura 16.—Tratamiento anti-proteinúrico, porcentajes



5.1.2 Afectación orgánica

En nuestra población las manifestaciones músculo-esqueléticas y muco-cutáneas fueron las más frecuentes (**Figura 17**), ambas presentes de igual manera en 41 pacientes. Ocupando el segundo puesto, los síntomas generales fueron la principal molestia de 30 pacientes.

Figura 17.—Afectación órgano por órgano, porcentajes



En 14 pacientes se puso de manifiesto la presencia de afectación renal (**Tabla 15**), definida por la presencia de proteinuria mayor o igual de 0.5 gr/24 horas, o creatinemia mayor de 1.1 mg/dl en mujeres y mayor de 1.3 mg/dl en hombres, o sedimento urinario alterado con

más de 5 hematies/campo o más de 6 leucocitos/campo, o presencia de células epiteliales descamativas.

Once pacientes habían presentado leucopenia y/o plaquetopenia. En 10 pacientes se recogió algún tipo de vasculitis, que se asoció al diagnosticado de LES. Ocho pacientes refirieron molestias de tipo neurológico, se trató de cefaleas principalmente, seguido de cuadros de depresión. En una paciente se recogieron molestias que correspondieron a pleuritis y pericarditis.

Las manifestaciones músculo-esqueléticas y muco-cutáneas continuaron siendo frecuentes en los tres grupos constituidos por SLEDAI. Sin embargo, en los diez pacientes con actividad grave los síntomas generales pasaron a ocupar el primer lugar, al ser referidos por todos ellos. Así, ocupando el segundo y tercer lugar, las afectaciones músculo-esquelética y muco-cutánea fueron referidas por siete y cinco pacientes respectivamente. Los siete pacientes con manifestaciones músculo-esqueléticas fueron cinco mujeres y dos varones. Los cinco pacientes con afectación muco-cutánea presentaban además afectación músculo-esquelética, y fueron cuatro mujeres y un varón.

Aplicando BILAG, se alcanzó la categoría C en los diez pacientes con enfermedad severamente activa y síntomas generales.

Se alcanzó la categoría B en los cinco pacientes con afectación muco-cutánea y $SLEDAI-2K \geq 8$, principalmente por el empeoramiento y/o la nueva aparición de un eritema malar. En el resto de casos con afectación muco-cutánea se obtuvo un BILAG C o D.

En una paciente severamente activa y que presentó un episodio de artritis "*de novo*", se obtuvo un BILAG B. En los restantes 6 pacientes con afectación músculo-esquelética y SLEDAI-2K ≥ 8 se obtuvo un BILAG C por el empeoramiento de sus habituales artralgias y mialgias. En el resto de casos con afectación músculo-esquelética se obtuvo un BILAG D.

5.1.3 Nefropatía lúpica

De los catorce pacientes con datos de nefropatía lúpica al momento de su inclusión en el estudio, tres no presentaban actividad de la enfermedad según SLEDAI, cinco presentaban moderada actividad, y seis una enfermedad severamente activa.

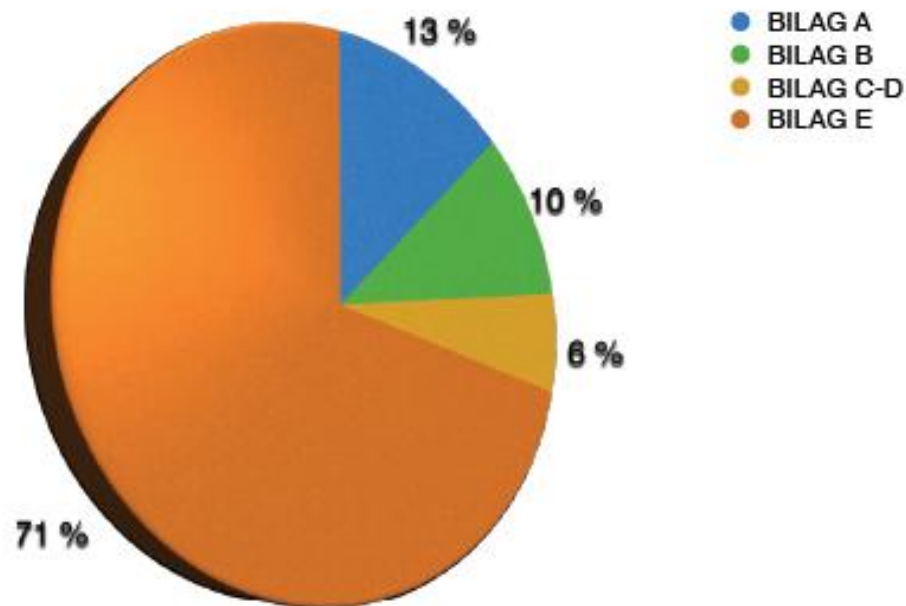
Aplicando BILAG, alcanzaron la categoría B los cinco pacientes con moderada actividad. Los seis pacientes con SLEDAI-2K ≥ 8 alcanzaron la categoría A definitoria de brote (**Figura 18**).

Los seis pacientes en brote renal correspondieron a los cinco pacientes que presentaban una afectación músculo-esquelética y muco-cutánea a la vez, y a uno de los dos varones con sólo afectación músculo-esquelética.

Tabla 15.- Pacientes con nefropatía lúpica

| Paciente | Sexo | SLEDAI-2K | BILAG | Biopsia renal | Tratamiento |
|-----------------|-------------|------------------|--------------|----------------------|---|
| 1 | F | 0 | C | Tipo IV | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 2 | M | 0 | D | Tipo IV | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 3 | F | 0 | C | Tipo II | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 4 | F | 4 | B | tubulo-intersticial | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 5 | F | 2 | B | Tipo IV | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 6 | F | 2 | B | No realizada | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 7 | F | 2 | B | Tipo II | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 8 | M | 6 | B | Tipo III | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 9 | F | 16 | A | Material insuf | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina + MMF |
| 10 | F | 12 | A | Material insuf | Corticoides<10 mg/24h |
| 11 | F | 8 | A | Material insuf | Corticoides<10 mg/24h |
| 12 | F | 8 | A | Tipo IV | Corticoides + MMF |
| 13 | M | 10 | A | Tipo III | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |
| 14 | M | 23 | A | Tipo II | Corticoides<10 mg/24h + hidroxicloroquina |

Figura 18.—BILAG para la afectación renal



Estos seis pacientes en brote renal presentaban una proteinuria mayor 0.5 gr/24 horas, la mitad de estos con un sedimento activo (hematuria lo más frecuentemente). Se observó, además, que uno de estos seis pacientes (un varón) presentaba asociado un deterioro de la función renal, con un aumento de la creatinemia de alrededor del 50%, equivalente a un descenso del filtrado glomerular hasta menos de 50 ml/min.

Habiendo sido diagnosticados de brote, estos seis pacientes ingresaron para el tratamiento indicado según nuestro protocolo. Estos pacientes fueron tratados con ciclofosfamida intravenosa (500 mg/m² superficie corporal) tras tres bolos diarios de 1 gr de 6-metilprednisolona, con recuperación de la proteinuria y normalización del sedimento en cinco de ellos. El paciente varón que presentaba deterioro de su función renal, el cual recibió la misma pauta, sólo mostró un descenso de la proteinuria hasta los 0.3-0.5 gr/24 horas con normalización del sedimento, pero sin recuperación alguna del filtrado glomerular.

5.1.4 Determinación de citoquinas en orina

Los valores de ninguna de las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento medidos en orina seguían una distribución según la ley de Laplace-Gauss, como lo indicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnovb y Shapiro-Wilk.

Los mediadores inmunológicos que aparecen a continuación presentaron valores que se encontraron por debajo del límite de detección para el método que utilizamos (fueron equiparados al nivel de detección tal cual se explica en Material y Métodos): IL-9, IL-15, FGF-b, MIP-1 α , IL-1 β , IL-17, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α .

Las restantes 13 citoquinas, que resultaron detectables, presentaron los siguientes valores (mediana y desviación estándar): IL-1RA (35.47 \pm 1362.92), IP-10 (320.12 \pm 6210.17), VEGF (225.78 \pm 654.94), IL-8 (7.91 \pm 173.48), IL-7 (2.11 \pm 18.77), MCP-1 (24.47 \pm 63.67), MIP-1 β (6.53 \pm 92.36), IL-12 (14.24 \pm 24.98), Eotaxina (1.51 \pm 84.72), PDGF-BB (1.33 \pm 39.33), RANTES (1.27 \pm 42.07), IL-6 (1.96 \pm 39.56), e IL-10 (1.71 \pm 3.04). Algunos de estas citoquinas se detectaron a niveles muy cercanos al límite inferior, con valores muy parecidos en pacientes con enfermedad inactiva, moderada y severa, respectivamente (número de pacientes pertenecientes a cada categoría): Eotaxina (1, 3, 3); PDGF-BB y RANTES (1, 2, 1); IL-6 (1, 4, 2), e IL-10 (6, 4, 5).

Las citoquinas que resultaron detectables lo fueron en los 10 pacientes catalogados como severos según SLEDAI-2K (**Tabla 16**).

IP-10 fue la única quimiocina cuyos niveles urinarios alcanzaron el límite superior de detección fijado por el fabricante. Este resultado se obtuvo en una mujer embarazada de seis meses, con enfermedad inactiva (ver características clínicas de la población).

Tabla 16.- Citoquinas detectables en pacientes severos

| Paciente | Proteinuria gr/24h | IL-1RA | IP-10 | VEGF | IL-8 | IL-7 | MCP-1 | MIP-1b | IL-12 |
|-----------------|-------------------------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| 1 | 0.86 | 2180.64 | 12.88 | 16.89 | 11.23 | 1.68 | 96 | 1.26 | 3.83 |
| 2 | 1.25 | 2.06 | 526.79 | 204.43 | 179.47 | 10.68 | 99.67 | 30.82 | 13.37 |
| 3 | 0 | 2.06 | --- | --- | --- | --- | 43.55 | --- | --- |
| 4 | 0 | 2933.42 | 681.02 | 624.29 | 173.52 | 9.68 | 102.49 | 11.56 | 28.48 |
| 5 | 0.55 | 40.19 | 209.32 | 116.65 | 42.95 | 1.68 | 110.49 | 1.26 | 6.8 |
| 6 | 0 | 11.93 | 3547.74 | 1055.78 | 6.91 | 41.57 | 133.57 | 44.57 | 30.21 |
| 7 | 0.92 | 2.06 | 1009.65 | 636.19 | 1.67 | 28.24 | 139.76 | 15.9 | 35.17 |
| 8 | 2.05 | 339.15 | 2032.69 | 2625.26 | 20.27 | 33.98 | 144 | 178.4 | 59.78 |
| 9 | 0.56 | 3337.59 | 14262.3 | 1805.86 | 862.48 | 106.42 | 238.98 | 55.65 | 69.44 |
| 10 | 0 | 1909.71 | 2327.1 | 49.77 | 29.05 | 0.37 | 308.41 | 32.26 | 3.83 |

5.2 Análisis de contraste

5.2.1 Mediadores inmunológicos en orina en enfermos lúpicos y población sana

Con las pruebas del Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher se compararon la distribución de frecuencias para IL-1RA, IP-10, VEGF, IL-8, IL-7, MCP-1, MIP-1 β , e IL-12, entre sanos y enfermos, no observando diferencias significativas para ninguna de ellas.

5.2.2 Diferencias significativas halladas

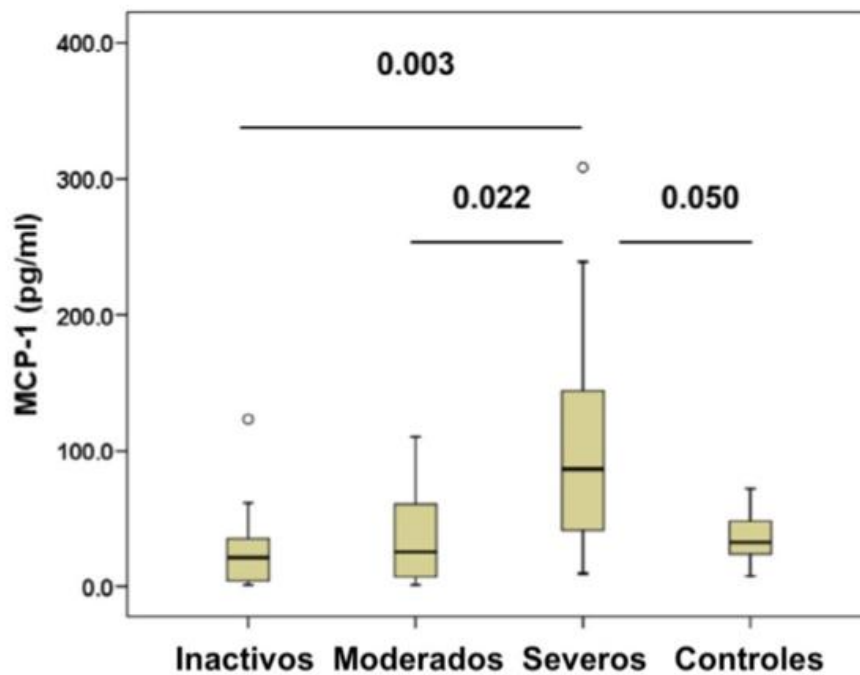
Utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney, se compararon los valores en orina de IL-1RA, IP-10, VEGF, IL-8, IL-7, MCP-1, MIP-1 β , e IL-12 entre pacientes y controles sanos, no hallándose diferencias significativas respecto a ninguna de estas moléculas.

Utilizando la prueba de la H de Kruskal-Wallis, se compararon estas mismas citoquinas entre cada uno de los grupos de pacientes definidos por SLEDAI-2K (inactivo, moderado y severo), hallándose sólo diferencias significativas con IL-8, MIP-1 β y MCP-1, con un valor- p de 0.01, 0.04 y 0.003 respectivamente. No obstante, con la prueba de la U de Mann-Whitney, al comparar enfermos inactivos con moderados, y enfermos moderados con severos, se observó que las diferencias dejaban de ser significativas con IL-8 y MIP-1 β .

Para MCP-1 las diferencias fueron significativas al comparar pacientes inactivos con moderado y severos con un valor- p de 0.003. Se obtiene un valor- p de 0.050 al comparar enfermos severos con controles sanos. Por último, se obtiene un valor- p de 0.022 al comparar

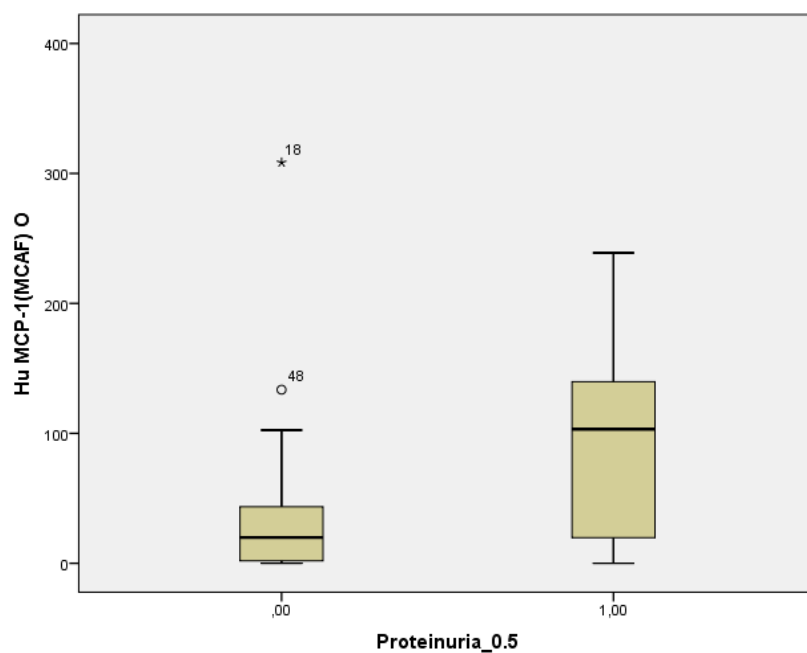
enfermos con actividad moderada y enfermos con actividad severa. Las diferencias no fueron significativas al comparar controles sanos con pacientes inactivos. (**Figura 19**).

Figura 19.—Niveles en orina de MCP-1 en LES inactivo, moderado, severo y controles sanos



También, con el estadístico apropiado, se compararon los niveles de MCP-1 entre enfermos severos sin y con afectación renal definida por la presencia de proteinuria mayor o igual de 0.5 gr/24 horas (**Figura 20**), siendo estos significativamente más elevados en aquellos pacientes con afectación renal lúpica ($p < 0.05$) [(mediana, rango intercuartil con afectación renal); (mediana, rango intercuartil sin afectación renal)]: [(103.3, 126.3); (19.8, 43.1)].

Figura 20.—Niveles en orina de MCP-1 en pacientes con o sin proteinuria



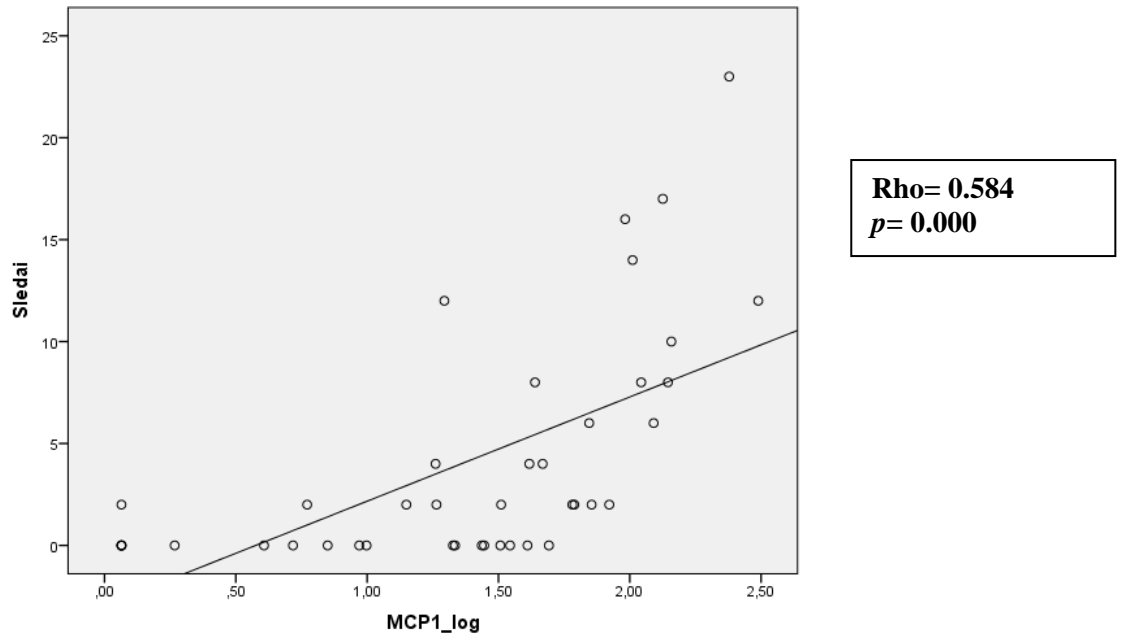
5.3 Análisis de correlación y capacidad diagnóstica

5.3.1 Asociación entre citoquinas en orina y la clínica

Con el coeficiente de correlación de Spearman (aplicando la corrección de Bonferroni) se midió la asociación o interdependencia entre IL-1RA, IP-10, VEGF, IL-8, IL-7, MCP-1, MIP-1 β , e IL-12, y el resultado obtenido con SLEDAI-2K, así como con los siguientes parámetros de laboratorio: leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrofilos, VSG, urea, IgG, IgA, IgM, C3 y C4.

Sólo MCP-1 se correlaciona directamente con SLEDAI-2K (coeficiente de correlación , p): (0.584, 0.000) (**Figura 21**).

Figura 21.—Análisis de correlación entre MCP-1 y SLEDAI-2K



MCP-1 se correlaciona inversamente con los niveles séricos de complemento C3 (-0.475, 0.001) (Figura 22) y C4 (-0.509, 0.001) (Figura 23), y con los leucocitos (-0.301, 0.002) en sangre periférica (Figura 24).

Figura 22.—Análisis de correlación entre MCP-1 y C3

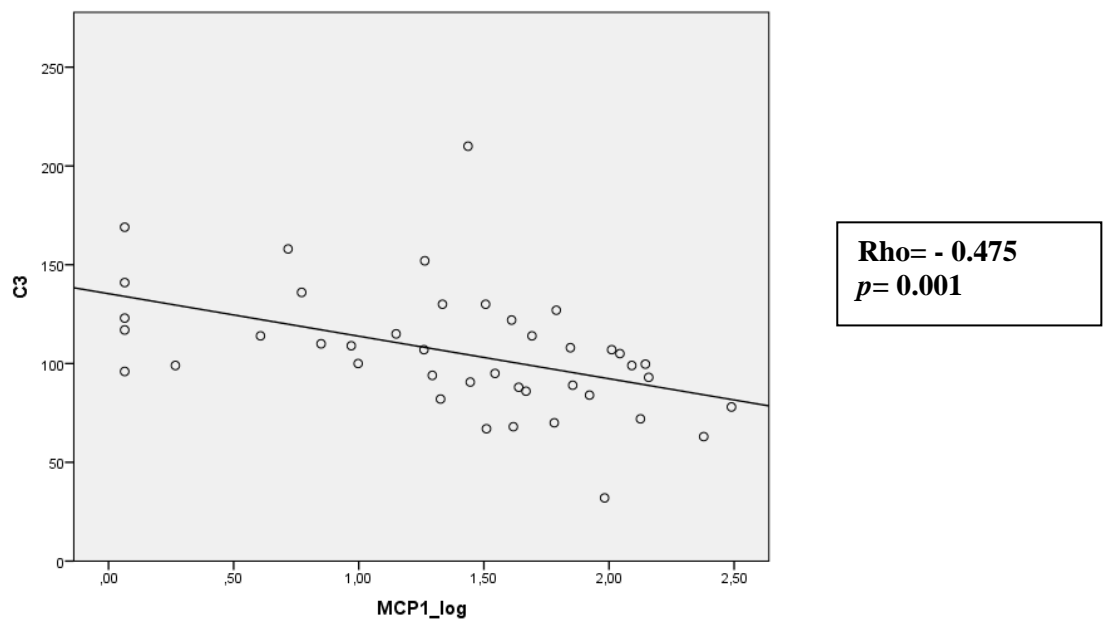


Figura 23.—Análisis de correlación entre MCP-1 y C4

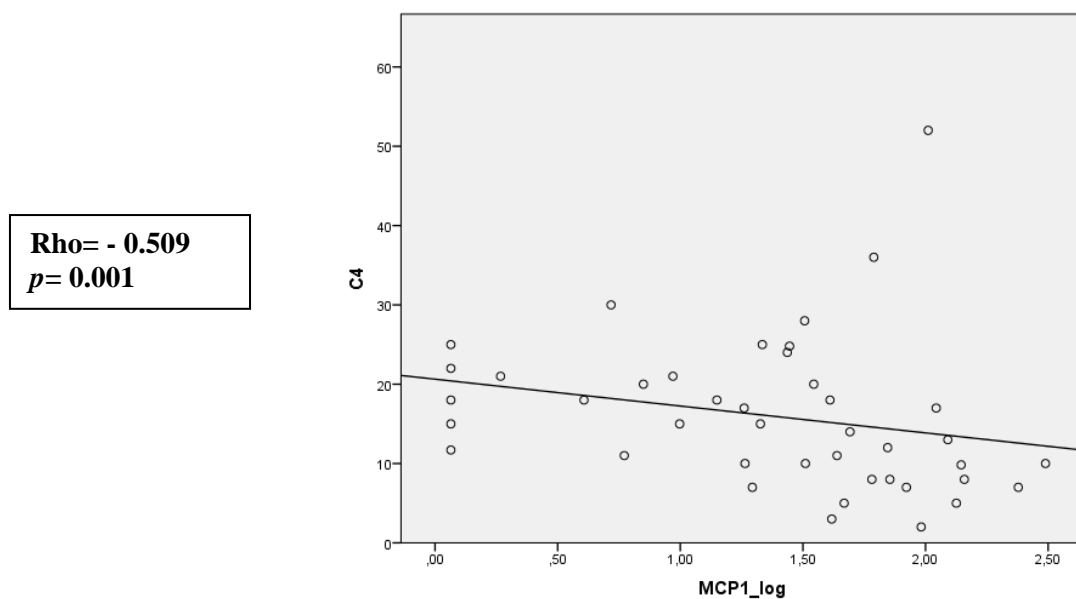
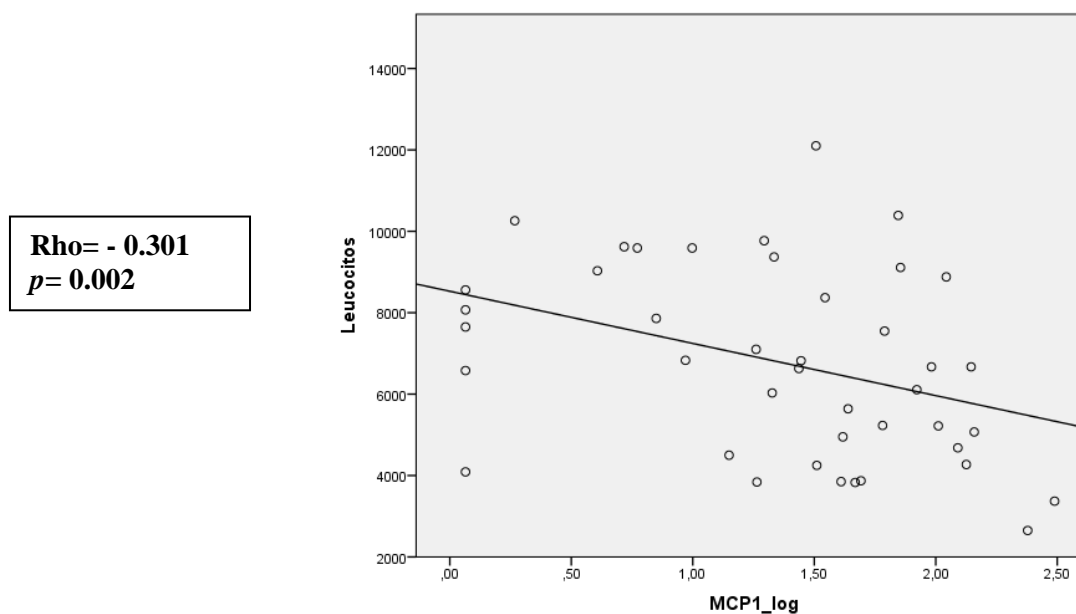


Figura 24.—Análisis de correlación entre MCP-1 y Leucocitos



No observamos ninguna otra asociación significativa entre las otras citoquinas y SLEDAI, o con algún parámetro de laboratorio.

MIP-1 β e IL-8 no tienen una correlación significativa con SLEDAI-2K (coeficiente de correlación , p): (0.304, 0.036) (**Figura 25**) y (0.163, 0.269) (**Figura 26**), respectivamente.

