

PROYECTO EXLEDAI

SLEDAI MOLECULAR SEGÚN PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

Autor: Luis Miguel de la Cal Caballero

Tutora: Julia Barbado Ajo, Servicio de Medicina Interna, HCUV

Universidad de Valladolid, curso 2015 - 2016

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica de etiología multifactorial. Su impronta genética cada vez se conoce mejor gracias a los avances en las técnicas de biología molecular aplicadas a la caracterización de los patrones de expresión génica en individuos enfermos. En este sentido, el desarrollo de la PCR digital constituye un paso importante, ya que permite identificar y cuantificar de forma rápida y en términos absolutos el número de transcritos de mRNA (RNA mensajero) correspondientes a un gen en una muestra de sangre del paciente.

El objetivo principal de este estudio es evaluar, mediante la aplicación de PCR digital, el perfil de expresión del gen TWEAK (superfamilia del factor de necrosis tumoral, TNF) a través del mRNA de muestras de sangre periférica de 22 pacientes con LES, y relacionarlo con el grado de actividad del lupus según el índice SLEDAI 2K. Asimismo, se pretende valorar la idoneidad de su uso como predictores de actividad/brote.

Se encontró correlación positiva y estadísticamente significativa entre la expresión del gen TWEAK y la actividad de la enfermedad medida por el índice SLEDAI. Se estudió la misma asociación categorizando a los pacientes en dos grupos según SLEDAI <6 (actividad leve) o ≥ 6 (actividad moderada-severa), y de nuevo se encontró correlación significativa. También se construyó la curva ROC para evaluar la capacidad discriminativa de la prueba, y se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0.873.

A la luz de estos resultados y los que se espera obtener de la continuación del estudio, se pretende aportar una evidencia científica que avale la utilización en un futuro de esta herramienta, combinada con los scores ya conocidos, para evaluar el grado de actividad en pacientes con LES, mejorando así su seguimiento a través de la detección y tratamiento precoz de los brotes.

INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad de tipo autoinmune y carácter crónico, cuya etiología directa se desconoce aunque se han identificado factores genéticos de predisposición, epigenéticos (metilación de DNA y acetilación de histonas), ambientales (luz ultravioleta y algunas infecciones víricas, sobre todo descritos como desencadenantes de brotes e intensificadores de la enfermedad), y mecanismos de disregulación inmunológica implicados en su aparición. Se caracteriza por un importante componente inflamatorio mediado por inmunocomplejos, que produce daño tisular en diferentes órganos. Existe un claro predominio en el sexo femenino (90% de los casos) especialmente en edad reproductiva, aunque presenta una distribución mundial y afecta a todas las etnias y grupos etarios.

La base genética del lupus ha sido estudiada desde hace años, y es unánimemente reconocido su carácter poligénico. Se comenzó por establecer la relación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHC-2), y hoy en día la investigación avanza hacia el estudio de las citoquinas y los genes que las codifican. Se sabe que los polimorfismos en los genes de las citoquinas se relacionan con diferentes niveles de expresión y producción de las mismas, jugando un papel básico en la hiperrespuesta Th2, favorecedora de la inmunidad humoral, y la activación persistente de linfocitos B. Otras características inmunopatológicas constantes son el aumento de células Th (CD4+), disminución de células Tc (CD8+) y T supresoras que regulan la respuesta inmune, y defectos en la apoptosis y/o déficit de complemento que prolonga la vida de las células B.

Los modelos hipotéticos que tratan de explicar su compleja patogénesis postulan un efecto acumulativo de los factores arriba citados para dar lugar a una disfunción en la inmunidad innata. Ésta consistiría en un aclaramiento defectuoso de los residuos apoptóticos por parte de los macrófagos, que junto con la degradación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, que habitualmente cumplen una función lítica de bacterias y otros agentes) inducen la activación de células dendríticas plasmocitoides, implicadas en los procesos de tolerancia antigénica mediante selección negativa de linfocitos T

autorreactivos. Las células dendríticas alteradas producen IFN- α , y los macrófagos actúan como células presentadoras de antígenos (CPA) presentando antígenos propios, y favoreciendo la co-estimulación entre linfocitos Th y B. Finalmente ocurre la producción de los Autoanticuerpos (sobre todo IgG) que se depositarán junto a los autoantígenos en forma de inmunocomplejos, dando lugar a daño tisular en los órganos diana del LES, esencialmente la piel, riñones, serosas y articulaciones.