Figura 25.—Análisis de correlación entre MIP-1 β y SLEDAI-2K

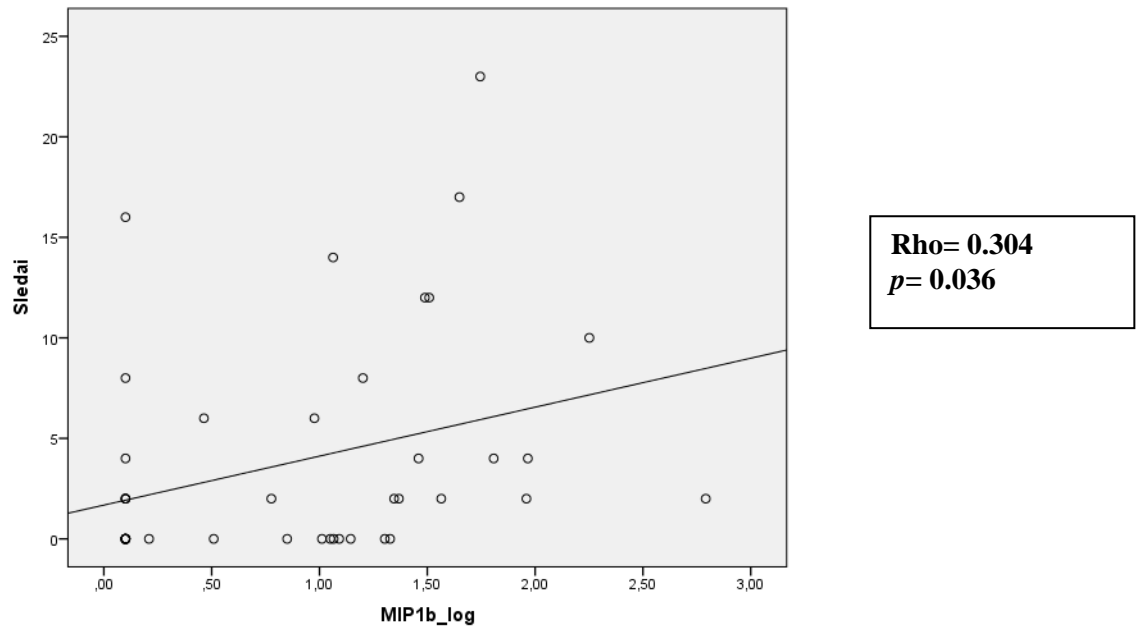
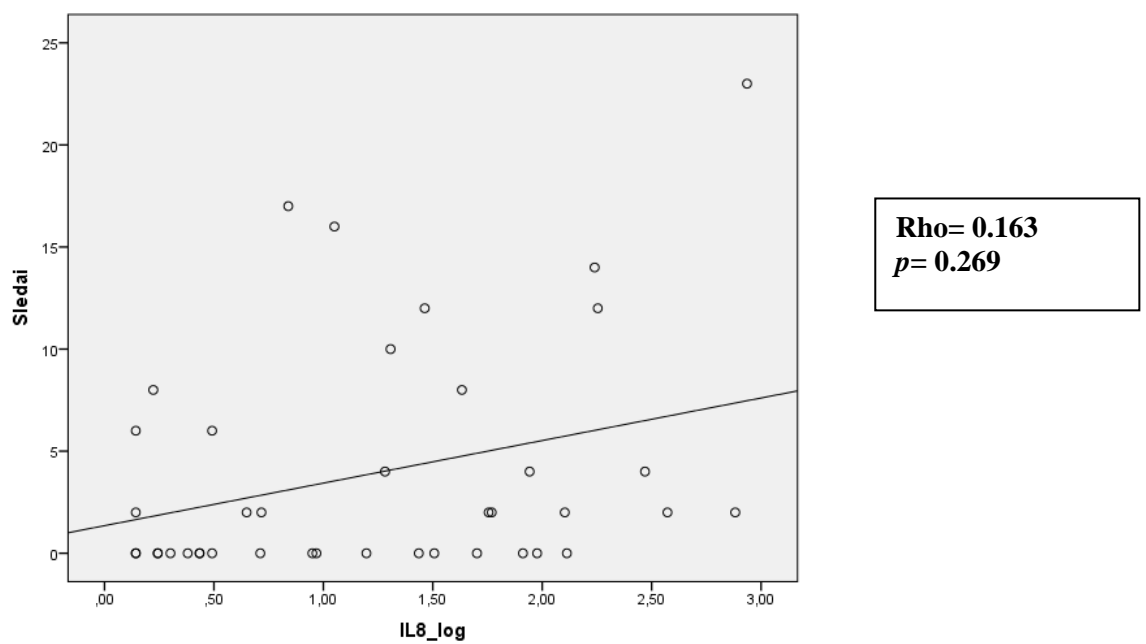


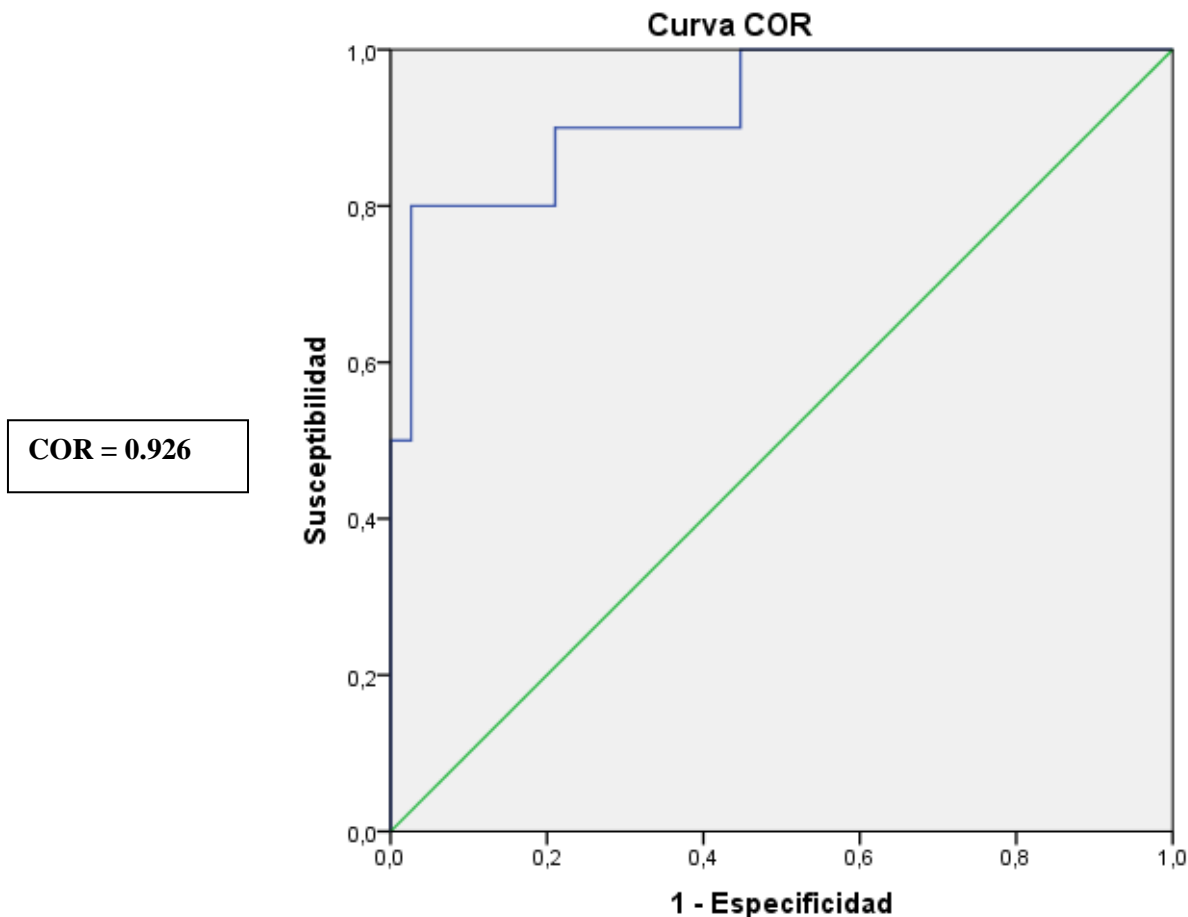
Figura 26.—Análisis de correlación entre IL-8 y SLEDAI-2K



5.3.2 Capacidad de diagnóstico de las citoquinas en orina

Se calculó el área bajo la curva COR ("AUROC" por sus siglas en inglés) con IL-1RA, IP-10, VEGF, IL-8, IL-7, MCP-1, MIP-1 β , e IL-12, para detectar SLEDAI \geq 8. MCP-1 permite diagnosticar actividad severa global de la enfermedad [AUROC, (IC95%), p , error típico]: [0.926, (0.832-1.00), 0.0001, 0.048] (**Figura 27**).

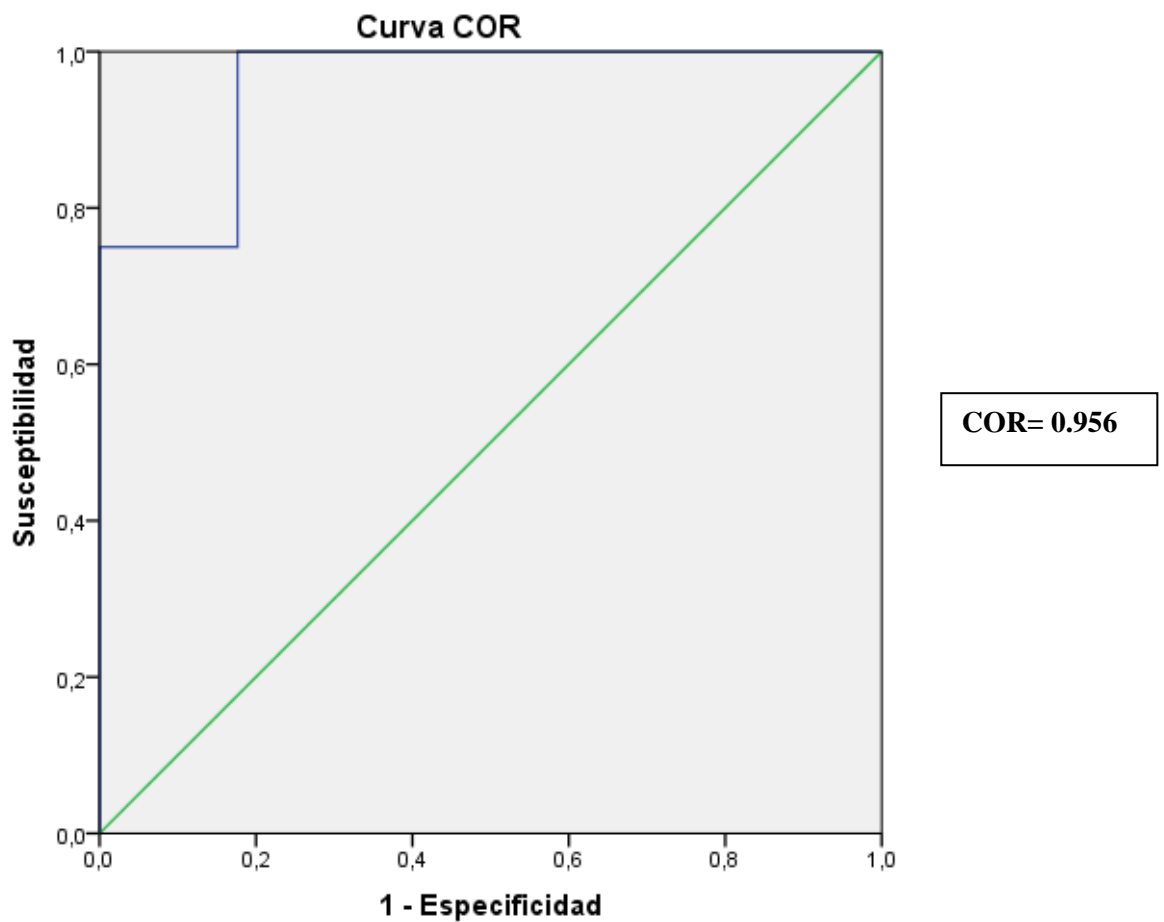
Figura 27.- Cálculo del área bajo la curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI \geq 8



Curva COR MCP-1 para SLEDAI \geq 8 en pacientes con proteinuria \geq 0.5 gr/24 horas o sin proteinuria (sensibilidad: 100%; especificidad: 98%).

Considerando sólo a los pacientes sin proteinuria (o con una eliminación de proteínas en orina menor de 0.5 gr/24 horas), el área bajo la curva de MCP-1 para detectar SLEDAI ≥ 8 aumenta ligeramente [0.956, (0.87-1.00), 0.003, 0.44] (**Figura 28**).

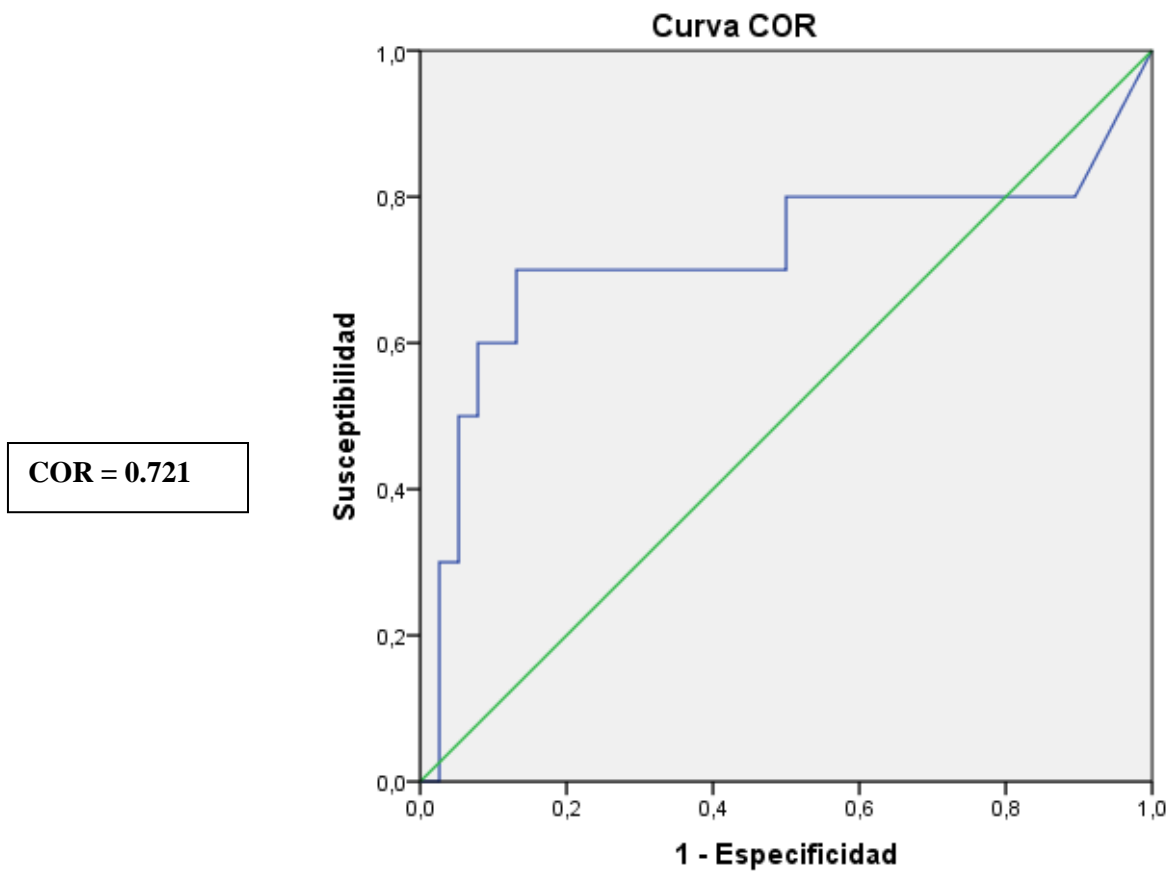
Figura 28.- Cálculo del área bajo la curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI ≥ 8 , en pacientes sin proteinuria



Curva COR MCP-1 en SLEDAI ≥ 8 para pacientes sin proteinuria
(sensibilidad: 100%; especificidad: 82%).

El área bajo la curva disminuye y muestra una forma atípica (parte de ella cae por debajo del área de 0.5) si consideramos sólo a los pacientes con proteinuria [0.721, (0.491-0.951), 0.033, 0.118] (**Figura 29**).

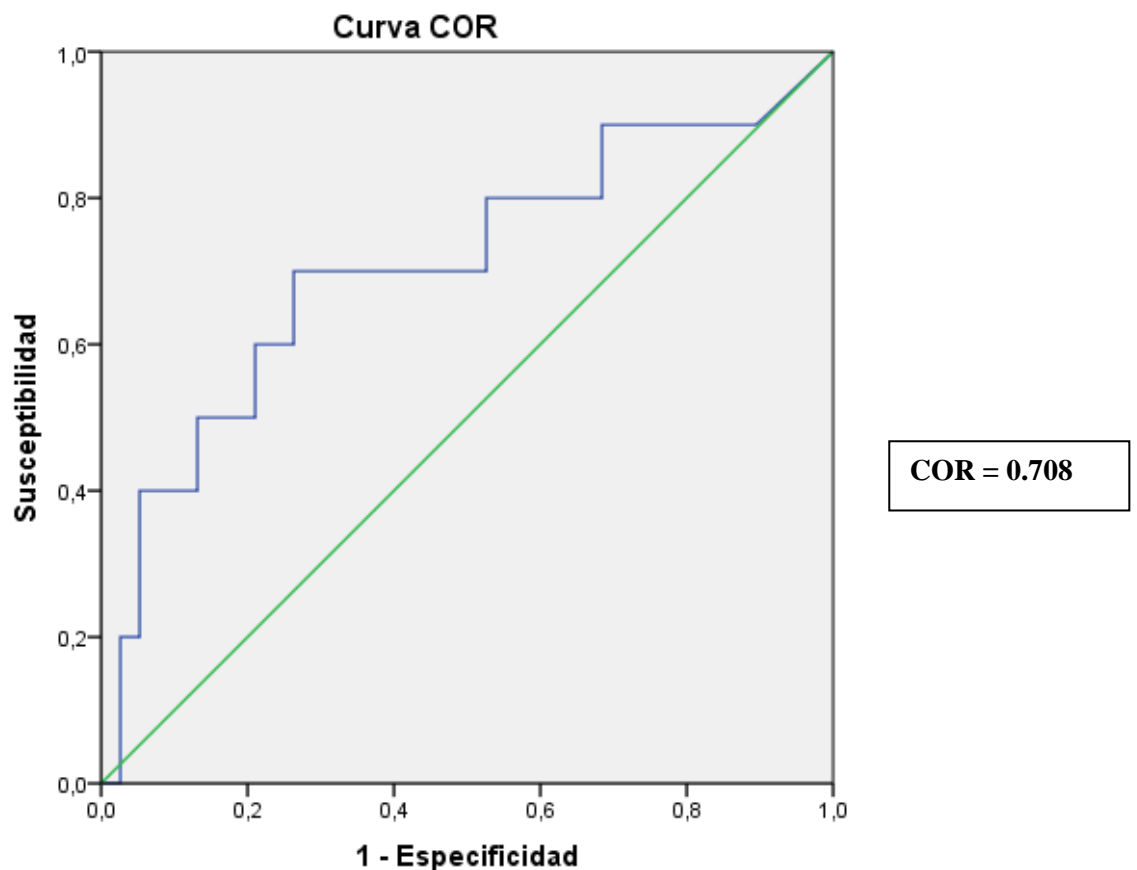
Figura 29.- Cálculo del área bajo la curva COR con MCP-1, para detectar SLEDAI ≥ 8 , en pacientes con proteinuria $\geq 0.5\text{gr}/24\text{h}$



Curva COR MCP-1 para SLEDAI ≥ 8 en pacientes con proteinuria (sensibilidad: 81%; especificidad: 67%).

El área bajo la curva con IP-10 [0.708, (0.505-0.911), 0.045, 0.103] puede también considerarse buena, a efectos de atribuir a esta quimiocina la capacidad de detectar actividad severa de la enfermedad. Pero cabe destacar la forma atípica de la curva dibujada (parte de ella se encuentra sobre la línea de no discriminación, lo cual quiere decir que la capacidad diagnóstica puede no existir y los resultados sean productos del azar, por lo que se plantea realizar un modelo de regresión logística para hallar la predictividad de esta quimiocina) (Figura 30).

Figura 30.- Cálculo del área bajo la curva COR con IP-10, para detectar SLEDAI ≥ 8



Curva COR IP-10 para SLEDAI ≥ 8 (sensibilidad: 82%; especificidad: 76%).

5.4.- Capacidad de predicción

Cuantificamos el riesgo de presentar un lupus severo (SLEDAI-2K \geq 8) por regresión logística, en un modelo construido considerando MCP-1, hematuria, leucocituria y proteinuria de 24 horas. Los niveles elevados de MCP-1 suponen de riesgo para presentar un LES severo (Tabla 17). Cabe destacar el intervalo de confianza bastante estrecho para el valor de Exp (B) con MCP-1, respecto de la proteinuria, frente a la leucocituria y hematuria.

Tabla 17.—Regresión logística con MCP-1 para detectar LES grave, hematuria, leucocituria y proteinuria de 24 horas

| Variables | Coef. B | error típico | Wald | p | Exp (B) | IC95% |
|--------------------|---------|--------------|-------|-------|--------------|---------------|
| Proteinuria 24 hrs | 2,012 | 1,467 | 1,882 | 0,170 | 7,480 | 0,422-132,506 |
| Hematuria | 0,012 | 0,327 | 0,001 | 0,970 | 1,012 | 0,534-1,921 |
| Leucocituria | 0,180 | 0,110 | 2,665 | 0,103 | 1,197 | 0,965-1,486 |
| MCP-1 | 0,058 | 0,022 | 6,826 | 0,009 | 1,060 | 1,015-1,107 |
| Constante | -6,322 | 2,109 | 8,982 | 0,003 | 0,002 | |

Tabla 18.—Regresión logística con MCP-1 para detectar LES grave y proteinuria de 24 horas

| Variables | Coef. B | error típico | Wald | p | Exp (B) | IC95% |
|--------------------|---------|--------------|--------|-------|--------------|--------------|
| Proteinuria 24 hrs | 2,207 | 1,196 | 3,403 | 0,065 | 9,086 | 0,871-94,754 |
| MCP-1 | 0,0422 | 0,014 | 8,473 | 0,004 | 1,043 | 1,014-1,072 |
| Constante | -4,636 | 1,297 | 12,788 | 0,000 | 0,010 | |

Por regresión logística binaria, obtenemos que los niveles de MCP-1 en orina son un factor asociado a la presencia de LES severo, independientemente de la presencia de proteinuria, hematuria o leucocituria (**Tabla 18**).

Los niveles elevados de IP-10 no suponen de riesgo para un lupus severo (**Tabla 19**). El valor de Exp (B) confortado con el valor de Wald invitan a considerar a esta quimiocina como un factor de confusión. IP-10 es un marcador dependiente de la presencia de proteinuria.

Tabla 19.—Regresión logística con IP-10 para detectar LES grave y proteinuria de 24 horas

| Variables | Coef. B | error típico | Wald | p | Exp (B) | IC95% |
|--------------------|----------------|---------------------|-------------|----------|----------------|--------------|
| Proteinuria 24 hrs | 2,230 | 0,916 | 5,922 | 0,015 | 9,301 | 1,543-56,056 |
| IP-10 | 0,000 | 0,000 | 0,307 | 0,580 | 1,000 | 1,000-1,000 |
| Constante | -2,036 | 0,501 | 16,482 | 0,000 | 0,131 | |

5.5.- Puntos de corte para curvas ROC con capacidad diagnóstica

Para cada una de las curvas COR calculadas con capacidad diagnóstica, de acuerdo a la sensibilidad y especificidad más adecuadas, se fijó el valor de MCP-1 capaz de detectar la presencia de actividad de LES. Estos puntos de corte gozan de una alta precisión.

Independientemente de si los pacientes presentan proteinuria, un resultado de MCP-1 ≥ 42.5 pg/ml permite detectar actividad severa de la enfermedad, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 79% (**Tabla 20**).

Tabla 20 .- MCP-1 y SLEDAI-2K ≥ 8 para pacientes con y sin proteinuria. Punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad

| Positivo si es mayor o igual que ^a | Sensibilidad | 1 - Especificidad |
|---|--------------|-------------------|
| -1,00 | 1,000 | 1,000 |
| ,58 | 1,000 | ,842 |
| 1,51 | 1,000 | ,711 |
| 2,95 | 1,000 | ,684 |
| 4,64 | 1,000 | ,658 |
| 5,56 | 1,000 | ,632 |
| 6,49 | 1,000 | ,605 |
| 8,20 | 1,000 | ,579 |
| 9,64 | 1,000 | ,553 |
| 12,02 | 1,000 | ,526 |
| 16,16 | 1,000 | ,500 |
| 18,29 | 1,000 | ,474 |
| 19,02 | 1,000 | ,447 |
| 20,45 | ,900 | ,447 |
| 21,41 | ,900 | ,421 |
| 24,47 | ,900 | ,395 |
| 27,61 | ,900 | ,368 |
| 30,01 | ,900 | ,342 |
| 32,26 | ,900 | ,316 |
| 33,70 | ,900 | ,289 |

| | | |
|--------|------|------|
| 37,91 | ,900 | ,263 |
| 41,13 | ,900 | ,237 |
| 42,50 | ,900 | ,211 |
| 45,07 | ,800 | ,211 |
| 47,90 | ,800 | ,184 |
| 54,82 | ,800 | ,158 |
| 60,99 | ,800 | ,132 |
| 65,82 | ,800 | ,105 |
| 70,84 | ,800 | ,079 |
| 77,57 | ,800 | ,053 |
| 89,78 | ,800 | ,026 |
| 99,25 | ,700 | ,026 |
| 106,49 | ,600 | ,026 |
| 116,89 | ,500 | ,026 |
| 128,43 | ,500 | ,000 |
| 136,67 | ,400 | ,000 |
| 141,88 | ,300 | ,000 |
| 191,49 | ,200 | ,000 |
| 273,70 | ,100 | ,000 |
| 309,41 | ,000 | ,000 |

Un resultado de MCP-1 ≥ 42.5 pg/ml permite detectar actividad severa de la enfermedad en pacientes sin proteinuria (o proteinuria menor de 0.5 gr/24 horas), con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 82% (**Tabla 21**).

Tabla 21 .-MCP-1 y SLEDAI-2K ≥ 8 para pacientes sin proteinuria. Punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad

| Positivo si es mayor o igual que ^a | Sensibilidad | 1 - Especificidad |
|---|--------------|-------------------|
| -1,00 | 1,000 | 1,000 |
| ,58 | 1,000 | ,882 |
| 1,51 | 1,000 | ,735 |
| 2,95 | 1,000 | ,706 |
| 4,64 | 1,000 | ,676 |
| 5,56 | 1,000 | ,647 |
| 6,49 | 1,000 | ,618 |
| 8,20 | 1,000 | ,588 |
| 9,64 | 1,000 | ,559 |
| 12,02 | 1,000 | ,529 |
| 16,16 | 1,000 | ,500 |
| 18,29 | 1,000 | ,471 |
| 19,79 | 1,000 | ,441 |
| 21,41 | 1,000 | ,412 |
| 24,47 | 1,000 | ,382 |

| | | |
|--------|-------|------|
| 27,61 | 1,000 | ,353 |
| 30,01 | 1,000 | ,324 |
| 32,26 | 1,000 | ,294 |
| 33,70 | 1,000 | ,265 |
| 37,91 | 1,000 | ,235 |
| 41,13 | 1,000 | ,206 |
| 42,50 | 1,000 | ,176 |
| 45,07 | ,750 | ,176 |
| 47,90 | ,750 | ,147 |
| 54,82 | ,750 | ,118 |
| 60,99 | ,750 | ,088 |
| 66,57 | ,750 | ,059 |
| 77,57 | ,750 | ,029 |
| 93,02 | ,750 | ,000 |
| 118,03 | ,500 | ,000 |
| 220,99 | ,250 | ,000 |
| 309,41 | ,000 | ,000 |

Un resultado de MCP-1 ≥ 65.82 pg/ml permite detectar actividad severa de la enfermedad en pacientes con proteinuria mayor o igual de 0.5 gr/24 horas, con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 87% (**Tabla 22**).