Conocemos por diversos estudios que la aparición de fenómenos de autoinmunidad con producción final de auto-anticuerpos precede cronológicamente en años al desarrollo de síntomas y signos que nos lleven al diagnóstico de la enfermedad. Además parece probable que, durante los sucesivos brotes de lupus, los procesos inflamatorios se pongan en marcha también un tiempo antes que la clínica, de lo cual inferimos que sería altamente interesante conocer los perfiles de expresión génica diferencial de pacientes con distinto grado de actividad y adelantarnos así a la aparición de los brotes. En la práctica clínica habitual se utiliza el índice SLEDAI 2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) para realizar el seguimiento de la actividad del LES. Si bien es una herramienta fácil de administrar, objetiva y breve, tiene limitaciones manifiestas como la dependencia del observador, la no valoración de la severidad de las manifestaciones que recoge, la baja frecuencia de los componentes con mayor peso en el índice, o la presencia de componentes sujetos a subjetividad por parte del investigador. Es por ello que la cuantificación de la expresión génica en la sangre de estos pacientes mediante PCR digital podría ser un método más objetivo y precoz para identificar el grado de actividad global de la enfermedad, y avanzar hacia la individualización del manejo diagnóstico y terapéutico.

La PCR digital (ddPCR por sus siglas en inglés “droplet digital PCR”) aporta como ventaja fundamental respecto a su anterior versión, la PCR en tiempo real (qPCR, “quantitative PCR”), la posibilidad de cuantificar de forma absoluta las copias o transcritos del ácido nucleico estudiado, sin necesidad de calcular en función de una muestra de referencia. Su mayor precisión radica en la distribución de las moléculas de ácido nucleico en pequeñas micro-placas donde ocurre la reacción, y son analizadas individualmente en el paso final.

En estudios previos se ha determinado mediante la utilización de microarrays de ácidos nucleicos qué grupos de genes y rutas de señalización celular intervienen en la producción de mediadores y efectores (principalmente citoquinas) implicados en la patogénesis del lupus. *Nikpour et al* analizó la expresión diferencial de 31 genes ya conocidos de la vía del IFN- α en muestras de sangre periférica de pacientes con LES, controles enfermos (artritis reumatoide y granulomatosis de Wegener) y controles sanos, y concluyó que era posible separar las muestras en dos grupos claramente diferenciados por expresión génica elevada o baja de estos genes. Halló correlación positiva y significativa entre la expresión génica y la puntuación del SLEDAI, así como expresión elevada preferentemente en pacientes con LES. El gen TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis es la citoquina proinflamatoria para la que codifica), objeto de nuestro estudio e integrante de la superfamilia del TNF, fue utilizado por *Liu et al*, evidenciando que la expresión de TWEAK, en linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES, era significativamente mayor que la de los controles con artritis reumatoide y sanos, así como mostraba correlación positiva con el grado de actividad y el daño renal. En este mismo estudio se correlacionó el mRNA del gen TWEAK con niveles de proteínas séricas como MCP-1 entre otras, así como con el SLEDAI y otros parámetros de laboratorio.

En el estudio que nos ocupa nuestro objetivo es determinar si existe asociación entre la expresión génica de TWEAK, medida con PCR digital como número de transcritos de mRNA, procedente de muestras de sangre periférica de 22 pacientes con LES, y el grado de actividad de enfermedad de estos pacientes, reflejado en la puntuación del índice SLEDAI 2K. De esta forma sabremos si se trata de un buen predictor de enfermedad activa. Analizaremos también la aplicabilidad de esta técnica a la práctica clínica mediante la construcción de la curva ROC.

En otro estudio del mismo grupo de trabajo que inició este proyecto (Grupo de Investigación Clínica en Autoinmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid) se realizó la determinación de 27 citoquinas en orina, y se aplicaron test de correlación de los niveles de aquéllas detectadas con el SLEDAI, valorando su posible aplicación como biomarcadores de actividad de cara a la monitorización de los pacientes. Únicamente la

quimiocina MCP-1 presentó concentraciones significativamente mayores en pacientes con LES respecto a controles sanos, y con ella continuó el estudio. La línea de investigación actual en LES avanza en esta dirección, hacia la búsqueda de marcadores poco o no invasivos de actividad de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño y división del estudio

Se trata de un estudio experimental prospectivo que consta de dos fases, una primera de recogida de datos de los pacientes, y la segunda de aplicación de PCR digital a las muestras de mRNA y realización de análisis estadísticos.

Sujetos de estudio

Se reclutó a 22 pacientes seguidos en el Área de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (EAS) del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), específicamente en la consulta de detección de actividad/brote de la enfermedad. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del HCUV, y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión en el estudio fueron el diagnóstico de LES, y el cumplimiento en algún momento de la historia evolutiva de la enfermedad de ≥ 4 de los 11 criterios de clasificación revisados en 1997 establecidos por el American College of Rheumatology (ACR), recogidos en el Anexo 2.

VARIABLES DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE DATOS

Se citó a los pacientes en consulta durante varios días, y se llevó a cabo la valoración del cumplimiento de los criterios de LES del ACR, junto con la recopilación de otra serie de variables clínicas, epidemiológicas y analíticas. Además, todos ellos aportaron el consentimiento informado ya firmado.