Tabla 22 .-MCP-1 y SLEDAI-2K ≥ 8 para pacientes con proteinuria. Punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad

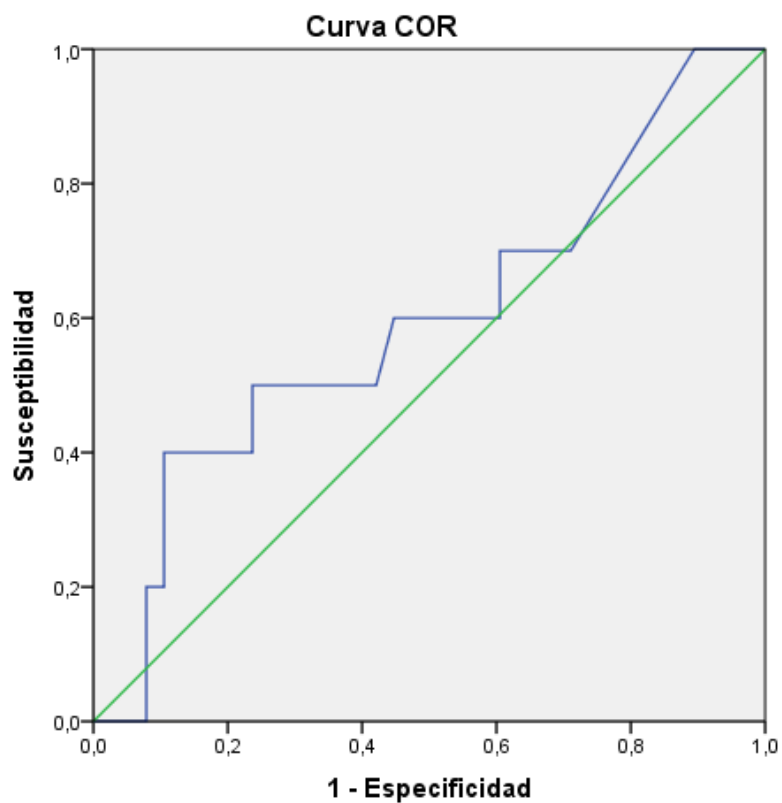
| Positivo si es mayor o igual que ^a | Sensibilidad | 1 - Especificidad |
|---|--------------|-------------------|
| -1,00 | 1,000 | 1,000 |
| ,58 | ,800 | ,895 |
| 1,51 | ,800 | ,763 |
| 2,95 | ,800 | ,737 |
| 4,64 | ,800 | ,711 |
| 5,56 | ,800 | ,684 |
| 6,49 | ,800 | ,658 |
| 8,20 | ,800 | ,632 |
| 9,64 | ,800 | ,605 |
| 12,02 | ,800 | ,579 |
| 16,16 | ,800 | ,553 |
| 18,29 | ,800 | ,526 |
| 19,02 | ,800 | ,500 |
| 20,45 | ,700 | ,500 |
| 21,41 | ,700 | ,474 |
| 24,47 | ,700 | ,447 |
| 27,61 | ,700 | ,421 |
| 30,01 | ,700 | ,395 |
| 32,26 | ,700 | ,368 |

| | | |
|--------|------|------|
| 33,70 | ,700 | ,342 |
| 37,91 | ,700 | ,316 |
| 41,13 | ,700 | ,289 |
| 42,50 | ,700 | ,263 |
| 45,07 | ,700 | ,237 |
| 47,90 | ,700 | ,211 |
| 54,82 | ,700 | ,184 |
| 60,99 | ,700 | ,158 |
| 65,82 | ,700 | ,132 |
| 70,84 | ,600 | ,132 |
| 77,57 | ,600 | ,105 |
| 89,78 | ,600 | ,079 |
| 99,25 | ,500 | ,079 |
| 106,49 | ,500 | ,053 |
| 116,89 | ,400 | ,053 |
| 128,43 | ,300 | ,053 |
| 136,67 | ,300 | ,026 |
| 141,88 | ,200 | ,026 |
| 191,49 | ,100 | ,026 |
| 273,70 | ,000 | ,026 |
| 309,41 | ,000 | |

5.6.- Otras Citoquinas

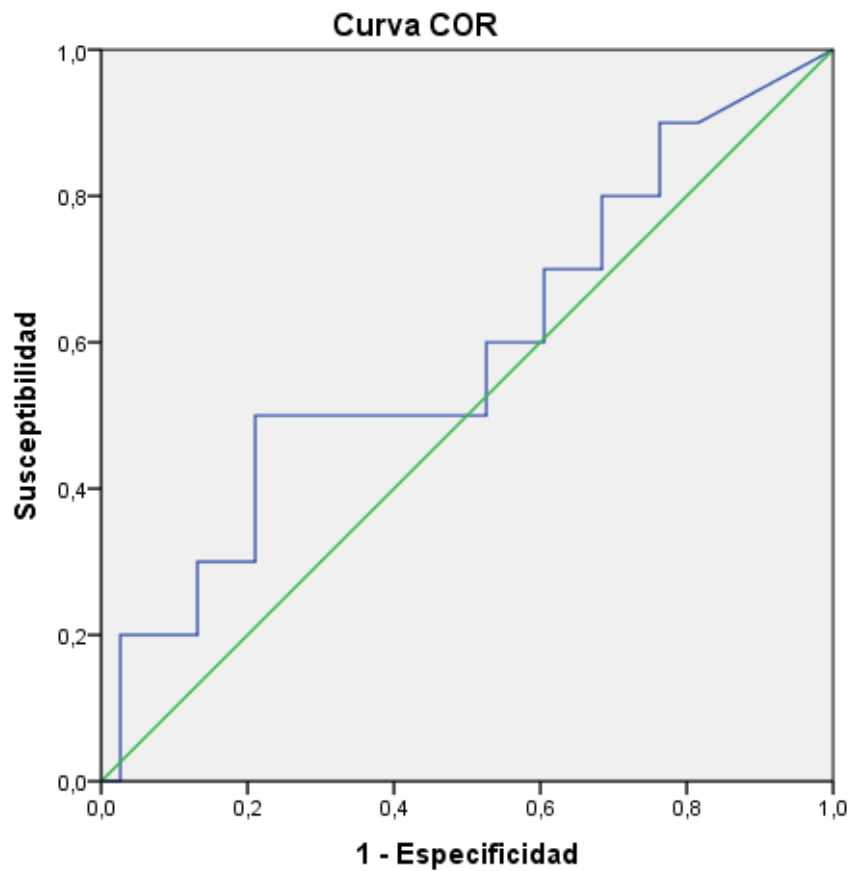
Se calculó el área bajo la curva COR con IL-1RA, VEGF, IL-8, IL-7, MIP-1 β , e IL-12, para detectar SLEDAI \geq 8, observándose que las curva no eran buenas, es decir que dichas citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento no poseen capacidad diagnostica de actividad severa de LES (**Figuras 31 a 36**).

Figura 31.-Área bajo la curva COR con IL-1RA, para detectar SLEDAI \geq 8



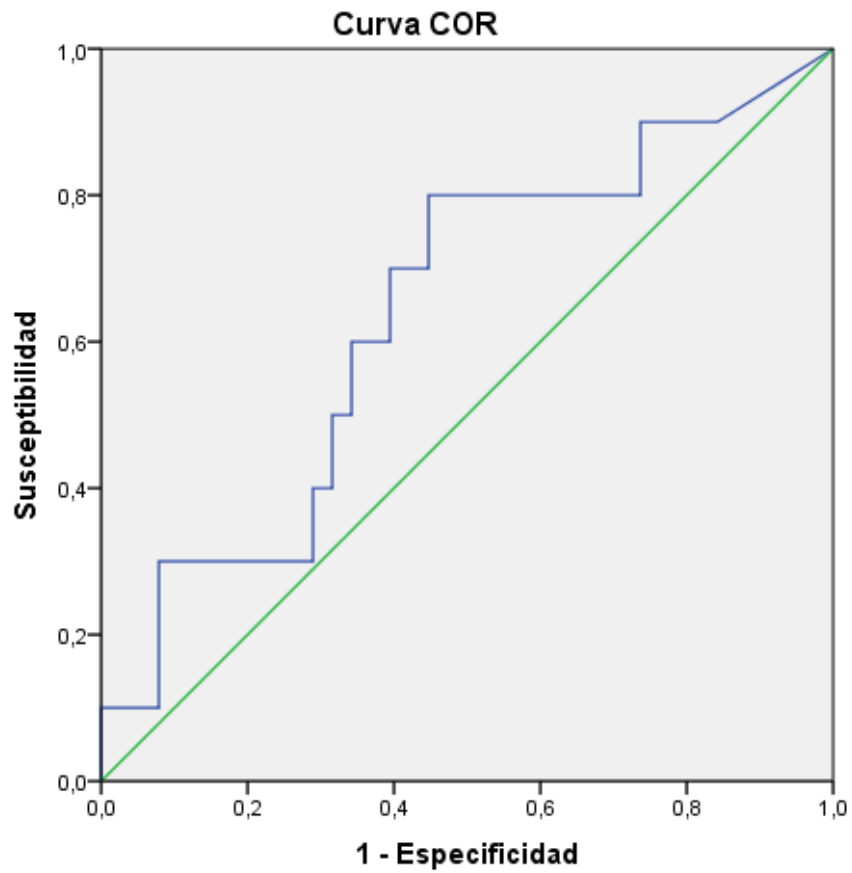
| Área bajo la curva | | | | |
|---|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste: Hu IL-1ra | | | | |
| Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| ,595 | ,107 | ,361 | ,385 | ,805 |

Figura 32.-Área bajo la curva COR con VEGF, para detectar SLEDAI ≥ 8



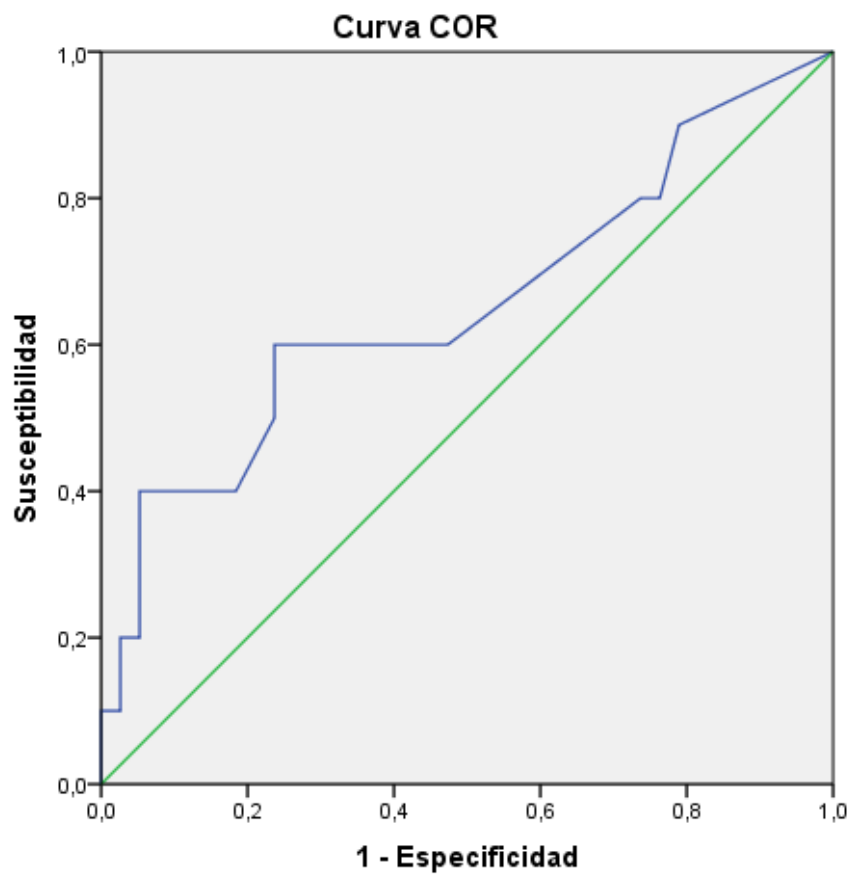
| Área bajo la curva | | | | |
|---|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste: Hu VEGF | | | | |
| Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| ,591 | ,107 | ,381 | ,380 | ,801 |

Figura 33.-Área bajo la curva COR con IL-8, para detectar SLEDAI ≥ 8



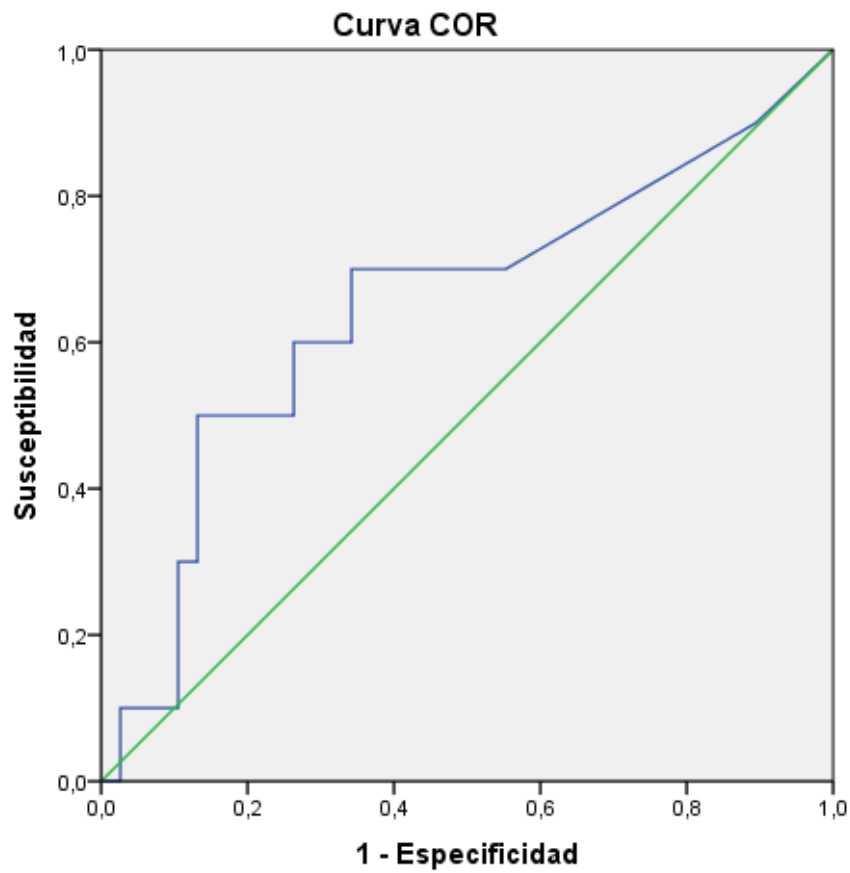
| Área bajo la curva | | | | |
|---|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste: Hu IL-8 | | | | |
| Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| ,639 | ,100 | ,178 | ,444 | ,835 |

Figura 34.-Área bajo la curva COR con IL-7, para detectar SLEDAI ≥ 8



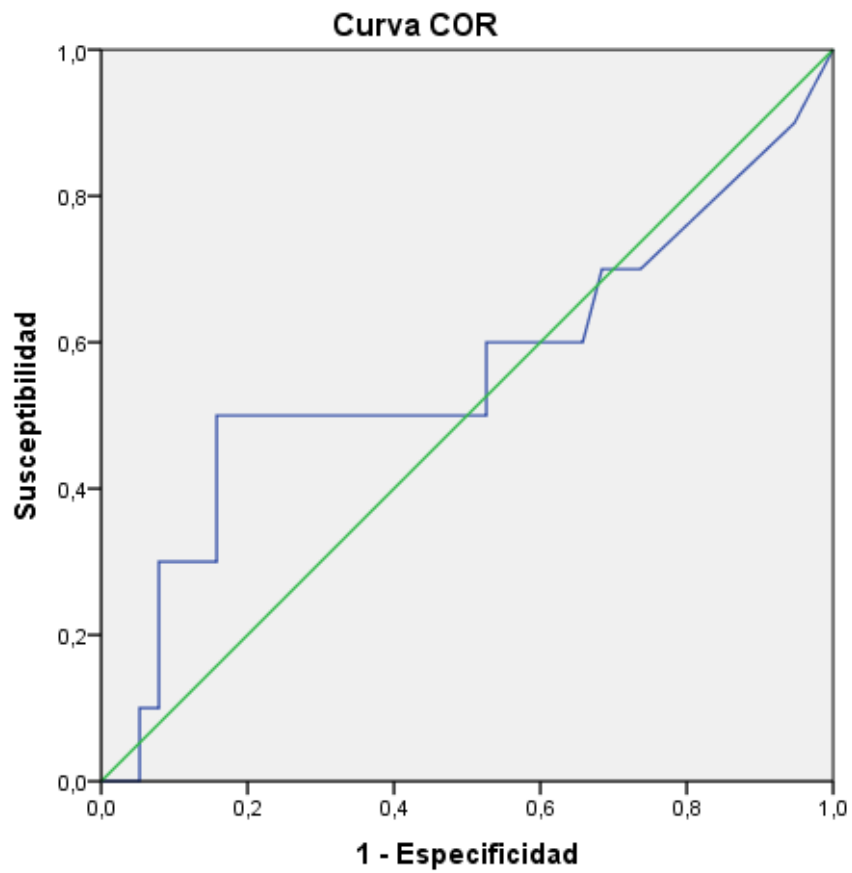
| Área bajo la curva | | | | |
|---|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste: Hu IL-7 | | | | |
| Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| ,654 | ,110 | ,138 | ,439 | ,869 |

Figura 35.-Área bajo la curva COR con MIP-1 β , para detectar SLEDAI \geq 8



| Área bajo la curva | | | | |
|---|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste: Hu MIP-1b | | | | |
| Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| ,650 | ,108 | ,148 | ,439 | ,861 |

Figura 36.-Área bajo la curva COR con IL-12, para detectar SLEDAI ≥ 8

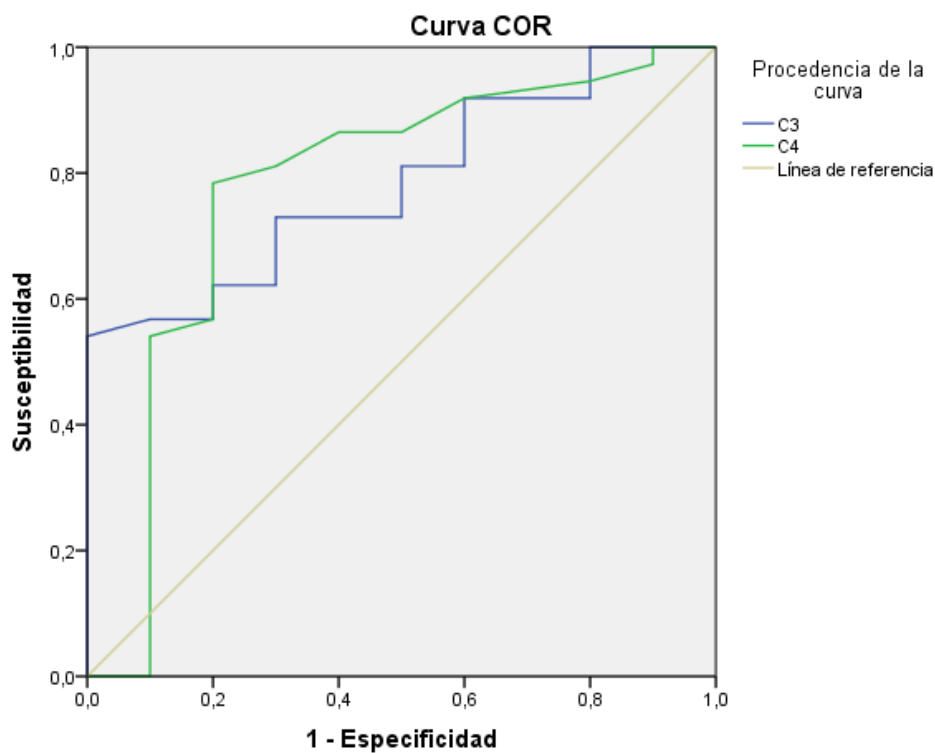


| Área bajo la curva | | | | |
|--|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste: Hu IL-12 | | | | |
| Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| ,562 | ,118 | ,551 | ,330 | ,794 |

5.7.- Otros parámetros

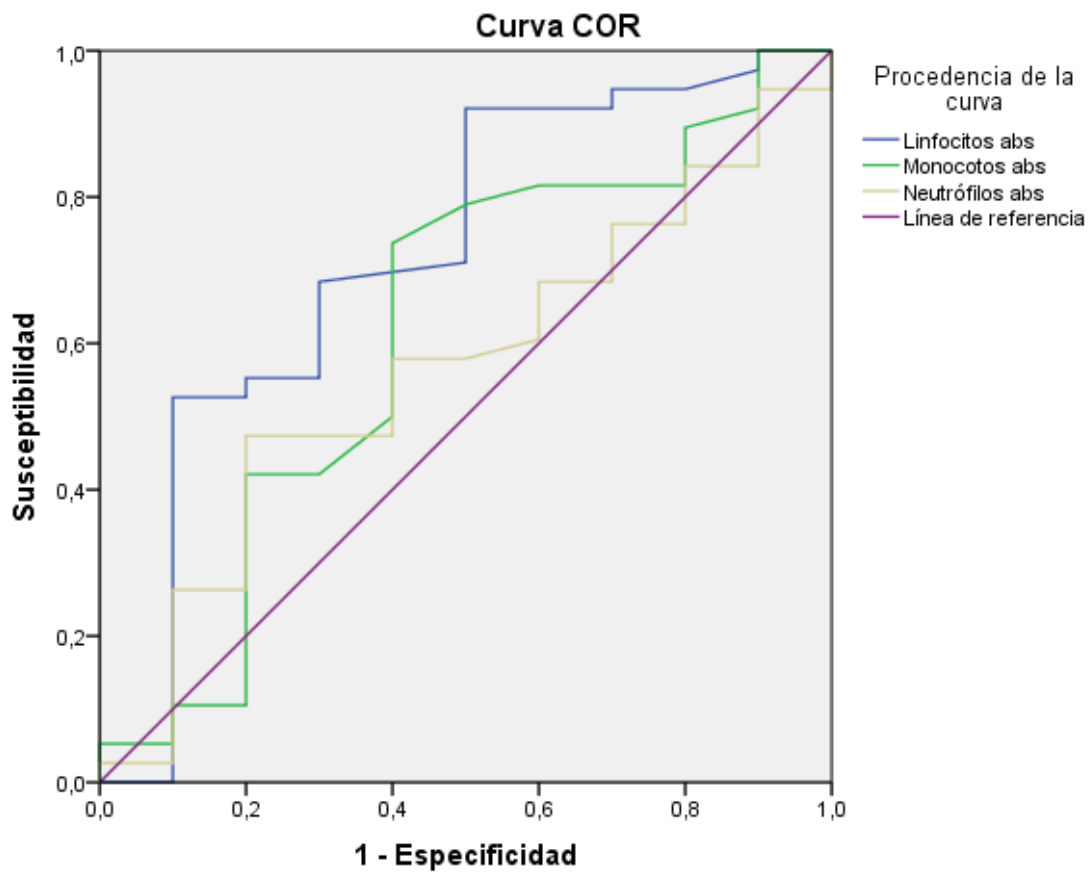
Se realizó el cálculo de área bajo la curva COR para C3 y C4, comprobando que C3 y C4 presenta capacidad diagnóstica de actividad severa de la enfermedad (SLEDAI \geq 8) (Figura 37). Como se puede observar se ha realizado una inversión de la curva, de tal forma, que podemos decir que cuanto menor sea la cifra de C3 o C4 más capacidad existe de diagnosticar un paciente con actividad severa lúpica (SLEDAI \geq 8).

Figura 37.- Cálculo de área bajo la curva COR con C3 y C4, para detectar SLEDAI \geq 8



| Área bajo la curva | | | | | |
|----------------------------------|------|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste | Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| C3 | ,785 | ,070 | ,006 | ,648 | ,922 |
| C4 | ,777 | ,097 | ,008 | ,587 | ,967 |

Figura 38.- Cálculo de área bajo la curva COR con el leucograma, para detectar SLEDAI ≥ 8



| Área bajo la curva | | | | | |
|----------------------------------|------|-------------------------|------------------------------|--|-----------------|
| Variables resultado de contraste | Área | Error típ. ^a | Sig. asintótica ^b | Intervalo de confianza asintótico al 95% | |
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Linfocitos abs | ,722 | ,100 | ,032 | ,526 | ,919 |
| Monocitos abs | ,614 | ,109 | ,269 | ,400 | ,829 |
| Neutrófilos abs | ,564 | ,098 | ,534 | ,372 | ,757 |

Con el cálculo del área bajo la curva COR para las células del leucograma, podemos decir que los valores del área bajo la curva para los monocitos y los neutrófilos no es buena, solo regular. Sin embargo, para los linfocitos el cálculo del área bajo la curva es bueno

[AUROC, (IC95%), p , error típico]: [0.722, (0.526-0.91), 0.032, 0.100] lo que significa que los linfocitos tienen capacidad diagnóstica de actividad severa de la enfermedad (SLEDAI \geq 8) (**Figura 38**). Al igual que ocurre con el complemento, como se puede observar, se ha realizado una inversión de la curva, de tal forma, que podemos decir que cuanto menor sea la cifra de linfocitos más capacidad existe de diagnosticar un paciente con actividad severa de la enfermedad (SLEDAI \geq 8).

6. Discusión

6.1.- Justificación de la necesidad de biomarcadores en LES

El Lupus eritematoso sistémico es el más representativo de los procesos de naturaleza autoinmune y además, el que presenta una mayor complejidad desde el punto de vista clínico, puesto que tiene una gran variedad de patrones de expresión, puede afectar a cualquier órgano y evoluciona a brotes, con períodos de distinto grado de actividad. Es una enfermedad crónica que puede resultar mortal si se ven afectados órganos vitales, aunque lo más habitual es que provoque un estado general crónico y mala calidad de vida para aquellos que la padecen. Estos factores justifican el interés excepcional que despierta esta enfermedad, motivo por el cual todavía constituye un desafío para los médicos [91].

No se ha identificado una causa concreta del LES, pero se sabe que ciertos factores como la luz solar, la influencia hormonal y determinados medicamentos o infecciones virales, pueden desencadenar el trastorno en aquellos individuos que poseen una predisposición genética [92].

Los pacientes con signos y síntomas clínicos de lupus atraviesan por distintas fases del desarrollo de la enfermedad: la predisposición genética, la producción asintomática de autoanticuerpos, los síntomas prodrómicos que suelen ser inespecíficos y, por último, la enfermedad clínica y la aparición de inflamación, la disfunción de órganos vitales y la mejoría o persistencia de daño crónico, condicionando todo ello una alta morbilidad y mortalidad.

El LES ha pasado con los años, de ser una enfermedad poco frecuente a ir aumentando su prevalencia, probablemente debido a que se diagnostican formas leves de la enfermedad

que antes pasaban inadvertidas. La mayoría de los casos se presentan en mujeres, entre la adolescencia tardía y el comienzo de la quinta década de vida, con una relación entre mujeres y varones de 10:1. Esta razón es menor cuando se estudian edades extremas, en niños y ancianos la relación mujeres/hombres desciende a 7/1 y 5/1 respectivamente. Algunos grupos étnicos en especial los de origen africano u oriental, tienen más probabilidad de presentar la enfermedad y además en ocasiones con más gravedad que en los pacientes blancos. La incidencia es mayor en aquellos países con un rápido crecimiento demográfico. En los grupos sociales con peores condiciones económicas son más frecuentes las formas graves. Estas condiciones económicas precarias dificultan el acceso a la sanidad, la calidad de ésta o la capacidad para iniciar un tratamiento adecuado [93].

En Europa la incidencia anual está comprendida entre uno a diez por 100.000 habitantes. La mayor incidencia y prevalencia se observa en Suecia, Islandia y España.

El impacto negativo que ocasiona en la calidad de vida de los pacientes, los altos costes sanitarios o la disminución de la productividad, hacen del paciente con LES una gran carga para la sociedad.

En la Consulta de Medicina Interna, Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del HCUV, desde su creación en mayo de 2007, se han dedicado grandes esfuerzos no solo para la atención clínica de estos pacientes, sino también a la investigación junto con la Unidad de Investigación Médica en Infección e Inmunidad del HCUV, en la mejora de la detección de la actividad de la enfermedad y la presencia de brote de LES, con el objetivo de un diagnóstico e instauración de tratamiento precoz, con el fin último de mejorar el pronóstico de estos pacientes.

El diagnóstico de LES en la consulta se realiza contando con la historia clínica y la exploración física del paciente junto con los datos de laboratorio y otras pruebas complementarias. Siguiendo los criterios del Colegio Americano de Reumatología de 1982, revisados en 1997 y actualizados por "*The Systemic Lupus International Collaborating Clinics*" en 2012.

Las escalas de actividad permiten integrar datos clínicos y analíticos relevantes en una única variable numérica. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos por desarrollar sistemas simples y eficaces para la detección de actividad de LES, todavía no se ha consolidado como perfecto ninguno de los índices de evaluación de actividad propuestos hasta la fecha.

El seguimiento en la consulta tiene por objeto reconocer el grado de actividad de la enfermedad, en muchas ocasiones en ausencia de clínica, y la detección precoz de brote. Para esta labor, ya desde los años 80 se intenta conjugar los datos de la clínica y la analítica, desarrollando distintas escalas de evaluación intentando conseguir una valoración menos subjetiva. Escalas como la de SLEDAI-2K ("*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*") utilizada para la valoración de actividad de la enfermedad [29-31], BILAG usada para la detección de brote ("*British Isles Lupus Assessment Group Index*") [32-34], la escala de SLAM ("*Systemic Lupus Activity Measure*"), ECLAM ("*European Consensus Lupus Activity*") [35] o la de evaluación de daño crónico por SLICC/ACR/DI ("*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*") [36]; permiten evaluar a los pacientes, a pesar de sus limitaciones. Por ejemplo, con SLEDAI-2K dos pacientes con una misma puntuación pueden tener afectaciones de órganos diferentes o como con BILAG que presenta dificultades en el procesamiento de los datos ya que precisa

una base de datos concreta, así como la subjetividad de los síntomas del paciente, la intensidad y duración de los mismos, o la interpretación por parte del entrevistador. De igual modo que esto produce cierta variabilidad en la práctica clínica, estas limitaciones influyen también en los ensayos clínicos.

En cuanto a la nefritis lúpica (NL), la biopsia renal es considerada, actualmente, el "gold standard" para su diagnóstico [94], ya que permite conocer el tipo histológico y discriminar entre lesiones agudas y/o crónicas. Con ella se consigue precisar el diagnóstico, orientar el pronóstico y es una guía en el manejo general del paciente y el tratamiento que se debe instaurar. Pero esta técnica no está exenta de complicaciones. Se necesita el consentimiento del paciente ya que es un procedimiento invasivo, cuyo fin último no es tratar, sino solo diagnosticar y, además el diagnóstico se retrasa en el tiempo, hasta que se puede realizar la lectura de las preparaciones anatómo-patológicas. En ocasiones la cantidad y/o calidad del tejido obtenido no es suficiente para el diagnóstico y se precisa repetir el procedimiento. Como complicaciones clínicas más frecuentes, puede presentarse hematuria macroscópica prolongada (5-10% de los casos), dolor cólico, hematoma local perirrenal, que en ocasiones precise evacuación quirúrgica y/o transfusión sanguínea, una fístula arterio-venosa intrarrenal y de forma muy excepcional la extirpación del riñón o la muerte.

En todos los ámbitos de la medicina podemos encontrar como las escalas aplicadas hasta la actualidad para el diagnóstico y predicción de la evolución de una enfermedad tienen sus limitaciones y en los últimos tiempos, en varias enfermedades se ha investigado en la detección de distintas moléculas en distintos fluidos orgánicos, generalmente sangre y orina, con el objetivo de evitar procedimientos invasivos y obtener un diagnóstico más rápido de la gravedad de la enfermedad. En el ámbito de las enfermedades auto-inmunes sistémicas y en

concreto en el LES, también se presentan estas limitaciones, por lo que la capacidad de predicción de un potencial biomarcador para el LES debería traducirse en [38]: 1) no invasivo o sólo minimamente, 2) fiable y capaz de poderse reproducir, 3) disponible desde antes o lo más temprano posible respecto al momento en que aparece el evento, 4) cambios en los niveles durante los periodos de actividad de la enfermedad o la aparición de determinada afectación orgánica y 5) cambios en los niveles de estos mediadores influidos por el tratamiento.

Desde hace años se utilizan en la clínica biomarcadores de distintos tipo, y ya que éstos en ocasiones solo son una ayuda, sin comportarse como verdaderos marcadores diagnósticos o pronósticos, se investiga para poder detectar moléculas que ayuden a un diagnóstico más definitivo y orienten en las posibilidades terapéuticas. En el día a día, por ejemplo, para el seguimiento del trasplante renal [38] con el objetivo de prevenir el rechazo agudo y mejorar la supervivencia del injerto y la morbi-mortalidad del paciente, se utilizan los siguientes marcadores:

1.- Valoración a corto y largo plazo de la supervivencia del injerto: por un lado los que cuantifican la función renal en sangre y orina (biomarcadores de laboratorio: creatinina sérica, Cistatina C sérica, aclaramiento de creatinina calculado con Cockcroft-Gault o la fórmula de MDRD, o aclaramiento de creatinina con métodos nucleares con el uso de iohexol o iothalamate), por otro lado los parámetros histológicos: biomarcadores histológicos, realización de biopsia renal para valorar daño agudo y/o crónico, así como toxicidad por la medicación inmunosupresora.

2.- Detección de rechazo agudo: biomarcadores inmunológicos, como la medición de los niveles de anticuerpos anti-donante específicos (anticuerpos anti-HLA).

3.- Medición de la morbilidad y la mortalidad y valorar su relación con la medicación inmunosupresora, para lo que sería de gran utilidad la valoración de los factores de riesgo cardiovascular: Hipertensión arterial (HTA), Diabetes Mellitus (DM), hiperlipemia, presencia de tumores o de infecciones, así como el uso de escalas para cuantificar la calidad de vida.

No obstante se intenta ir más allá y poder entender la base fisiopatológica e inmunológica de un proceso que causa daño en el organismo, con el fin de poder actuar sobre él y ganar la batalla a la enfermedad. Son ejemplos de pruebas no invasivas, la detección de citoquinas en sangre y orina de pacientes que han recibido un trasplante renal, o la determinación de los niveles de ARNm que codifica a las proteínas citotóxicas Granzina B o Perforina en las células urinarias [95], para el diagnóstico del rechazo agudo de los aloinjertos renales.

Muthukumar T, *et al.* [96] analizaron el significado pronóstico de la expresión del gen Foxp3+ en las células mononucleares presentes en la orina de pacientes con trasplante renal, y objetivaron que los pacientes con más niveles urinarios de expresión de Foxp3+ tenían menos incidencia de rechazo agudo y respondían mejor al tratamiento con corticoides cuando presentaban rechazo agudo celular.

Otro contexto en el que la investigación y el uso de biomarcadores puede ser de gran utilidad es en el paciente crítico, para mejorar la capacidad predictiva del curso de la enfermedad. Se han realizado estudios clínicos con importantes aportes a la hora del seguimiento de estos pacientes. Bermejo-Martín JF y colaboradores [97] analizaron la asociación entre el recuento de neutrófilos circulantes en sangre y la evolución clínica de

pacientes con diagnóstico de sepsis y como el recuento de los otros subtipos de leucocitos no presenta ninguna asociación significativa con la evolución de estos pacientes.

Otros ejemplos son el recuento de eosinófilos en sangre y su utilidad como biomarcador de mejor supervivencia en aquellos pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica en unidades de cuidados intensivos, producidas por *S. aureus* [98]. La detección de citoquinas en plasma como biomarcadores de la pandemia de H1N1 virus de la gripe A, en los que se detecta un aumento de IL-6 en aquellos pacientes que están más graves [99]. O la correlación inversa que existe entre G-CSF e IL-17, generando un desbalance en la respuesta inflamatoria mediada por células Th17 [100], estudiado en pacientes afectados por la pandemia del 2009 por influenza.

El método utilizado para detectar la molécula candidata a biomarcador de actividad debería no representar gran dificultad para el personal técnico y médico de laboratorio, respecto al procesamiento, a la interpretación y la correcta identificación de artefactos, para poder así emitir un resultado fiable que pueda ser útil al clínico. El sistema de detección, los programas informáticos y los reactivos, que permitirán la determinación rutinaria de este biomarcador debería cumplir los estándares internacionales de calidad. En este sentido, Luminex es un método moderno de análisis que destaca por su precisión y fiabilidad.

Tras revisar la literatura, hemos objetivado que la detección de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento se realiza en los ensayos clínicos por medio de la técnica de ELISA. El ensayo luminométrico múltiple (Luminex) tiene la ventaja de que permite la detección de hasta 100 analitos en una sola determinación y con un volumen pequeño de muestra (aproximadamente 50 μ L). Estas son las ventajas más importantes del Luminex comparado con ELISA [101], ya que para realizar el mismo número de

determinaciones específicas por ELISA se requerirían 100 placas. La técnica es una variante del ELISA indirecto, pero la detección es distinta: en el ELISA se utiliza un compuesto cromogénico, en tanto que en el Luminex la detección se realiza por fluorescencia, con lo que la sensibilidad es mayor en el Luminex.

Para el estudio se seleccionó un panel amplio de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Nuestro estudio es el único en la literatura en el que se ha realizado un screening tan amplio, con el objetivo de detectar y discriminar entre aquellas citoquina, quimiocina y factores de crecimiento que presentan con más fiabilidad las características que debe cumplir un biomarcador. La selección de este panel permite estudiar el perfil de respuesta mediante la producción de citoquinas característico de las células Th1 (secretan IFN- γ , IL-2 y TNF- β) ó las células Th2 (secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). De acuerdo con el paradigma Th1/Th2, las citoquinas, al interactuar entre sí, constituyen un mecanismo de regulación indispensable en el balance entre inmunidad celular y humoral. El estudio de las células Th17, que se caracterizan por tener probablemente un papel central en la inflamación y la autoinmunidad y desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto pro-inflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la adquirida. Por ejemplo, la hiperfunción de las Th17 está asociada a enfermedades como la artritis reumatoide debido a la hipersecreción de la citocina con mayor efecto proinflamatorio, la interleucina-17. Las quimiocinas o citoquinas quimiotácticas son secretadas por células endoteliales activadas y muchos otros tipos de células en respuesta a daño tisular. Por este motivo los primeros estudios fueron en procesos inflamatorios, y ahora se conoce que desempeñan también un rol fundamental en direccionar el movimiento de las células mononucleares por todo el organismo, generando una respuesta inmune adaptativa y contribuyendo a la patogénesis de varias enfermedades. Por otra parte,

los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores presentes en la superficie de las células, con el objetivo de desencadenar la proliferación y/o diferenciación celular. En ocasiones la estimulación se produce para varios tipos celulares mientras que en otras ocasiones estimulan la proliferación de un solo tipo celular [102]. De esta manera se consigue estudiar de forma amplia la respuesta inmune.

6.2.- Principales hallazgos

En la hipótesis de trabajo se propuso el estudio de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, de forma no invasiva, en orina, para valorar si podían comportarse como buenos biomarcadores de actividad en lupus eritematoso sistémico.

En nuestro estudio se dispuso de una muestra de orina de aquellos pacientes que tras ser informados de las condiciones del mismo, aceptaron a participar y firmaron el consentimiento informado.

Se trató de una muestra representativa de nuestros pacientes con LES: relación mujer/hombre que se acerca a la proporción 10/1, de raza caucásica el 91.6%. Coincidiendo las características epidemiológicas con lo descrito en otras series [91-93].

La muestra de pacientes eran jóvenes, entre 35-65 años (58.33 %), la mayor parte de ellos con un tiempo de evolución de la enfermedad de 15.2 años y tres brotes previos como mediana.

En la consulta de seguimiento y detección de actividad de la enfermedad y brote lúpico, se realizaron los interrogatorios de las escalas de valoración de actividad (SLEDAI-2K) y detección de brote (BILAG). Así los pacientes se clasificaron en tres grupos, de acuerdo con la puntuación obtenida: sin actividad (SLEDAI-2K=0), actividad moderada (SLEDAI-2K=1-7) y actividad severa con afectación orgánica importante (SLEDAI-2K \geq 8). Aquellos pacientes que presentaban un puntuación de actividad moderada y severa se les aplicó la escala de BILAG, para el estudio de brote órgano por órgano, con la calificación de BILAG C, D o E si el paciente se encontraba igual clínicamente, BILAG B si se encontraba peor y BILAG A si estaba en brote.

Respecto al tratamiento inmunosupresor, los 48 pacientes habían permanecido estables hasta el momento de la inclusión, el 31% de los pacientes mantenía tratamiento con prednisona \leq 10 mg/día e hidroxiquina, el 17% de ellos sólo están en tratamiento con hidroxiquina, el 12% con MMF asociado a corticoides y el 11% con corticoides solos. Un porcentaje menor en tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas y azatioprina o metotrexato asociados a corticoides. Un paciente en tratamiento con etanercept e hidroxiquina, para tratamiento de sus manifestaciones articulares. Dos pacientes con nefritis lúpica en un brote anterior habían sido tratado con pulsos de 6-metilprednisolona seguido de ciclofosfamida iv, actualmente en tratamiento con corticoides y MMF oral. Por tanto los pacientes seguían un tratamiento adecuado a su tipo de afección y en consonancia con lo recomendado en la literatura [84].

En relación al tratamiento anti-proteinúrico, presentaban bloqueo del SRAA solo trece pacientes. En dos de ellos la prescripción se indicó para el tratamiento de hipertensión arterial y en el resto, todos con antecedentes de nefritis lúpica, recibían tratamiento con al menos uno

de estos fármacos. Lo más frecuente fue el tratamiento con dos fármacos (45.45 %), seguido de la monoterapia (27.27 %), sin detectarse efectos secundarios de deterioro de función renal y/o hiperkalemia.

En la clínica, las manifestaciones más frecuentes fueron las musculo-esqueléticas y muco-cutáneas, seguido de las manifestaciones generales y la nefritis lúpica (presencia de proteinuria mayor o igual a 0.5 gr/24 horas, o creatinina mayor de 1 mg/dl en mujeres y 1.3 mg/dl en hombres o sedimento urinario alterado). En nuestra muestra fueron menos frecuentes las manifestaciones hematológicas (leucopenia y/o trombopenia), la afectación vasculitis, los síntomas neurológicos, en su mayoría cefaleas y depresión, y por último la afectación cardio-pulmonar.

En la siguiente tabla (**Tabla 23**) se describen las prevalencias de diferentes manifestaciones clínicas del LES en una serie de 1.000 pacientes procedentes de diversos países europeos (estudio "Euro-Lupus") [91, 103], en relativa consonancia con los datos de nuestra muestra.

La astenia es la manifestación sistémica más habitual y está presente en prácticamente todos los pacientes. La afectación cutánea (eritema malar y fotosensibilidad) y articular son las manifestaciones orgánicas más frecuentes y aparecen en la mayoría de los pacientes. Asimismo, afectaciones potencialmente graves como la renal, serosítica, neurológica y hematológica son también relativamente frecuentes. Podemos comprobar que las prevalencias descritas son similares a las obtenidas en nuestro estudio.

Tabla 23.- Prevalencia de las principales manifestaciones clínicas detectadas en una serie de 1.000 pacientes europeos con LES

| Manifestación | Prevalencia | Manifestación | Prevalencia |
|----------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| Artritis | 84 | Síndrome seco | 16 |
| Eritema malar | 54 | Livedo reticularis | 14 |
| Fiebre | 52 | Trombosis | 14 |
| Fotosensibilidad | 45 | Linfadenopatías | 12 |
| Nefropatía | 39 | Lesiones discoides | 10 |
| Serositis | 36 | Miositis | 9 |
| Fenómeno de Raynaud | 34 | Anemia hemolítica | 8 |
| Afección neurológica | 27 | Afección pulmonar | 7 |
| Úlceras orales | 24 | Lesiones cutánea subagudas | 6 |
| Trombocitopenia | 22 | Corea | 2 |

En los pacientes con actividad severa los síntomas generales fueron los más frecuentes, aunque aplicando la escala de BILAG se alcanzó la categoría C. A continuación la mayor prevalencia fue la de afectación musculo-esquelética y muco-cutánea, que aplicando la escala de BILAG se obtuvo la categoría B para la afectación muco-cutánea y la categoría C para la afectación musculo-esquelética, excepto en un caso que alcanzó la categoría B.

Del total de 48 pacientes, catorce tenían historia de nefritis lúpica. Tres no presentaban actividad según SLEDAI, cinco presentaban actividad moderada, con categoría B en la escala de BILAG y seis presentaban actividad grave, con categoría A en la escala de BILAG. Cuatro de las pacientes eran mujeres y dos eran hombres. En el total de la muestra de pacientes con nefritis lúpica, la razón mujer/hombre fue 10/4.

Para el análisis de los distintos parámetros y la asociación entre ellos se obtuvieron las siguientes muestras: 1) Sangre en tubos de suero y EDTA para el análisis bioquímico,

hemograma y fórmula leucocitaria, y orina de 24 horas y primera orina de la mañana, procesado en el Servicio de Análisis Clínicos del HCUV, 2) muestra de sangre para estudio en el laboratorio de Microbiología e Inmunología de inmunoglobulinas, complemento y autoanticuerpos, y 3) una muestra de orina para la detección de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el laboratorio de Investigación Médica en Infección e Inmunología del HCUV.

Respecto a los datos de la analítica de rutina, el recuento de linfocitos y los niveles de complemento son menores en pacientes con actividad severa, respecto a los pacientes con sin actividad o actividad moderada. El perfil de los autoanticuerpos fue similar en los tres grupos. Estos datos son concordantes con lo ya descrito por otros estudios [104-106].

Con tecnología Luminex y la utilización del panel "*Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex bio-rad assay®- Hercules, CA, USA*", se estudiaron en orina 27 citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Las que se citan a continuación presentaban valores por debajo del límite de detección: IL-9, IL-15, FGF-b, MIP-1 α , IL-1 β , IL-17, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α . De las trece restantes, cinco de ellas todavía presentaban valores cercanos al límite inferior y muy parecidos para enfermedad inactiva, moderada y grave. La citoquinas detectables lo fueron en los 10 pacientes catalogados como severos según SLEDAI-2K

Es posible que el peso molecular (PM) de varias de las citoquinas analizadas influyan en nuestros hallazgos. En la **tabla 13**, límites de detección de las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento estudiados, se pueden confrontar los distintos pesos moleculares. Las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento que finalmente son detectables en orina, en

los pacientes con actividad grave (SLEDAI \geq 8) poseen algunas de ellas un PM bajo: IL-1RA (65 kDa), IP-10 (8.5 kDa), VEGF (38.2 kDa), IL-8 (8-9 kDa), IL-7 (17.4 kDa), MCP-1 (8.6 kDa), MIP-1 β (8 kDa) e IL-12 (70 kDa).

IP-10, IL-8, MCP-1 y MIP-1 β son moléculas con peso molecular bajo, caracterizadas por pertenecer a la familia de las quimiocinas. Su paso a través de la membrana basal glomerular podría, falsamente, llevar a concluir la presencia de actividad lúpica a nivel renal. No obstante, el daño glomerular "per se" puede explicar que se requieran niveles más elevados de estas quimiocinas en pacientes con proteinuria respecto a los pacientes sin proteinuria, para calificar un lupus como activo (datos que se describirán más adelante).

Para la evaluación de la asociación de la clínica con los parámetros de laboratorio y los posibles candidatos a biomarcadores se realizó un análisis de contraste y posteriormente un análisis de correlación. Se estudió la capacidad diagnóstica de las citoquinas detectadas y también su capacidad de predicción. Por último, se calcularon los puntos de corte de los niveles urinarios de la citoquina que reunía las características de biomarcador, para detectar actividad global de la enfermedad y actividad a nivel renal.

En el análisis de contraste, se compararon los valores en orina de las citoquinas que fueron detectables (IL-1RA, IP-10, VEGF, IL-8, IL-7, MCP-1, MIP-1 β , e IL-12) entre pacientes y controles sanos, no hallándose diferencias significativas respecto a ninguna de estas moléculas.

Posteriormente, se compararon estas citoquinas entre cada uno de los grupos de pacientes definidos por SLEDAI-2K (inactivo, moderado y severo), hallándose sólo

diferencias significativas con IL-8, MIP-1 β y MCP-1, con un valor- p de 0.01, 0.04 y 0.003 respectivamente. Pero al comparar enfermos inactivos con moderados, y enfermos moderados con severos, se observó que las diferencias dejaban de ser significativas con IL-8 y MIP-1 β .

MCP-1 es la única quimiocina que presenta diferencias significativas al comparar pacientes inactivos, con actividad moderada y severa de LES, con un valor- p de 0.003 y 0.050, respectivamente. Al comparar controles con pacientes con actividad severa se obtiene un valor- p de 0.050. Y por último, al comparar enfermos con actividad moderada y severa, se obtiene un valor- p de 0.022. En conclusión, MCP-1 alcanzó sus niveles más elevados en el grupo de enfermos definidos por SLEDAI-2K como severos. Estos resultados sorprenden si consideramos el reducido número de pacientes con puntuación SLEDAI ≥ 8 , sólo diez enfermos. Sin embargo, nuestros hallazgos se corroboran con lo obtenido en el análisis de asociación que mostró que MCP-1 se correlaciona directamente con la puntuación obtenida con la escala de actividad de LES.

Se estudió además la asociación entre los niveles de MCP-1 en orina con la presencia de proteinuria, dividiendo a los pacientes en proteinuria menor de 0.5 gr/24 horas y proteinuria mayor o igual a 0.5 gr/24 horas. Se obtuvo que los niveles en orina de MCP-1 son estadísticamente significativos más elevados en aquellos pacientes con afectación renal lúpica ($p < 0.05$).

Hemos observado que aquellos enfermos con actividad grave presentaban un recuento más bajo de leucocitos circulantes que los pacientes con enfermedad inactiva o moderada. El complemento C3 y C4 presentaron niveles más bajos en los enfermos severos respecto a los moderados o inactivos. MCP-1 mostró una correlación inversa con los niveles de

complemento C3 y C4 séricos y con el número de leucocitos circulantes. Estos datos se corresponden con lo descrito en la literatura [104-105].

No encontramos correlación entre MCP-1 y las modificaciones en los niveles de anticuerpos antinucleares, ni con alguna especificidad de estos auto-anticuerpos, ni tampoco con la VSG, ni los niveles séricos de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA). De nuevo, otros datos que se corresponden con lo descrito previamente [104-105].

Con el cálculo del área bajo la curva, MCP-1 e IP-10 en orina, presentaban unas curvas muy buena y regular respectivamente. En el cálculo del área bajo la curva COR con MCP-1 para detectar SLEDAI ≥ 8 , se observó que posee capacidad diagnóstica de actividad severa de la enfermedad con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98%. Y en el cálculo del área bajo la curva COR con IP-10 para detectar SLEDAI ≥ 8 , se observó que posee capacidad diagnóstica de actividad grave de la enfermedad con una sensibilidad de 82% y una especificidad de 76%.

Se sometió a MCP-1 al cálculo del área bajo la curva para detectar SLEDAI ≥ 8 en pacientes sin proteinuria, detectándose que el área bajo la curva aumenta ligeramente, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 82%. De igual modo se calculó el área bajo la curva para detectar SLEDAI ≥ 8 en pacientes con proteinuria. Se detecta que el área bajo la curva disminuye, tal vez condicionado por las características de los pacientes, una *n* pequeña de pacientes y todos con MCP-1 elevado por presentar actividad grave de la enfermedad.

La proteinuria constituye uno de los requerimientos para calificar de presencia de actividad a nivel renal según SLEDAI-2K, lo mismo que la hematuria, leucocituria y el

deterioro de la función renal. La creatinina ha constituido el clásico marcador de muchas afecciones que alcanzan el parénquima renal, primarias o secundarias a otros procesos. Siendo una prueba muy barata, la medición de la creatinina en suero carece de sensibilidad y especificidad para un proceso cualquiera en Nefrología, sin embargo, no parece que su uso pueda quedar relegado.

Por regresión logística se construyó un modelo para cuantificar el riesgo de presentar actividad severa ($SLEDAI \geq 8$), considerando MCP-1, hematuria, leucocituria y proteinuria como variables de ajuste. También se construyeron otros dos modelos considerando por una parte MCP-1 y proteinuria y por otra IP-10 y proteinuria. Observamos que ni la hematuria, ni la leucocituria se asocian de forma significativa a la actividad de la enfermedad a nivel renal. Por su parte, los niveles de MCP-1 elevados en orina son un factor asociado a la presencia de LES severo, independientemente de la presencia de proteinuria, leucocituria y/o hematuria. Por el contra, los niveles elevados de IP-10 en orina no son un factor asociado a la presencia de LES severo.

Por último, se hallaron los puntos de corte para las curvas ROC, de acuerdo con la máxima sensibilidad y especificidad, con el objetivo de fijar el valor urinario de MCP-1 por el encima del cual es capaz de detectar la presencia de actividad de la enfermedad. Un resultado de $MCP-1 \geq 42.5$ pg/ml permite detectar actividad severa de la enfermedad en pacientes con proteinuria menor de 0.5 gr/24 horas, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 82%. Un resultado de $MCP-1 \geq 65.82$ pg/ml permite detectar actividad severa de la enfermedad en pacientes con proteinuria mayor o igual de 0.5 gr/24 horas, con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 87%. Estos datos nos confirman la teoría de que las quimiocinas que poseen pequeño peso molecular pueden atravesar la membrana de

filtración, pero que además se precisa una concentración elevada para que posean capacidad diagnóstica de LES severo y que los niveles de dicha quimiocina deben ser superiores cuando se estudia afectación renal.

A continuación, describiremos las características de la barrera de filtración a nivel renal y como pueden influir en nuestro estudio.

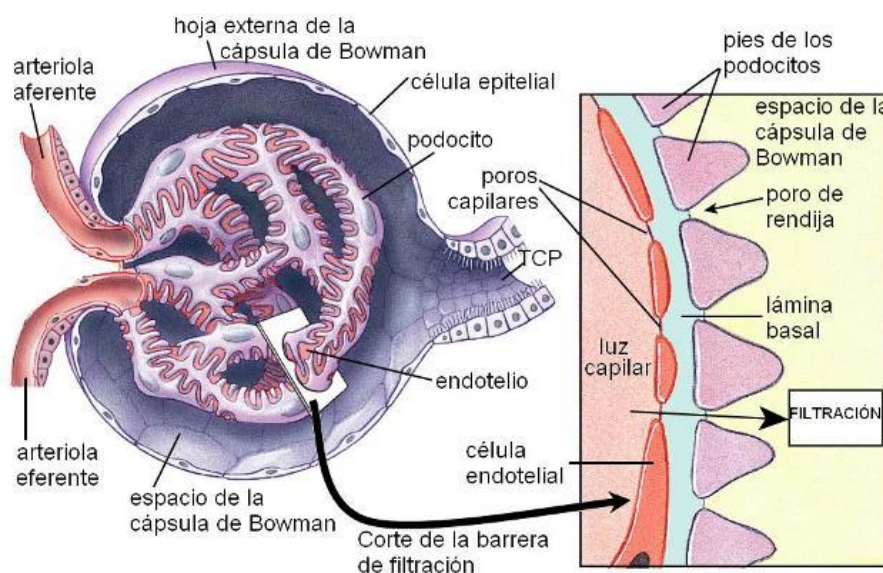
En el ser humano, cada riñón está formado por un millón de nefronas, aproximadamente. La nefrona es la unidad estructural y funcional básica del riñón, responsable de filtrar la sangre para regular el agua y las sustancias solubles, reabsorbiendo lo que es necesario y excretando el resto como orina [107,108]. La nefrona se caracteriza por ser una estructura compleja constituida por dos partes principales: el corpúsculo renal de Malpighi (formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman), y el túbulo renal (formado por túbulo contorneado proximal, el Asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector), estando situada principalmente en la corteza renal.

El glomérulo es la unidad anatómica funcional del riñón, donde tienen lugar la depuración y la filtración del plasma sanguíneo como primera etapa en el proceso de formación de la orina. Es una red de capilares rodeada por una envoltura externa en forma de copa llamada cápsula de Bowman. El plasma se filtra en el interior de la cápsula, a través de los capilares glomerulares, y el material filtrado se vierte en el túbulo proximal. El glomérulo recibe su irrigación de una arteriola aferente de la circulación renal. A diferencia de la mayor parte de los lechos capilares, el glomérulo desemboca en una arteriola eferente en lugar de una vénula. La resistencia de estas arteriolas produce una presión intraglomerular elevada que contribuye al proceso de ultrafiltración por el que los líquidos y los materiales solubles en la sangre son forzados fuera de los capilares hacia la cápsula de Bowman. El glomérulo y la

cápsula de Bowman que lo circunda constituyen el corpúsculo renal, la unidad de filtración básica del riñón (**Figura 39**).

Los capilares glomerulares son capilares fenestrados. Las fenestras son más grandes (70-90 nm de diámetro), más abundantes y de contorno más irregular que el de los capilares fenestrados de otras localizaciones. En las fenestras de los capilares glomerulares no hay diafragma. La membrana de las células endoteliales contiene gran cantidad de canales acuosos de acuaporina, una proteína transmembrana encargada de transportar el agua a través de los compartimientos celulares. Los capilares tienen una lámina basal que se fusiona con la de los podocitos que los rodean. La pared del capilar glomerular es una barrera molecular capaz de impedir el paso de la mayor parte de las proteínas plasmáticas y permitir el paso del agua, de moléculas de soluto pequeñas y de iones.

Figura 39.- Esquema del glomérulo y localización de la barrera de filtración glomerular



Guyton AC, Hall JE. Formación de la orina en los riñones: Filtración glomerular, riego sanguíneo renal y su regulación In Tratado de Fisiología Médica.

El endotelio está perforado por poros o fenestraciones de entre 70 y 100 nm de diámetro que permiten la separación mecánica de los elementos de la sangre y el plasma. La superficie de la célula endotelial tiene carga negativa por la presencia de una glucoproteína polianiónica, la podocalixina, que es la principal sialoproteína glomerular. La concentración de moléculas superficiales aniónicas y fenestraciones, determina que el endotelio glomerular se diferencie de otras membranas plasmáticas endoteliales y permita el paso de partículas de bajo peso molecular.

Los podocitos son células estrelladas de gran tamaño con prolongaciones similares a tentáculos que rodean los capilares glomerulares.

La cápsula de Bowman es la parte más externa del corpúsculo renal y está formada por una pared doble (con una capa parietal y otra visceral) que delimita un espacio llamado espacio urinario o espacio capsular de Bowman. En el polo urinario del corpúsculo está el espacio urinario que se continúa con la luz del túbulo contorneado proximal.

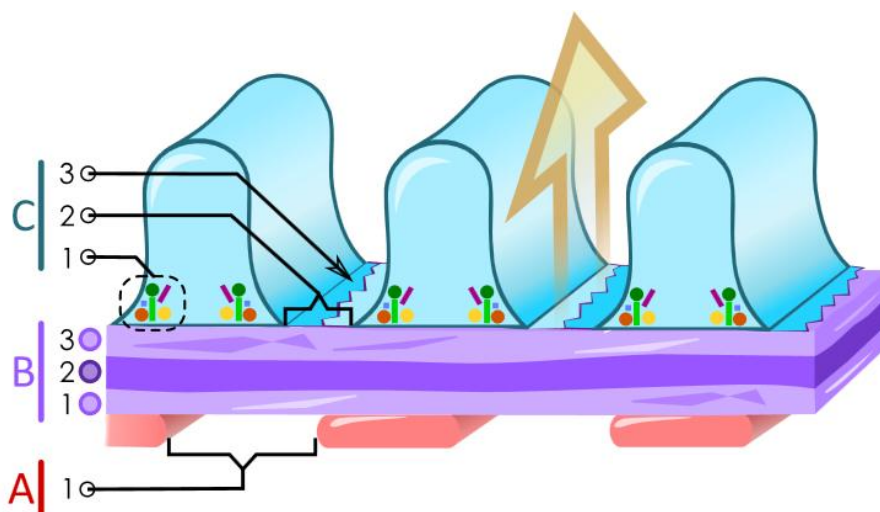
La membrana basal glomerular [109] impide el paso de macromoléculas de forma mecánica y eléctrica, esta última debida a la presencia de moléculas de carga negativa, proteoglicanos ricos en heparán sulfato. Esta membrana está compuesta por dos capas finas, la lámina rara interna y la lámina rara externa, y una capa central gruesa, la lámina densa. Las células endoteliales y epiteliales adyacentes secretan moléculas de colágeno de tipo IV, laminina, fibronectina, nidógeno/entactina y proteoglicanos de heparán sulfato que forman una estructura similar a un enrejado. Entre los pedicelos que cubren la superficie externa de la membrana basal glomerular existen hendiduras de 25 a 60 nm que están cruzadas por una

membrana delgada llamada diafragma de hendidura o diafragma de filtración. Esta fina estructura es la responsable principal de impedir el paso de moléculas como la albúmina.

La estructura que realiza el ultrafiltrado es la barrera de filtración glomerular, que separa la luz de los capilares glomerulares de la luz del espacio urinario de la cápsula de Bowman y está formada por diversos elementos entre los que figuran:

1) el endotelio fenestrado de los capilares (las fenestras grandes y sin diafragma permiten el paso de todos los elementos no celulares de la sangre, aunque las proteínas aniónicas de gran tamaño se filtran con lentitud por la cubierta de heparán sulfato que poseen las células endoteliales), 2) la membrana basal glomerular y 3) la membrana de la ranura de filtración que hay entre los pedicelos de los podocitos. La capacidad de los solutos para filtrarse está determinada por su tamaño (los poros de la membrana glomerular se cree que tienen ocho nanómetros y por ejemplo el diámetro molecular de la albúmina del plasma es de seis nm) y su carga eléctrica (los compuestos con carga eléctrica negativa se filtran con menos facilidad que las moléculas de igual tamaño cargadas positivamente). (**Figura 40**).

Figura 40.- Esquema de la barrera de filtración glomerular



A. Células endoteliales del glomérulo. 1. Poro (fenestra). **B.** Membrana basal glomerular: 1. Lámina rara interna. 2. Lámina densa. 3. Lámina rara externa. **C.** Podocitos: 1. Proteína enzimática y estructural. 2. Hendidura de filtración. 3. Diafragma.

Una capacidad de filtración de 1.0 indica que esa sustancia se filtra con la misma facilidad que el agua; una capacidad de filtración de 0.75 equivale a una velocidad de filtración del 75% con respecto al agua. Cuando el PM de una sustancia se aproxima a la albúmina, la capacidad de filtración disminuye rápidamente a niveles bajos, y se acerca a cero (**Tabla 24**).

Tabla 24.- Capacidad de filtración de distintas sustancias en los capilares glomerulares en relación con su peso molecular (modificada de Guyton AC, Hall JE)

| Sustancia | Peso molecular (daltons) | Capacidad de filtración |
|---------------|--------------------------|-------------------------|
| Agua | 18 | 1.0 |
| Sodio | 23 | 1.0 |
| Glucosa | 180 | 1.0 |
| Inulina | 5500 | 1.0 |
| MIP-1 β | 8000 | |
| IP-10 | 8500 | |
| MCP-1 | 8600 | |
| IL-8 | 8000-9000 | |
| Mioglobina | 17000 | 0.75 |
| IL-7 | 17400 | |
| VEGF | 38200 | |
| IL-1RA | 65000 | |
| Albúmina | 69000 | 0.005 |
| IL-12 | 70000 | |

Las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento son proteínas de pequeño tamaño (**Tabla 13**). Al integrar los datos de nuestro estudio en la tabla extraída de Guy AC, Hall JE, de peso molecular y capacidad de filtración de determinadas moléculas (**Tabla 24**), podemos decir, por una parte, que aquellas citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento con peso molecular alto, no pueden ser filtradas en condiciones normales, por tanto la orina

no sería la muestra más adecuada para su estudio. Por otra parte, algunas de las citoquinas que no se detectaron en orina tenían peso molecular bajo y sin embargo no estaban presentes, lo que confirma que estas citoquinas no son secretadas en presencia de actividad de la enfermedad. Además, existen citoquinas detectadas en el límite bajo y otras en los límites establecidos de detección, que al someterse al análisis estadístico no presentan capacidad diagnóstica ni capacidad de predicción de actividad y/o brote de la enfermedad, por lo que se puede decir que no solo se requiere la presencia de dichas citoquinas, sino además se necesita de una determinada concentración. De las citoquinas presentes en orina para detectar actividad severa de la enfermedad sólo MCP-1, tras someterse al análisis estadístico, muestra capacidad diagnóstica y predictiva de LES, tanto de actividad global como renal. La presencia de niveles altos de MCP-1 en orina no se explican por tanto solamente por ser una molécula con peso molecular bajo y poder atravesar la barrera de filtración glomerular, sino que también son debidos a la respuesta sistémica del estado inflamatorio en la situación de actividad de LES.

Por regresión logística, la presencia de MPC-1 se define como factor de riesgo para presentar actividad de la enfermedad independientemente de la presencia de sedimento alterado y/o la presencia de proteinuria mayor o igual a 0.5 gr/24 horas. Al hallar un punto de corte y determinar a partir de que niveles en orina MCP-1 puede ser de utilidad en la práctica clínica diaria, se observó que para detectar actividad global de la enfermedad se requieren de unos niveles ≥ 42.5 pg/ml y para la detección de actividad renal los niveles deben ser superiores, ≥ 65.82 pg/ml, lo cual indica que la presencia de daño renal implica una mayor eliminación de MCP-1 en orina.

MCP-1 cumple con la mayor parte de los requisitos de un biomarcador [38]. Nuestros resultados muestran que los niveles de esta quimiocina aumentan durante la actividad de la enfermedad. Determinar los niveles en orina de MCP-1 no suponen ningún gesto invasivo para el paciente. El empleo de la tecnología Luminex permite una medición precisa, fiable y reproducible de esta quimiocina en orina. MCP-1 se pudo determinar desde muy temprano en nuestros pacientes, coincidiendo con las manifestaciones y datos de laboratorio testigos de actividad, encontrándose disponible con la analítica de rutina de la consulta, y bastante antes de poder disponer del resultado de la biopsia para los casos de afectación renal. Por tanto MCP-1 puede servir como biomarcador de actividad de LES.

Muchos han sido los intentos de descubrir un biomarcador de actividad de LES, tanto en sangre como en orina. A este respecto, podemos nombrar algunos de los estudios más relevantes que hemos revisado. Lo primero, destacar que las determinaciones siempre se han hecho con ELISA, en contraste con nuestro estudio que se realizó con Luminex. La mayoría de los estudios encontrados han sido realizados en orina, ya que se trata de un medio menos invasivo y además el objetivo era el estudio de detección de actividad y/o brote a nivel renal.

Marie MA, *et al.* [110] compararon los niveles de IP-10 en orina entre dos grupos de pacientes diagnósticos de LES, un grupo con afectación renal y el otro sin ella. Detectaron que los niveles de IP-10 eran significativamente mayores en pacientes con nefritis lúpica activa. IP-10 se correlacionó con actividad renal medida por la presencia de proteinuria y el grado de daño renal (realizada biopsia renal) y existe una correlación inversa con los niveles de complemento C3 en sangre. De igual modo Abujam B, *et al.* [111] detectaron que tanto IP-10 como MCP-1 en orina podrían, en un futuro, predecir la presencia de brote renal en paciente con LES. En nuestro estudio, IP-10 se detectó en pacientes con actividad severa de la

enfermedad, y en el cálculo de área bajo la curva mostró una capacidad diagnóstica regular, pero al someterse a un análisis de regresión logística en un modelo con IP-10 y proteinuria, se observó que los niveles elevados de IP-10 en orina no son un factor asociado a la presencia de LES severo. Walson L, *et al.* concluyeron, al igual que nosotros, que IP-10 no es un buen biomarcador de actividad renal de LES [112].

La mayoría de los estudios realizados, investigan acerca de una citoquina o quimiocina o factor de crecimiento, como mucho, acerca de dos de estas moléculas. Su objetivo es el estudio en orina de la presencia de estas moléculas para el diagnóstico de brote lúpico a nivel renal. Se estudian sustancias como la glicoproteína ácida $\alpha 1$ en orina [112] concluyendo que está más elevada en pacientes con nefritis lúpica que en aquellos que no tienen actividad renal. Otra molécula estudiada es la hepcidina [104], que se considera puede estar asociada a nefritis lúpica, aunque se necesitan más estudios con una muestra más amplia.

Por el contrario, Vega L y colaboradores [47], estudiaron 17 mediadores inmunológicos en orina y detectaron que solo MCP-1 puede comportarse como un biomarcador de actividad renal del LES.

La molécula más estudiada es MCP-1 [104,105,111-114], y sus niveles urinarios se asocian con actividad renal.

Estos biomarcadores no solo se les intentan buscar utilidad en pacientes adultos, sino también los pediatras [105] han intentado buscar una alternativa a la biopsia, estudiando biomarcadores urinarios con capacidad diagnóstica de actividad de LES a nivel renal. Se observó que los niveles de MCP-1 y de lipocalina asociada a gelatinasa del neutrófilo pueden

ser utilizados para monitorizar la actividad de la nefritis lúpica en pacientes jóvenes. De igual manera Waltson L, *et al.* [112] estudian la capacidad de IP-10, MCP-1 y glicoproteína ácida $\alpha 1$ para el diagnóstico precoz de brote renal.

Nosotros hemos realizado el presente estudio analizando 27 citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, con el objetivo de tener una visión amplia de la respuesta innata y adaptativa (humoral y celular), que pudieran influir en la fisiopatogenia del LES y en detectar actividad tanto a nivel renal como a nivel global de la enfermedad.

Por otra parte, también se ha intentado valorar la relación entre MCP-1 en orina y la respuesta al tratamiento instaurado para la nefritis lúpica. Rovin, *et al.* [114] no detectaron relación entre los niveles urinarios de MCP-1 en los treinta primeros días tras la administración de corticoides u otros inmunosupresores y tampoco si el paciente está siendo tratado con fármacos inhibidores del SRAA. Por otra parte, Ble A, *et al.* [115] detectaron que al administrar tratamiento con bindarit (terapia que actúa inhibiendo a MCP-1) a pacientes con nefritis lúpica activa, se reducen significativamente los niveles de albúmina y MCP-1 en orina.

Algunos grupos [104, 112-114] se han aventurado a establecer una asociación entre los niveles de MCP-1 en orina y la clase de nefritis lúpica, así como el grado de severidad de la misma. Describen como la NL clase IV es la que presenta niveles urinarios más elevados de MCP-1, seguido de NL clase III y por último NL clase II. Nosotros no hemos observado estas asociaciones.

En las determinaciones realizadas en plasma, destaca el trabajo de nuestro grupo [43], en el que analizamos 18 mediadores inmunológicos en plasma de pacientes diagnosticados de

LES, con diferente grado de actividad de la enfermedad. Concluyendo que en los pacientes con LES existe un estado basal pro-inflamatorio, incluso en ausencia de síntomas y a pesar de estar recibiendo tratamiento de la enfermedad. Se detectaron niveles plasmáticos elevados de MCP-1, MIP-1 β e IL-8 en pacientes diagnosticados de LES en comparación con los controles. Los niveles plasmáticos de citoquinas Th1, Th2 y Th17 fueron similares al comparar controles con enfermos. Las siguientes moléculas fueron indetectables en este estudio: IFN- α , IL-1 β , IL-6, IL-7 e IL-13.

Wu Q, *et al.* [106] detectaron niveles de mRNA de IFN- λ en células mononucleares de sangre periférica. y niveles de proteínas inducidas por éste (IP-10, MIG e IL-8) por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y técnica de ELISA, respectivamente. Concluyeron que IFN- λ está probablemente relacionado con enfermedades renales, la progresión de la artritis y quizá juegue un papel importante en la patogénesis del LES estimulando la secreción de las quimioquinas detectadas. Este hallazgo puede ser un punto estratégico para dirigir el tratamiento.

En 2005, Li Y, *et al.* realizaron una revisión [116], acerca del estudio de citoquinas y quimiocinas (IL-6, IL-10, IL-8, MCP-1 y MIP-1 α) en sangre y orina para la detección de nefritis lúpica activa. En presencia de actividad de lupus estaban elevados en sangre IL-6, IL-10, IL-8 y MIP-1 α y MCP-1, en comparación con pacientes sanos. En orina IL-6 e IL-10 no se detectaron e IL-8 y MIP-1 α presentaron niveles urinarios elevados pero no fueron significativos. Solo los niveles urinarios de MCP-1 se correlacionaron con actividad de la enfermedad a nivel renal y no existía relación entre los niveles urinarios y los plasmáticos de esta sustancia.

Alzawawy A, *et al.* [117] en un estudio de casos y controles determinaron niveles de MCP-1 en sangre y orina. Detectaron que los niveles plasmáticos de MCP-1 estaban más elevados en pacientes con LES y NL comparado con los controles, pero no fue significativo al compararlo con los pacientes con LES pero sin NL. Por otra parte, estos niveles no tenían ningún tipo de relación con determinados parámetros de laboratorio: creatinina, anticuerpos anti-DNA, proteinuria,... atribuyendo sus hallazgos a que la vida media de MCP-1 en sangre es corta. Por otra parte, los niveles urinarios de MCP-1 se correlacionaron con actividad renal de la enfermedad, grado de severidad de la NL y parámetros de laboratorio como proteinuria.

Por último, en el estudio de Tesar V, *et al.* [118] se estudiaron moléculas como TNF- α , IL-6, IL-8, sICAM-1 y sVCAM-1 en plasma y orina, por ELISA, para la detección de NL. Obtuvieron que los niveles plasmáticos y urinarios de IL-6 no son significativos. Solo fueron significativos para el diagnóstico de actividad a nivel renal de LES, los niveles de TNF- α plasmáticos, niveles urinarios de IL-8, siendo sVCAM-1 en plasma el mejor biomarcador.

Nuestro estudio es el primero en analizar hasta 27 mediadores inmunológicos, en orina, por tecnología Luminex y en demostrar que MCP-1 posee capacidad diagnóstica de lupus activo no necesariamente renal.

6.3.- Medicina personalizada y Medicina de precisión

Ante nuestros hallazgos, no podemos dejar de nombrar a la Medicina personalizada y la Medicina de precisión, y como nuestro estudio influye en ellas.

La Medicina personalizada puede ser definida como aquella en la que a través de la utilización de tecnología de perfil molecular se intenta obtener una estrategia terapéutica adecuada, para una persona concreta, en un determinado momento. Su objetivo es determinar la predisposición a padecer una enfermedad concreta y aportar las medidas preventivas adecuadas y estratificadas.

En 2010 se reunió en Bruselas la "*European Commission DG Research Directorate*" con el objetivo de clarificar el alcance de los biomarcadores, permitir la estratificación de las enfermedades, e identificar las limitaciones en el proceso de descubrimiento de los mismos, para su uso en ensayos clínicos y en la práctica médica diaria. Su objetivo era la construcción de una visión para 2020, intentando identificar los puntos más débiles para llegar a la meta [119].

A pesar de los avances por parte de la industria farmacéutica, no todos los pacientes presentan una respuesta favorable a los medicamentos. Por tanto, el progreso en el conocimiento de los mecanismos implicados en la etiopatogenia de las enfermedades y en la forma de actuación de los fármacos, abre un nuevo campo de oportunidades para ofrecer a los pacientes una terapia exclusiva para las características concretas de una enfermedad en un determinado individuo.

El uso de biomarcadores nos puede ayudar en la identificación de los pacientes que pueden tener una respuesta favorable a la instauración precoz de un determinado tratamiento.

Los biomarcadores permiten, por tanto, facilitar la prevención de las enfermedades y el desarrollo de nuevos tratamientos. Será necesario un mejor conocimiento de los

mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad y el conocimiento de los mecanismos de acción de los fármacos.

Antes de aplicar la Medicina personalizada de forma rutinaria en la práctica clínica, se necesita contar con las herramientas de investigación adecuadas, lo que en su conjunto se denomina Medicina de precisión. De esta forma se podrá diagnosticar y tratar cada patología de forma individual.

Con la finalización del Proyecto Genoma Humano, muchos anticiparon que a medio plazo las enfermedades podrían diagnosticarse y tratarse de forma individualizada. Esto suponía que ya no se abordarían las patologías en función de los síntomas, puesto que se podría aplicar diferentes terapias de acuerdo a los genes.

La anteriormente conocida como Medicina personalizada ha saltado a los medios de comunicación con el anuncio de Barack Obama de invertir 125 millones de dólares en 2016 en este campo. La Medicina de precisión es una aproximación al tratamiento y prevención de las enfermedades basado en la variabilidad genética, el ambiente y el estilo de vida de cada persona. Uno de los objetivos de la iniciativa es proporcionar ensayos clínicos innovadores en los se evalúe la efectividad de fármacos dirigidos a dianas moleculares concretas. De forma tradicional, en los ensayos clínicos se obtiene información sobre diferentes variables en múltiples individuos, miles, en ocasiones. Ésto ha derivado en que muchos de los fármacos utilizados en la actualidad, basados en generalizaciones, son efectivos únicamente en una proporción de la población. Para el resto, pueden ser inocuos o incluso tener un efecto negativo. Por tanto, para introducir el concepto de Medicina de precisión en la práctica clínica, el modelo clásico de ensayo clínico tiene que ser modificado. Ha llegado el momento

de los ensayos clínicos de una persona. Se recogerían múltiples datos de relevancia clínica a partir de un único paciente, de forma tan frecuente como fuera posible. Posteriormente, con el análisis estadístico adecuado los investigadores compararían el efecto de diferentes tratamientos en la misma persona. Schork [120] indica que habrá situaciones en las que los ensayos clínicos de una sola persona no sean adecuados o factibles, por ejemplo aquellos estudios de salud en los que se valora una intervención sobre la población completa donde el coste económico sea demasiado elevado. Sin embargo, en muchos otros, como en enfermedades "raras" o en los estadios tempranos en el desarrollo de un fármaco, la aproximación podría ser ideal.

La llegada del "*big data*" (del inglés, se define como la acumulación masiva de datos y los procedimientos usados para identificar patrones recurrentes dentro de esos datos) aplicado a la medicina, la mejora en la secuenciación genética y los avances de disciplinas como la epigenética y la proteómica, son la base para el desarrollo de este tipo de medicina.

En España, ya se aplican biomarcadores para 14 fármacos que permiten saber qué pacientes de cáncer de mama, pulmón y colon responderán a un tratamiento específico. Hasta ahora, la herramienta del clínico más precisa para catalogar una lesión, su gravedad y poder decidir un tratamiento es la biopsia del tumor. A pesar del tratamiento, la evolución inesperada o inexplicada del tumor nos hace dudar sobre la actitud terapéutica, pero la biopsia no se realiza de forma repetida, dado que es un método invasivo. Aparecen nuevos conceptos como "biopsia líquida" (transcriptómica). Se trata de obtener la información estudiando alteraciones genómicas o las células tumorales circulantes en la sangre, prueba que se puede repetir varias veces por su inocuidad.

De esta forma se consigue hacer más eficiente la sanidad. La accesibilidad a poder realizar estos test permite la mejora de la supervivencia del paciente, ya que el pronóstico de una enfermedad es mejor si se establece el tratamiento en las fases precoces de la misma.

Nuestro estudio es el primero en intentar el desarrollo de una estrategia de inmunovigilancia para el paciente lúpico, basada en la clínica y la determinación de biomarcadores no invasivos. Nuestros resultados proponen a MCP-1 en orina como un potencial biomarcador de actividad lúpica global y a nivel renal.

6.4.- Ventajas e importancia de nuestros hallazgos

En nuestro estudio, los valores elevados en orina de MCP-1 se asociaron a una peor puntuación con SLEDAI, y se encontró que poseían capacidad de diagnóstico y predicción para un LES severo. Encontramos, también, que los niveles urinarios elevados de MCP-1 tienen capacidad de diagnóstico y de predicción de actividad de la enfermedad a nivel renal. MCP-1 reúne, además, las características para considerarse como biomarcador de actividad. Por lo tanto, puede proponerse la determinación en orina de MCP-1 para el seguimiento clínico del paciente con LES. Puede sugerirse, además, el uso de MCP-1 como potencial biomarcador de actividad renal lúpica en enfermos lúpicos severos.

Con el objetivo fundamental de realizar un diagnóstico precoz e instaurar un tratamiento eficaz para mejorar el pronóstico de estos pacientes, nuestros hallazgos nos permiten el desarrollo de una estrategia de inmunocontrol, que integre la inmunología con la clínica, y que esté exenta de los errores ocasionados por la subjetividad del paciente a la hora

de explicar su síntomas y del clínico en la interpretación. Ésto marca un punto de partida a la hora de hablar de prevención. Según nuestros hallazgos, niveles elevados de MCP-1 en pacientes con un SLEDAI elevado podrían perfectamente indicar una intensificación del tratamiento. No obstante, actualmente, para los casos de afectación renal la biopsia es indispensable. Ciertamente, es necesaria la confirmación del tipo histológico de la lesión renal, pero se podría empezar a tratar mientras se espera el resultado de la biopsia. Presentar una proteinuria elevada, con valores de MCP-1 también elevados, podrían indicar el inicio de un tratamiento de rescate ante una puntuación elevada con SLEDAI-2K. Debe entenderse el aporte de MCP-1 como indirecto. No pretendemos substituir a la biopsia, ni alterar la secuencia en el estudio para diagnosticar y tratar adecuadamente un lupus activo, o un lupus renal activo.

6.5.- Limitaciones del estudio y Lineas futuras

Nuestros resultados deberían re-experimentarse en un mayor número de pacientes, con la participación de otros centros nacionales o extranjeros, si fuera posible. Al revisar los hallazgos que obtuvimos con IL-8 y MIP-1 β , en los que existían diferencias significativas entre enfermos inactivos, moderados y severos, y que éstas desaparecían al comparar por parejas enfermos inactivos con moderados y enfermos moderados con severos, revisamos la literatura. IL-8 y MIP-1 β pueden asociarse con nefritis lúpica y la afectación de otros órganos por el lupus [64,70]. Respecto a IP-10, unos los describen como un biomarcador de nefritis lúpica [110,111] y otros, sin embargo, la desestiman como biomarcador [113].

De igual manera, los resultados obtenidos por regresión logística deberían de analizarse de nuevo en en una población más amplia, junto con otras variables. La hematuria y la leucocituria se encuentran lejos de presentar capacidad de predicción de actividad. Los amplios intervalos de confianza confirman la imprecisión de estos dos clásicos signos de actividad lúpica renal, que pueden observarse vinculados a la clínica de otros procesos inmunes y no inmunes.

Ya que no se planteó como uno de los objetivos a la hora del diseño del estudio, no lo deberíamos plantear como una limitación. La idea de la realización de un estudio multicéntrico, prospectivo en el que realizara un seguimiento de los pacientes diagnosticados de LES y la toma seriada de muestras biológicas no invasivas, en este caso orina, nos permitiría describir más cualidades de MCP-1 u otros mediadores inmunológicos, respecto a las alteraciones existentes meses antes de la aparición de un brote de la enfermedad y la respuesta al tratamiento de inducción y de mantenimiento.

Creemos que nuestro estudio, aporta importantes avances en el conocimiento del LES y nuestro interés es poder plasmar estos hallazgos en la práctica clínica diaria para conseguir un beneficio por y para el paciente. Dos son las ideas que surgen:

- 1.- Creemos necesario conseguir lo que se denomina "*Point of care*" (pruebas en el punto de atención) para los pacientes con LES. La posibilidad de realizar un análisis, en este caso de orina, en un Centro de Salud o el paciente en su propio domicilio, a través de una tira reactiva con la capacidad de medir la concentración de MCP-1 en orina y poder monitorizar la enfermedad de forma ambulatoria, con la ventaja de que los niveles de MCP-1 son capaces de evaluar tanto actividad global de la enfermedad y

actividad renal. A este respecto, hemos iniciado conversaciones con empresas para conseguir implantar este test de cromatografía de forma ambulatoria. Nos permitiría un diagnóstico rápido, la toma de decisiones terapéuticas de forma inmediata, reduciría el número de visitas al hospital y por tanto los gastos sanitarios.

2.- Desarrollar “*scores*” combinados. Realización de estudios estadísticos para efectuar una combinación de biomarcadores, como puede ser el recuento de linfocitos en sangre, junto con el valor del complemento y su asociación con los niveles urinarios de MCP-1. De esta forma se mejoraría la capacidad de diagnóstico y predicción de actividad y brote de LES de cada uno de ellos de forma individual, con una mayor precisión en el diagnóstico. Conseguiríamos instaurar los el tratamiento de forma inmediata e individual para una persona concreta, en un momento determinado del curso de su enfermedad, optimizando su supervivencia.

Como conclusión principal de este trabajo, MCP-1 es un biomarcador no invasivo, de utilidad para detectar actividad global de la enfermedad y cuya aplicación en la práctica clínica diaria sería una aportación importante para individualizar/personalizar el tratamiento en una persona concreta con actividad lúpica, en un momento determinado, consiguiéndose un diagnóstico precoz, optimizando y estandarizando los tratamientos para cada persona y como el fin último de minimizar el daño crónico y mejorar la supervivencia de los pacientes con LES.

7. Conclusiones

Primera

La población estudiada fue similar en cuanto a sus características clínicas y epidemiológicas, respecto a otros estudios. Predominan las mujeres en edad fértil, siendo la afectación más frecuente la muco-cutánea y músculo-esquelética. La afectación renal fue característicamente de mayor gravedad en los varones que en las mujeres. Los pacientes seguían un tratamiento adecuado a su tipo de afección y en consonancia con lo sugerido o recomendado en la literatura.

Segunda:

De las 27 citoquinas estudiadas en orina, solo se detectaron y analizaron estadísticamente: IL-1RA, IP-10, VEGF, IL-8, IL-7, MCP-1, MIP-1 β e IL-12.

Tercera:

MCP-1 fue la quimiocina que presentó el valor urinario más elevado en relación con la mayor gravedad de la enfermedad, medido por SLEDAI-2K, respecto a pacientes sanos y pacientes con LES en fase inactiva.

Cuarta:

MCP-1 fue la única quimiocina que se asocia de forma independiente a la presencia daño renal y enfermedad grave, como marcador de actividad global.

Quinta:

MCP-1 presenta una asociación inversa con los niveles de complemento en suero, tanto C3 como C4 y con el conteo de linfocitos en sangre, lo que refuerza su papel como biomarcador de enfermedad severa.

Sexta:

Niveles urinarios de MCP-1 $\geq 42,65$ pg/ml sirven para la detección de actividad grave de la enfermedad, con alta sensibilidad y especificidad.

Séptima:

Por tanto, nuestros resultados indican que MCP-1 puede ser útil como biomarcador de actividad de la enfermedad tanto global como renal y puede aplicarse en la práctica clínica diaria, de una forma no invasiva y ambulatoria.

8. Rendimiento científico

En julio-2012 fue aceptado el artículo "MCP-1 in urine as biomarker of disease activity in systemic lupus erythematosus" en la revista Cytokine, publicándose en agosto-2012. **El factor de impacto de esta revista fué de 3.019 ese año.**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.journals.elsevier.com/cytokine

MCP-1 in urine as biomarker of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus

Julia Barbado^{a,b}, Debora Martin^{a,b}, Luisa Vega^{a,b}, Raquel Almansa^{b,c}, Lisbeth Gonçalves^c, Mercedes Nocito^c, Antonio Jimeno^{a,b}, Raúl Ortiz de Lejarazu^c, Jesus F Bermejo-Martin^{b,c,*}

^aAutoimmunity Unit, Internal Medicine Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid–SACYL, Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

^bInvestigación Biomédica del Clínico (ibC), Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

^cInfection & Immunity Medical Investigation Unit (IMI), Microbiology and Immunology Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2012

Received in revised form 7 July 2012

Accepted 9 July 2012

Available online 3 August 2012

Keywords:

MCP-1

Urine

SLE

Activity

ABSTRACT

Conventional clinical parameters are not sensitive or specific enough for detecting ongoing disease activity in the Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Measurement of cytokines in urine is an encouraging approach to detection of early flares in this disease. Here we have profiled 27 different cytokines, chemokines and cellular growth factors in the urine of 48 patients previously diagnosed of SLE as potential biomarkers of disease activity. Correlation analysis with Bonferroni correction showed that MCP-1 was the only immune mediator which levels in urine correlated directly with the SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2 K) score (correlation coefficient, p): MCP-1 (0.45, 0.003). MCP-1 correlated inversely with levels of C3 complement protein in serum (-0.50 , 0.001). MCP-1 showed significant higher levels in patients with severe disease activity in comparison with those exhibiting mild activity. Levels of this chemokine were also higher in patients with severe disease activity in comparison with patients with inactive disease and healthy controls. Areas under receiver operating characteristic curves (AUROC) for detection of severe disease (SLEDAI ≥ 8) was as follows for MCP-1: [AUROC, (IC95%), p]: [0.81 (0.65–0.96) 0.003]. In addition, MCP-1 showed a good result in the AUROC analysis for detecting renal involvement [0.70 (0.52–0.87) 0.050]. When correlation analysis were repeated excluding those patients with active renal disease ($n = 14$), levels of MCP-1 in urine kept on showing a significant positive association with SLEDAI-2 K score. In conclusion, multiplex-based cytokine profiling in urine demonstrated the superiority of MCP-1 over a wide range of cytokines as biomarker of disease activity in SLE.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a prototypical, autoimmune, multisystem disease characterized by chronic inflammation in multiple organs. In the UK, the prevalence has been estimated as 25 per 100,000, and the annual incidence as 5.3 for females and 0.7 for males per 100,000 [1]. In Asia, crude incidence rates (per 100,000 per year) range from 0.9 to 3.1, while crude prevalence rates range from 4.3 to 45.3 (per 100,000) [2]. There is a trend towards higher incidence and prevalence of SLE in Europe and Australia compared to the USA. In Europe, the highest prevalence is reported in Sweden, Iceland and Spain [3]. SLE has a negative impact on quality of life and is associated with high health-care costs and significant productivity loss. In the US, mean annual direct costs of SLE patients range from \$13,735 to \$20,926 [4]. In consequence, SLE incurs a great burden on both the patient and society [5].

In this context, there is an urgent need to identify biomarkers to predict lupus flares [6].

Conventional clinical parameters are not sensitive or specific enough for detecting ongoing disease activity in the Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Cytokines, chemokines and the immunoregulatory networks in which they participate play a principal role in the pathogenesis of this chronic disease [7]. Measurement of cytokines in urine is an encouraging approach with increasing clinical applications in SLE [8]. Recently, multiplex based technologies allows to profile a large number of cytokines, chemokines and cellular growth factors in a wide range of human samples while consuming a very limited amount of sample [9–11]. This work was designed to identify those cytokines secreted in urine which could work as potential biomarkers of disease activity in patients with SLE. Early detection of disease activity in SLE could translate into earlier instauration of the treatment, potentially limiting the flare consequences.

2. Materials and methods

SLE patients ($n = 48$) were recruited at the Unit of Autoimmune Diseases of our Hospital. Informed consent was obtained directly

* Corresponding author at: Investigación Biomédica del Clínico (ibC), Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain. Tel.: +34 983420000x974; fax: +34 983420040.

E-mail address: jfbermejo@saludcastillayleon.es (J.F. Bermejo-Martin).

from each patient before enrolment. Patient identification remained anonymous. Approval of the study protocol in both the scientific and the ethical aspects was obtained from the Scientific Committee for Clinical Research of our Hospital. The SLE patients fulfilled the classification criteria of the American College of Rheumatology for SLE [12]. Patients with clinical signs of infection at the moment of sample collection were excluded. For each patient, disease activity was assessed at the time of sampling, using the SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2 K) [13]. One freshly voided urine specimen was collected from each patient. Urine samples were placed at 4 °C and transported directly to the laboratory, where they were centrifuged to remove sediment and frozen in aliquots at –80 °C for later cytokine analysis. Serum and EDTA tubes were collected in parallel for biochemistry and hemogram analysis following the standard procedures employed in the Clinical Analysis Laboratory of our Hospital. Immunoglobulins and complement factors were measured using a Dade Behring BN II System nephelometer (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). Detection of auto-antibodies was done by indirect immunofluorescence using Hep-2 cells and *Crithidia luciliae* preparations as substrates, respectively, for detection of antinuclear/anti-DNA antibodies (Euroimmune, Lübeck, Germany), INNO-LIA device for detecting anti-extractable nuclear antigens antibodies (anti-ENA) and ELISA for detection of anticardiolipin antibodies (IgM and IgG). Immune mediators were analyzed in the urine samples using the 27-plex Biorad assay (Hercules, CA, USA) on a Luminex platform (Austin, TX, USA). Cytokines measured and limits of detection (lower and upper) were as follows (pg/ml): IL-1 receptor antagonist (IL-1RA): (2.06, 51837.3); IL-9: (1.58, 26447.2); IL-15: (1.96, 11900.8); Eotaxin: (1.51, 25057.0); human fibroblast growth factor–basic (FGF-b): (0.66, 8839.7); IFN-inducible protein 10 (IP-10): (2.51, 41274.8); macrophage inflammatory protein 1a (MIP-1 α): (0.99, 4207.0); platelet-derived growth factor (PDGF-BB): (1.33, 21802.4); Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted protein (RANTES): (1.27, 2502.0); vascular endothelial growth factor (VEGF): (4.77, 31623.9); IL1 β : (1.8, 4219.5); IL-6: (1.96, 25069.5); IL-8: (1.4, 25130); IL-7: (1.68, 27537.1); IL-17: (0.54, 22242.5); granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): (2.18, 12648.4); monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): (1.16, 2881.7); macrophage inflammatory protein 1b (MIP-1 β): (1.26, 1637.4); IL-2: (1.46, 7645.8); IL-4: (0.14, 3415.7); IL-5: (1.83, 19532.1); IL-10: (1.71, 24304); IL-12: (3.83, 36459.8); IL-13: (2.34, 11943.7); Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): (0.84, 13823.7); IFN- γ : (1.44, 24564.7); Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α): (4.75, 77755). Those values less than the level of detection were reported as being equal to the level of detection.

Differences in cytokine levels between groups were assessed by using the Mann Whitney U test. Chi squared test or Fisher's exact test were employed to compare proportions where appropriated. Correlations showed in this work were performed by using the Spearman correlation test, with further application of Bonferroni's correction ($p = 0.006$). The accuracy and the predictive values of the cytokines analyzed for detection of SLEDAI score ≥ 8 was studied by calculating areas under the receiver operating characteristic (AUROC) curves, as an appropriate cutoff to define severe disease [14]. 10 voluntary healthy controls of similar age, with no concomitant comorbidities and no signs of active inflammatory or infectious diseases, were recruited between workers at the University of Valladolid.

3. Results

Patients were split into three groups: those with no active disease (SLEDAI index = 0), those with mild disease activity (SLEDAI

index: 1–7) and those with severe disease activity (SLEDAI index ≥ 8) (Table 1). Groups showed no differences in terms of age or sex composition, predominating middle-aged women. Regarding personal antecedents, two men with no active SLE disease, two men and one woman with mild SLE disease and one woman with severe disease had concomitant antiphospholipid antibodies syndrome. A woman in the mild group had overcome a breast cancer, being free of disease at the moment of sample collection. A woman with no active lupus had suffered in the past a secondary syphilis, which was appropriately treated. She showed no symptoms when she was recruited for the study. Another woman with inactive disease had a mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Positive serology for Chagas disease in absence of symptoms was detected in one woman with no active lupus. A woman with severe lupic disease had ischemic cardiomyopathy + heart valvular insufficiency as personal antecedents. Another woman with inactive disease had a concomitant Rosacea. A woman with mild disease had overcome a renal tuberculosis, showing no signs of renal dysfunction at the moment of the study. Finally, a woman in the severe group had type I diabetes mellitus + hypothyroidism. The remaining patients included in this study had no other relevant clinical antecedents.

Patients in the severe group had significant lower lymphocyte counts in blood than patients with inactive or mild disease. Severe patients showed in addition significant lower levels of the complement proteins C3 and C4 in serum than patients with inactive disease. Patients with mild disease showed lower levels of C4 in serum than patients with no active disease. Renal involvement, defined by the presence of 24-h proteinuria exceeding 1 g or serum creatinine (>1.1 mg/dl for women; >1.3 for men), or urine sediment with >5 red blood cells or >6 leukocytes per high-power field or presence of casts, was more frequent in the severe group compared to the group with no active disease. Autoantibodies profiles were similar in the compared groups, except in the case of anti-Ro/SS-A antibodies, more frequently found in patients with inactive disease compared with those patients with severe disease (Table 1).

IL-9, IL-15, FGF-b, MIP-1a, IL-1 β , IL-17, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α were below of the limit of detection of the employed quantification method. A group of immune mediators was detected in a limited number of patients with inactive, mild or severe disease respectively: eotaxin (number of patients in each category) (1, 3, 3); PDGF and RANTES (1, 2, 1); IL-6 (1, 4, 2); IL-10 (6, 4, 5). Correlation analysis with Bonferroni correction were performed between each one of the 8 remaining cytokines and SLEDAI score. MCP-1 levels correlated directly with SLEDAI score (correlation coefficient, p): MCP-1 (0.45, 0.003) (Fig. 1). MCP-1 correlated inversely with C3 levels in serum ($-0.50, 0.001$). MCP-1 correlated inversely with neutrophil counts in peripheral blood ($-0.46, 0.002$). Correlation analysis with Bonferroni correction revealed no other significant association between levels of cytokines, chemokines and SLEDAI score. In consequence, further statistical analysis were focused in MCP-1.

MCP-1 showed significant higher levels in patients with severe disease activity in comparison with those exhibiting mild activity. Levels of this chemokine were also higher in patients with severe disease activity in comparison with patients with inactive disease and healthy controls. Areas under receiver operating characteristic curves (AUROC) for detection of severe disease (SLEDAI ≥ 8) was as follows for MCP-1: [AUROC, (IC95%), p]: [0.81 (0.65–0.96) 0.003]. In addition, MCP-1 showed a good result in the AUROC analysis for detecting renal disease [0.70 (0.52–0.87) 0.050]. This way, when we compared cytokine levels between patients with and without renal involvement, MCP-1 levels were higher in the former ($p < 0.05$) [(median, interquartile rank in each group): MCP-1 [(43.5, 103.6); (27.3, 43.9)]. Nonetheless, when correlations were repeated excluding from the analysis those patients with ac-

Table 1
Clinical characteristics of the patients.

| | Inactive disease SLEDAI = 0 n = 20 | Mild disease SLEDAI (1–7) n = 18 | Severe disease SLEDAI ≥ 8 n = 10 |
|--|--|--|--|
| Age | 42.5 [11.8] | 41.6 [9.4] | 35.0 [14.6] |
| Sex (F/M) | 17/3 | 15/3 | 8/2 |
| Leucocytes (n/mm ³) | 7254.0 [2343.9] | 6720.0 [1988.5] | 5800.0 [2524.8] |
| Lymphocytes (n/mm ³) | 2041.0 [825.6] | 2202.8 [949.9] | 1385.0 [906.8] [†] |
| Monocytes (n/mm ³) | 425.5 [139.7] | 446.1 [157.1] | 387.0 [198.8] |
| Neutrophils (n/mm ³) | 4407.5 [1987.8] | 3897.8 [1427.1] | 3923.0 [1789.7] |
| Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) | 13.6 [11.6] | 21.1 [15.4] | 20.7 [22.1] |
| Urea (serum) | 39.6 [23.9] | 41.1 [20.1] | 40.4 [23.2] |
| IgG (serum) | 1198.4 [669.0] | 1458.7 [861.9] | 1209.4 [541.5] |
| IgA (serum) | 265.2 [181.1] | 242.7 [177.3] | 196.2 [148.5] |
| IgM (serum) | 100.6 [83.6] | 112.3 [92.4] | 135.3 [107.5] |
| C3 (serum) | 119.6 [32.0] | 101.1 [36.4] | 80.3 [23.0] [†] |
| C4 (serum) | 20.7 [6.0] | 14.2 [7.8] [†] | 13.4 [15.0] [†] |
| Anti-DNA antibodies (NO/YES) | 16/4 | 15/3 | 6/4 |
| Anti-Ro/SS-A antibodies (NO/YES) | 10/10 | 10/8 | 9/1 [†] |
| Anti-La/SS-B antibodies (NO/YES) | 14/6 | 15/3 | 9/1 |
| Anti-Sm antibodies (NO/YES) | 19/1 | 18/0 | 10/0 |
| Anti-nucleosome antibodies (NO/YES) | 14/6 | 14/4 | 6/4 |
| Anti-cardiolipin IgM antibodies (NO/YES) | 20/0 | 17/1 | 9/1 |
| Anti-cardiolipin IgG antibodies (NO/YES) | 20/0 | 16/2 | 8/2 |
| Treatment with non-steroidal immunosuppressors | 15/5 | 13/5 | 5/5 |
| Renal involvement | 17/3 | 13/5 | 4/6 [†] |

Continuous variables are showed as (mean, SD).
[†] Significant differences with inactive disease group.
[‡] Significant differences with mild disease activity group.

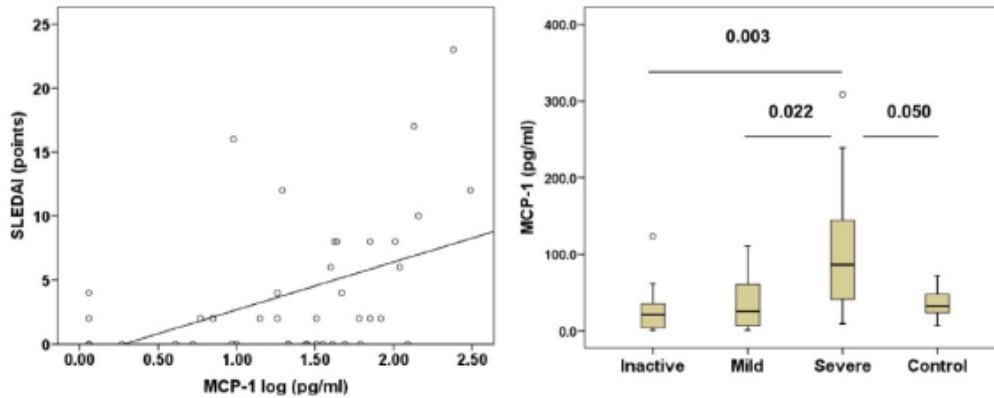


Fig. 1. Left: Correlation analysis between MCP-1 levels in urine and SLEDAI score. Right: MCP-1 levels in urine in patients with inactive, mild and severe SLE disease.

tive renal disease (n = 14), levels of MCP-1 in urine kept on showing a positive association with SLEDAI score in the remaining 34 patients of our cohort (correlation coefficient, *p*) (0.423, 0.018).

4. Discussion

Emergence of multiplex assays for cytokine profiling has opened a major avenue for biomarker discovery in autoimmune diseases. Here we have evaluated a good representation of analytes for inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, Th1 cytokines, Th2 cytokines, Th17 cytokines and chemokines in urine as potential biomarkers of disease activity in SLE. Correlation, AUR-

mokine (13 KDa) linked to the innate immunity that could easily filter into the urine. MCP-1 attracts monocytes, T cells, NK cells, and basophils in acute inflammatory conditions, and also can act as an important mediator in chronic inflammation [7,15,16]. The inverse associations found between levels of this chemokine in urine, neutrophil counts and levels of C3 in serum supports the participation of MCP-1 in the inflammatory events leading to complement consumption occurring during intense disease activity. An increase of serum MCP-1 had already been reported to occur with the progression of disease activity in SLE patients compared to healthy controls [17]. Moreover, we have previously reported that SLE patients, even in absence of symptoms, have higher MCP-1 levels in plasma than healthy controls [10].

cule has been described to play a main role in progression of inflammatory processes in kidney disease linked to SLE [18,15,19–21]. In fact, in our cohort, MCP-1 behaved as a good diagnostic test for detection of renal failure. Remarkably, our work demonstrates, in addition to the detection of renal damage, the potential use of urinary levels MCP-1 for monitoring extra-renal disease activity in SLE. Nonetheless, a limitation of our study was that subclinical forms of renal disease could not be assessed since we did not perform renal biopsies in the patients of our cohort.

In conclusion, multiplex-based cytokine profiling in urine demonstrated the superiority of MCP-1 over a wide range of cytokines as biomarker of disease activity in SLE. Using non-invasive biomarkers for monitoring renal or systemic involvement in SLE could translate into great benefits for the patients, since it could avoid using more aggressive alternatives such as blood sampling or tissue biopsies.

Acknowledgments

The authors thank Lucia Rico and Veronica Iglesias for technical support in cytokine profiling and Caja de Burgos for its scientific support.

References

- [1] Systemic lupus erythematosus – an update. *Drug Ther Bull* 2011;49:81–4.
- [2] Jakes RW, Bae SC, Louthrenoo W, Mok CC, Navarra SV, Kwon N. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:159–68.
- [3] Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006;15:308–18.
- [4] Slawsky KA, Fernandes AW, Fufeld L, Manzi S, Goss TF. A structured literature review of the direct costs of adult systemic lupus erythematosus in the US. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:1224–32.
- [5] Lau CS, Mak A. The socioeconomic burden of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:400–4.
- [6] Ahearn JM, Liu CC, Kao AH, Manzi S. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Trans Res* 2012;159:326–42.
- [7] Yu SL, Kuan WP, Wong CK, Li EK, Tam LS. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012;7:15190.
- [8] Mok CC. Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal. *J Biomed Biotechnol* 2010;638413.
- [9] Willis R, Seif A, McGwin Jr G, Martinez-Martinez LA, Gonzalez EB, Dong N, et al. Effect of hydroxychloroquine treatment on pro-inflammatory cytokines and disease activity in SLE patients: data from LUMINA (LXXV). *A multiethnic US Cohort. Lupus* 2012;21:830–5.
- [10] Vega L, Barbado J, Almansa R, Gonzalez-Gallego R, Rico L, Jimeno A, et al. Prolonged standard treatment for systemic lupus erythematosus fails to normalize the secretion of innate immunity-related chemokines. *Eur Cytokine Netw* 2010;21:71–6.
- [11] Hermansen ML, Hummelshoj L, Lundsgaard D, Hornum L, Keller P, Fleckner J, et al. Increased serum beta2-microglobulin is associated with clinical and immunological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012.
- [12] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271–7.
- [13] Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;29:288–91.
- [14] Li QZ, Xie C, Wu T, Mackay M, Aranow C, Putterman C, et al. Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. *J Clin Invest* 2005;115:3428–39.
- [15] Alzawawy A, Zohary M, Ablordiny M, Eldalie M. Estimation of monocyte-chemoattractant protein-1 (Mcp-1) level in patients with lupus nephritis. *Int J Rheum Dis* 2009;12:311–8.
- [16] Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005;125:615–28.
- [17] Kaneko H, Ogasawara H, Naito T, Akimoto H, Lee S, Hishikawa T, et al. Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999;26:568–73.
- [18] Barbado J, Vega L, Gonzalez-Gallego R, Jimeno A, Ortiz De Lejarazu R, et al. MCP-1 in urine as biomarker of renal lupus in absence of cytokines, interferon-gamma and growth factors. *Reumatol Clin* 2010;6:296–8.
- [19] Kiani AN, Johnson K, Chen C, Diehl E, Hu H, Vasudevan G, et al. Urine osteoprotegerin and monocyte chemoattractant protein-1 in lupus nephritis. *J Rheumatol* 2009;36:2224–30.
- [20] Marks SD, Williams SJ, Tullus K, Sebire NJ. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 is predictive of poor renal prognosis in pediatric lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:3521–6.
- [21] Wagrowska-Danilewicz M, Stasikowska O, Danilewicz M. Correlative insights into immunexpression of monocyte chemoattractant protein-1, transforming growth factor beta-1 and CD68+ cells in lupus nephritis. *Pol J Pathol* 2005;56:115–20.

9. Anexos

Anexo 1: SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000)

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 granulosos. |
| 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 | | Ulceras bucales | De comienzo reciente o recurrente. Ulceras 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: BILAG (British Isles Lupus Assessment Group index)

INDICE BILAG

Todos los síntomas, signos y datos de laboratorio se refieren al mes previo en que se realiza el estudio, salvo que se indique lo contrario.

(5) Datos del paciente:.....

(6) Hospital:

.....

(7) Fecha de la evaluación:

(8) Tratamiento (máxima dosis del medicamento recibida en el último mes o en la última visita):

SÍNTOMAS GENERALES: Mejoría (1), Igual (2), Peor (3), Nuevo (4)

1. () Fiebre documentada.
2. () Pérdida de peso.
3. () Linfadenopatías/esplenomegalia.
4. () Fatiga/malestar/letargia.
5. () Anorexia/nauseas/vómitos.

MUCO-CUTÁNEOS: Mejoría (1), Igual(2), Peor(3), Nuevo (4)

1. () Erupción máculopapular con actividad severa: discoide o bullosa.
2. () Erupción máculopapular leve.
3. () Lesiones discoides activas (generalizadas y extensas).
4. () Lesiones discoides activas (localizadas indicativas de lupus profundo).
5. () Alopecia activa severa.
6. () Alopecia leve.
7. () Paniculitis severa.
8. () Angioedema.
9. () Úlceras mucosas extensas.
10. () Úlceras mucosas pequeñas.
11. () Eritema malar.
12. () Nódulos subcutáneos.

13. () Lesiones de lupus pernio.
14. () Eritema periungueal.
15. () Inflamación de los dedos. SI/NO
16. () Esclerodactilia. SI/NO
17. () Calcinosis. SI/NO
18. () Telangiectasias. SI/NO

NEUROLÓGICO: Mejoría (1), Igual(2), Peor(3), Nuevo (4)

1. () Deterioro leve de la conciencia.
2. () Psicosis aguda o delirio o estado confusional.
3. () Ataques epilépticos tipo gran mal.
4. () Accidente cerebrovascular agudo.
5. () Meningitis aséptica.
6. () Mononeuritis múltiple.
7. () Mielitis transversa.
8. () Neuropatía periférica o de pares craneales.
9. () Tumefacción localizada.
10. () Corea.
11. () Ataxia cerebelosa.
12. () Cefalea severa y continua.
13. () Enfermedad depresiva orgánica.
14. () Síndrome cerebral orgánica, pseudotumor cerebral.
15. () Episodios de cefalea migrañosa.

MÚSCULO-ESQUELÉTICO: Mejoría (1), Igual(2), Peor(3), Nuevo (4)

1. () Miositis definida.
2. () Poliartritis severa.
3. () Artritis.
4. () Tendinitis.
5. () Miositis crónica leve.
6. () Artralgia.
7. () Mialgia.
8. () Contractura tendinosa y deformidad fija.
9. () Necrosis aséptica.

CARDIOVASCULAR Y RESPIRATORIO: Mejoría (1), Igual(2), Peor(3), Nuevo (4)

1. () Dolor pleuropericardítico.
2. () Disnea.
3. () Fallo cardiaco.
4. () Roce.
5. () Pericarditis o pleuritis.
6. () Dolor torácico leve o intermitente.
7. () Cambios progresivos en la radiografía de tórax con afectación pulmonar. SI/NO
8. () Cambios progresivos en la radiografía de tórax con afectación cardiaca. SI/NO
9. () Evidencia electrocardiográfica de pericarditis o miocarditis. SI/NO
10. () Arritmia cardiaca incluida la taquicardia a más de 100 latidos por minuto sin fiebre.
11. () Disminución de la función pulmonar en menos del 20%. SI/NO
12. () Evidencia citohistológica de enfermedad inflamatoria del pulmón.

VASCULITIS: Mejoría (1), Igual(2), Peor(3), Nuevo (4)

1. () Vasculitis cutánea importante incluidas las úlceras.
2. () Dolor abdominal debido a vasculitis.
3. () Tromboembolismo recurrente (excluido el ACV).
4. () Síndrome de Raynaud.
5. () Livedo reticularis.
6. () Flebitis superficial.
7. () Vasculitis cutánea menor (uña, digital, púrpura, úlceras).
8. () Primer episodio de tromboembolismo (excluido el ACV)

RENAL: Mejoría (1), Igual(2), Peor(3), Nuevo (4)

1. () Aumento de la tensión arterial sistólica (mmHg).
2. () Aumento de la tensión arterial diastólica.
3. () Hipertensión acelerada. SI/NO
4. () Tira reactiva (+=1, ++=2, +++=3)
5. () Proteinuria de 24 horas (gr).
6. () Proteinuria de reciente aparición de >1gr/24h.
7. () Síndrome nefrótico. SI/NO
8. () Creatinina.
9. () Aclaramiento de creatinina (ml/min).
10. () Sedimento urinario activo. SI/NO
11. () Evidencia histológica de nefritis activa (dentro de los tres meses últimos).

HEMATOLÓGICO: Mejoría (1), Igual(2), Peor(3), Nuevo (4)

1. () Hemoglobina (g/dl).
2. () Leucocitos totales
3. () Neutrófilos.
4. () Linfocitos.
5. () Plaquetas.
6. () Evidencia de hemólisis activa.
7. () Test de Coombs +.
8. () Evidencia de anticoagulante lúpico.

SISTEMA DE PUNTUACIÓN DEL ÍNDICE BILAG.

Categoría A. Enfermedad lo suficientemente activa como para cambiar el tratamiento: Prednisolona > 20 mg/día y/o inmunosupresores.

Categoría B. Enfermedad con menor actividad que en la categoría A; síntomas o signos reversibles con tratamiento sintomático como antimaláricos, antiinflamatorios no esteroideos o Prednisolona < 20 mg/día.

Categoría C. Enfermedad estable o con baja actividad.

Categoría D. Sistema previamente afectado pero en la actualidad inactivo.

Categoría E. Sistema nunca afectado.

CRITERIOS DE RESPUESTA

Brote mayor: nuevo score A.

Brote moderado: paso de un C, D o E a un B.

Respuesta completa: desaparición (sin reaparición) de todos los A y B.

Respuesta parcial: desaparición de los A pero persistencia de por lo menos un nuevo B.

SÍNTOMAS GENERALES

CATEGORÍA A

Fiebre más otras dos manifestaciones.

CATEGORÍA B

Fiebre u otras dos manifestaciones.

CATEGORÍA C

Algún otro criterio.

CATEGORÍA D

Implicación previa.

CATEGORÍA E

No implicación.

MUCO-CUTÁNEAS

CATEGORÍA A

Algunas de las manifestaciones siguiente:

1. Erupción máculopapular con actividad severa: discoide o bullosa.
2. Lesiones discoides activas (generalizadas y extensas).
3. Angioedema.
4. Úlceras mucosas extensas.

CATEGORÍA B.

Algunas de las manifestaciones siguientes:

1. Erupción máculopapular leve.
2. Eritema malar.
3. Lesiones discoides activas (localizadas indicativas de lupus profundo).
4. Paniculitis severa.
5. Alopecia activa severa.
6. Nódulos subcutáneos.
7. Lesiones de lupus pernio.

CATEGORÍA C.

Algunas de las manifestaciones siguientes:

1. Eritema periungueal.

2. Inflamación de los dedos.
3. Esclerodactilia.
4. Calcinosis.
5. Telangiectasias.
6. Alopecia leve.
7. Úlceras mucosas pequeñas.

CATEGORÍA D.

Implicación previa.

CATEGORÍA E

No implicación previa.

SISTEMA NERVIOSO (PRIMER EPISODIO)

CATEGORÍA A.

Uno de los siguientes:

1. Deterioro leve de la conciencia.
2. Psicosis aguda o delirio o estado confusional.
3. Ataques epilépticos tipo gran mal.
4. Accidente cerebrovascular agudo.
5. Meningitis aséptica.
6. Mononeuritis múltiple.
7. Mielitis transversa.
8. Neuropatía periférica o de pares craneales.
9. Corea.
10. Ataxia cerebelosa.

CATEGORÍA B

Alguno de los siguientes:

1. Cefalea severa y continua.
2. Enfermedad depresiva orgánica.
3. Síndrome cerebral orgánico, pseudotumor cerebral.
4. Tumefacción localizada.

CATEGORÍA C

Episodios de cefalea migrañosa.

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LOS ANTERIORES.

SISTEMA NERVIOSO (EPISODIOS SIGUIENTES)

CATEGORÍA A

Cuando alguno de los síntomas ha empeorado o se manifiesta de nuevo:

1. Deterioro leve de la conciencia.
2. Psicosis aguda o delirio o estado confusional.
3. Ataques epilépticos tipo gran mal.
4. Accidente cerebrovascular agudo.
5. Meningitis aséptica.
6. Mononeuritis múltiple.
7. Mielitis transversa.
8. Neuropatía periférica o de pares craneales.
9. Corea.
10. Ataxia cerebelosa.

CATEGORÍA B

Cuando alguno de los síntomas ha empeorado o se manifiesta de nuevo:

1. Cefalea severa y continua.
2. Enfermedad depresiva orgánica.
3. Síndrome cerebral orgánico, pseudotumor cerebral.
4. Tumefacción localizada.

O alguno de los siguientes esté igual o haya mejorado:

1. Deterioro leve de la conciencia.
2. Psicosis aguda o delirio o estado confusional.
3. Ataques epilépticos tipo gran mal.

CATEGORÍA C

1. Episodio de cefalea migrañosa
2. Síntomas recogidos en la categoría A de 4-10 que estén igual o hayan mejorado.
3. Síntomas recogidos en la categoría B de 1-4 que estén igual o hayan mejorado.

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LOS ANTERIORES.

MÚSCULO-ESQUELÉTICO

CATEGORÍA A

Uno o más de los siguientes:

1. Miositis.
2. Poliartritis severa con pérdida de función (no responde a antipalúdicos, esteroides 20 mg/día y antiinflamatorios no esteroideos).

CATEGORÍA B

Uno o más de los siguientes:

1. Artritis.
2. Tendinitis.

CATEGORÍA C

1. Artralgias.
2. Mialgias.
3. Contracturas tendinosas y deformidades.
4. Necrosis aséptica.
5. Miositis crónica leve

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LAS ANTERIORES.

CARDIOVASCULAR/RESPIRATORIO

CATEGORÍA A

Fallo cardiaco más dos de los siguientes criterios:

1. Dolor pleuro-pericardítico.
2. Disnea.
3. Roce.
4. Cambios progresivos en la radiografía de tórax con afectación pulmonar.
5. Cambios progresivos en la radiografía de tórax con afectación cardiaca.
6. Evidencia electrocardiográfica de pericarditis o miocarditis.
7. Arritmia cardiaca incluida la taquicardia a más de 100 latidos por minuto sin fiebre.
8. Disminución de la función pulmonar en menos del 20%.
9. Evidencia citohistológica de enfermedad inflamatoria del pulmón.

CATEGORÍA B

Sin fallo cardiaco más dos criterios de la lista anterior.

CATEGORÍA C

Dolor torácico intermitente y leve o uno de los criterios de la lista anterior.

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LOS ANTERIORES.

VASCULITIS

CATEGORÍA A

Uno de los siguientes:

1. Vasculitis cutánea importante incluidas las úlceras.
2. Dolor abdominal debido a vasculitis.
3. Tromboembolismo recurrente (excluido el ACV).

CATEGORÍA B

Uno de los siguientes:

1. Flebitis superficial.
2. Vasculitis cutánea menor (uña, digital, púrpura, urticaria).
3. Primer episodio de tromboembolismo (excluido el ACV).

CATEGORÍA C

Uno de los siguientes:

1. Raynaud.
2. Livedo reticularis.

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LAS ANTERIORES.

AFECTACIÓN RENAL (PRIMER EPISODIO)

CATEGORÍA A

Dos o más de los siguientes incluidos siempre el 1, 4 y 5:

1. Proteinuria >1gr/24 horas.
2. Hipertensión arterial acelerada.
3. Aclaramiento de creatinina < 50 ml/minuto.
4. Sedimento: piuria (>5leucocitos/campo, hematuria>5/campo) o cilindros hemáticos en ausencia de infección.
5. Evidencia histológica de nefritis activa en los últimos tres meses o desde la evaluación previa si fue visto en menos de tres meses.

CATEGORÍA B.

Uno de los siguientes:

1. Uno de la categoría A.
2. Proteinuria en tira reactiva de 2+ o más.
3. Proteinuria de 24 horas >0.5gr y menor de 1 gr.

CATEGORÍA C

Uno de los siguientes:

1. Proteinuria en tira reactiva 1+.
2. Presión arterial >140/90 (tomada en 5 ocasiones).
3. Creatinina >130 mmol/l.

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LAS ANTERIORES.

AFECTACIÓN RENAL (EPISODIOS SIGUIENTES)

CATEGORÍA A

Dos o más de los siguientes y se incluye siempre 1, 4 o 5:

1. Proteinuria definida como: A. Aumento de 2+ o más en la tira reactiva; o B. Aumento de la proteinuria de 24 horas desde >0.20gr a >1gr; o C. Aumento de la proteinuria de > 1g por 100%; o D. Nuevo dato de proteinuria >1g.
2. Hipertensión acelerada.
3. Deterioro de la función renal definida como: A. Creatinina en plasma >130 micromoles por litro y aumento de >130% del valor previo; o B. Aclaramiento de creatinina menor del 67% del valor previo; o C. Aclaramiento de creatinina < 50 ml/minuto, y el último aclaramiento medido fue > 50 ml/minuto o no se midió.
4. Sedimento urinario activo.
5. Evidencia histológica de nefritis activa en los últimos tres meses o desde la evaluación previa si fue visto en menos de tres meses.

CATEGORÍA B

1. Uno de los siguientes: Uno de los criterios de la categoría A.
2. Proteinuria de: A. 2+ o más en la tira reactiva; o B. Aumento de la proteinuria de 24 horas de >1 gr por >50% pero < 100%.
3. Creatinina plasmática >130 micromoles por litro o incremento de 115% del valor previo.

CATEGORÍA C.

Uno de los siguientes:

1. Proteinuria en orina de 24 horas >0.25 gr.
2. Proteinuria en tira reactiva 1+ o más.
3. Aumento de la tensión arterial definida como aumento de la sistólica mayor o igual de 30 mm o aumento de la diastólica mayor o igual de 15 (siempre que los valores anotados sean mayores de 140/90).

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LOS ANTERIORES.

HEMATOLÓGICO

CATEGORÍA A

Uno de los siguientes:

1. Leucocitos <1000/mm³.
2. Plaquetas <25.000/mm³.
3. Hemoglobina <8gr/dl.

CATEGORÍA B

Uno de los siguientes:

1. Leucocitos <2.500/mm³.
2. Plaquetas <100.000/mm³.
3. Hemoglobina < 11 gr/dl.
4. Evidencia de hemólisis activa (aumento de bilirrubina, reticulocitos y test de Coombs positivo).

CATEGORÍA C

Uno de los siguientes:

1. Leucocitos <4.000/mm³.
2. Linfocitos <1.500/mm³.
3. Plaquetas <150.000 /mm³.
4. Test de Coombs positivo pero sin evidencia de hemólisis activa.
5. Evidencia de anticoagulante lúpico.

CATEGORÍA D Y E IGUAL QUE LOS ANTERIORES.

Anexo 3: Consentimiento informado para la recogida de muestra de orina y datos

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

ESTUDIO Biomarca-LUPUS

Yo, (nombres y apellidos): _____

He sido propuesto a participar del estudio "**Biomarcadores no invasivos de actividad en Lupus Eritematoso Sistémico**". He podido hacer todas las preguntas que me han surgido sobre el mismo y recibido la información suficiente.

La información la he recibido del Dr(a): _____

Comprendo que mi participación es voluntaria y puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Entiendo que al acceder a participar de este estudio, consiento la recogida, tratamiento, cesión y transferencia (si procede) de los datos relacionados con el estudio, con respeto del anonimato.

Entiendo también que es necesario que aporte una muestra de orina para la determinación objetivo.

Presto libremente mi conformidad a participar en el estudio.

En Valladolid, a _____ de _____ de 2010.

Firma del paciente o representante legal:

Firma del investigador principal:

Tal y como se establece en la LOPD 15/1999 y Real Decreto 1720/2007 el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales es revocable. Usted puede ejercer el derecho de acceso, rectificación y cancelación dirigiéndose al investigador.

Anexo 4: Algoritmo de actuación diagnóstica y terapéutica de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes del HCUV

Basado en el Documento consenso del Grupo de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (GEAS) de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) y de la Sociedad Española de Nefrología (S.E.N.). (2012). Nefrología 2012;32(Suppl.1):1-35.

Ruiz Irastorza G, Espinosa G, Frutos MA, Jiménez Alonso J, Praga M, Pallarés L, Rivera F, Robles Marhuenda A, Segarra A, Quereda C. [84]

1.- Valoración de ingreso si:

- 1.- Afectación del estado general.
- 2.- Necesidad de medicación intravenosa.
- 3.- Necesidad de realización de biopsia.

2.- Realización de biopsia renal: si presenta datos determinantes de nefritis lúpica:

- Aumento o no de creatinina plasmática. Disminución o no del filtrado glomerular.
- Proteinuria confirmada: > 0.5 gr/24 horas de reciente comienzo o aumento de la proteinuria ya conocida en más de 0.5 gr/24 horas o cociente proteínas/creatinina en muestra matutina ≥ 0.5 calculado en orina de 24 horas o sedimento activo.
- Sedimento urinario activo:
 - Cilindros urinarios: Cilindros hemáticos o granulosos.
 - Hematuria: > 5 hematies/campo. Excluir litiasis, infección u otras causas.
 - Piuria: > 5 leucocitos/campo. Excluir infección.
- Presencia de actividad inmunológica: Ac anti-ADNn, C3 y C4.

Indicaciones para repetir la biopsia renal:

- 1) Aumento o reaparición de proteinuria, síndrome nefrótico o sedimento activo, especialmente si la primera biopsia es una clase no proliferativa.
- 2) Aumento de creatinina sérica o evolución inexplicada hacia la insuficiencia renal.
- 3) Refractariedad para tratamientos inmunosupresores.
- 4) Incertidumbre respecto al grado de actividad/cronicidad de lesiones renales, para decidir tratamiento.
- 5) Sospecha de nefropatía no relacionada con lupus.

3.- Actitud terapéutica:

El tratamiento inmunosupresor está categorizado según la clase histológica de la biopsia renal.

Clase I. Nefritis lúpica mesangial mínima:

Es un diagnóstico de nefritis lúpica únicamente histológico y no se acompaña de alteraciones clínicas ni analíticas, no administramos tratamiento inmunosupresor.

El tratamiento de este grupo es guiado por sus manifestaciones extrarrenales.

Si aparece de novo, proteinuria significativa, síndrome nefrótico o hematuria macroscópica en pacientes diagnosticados de nefritis lúpica clase I, obligaría a descartar con una nueva biopsia renal procesos glomerulares asociados o evolución histológica a otras clases de nefritis lúpica.

Clase II. Nefritis lúpica proliferativa mesangial:

El tratamiento de este grupo es guiado por sus manifestaciones extrarrenales.

Si proteinuria significativa (>1-2 g/día a pesar de tratamiento renoprotector) y/o deterioro de función renal no atribuible a factores funcionales, iniciamos tratamiento esteroideo (hasta 0.5 mg/kg/día) acompañado o no de inmunosupresores (azatioprina, micofenolato) como ahorradores de corticoides, de seis a 12 meses de duración.

El tratamiento de las clases histológicas más graves de nefritis lúpicas (clases III y IV) y de la clase V se divide en dos fases:

La primera, o de inducción de la respuesta, tiene como objetivo la remisión precoz del brote renal y evitar la evolución a la cronicidad. Ello se consigue con un tratamiento inmunosupresor intensivo. Su duración puede variar pero, en general, será de tres a seis meses, o incluso más, si el paciente presenta todavía signos de actividad de la enfermedad en el riñón.

La segunda, o de mantenimiento de la respuesta, tienen como objetivo evitar el desarrollo de brotes renales durante la evolución o mantener la mejoría conseguida en la fase de inducción. Se lleva a cabo con un nivel de inmunosupresión menos intenso. En general se mantiene el tratamiento al menos hasta dos años después de establecida la remisión.

Clase III (A y A/C) y IV (A y A/C):

Tratamiento de inducción:

Tratamiento con glucocorticoides. se inician con una dosis de prednisona de hasta 1 mg/Kg/día, con una dosis máxima de 60 mg/día.

Pulsos intravenosos (i.v.) de metilprednisolona (250-1000 mg/día durante 3 días consensucivos) ante la presencia en la biopsia de proliferación extracapilar o en pacientes con deterioro agudo de la función renal.

Para disminuir la dosis acumulada y evitar su conocida toxicidad, administramos ciclofosfamida

en forma de pulsos i.v., mediante uno de siguientes esquemas:

- a) Pulsos i.v. mensuales, de 750 mg/m² de superficie corporal, durante seis meses consecutivos.
- b) Pulsos i.v. quincenales, con una dosis fija de 500 mg, durante tres meses (6 pulsos en total). Si se usa esta pauta debe ir precedida de la administración de pulsos de metilprednisolona (750 mg/día durante 3 días) seguida de prednisona a dosis de 0.5 mg/kg/día.

En los casos con deterioro grave de función renal (creatinina sérica > 3 mg/dl) o que se muestren lesiones de necrosis fibrinoide o semilunas en la biopsia, se utilizará siempre una pauta terapéutica que incluye la ciclofosfamida i.v.

En las otras ocasiones, se puede optar por el micofenolato sódico con cubierta entérica, como tratamiento de inducción. Lo iniciamos a dosis de 720 mg por vía oral (repartido en dos dosis). Esta dosis se irá incrementando progresivamente, en dos semanas, para alcanzar la dosis de 1.440-1800 mg, repartidos en dos-tres tomas diarias.

Tratamiento de mantenimiento:

Una vez completado el tratamiento de inducción y habiendo alcanzado la respuesta al menos parcial, el tratamiento de mantenimiento consiste en dosis bajas de esteroides y micofenolato sódico.

La dosis de micofenolato sódico oscilará entre 1.080-1.440 mg/día, repartidos en dos dosis.

La duración del tratamiento con el micofenolato sódico será de, al menos, dos años una vez alcanzada la remisión. La dosis de micofenolato se disminuirá progresivamente antes de la suspensión definitiva.

Si se tiene intolerancia al micofenolato sódico, se cambiará la medicación por azatioprina. La dosis de azatioprina oscilará entre 1.5-2 mg/kg/día. La duración del tratamiento, así como la reducción paulatina de la dosis, seguirá la misma pauta que en el caso del micofenolato sódico.

Al inicio del tratamiento de mantenimiento, si ha habido respuesta, la dosis de prednisona se situará como máximo en 10 mg/día. A partir de este momento, la pauta de descenso es progresiva y la más baja posible (≤ 5 mg/día). Esta dosis, la más baja posible, se mantendrá mientras se tenga el tratamiento con micofenolato o azatioprina.

Tras la suspensión del micofenolato o de la azatioprina se mantendrá la prednisona durante un periodo variable en función de las características del paciente. En caso de ausencia de actividad clínica/analítica y en pacientes que no hayan presentado recaídas previas, se reduce lenta y gradualmente hasta su retirada.

Clase V. Nefritis lúpica membranosa:

Tratamiento inicial con prednisona hasta 1 mg/kg/día (con una dosis máxima de 60 mg/día y posteriormente reducción de dosis de manera similar a las clase III y IV), acompañado de una de las

siguientes opciones terapéuticas: ciclofosfamida, anticalcineurínicos: ciclosporina o tacrolimus, micofenolato mofetilo o micofenolato sódico con cubierta entérica o azatioprina.

Si se opta por ciclofosfamida o micofenolato, se usarán las misma dosis que en las clases III y IV. Si se opta por azatioprina, la dosis inicial sería de 1.5-2 mg/kg/día, y en caso de anticalcineurínicos, de 2 a 5 mg/kg/día para la ciclosporina y de 0.1 a 0.2 mg/kg/día para el tacrolimus.

Los pacientes con nefritis lúpica clase V que presenten en la biopsia criterios de nefritis lúpica clases III ó IV coexistentes, seguirán el mismo esquema de tratamiento que éstos.

Una vez completado el tratamiento de inducción y habiendo alcanzado respuesta al menos parcial del proceso, el tratamiento de mantenimiento se hará con dosis bajas de esteroides y una de las siguientes opciones: micofenolato, anticalcineurínicos o azatioprina.

La duración del tratamiento de mantenimiento y las dosis de los fármacos será similar a lo descrito para las clases III y IV en lo que respecta a esteroides, micofenolato, azatioprina y anticalcineurínicos.

Clase VI. Nefritis lúpica esclerosada:

El diagnóstico es fundamentalmente clínico y la realización de una biopsia renal no está indicada de forma habitual.

Estará justificada la realización de biopsia renal si existe un deterioro rápido del filtrado glomerular, sin causa evidente, en paciente con antecedentes de brotes previos de nefritis lúpica.

Valorar en cada caso si se debe intensificar el tratamiento inmunosupresor.

Será remitido a la consulta del especialista en Nefrología-ERCA cuando el FG estimado alcance niveles inferiores a 30 ml/min (ERCA estadio 5), con el objetivo de iniciar la preparación para la terapia renal sustitutiva y el estrecho control de las alteraciones urémicas.

Mantener los fármacos bloqueantes del SRAA, vigilando de forma estrecha la aparición de complicaciones, fundamentalmente la hiperpotasemia y el deterioro de la función renal.

Se iniciará un lento descenso de la inmunosupresión hasta suspenderla, salvo que fuera necesaria por actividad lúpica extrarrenal.

En los casos de nefritis lúpica que alcanzan la ERCA (estadio 5) en el contexto de un brote agudo con insuficiencia renal rápidamente progresiva, el tratamiento de inducción se debería prolongar al menos durante 4-6 meses después de iniciado el tratamiento dialítico, hasta confirmarse la ausencia de recuperación.

Otras medicaciones y aspectos a considerar:

a) Corticoides:

En formas graves se realizan pulsos intravenosos de metilprednisolona (250-1000 mg) al inicio del tratamiento.

Independientemente de la dosis de inicio, el descenso de prednisona será rápido, hasta alcanzar una dosis de mantenimiento no superior a 5 mg/día, se valorará la suspensión según la actividad de la enfermedad.

b) Hidroxicloroquina:

La recibirán a largo plazo. La presencia de nefropatía lúpica, remisión mantenida o embarazo, no condiciona su retirada.

Es importante la monitorización de los efectos adversos: examen oftalmológico, sobre todo, si la dosis de hidroxicloroquina es >1000g.

c) Antiproteinúricos:

Los pacientes con nefritis lúpica, proteinuria y/o hipertensión arterial recibirán fármacos SRAA. Se recomienda la pérdida de peso en pacientes obesos.

d) Riesgo cardiovascular e hipertensión arterial:

Controlar la hipertensión arterial y de otros factores de riesgo cardiovascular (dislipemia, diabetes mellitus, ...) que aumenten la incidencia de eventos cardiovasculares. Introducir medidas no farmacológicas y farmacológicas.

e) Gastroprotección:

En pacientes con enfermedad ulcerosa o hemorragia gastrointestinal previa y en los tratados de forma concomitante con corticoides y anti-inflamatorios no esteroideos, se administrarán fármacos gastroprotectores.

f) Protección ósea:

En pacientes con corticoides, recibirán suplementos orales de calcio y vitamina D, siempre que no esté contraindicado.

En pacientes mayores de 50 años, o de menor edad si presentan una historia de fracturas, se valora la administración de bifosfonatos, como prevención de osteoporosis y fracturas.

Determinar de forma regular niveles circulantes de 25(OH) D₃, y su corrección en caso de déficit.

Prevenir el hiperparatiroidismo secundario en pacientes con NL con enfermedad renal crónica.

g) Protección ovárica y anticoncepción hormonal.

Minimizar el riesgo de toxicidad ovárica. De acuerdo con las guías no se sobrepasará una dosis acumulada de 10 gr de ciclofosfamida.

Se utilizarán análogos de GnRH para preservar la función ovárica de mujeres menores de 35 años, si la dosis de ciclofosfamida prevista supera los 10 gr.

En mujeres con nefropatía lúpica activa o con anticuerpos antifosfolípido, se desaconseja el empleo de anticoncepción con contenido estrogénico.

h) Vacunaciones y profilaxis infecciosa:

Completar los calendarios de vacunación acordes con la edad y evitar las vacunas con virus vivos o atenuados en momentos de inmunosupresión.

Adelantar la vacunación de pacientes que vayan a recibir agentes biológicos deplecionantes de linfocitos B, antes de su uso.

SITUACIONES ESPECIALES:

1.- Embarazo/puerperio:

- No está contraindicado en pacientes con nefritis lúpica en remisión y con función renal conservada.
- Evitar el embarazo en mujeres con insuficiencia renal avanzada.
- El embarazo debe ser controlado por un equipo multidisciplinario, se realizará un seguimiento conjunto con la Unidad de Alto Riesgo Obstétrico del hospital.
- En pacientes con antecedentes de nefritis lúpica, deben de ser embarazos adecuadamente planificados, de forma que tenga lugar tras un mínimo de seis meses de remisión, al menos parcial, de la nefropatía.
- Al planificar el embarazo con una mujer con nefritis lúpica, debemos adaptar su medicación inmunosupresora e inmunomoduladora para mantener controlada la actividad renal y sistémica, evitando la utilización de fármacos teratogénicos o con efectos negativos sobre la gestación.
- Se debería llevar a cabo una detección activa de los brotes de nefritis lúpica con análisis frecuentes de orina y determinaciones de otros parámetros de actividad lúpica, de forma que las recidivas sean detectadas y tratadas de forma precoz con fármacos no contraindicados en el embarazo.

- Se debe tener un control adecuado de la tensión arterial, suspendiendo los fármacos bloqueantes del sistema angiotensina-renina por sus efectos teratogénicos y utilizando en su lugar alfametildopa, labetalol o nifedipino.
- Se indicará aspirina a dosis bajas (100 mg/día) antes de la semana 12 en mujeres embarazadas con nefritis lúpica activa o en remisión, para disminuir el riesgo de preeclampsia y pérdidas fetales.

2.- Síndrome antifosfolípido:

- Dado el sustrato trombótico de la NSAF, se mantendrá la anticoagulación.
- Tratar las trombosis de grandes vasos renales con anticoagulación prolongada.
- No hay actuación especial/distinta para los pacientes en hemodiálisis y con síndrome antifosfolípido.
- En pacientes con trasplante renal y anticuerpos antifosfolípido, individualizar la indicación de anticoagulación.

3.- Tratamiento de las recidivas:

- En presencia de signos de recidiva renal, se deberá descartar la presencia de otra enfermedad o proceso (SAF con microangiopatía trombótica, nefritis secundaria a AINES, nefropatía isquémica ateromatosa, ...) y asegurar el adecuado cumplimiento terapéutico.
- Se deberían optimizar las medidas generales: control del peso corporal, evitar la sobreexposición solar, antiproteínúricos, hidroxiclороquina, control de los factores de riesgo vascular,...
- Si la recidiva es moderada o grave tras la respuesta completa o parcial, se debe tratar con el mismo tratamiento de inducción y de mantenimiento que fue eficaz inicialmente. El tratamiento debe hacerse de forma precoz para minimizar el riesgo de fibrosis residual.
- Si se indicó ciclofosfamida en el ciclo previo de inducción, y el riesgo de toxicidad es inaceptable por dosis acumulada o aparición de efectos adversos, se usará micofenolato.
- Se considerará la realización de una nueva biopsia renal si se detecta un cambio en el perfil de expresión clínica de la enfermedad, como signos indicativos de microangiopatía trombótica, si se sospecha cambios en la clase de nefritis lúpica o si el deterioro renal pudiera ser secundario a nefropatía terminal/cicatricial, más que actividad lúpica, por discordancia entre la clínica extrarrenal, los biomarcadores de actividad y los signos de afección renal.

4.- Tratamiento de los casos resistentes o no respondedores:

- Se debe cambiar el esquema terapéutico si no hay datos de respuesta antes de completar los seis meses de tratamiento de inducción.

- En los enfermos con insuficiencia renal aguda o rápidamente progresiva, con elevados índices de actividad en la biopsia y/o proliferación extracapilar, se debería considerar la intensificación de tratamiento si no hay mejoría al final de la cuarta semana.
- En pacientes no respondedores, se debería descartar la presencia de otra enfermedad o proceso (SAF con microangiopatía trombótica, nefritis secundaria a AINES, nefropatía isquémica ateromatosa, etc) y asegurar el adecuado cumplimiento terapéutico.
- Asegurar el cumplimiento de las indicaciones generales: control del peso corporal, evitar la sobreexposición solar, antiproteínúricos, hidroxiclороquina, control de los factores de riesgo vascular,...
- Los enfermos con criterios de resistencia a la ciclofosfamida o micofenolato serán tratados con el esquema terapéutico de inducción alternativo (micofenolato o ciclofosfamida, respectivamente).
- En caso de resistencia a los regímenes de inducción de eficacia contrastada (ciclofosfamida y micofenolato), se administrarán tratamientos alternativos: rituximab, anticalcineurínicos, inmunoglobulinas o utilizar estrategias terapéuticas basadas en combinación de fármacos.
- En ausencia de respuesta al tratamiento, se debería considerar la realización de una nueva biopsia renal si la persistencia de actividad renal no se asocia con signos de actividad extrarrenal y si los niveles de complemento y anti-ADN son normales, de cara a excluir que la causa de resistencia sea un cambio de patrón histológico o una glomeruloesclerosis avanzada.

Otras consideraciones:

Criterios de respuesta:

- **Respuesta parcial:** en pacientes con proteinuria basal ≥ 3.5 gr/24, descenso de proteinuria < 3.5 gr/24h. En pacientes con proteinuria basal < 3.5 gr/24h, reducción de la proteinuria en $> 50\%$ en comparación con la inicial. En ambas situaciones estabilización ($\pm 25\%$) o mejoría de filtrado glomerular respecto a valores iniciales.
- **Respuesta completa:** filtrado glomerular ≥ 60 ml/min/1,73m² (o descenso a valores iniciales o $\pm 15\%$ del valor basal en aquellos con filtrado glomerular < 60 ml/min/1,73m²), proteinuria ≤ 0.5 gr/24h, sedimento inactivo (≤ 5 hematias, ≤ 5 leucocitos o cilindros hemáticos) y albúmina sérica > 3 g/día.

Criterios de recidiva:

- Recidiva leve: Aumento de hematies/campo en sedimento de < 5 a > 15 con ≥ 2 hematies dismórficos en campo de gran aumento y/o aparición de ≥ 1 cilindro hemático, leucocituria (sin afectación urinaria), o ambos.

- Recidiva moderada:

Si la creatinina basal es:

- < 2 mg/dl que se produzca un aumento de 0,2-1 mg/dl,
- ≥ 2 mg/dl que se produzca un aumento de 0,4-1,5 mg/dl,

y/o si el cociente de Pr/Cr es:

- $< 0,5$, que aumente de ≥ 1 .
- 0.5-1, que aumente de ≥ 2 , pero con incremento absoluto inferior a 5.
- > 1 , que aumente de 2 veces con cociente Pr/cr < 5 .

- Recidiva grave:

Si la creatinina basal es:

- < 2 mg/dl, que exista un aumento > 1 mg/dl
- ≥ 2 mg/dl que exista un aumento > 1.5 mg/dl

y/o un cociente Pr/Cr > 5 .

10. Bibliografía

- [1] Piette JC, Papo T, Amoura Z. Lupus Érythémateux Systémique. *In*: P Godeau, S Herson, JCPiette. *Traité de Médecine*, 4ta edición. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2004: 125-148.
- [2] Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 2006; 15: 308-318.
- [3] Couthino A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural antibodies. *Curr Opin Immunol*, 1995; 7: 812-818.
- [4] Shoenfeld Y, Isenberg DA. *The mosaic of autoimmunity*. Amsterdam, Elsevier, 1989.
- [5] Michel M, Johanet C, Meyer O, Francès C, Wittke F, Michel C, *et al*. Familial lupus erythematosus. Clinical and immunologic features of 125 multiplex families. *Medecine (Baltimore)*, 2001; 80: 153-158.
- [6] Youinou P, Lydyard PM, Mageed RA. B cells underpin lupus immunopathology. *Lupus*, 2002; 11: 1-3.
- [7] Charron D. Molecular basis of human leucocyte antigen class II disease association. *Adv Immunol*, 1990; 48: 107-159.
- [8] Miossec P, Van Den Berg W. Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Reum*, 1997; 40: 2105-2115.

- [9] Osborne RA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the human system. *Curr Opin Immunol*, 1996; 8: 245-254.
- [10] Makoto M. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 2011; 10: 744-755.
- [11] Youinou P. Idiotypes et réseau idiotypique. *Presse Méd*, 1989; 18: 2059-2064.
- [12] Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol Today*, 1999; 20: 312-316.
- [13] Fujimoto M, Bradney AP, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. Modulation of B lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop. *Immunity*, 1999; 11: 191-200.
- [14] Kosko-Vilbois MH, Zentgraf H, Gerdes J, Bonnefoy JY. To “B” or not to “B” a germinal center? *Immunol Today*, 1997; 18: 225-230.
- [15] Youinou P, Saraux A, Legoff P. Super antigènes et auto-immunité. *Rev Rheum*, 1995; 62: 629-635.
- [16] Alarcon-Segovia D. Antinuclear antibodies: to pénétrate or not to pénétrate, that was the question. *J Autoimmun*, 2001; 10: 315-318.
- [17] Roitt IM, Hutchings PR, Dawe KI, Sumar N, Bodman KB, Cooke A. The forces driving

autoimmune disease. *J Autoimmun*, 1992; 5 (Suppl. A): 11-26.

[18] Hannahs Hahn B. Systemic Lupus Erythematosus. *In*: A Fouci, E Braunwald, D Kasper, S Hauser, D Longo, JL Hameson, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th edition. Mc Graw-Hill Global, 2011: 131-368bis.

[19] Youinou P, Legoff P, Saraux A. Pratique et interpretation des examens biologiques dans les maladies systémiques. *In*: MF Kahn, AP Peltier, O Meyer, JC Piette. *Maladies et syndromes systémiques*, 4ta edición. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2000: 77-128.

[20] Pisetsky DS. Antinuclear antibodies. *Rheum Dis Clin North Am*, 1992; 18: 283-505.

[21] Tan EM, Biologie moléculaire des auto-antigènes nucléaires. *In*: *Actualités néphrologiques 1992*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1992: 199-221.

[22] Nossent H, Rekvig OP. Antinuclear antibody screening in this new millennium: farewell to the microscope? *Scand J Rheumatol*, 2001; 30: 123-126.

[23] Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Autoimmune Rheumatic Diseases 3. Lancet*, 2013; 382: 819-831.

[24] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1982; 25: 1271-1277.

[25] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum*, 1997; 40: 1725.

[26] Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2012; 64(8): 2677-2686.

[27] Yee CS, Mc Kathleen EL, The LS, Gordon C. Assessment of disease activity and quality of life in systemic lupus erythematosus – new aspects. *Best Pract & Res Clin Rheumatol*, 2009; 23: 457-467.

[28] Calvo-Alén J, Silva-Fernández L, Úcar-Angulo E, Pego-Reigosa JM, Olivé A, Martínez-Fernández C. Consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre el uso de terapias biológicas en el lupus eritematoso sistémico. *Reumatol Clin*, 2013; 9(5): 281–296.

[29] Bombardier C, Gladmann DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. and the Committee on prognosis studies in SLE – Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum*, 1992; 35: 630-640.

[30] Gladmann DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*, 2002; 29: 288-291.

[31] Touma Z, Urowitz MB, Ibañez D, Gladman DD. SLEDAI-2K 10 days versus SLEDAI-2K 30 days in a longitudinal evaluation. *Lupus* 2011; 20: 67-70.

[32] Symmons DP, Coppock JS, Bacon PA, Bresnihan B, Isenberg DA, Maddison P, *et al.* Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q J Med*, 1988; 69: 927-937.

[33] Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, *et al.* The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Quart J Medicine*, 1993; 86: 447-458.

[34] Isenberg DA, Rahman A, Allen E, Farewell V, Akil M, Bruce IN, *et al.* BILAG 2004 Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, 2005; 44: 902-906.

[35] Castrejon I, Rúa-Figueroa I, Rosario MP. Índices compuestos para evaluar la actividad de la enfermedad y el daño estructural en pacientes con lupus eritematoso: revisión sistemática de la literatura. *Reumatol Clin*, 2014; 10: 309-320.

[36] Gladmann DD, Ginzler E, Glodsmith C. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1996; 39: 363-369.

[37] Keen Choong M and Tsafnat G. The implications of biomarker evidence for systematic reviews. *BMC Medical Research Methodology*, 2012; 12: 176.

- [38] Hariharan S, Kasiske B, Matas A, Cohen A, Harmon W, Rabb H. Surrogate markers for long-term renal allograft survival. *Am J Transplant*, 2004; 4: 1179-1183.
- [39] Ordi-Ros J, Torres MT, Segarra A, Vilardell M. Nefropatía lúpica. *In: Cervera R, Jimenez-Alonso J. Avances en lupus eritematoso sistémico. Marge Medica Books*, 2011.
- [40] Yu SL, Kuan WP, Wong CK, Li EK, Tam LS. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol*, 2012: 715190.
- [41] Ahearn JM, Liu CC, Kao AH, Manzi S. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Trans Res*, 2012; 159: 326-342.
- [42] Mok CC. Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 638413.
- [43] Vega L, Barbado J, Almansa R, González-Gallego R, Rico L, Jimeno A, *et al.* Prolonged standard treatment for systemic lupus erythematosus fails to normalize the secretion of innate immunity-related chemokines. *Eur Cytokine Netw*, 2010; 21: 71-76.
- [44] Kaneko H, Ogasawara H, Naito T, Akimoto H, Hishikawa T, Sekigawa I, *et al.* Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 1999; 26: 568-573.
- [45] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1

(MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*, 2009; 29: 313-326.

[46] Alzawawy A, Zohary M, Ablordiny M, Eldalie M. Estimation of monocyte-chemoattractant protein-1 (Mcp-1) level in patients with lupus nephritis. *Int J Rheum Dis*, 2009; 12: 311-318.

[47] Barbado J, Vega L, González-Gallego R, Jimeno A, ortiz de Lejarazu R, Bermejo-Martín JF. MCP-1 in urine as biomarker of renal lupus in absence of cytokines, interferon-gamma and growth factors. *Rheumatol Clin*, 2010; 6: 296-298.

[48] Kiani AN, Johnson K, Chen C, Diehl E, Hu H, Vasudevan G, *et al.* Urine osteoprotegerin and monocyte chemoattractant protein-1 in lupus nephritis. *J Rheumatol*, 2009; 36: 2224-2230.

[49] Marks SD, Williams SJ, Tullus K, Sebire NJ. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 is predictive of poor renal prognosis in pediatric lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 2008; 23: 3521-3526.

[50] Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1RA in disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002; 4-5: 323-340.

[51] Little FF, Cruikshank WW, Center DM. IL-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001; 25: 347-352.

[52] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Sección IV: mecanismos efectores de las respuestas

inmunitarias – 12. Citocinas. *In*: AK Abbas, AH Lichtman, S Pillai. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª Edición. Elsevier, 2008: 267-302.

[53] Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 2004; 25: 75-84.

[54] Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J. Immunol*, 2002; 168: 3195–3204.

[55] Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J. Exp. Med*, 1995; 182: 155–162.

[56] Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky JM, *et al*. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis*, 2006; 194: 895–903.

[57] Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky JM, *et al*. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology*, 2006; 44: 1617–1625.

[58] Rose T, Grützkau A, Hirseland H, Huscher D, Dähnrich C, Dzionek A, *et al*. IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2012-201586.

- [59] De Pablo R, Montserrat J, Prieto A, Alvarez-Mon M. Role of circulating soluble chemokines in septic shock. *Med Intensiva*, 2013; 37: 510-518.
- [60] Luk K, Boatman S, Johnson KN, Dudek OA, Ristau N, Vang D, *et al.* Influence of morphine on pericyte-endothelial interaction: implications for antiangiogenic therapy. *J Oncol*, 2012; 2012: 458385.
- [61] Conti P, Di Gioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc*, 2001; 22: 133-137.
- [62] Crawford A, Angelosanto JM, Nadwodny KL, Blackburn SD, Wherry EJ. A Role for the Chemokine RANTES in Regulating CD8 T Cell Responses during Chronic Viral Infection. *PLoS Pathog*, 2011; 7: e1002098.
- [63] Lu MM, Wang J, Pan HF, Chen GM, Li J, Cen H, *et al.* Increased serum RANTES in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*, 2012; 32: 1231-1233.
- [64] Feliars D. Vascular endothelial growth factor as a prognostic marker of lupus nephritis. *Kidney International*, 2009; 75: 1251-1253.
- [65] Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, *et al.* Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. *Ann Rheum Dis*, 2004 ;63: 91-94.

[66] Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney International*, 2002; 62: 261-265.

[67] Nalbandian A, Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol*, 2009; 157: 209–215.

[68] Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol*, 2004; 5: 508-515.

[69] Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, Voo KS, Peng W, Fu T, *et al.* Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*, 2005; 309: 1380-1384.

[70] Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, *et al.* Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol*, 2000; 164: 4783-4789.

[71] Cai X, Gommoll Jr CP, Justice L, Narula SK, Fine JS. Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17. *Immunol Lett*, 1998; 62: 51-58.

[72] Vila LM, Molina MJ, Mayor AM, Cruz JJ, Ríos-Olivares E, Ríos Z. Association of serum MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus. *Clin Rheumatol*, 2007; 26: 718-722.

[73] Dutcher J. Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and

metastatic melanoma. *Oncology*, 2002; 16: 4-10.

[74] Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Crispin JC, Alcocer-Varela J. Interleukin 2 and systemic lupus erythematosus: beyond the transcriptional regulatory net abnormalities. *Autoimmun Rev*, 2009; 9: 34-39.

[75] Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*, 2001; 166: 3008-3018.

[76] Min DJ, Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim WU, Yang SY, *et al.* Decreased production of interleukin-12 and interferon-gamma is associated with renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*, 2001; 30: 159-163.

[77] Willeke P, Schlüter B, Schotte H, Erren M, Mickholz E, Domschke W, *et al.* Increased frequency of GM-CSF secreting PBMC in patients with active systemic lupus erythematosus can be reduced by immunoadsorption. *Lupus*, 2004; 13: 257-262.

[78] Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol*, 2008; 181: 2211-2219.

[79] Karonitsch T, Feierl E, Steiner CW, Dalwigk K, Korb A, Binder N, *et al.* Activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus peripheral blood

mononuclear cells. *Arthritis Rheum*, 2009; 60: 1463-1471.

[80] Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol*, 2011-432595.

[81] Aringer M, Smolen JS. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2008; 10: 202.

[82] Font J, Ramos-Casals M, Darnell A. Nefropatía lúpica. *In*: J Font, M Khamashta, M Vilardell. *Lupus Eritematoso Sistémico*, 3ta edición. MRA ediciones, 2004: 147-168.

[83] Martin D, Barbado J, Herrera F. Biomarkers and their clinical relevance for lupus nephritis: a review. *Submitted*.

[84] Ruiz Irastorza G, Espinosa G, Frutos MA, Jiménez Alonso J, Praga M, Pallarés L, *et al*. Diagnóstico y tratamiento de la nefritis lúpica. Documento consenso del Grupo de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (GEAS) de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) y de la Sociedad Española de Nefrología (S.E.N.). *Nefrología*, 2012; 32(Suppl.1): 1-35.

[85] Weening JJ, D'Agati VD. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 241-250.

[86] Austin HA 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TA, Kullick ME, Kippel JH, *et al*. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. *Am J Med* 1983;

75: 382-91.

[87] Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis; identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 1984; 25: 689-695.

[88] Sanchez-Vegazo Sanchez I, Teruel C, Menendez J. Nefritis lúpica. *Rev Esp Patol*, 2002; 35: 269-278.

[89] Barbado J, Martin D, Vega L, Almansa R, Gonçalves L, Nocito M, *et al.* MCP-1 in urine as biomarker of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Cytokine*, 2012; 60: 583-586.

[90] Miniño M. Índice de actividad lúpica y tratamiento del lupus eritematoso en dermatología. *Dermatologia Rev Mex*, 2008; 52(1): 20-28.

[91] Cervera R, Pallarés L. Epidemiología y clasificación de lupus eritematoso sistémico. *In:* Cervera R, Jimenez-Alonso J. *Avances en lupus eritematoso sistémico*. Marge Medica Books, 2011.

[92] D´Cruz D. Conceptos actuales sobre la fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *In:* Cervera R, Jimenez-Alonso J. *Avances en lupus eritematoso sistémico*. Marge Medica Books, 2011.

- [93] Espinosa G, Cervera R. Epidemiología. *In*: Khamashta MA, Vilardell Tarrés M. Lupus eritematoso sistémico. Caduceo Multimedia, S.L., 2009
- [94] Ruíz San Millán IC y Arias Rodriguez M. Técnicas e indicaciones de biopsia renal. *In*: Hernando Avendaño. Nefrología Clínica. Editorial Médica Panamericana, 2009.
- [95] Baogui L. Diagnóstico no invasivo del rechazo de los aloinjertos renales mediante la determinación del ARN mensajero de la perforina y la granzima B en la orina. *N Eng J Med*, 2001; 344: 947-54.
- [96] Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowshi C, Naqvi R, Lee JB, *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of ranl-allograft recipient. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342-2351.
- [97] Bermejo-Martín JF, Tamayo E, Ruíz G, Andaluz-Ojeda D, Herrán-Monge R, Muriel-Bombín, *et al.* Circulating neutrophil counts and mortality in sepsis shock. *Critical Care*, 2014; 18: 407.
- [98] Rodriguez-Fernández A, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, Justel M, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Eosinophil as a protective cell in *S. aureus* ventilator-associated pneumonia. *Mediators Inflamm*, 2013; 2013:152943.
- [99] Paquette SG, Banner D, Zhao Z, Fang Y, Huang SsH, León AJ, *et al.* Interleukin-6 is a potential biomarker for severe pandemic H1N1 Influenza A infection. *PloS ONE*, 2012 (7): e38214.

[100] Almansa R, Socias L, Ramirez P, Marchin-Loeches I, Vallés J, Loza A, *et al.* Critical Care, 2011; 15: 448.

[101] Hernández DF, Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. Reumatol Clin, 2010; 6(3): 173-177.

[102] Filella X, Molina R y Ballesta AM. Estructura y función de las citoquinas. Med Integral, 2002; 39(2): 63-71.

[103] Cervera R, Khamashta MA, Font, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, *et al.* Systemic lupus erythematosus: Clinical and immunological patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. Medicina (Baltimore), 1993; 72: 113-124.

[104] Mohammed MF, Belal D, Bakry S, Marie MA, Rashed L, Eldin RE, *et al.* A study of hepcidin and monocyte chemoattractant protein-1 in Egyptian females with systemic lupus erythematosus. J Clin Lab Anal, 2014; 28: 306-309.

[105] Watson L, Tullus K, Pilkington C, Chesters C, Marks SD, Newland P, *et al.* Urine biomarkers form monitoring juvenile lupus nephritis: a prospective longitudinal study. Pediatr Nephrol, 2014; 29: 397-405.

[106] Wu Q, Yang Q, Lourenco E, Sun H and Zhang Y. Interferon-lambda1 induces peripheral blood mononuclear cell-derived chemokines secretion in patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. Arthritis Res Ther, 2011; 13(3).

[107] Arévalo Gómez MA. El riñón normal. Anatomía e histología. *In*: Hernando Avendaño L. Nefrología clínica. Editorial Médica panamericana, 2008.

[108] Guyton AC, Hall JE. Formación de la orina en los riñones: Filtración glomerular, riego sanguíneo renal y su regulación. *In*: Tratado de Fisiología Médica. Editorial McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, 1997.

[109] Ross MH, Romrell LJ. Aparato Urinario. *In*: Histología Texto y Atlas Color. Editorial Médica panamericana, 1994.

[110] Marie MA, Abu Khalil RE, Habib HM. Urinary CXCL10: a marker of nephritis in lupus patients. *Reumatismo*, 2014; 65(6): 292-297.

[111] Abujam B, Cheekatla S, Aggarwal A. Urinary CXCL-10/IP-10 and MCP-1 as markers to asses activity of lupus nephritis. *Lupus*, 2013; 22(6): 614-623.

[112] Watson L, Midgley A, Pilkington C, Tullus K, Marks S, Holt R, *et al*. Urinary monocyte chemoattractant protein 1 and alpha 1 acid glycoprotein as biomarkers of renal disease activity in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2012; 21: 496-501.

[113] Singh RG, Usha, Rathore SS, Behura SK, Singh NK. Urinary MCP-1 as diagnostic and prognostic marker in patients with lupus nephritis flare. *Lupus*, 2012; 21: 1214-1218.

[114] Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Herbert LA, Yu CY, Nagaraja HN. Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *J Am Soc*

Nephrol, 2005; 16: 467-473.

[115] Ble A, Mosca M, Di Loreto G, Guglielmotti A, Biondi G, Bombardieri S, *et al.* Antiproteinuric effect of chemokine C-C motif ligand 2 inhibition in subjects with acute proliferative lupus nephritis. *Am J Nephrol*, 2011; 34: 367-372.

[116] Li Y, Tucci M, Narain S, Barnes EV, Sobel ES, Segal MS, *et al.* Urinary biomarkers in lupus nephritis. *Autoimmun Rev*, 2006; 5(6): 383-388.

[117] Alzawawy A, Zohary M, Ablordiny M. Estimation of monocyte-chemoattractantprotein-1 (Mcp-1) level in patients with lupus nephritis. *Int J Rheum Dis*, 2009; 12: 311-318.

[118] Tesar V, Masek Z, Rychlik I, Merta M, Bartunkova J, Stejskalova A, *et al.* Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13: 1662-1667.

[119] European Commission DG Research Directorate. Biomarkers for patient stratification. Brussels 10-11 June 2010.

[120] Schork NJ. Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature*, 2015; 520: 609-611.