1. Nº estudio	2. Fecha	3. Sexo	4. Edad
5. Enfermedades importantes			
– HTA	– Valvulopatía	– EPOC	– Ansiedad
– DM 1-2	– Arritmias	– Asma	– Otras
– Cardiopatía isquémica	– FA	– Depresión	
6. Criterios ACR hasta el momento de la recogida de la muestra			
– Rash malar	– Serositis	– Trastornos hematológicos	
– Rash discoide	– Artritis	– ANA +	
– Fotosensibilidad	– Trastornos renales	– Trastornos inmunológicos (anti-DNA, anti-Sm, AAF)	
– Úlceras orales	– Trastornos neurológicos		
7. Otras enfermedades autoinmunes			
	– Sjögren	– AR	– Otras
8. Tratamiento actual (dosis/día de CC, HCQ, MMF, AZA, CP y dosis/sem MTX)			
– Corticoides	– Micofenolato	– Ciclosporina	– Inmunoglobulinas
– Hidroxicloroquina	– Ciclofosfamida	– Rituximab	
– Metotrexato	– Azatioprina	– Belimumab	
9. Tratamientos previos (sí/no)			
– Corticoides	– Micofenolato	– Ciclosporina	– Inmunoglobulinas
– Hidroxicloroquina	– Ciclofosfamida	– Rituximab	
– Metotrexato	– Azatioprina	– Belimumab	
10. Infecciones graves (hospitalización) y número			
– Respiratoria	– SNC	– Piel y partes blandas	
– Urinaria	– Digestiva	– Otras	
11. Hemograma			
	– Leucocitos	– Neutrófilos	– Monocitos
	– Linfocitos	– Plaquetas	
12. Bioquímica			
	– Cr	– Na	– GPT
	– ClCr	– K	– CK
	– Urea	– GOT	– Aldolasa
13. Orina			
	– Piuria (leucocitos/campo)	– Proteinuria (g/24h)	
	– Hematuria (hematíes/campo)	– Cilindros urinarios (sí/no)	
14. Anticuerpos			
	– ANA (título)	– Anti-DNA (título)	
15. Poblaciones linfocitarias			
	– LTCD3	– LTsCD8	– CD4/CD8
	– LThCD4	– LBCD19	– Células NK
16. Inmunoglobulinas			
	– IgG	– IgM	– IgA
17. Complemento			
	– C3	– C4	

Tabla 1. Listado de variables que se recogieron en la consulta, con parámetros clínicos, epidemiológicos y analíticos.

En la misma consulta se aplicó el índice de actividad de LES SLEDAI 2K (Anexo 1) a cada paciente, y fueron categorizados en dos grupos según la puntuación del índice: actividad leve (<6) y moderada-severa (≥6). Tras la

consulta se les realizó la extracción de muestras de sangre para obtener mRNA y plasma. El mRNA fue después sometido a PCR digital para obtener la cuantificación de la expresión génica de TWEAK, en términos de número de transcritos de mRNA.

Posteriormente, se completó el formulario de variables con datos de la historia clínica informática y física de los pacientes, así como de las muestras de sangre extraídas para este fin en torno a un mes previo a la consulta.

Tipo de muestras a recoger

Se llevó a cabo la extracción de muestras de sangre periférica para obtener el mRNA. Se recogieron en tubos PAXgene™ de Becton-Dickinson, y fueron utilizadas para los estudios de expresión de genes.

Aproximadamente un mes antes de realizar estas extracciones, se recogió una muestra de sangre para hemograma, bioquímica, determinación de anticuerpos, poblaciones linfocitarias, inmunoglobulinas y complemento. También se obtuvo una muestra de orina para estudio del sedimento.

Plan de análisis

Se realizará una descripción estadística de la muestra objeto de estudio, a partir de los datos clínicos, analíticos y epidemiológicos recogidos y de la puntuación del SLEDAI, aportando esencialmente medias muestrales y la desviación típica, y frecuencias expresadas como porcentajes.

Aplicaremos test de correlación entre las dos categorías creadas de puntuación SLEDAI (<6 y ≥ 6) y los parámetros analíticos, calculando el coeficiente de correlación de Pearson.

Para estudiar la asociación entre el número de transcritos de mRNA del gen TWEAK y el índice SLEDAI se calculará el coeficiente de correlación de Spearman. Se aplicarán los test de correlación doblemente, SLEDAI – copias de mRNA/20µl es el valor absoluto, y SLEDAI – ratio TWEAK/GAPDH el valor normalizado utilizando un gen de referencia (GAPDH). El objetivo de esta actuación es añadir potencia al resultado. Para realizar el análisis de contraste TWEAK-SLEDAI se utilizará la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Se

construirá la curva ROC para estudiar su aplicabilidad como predictor de actividad de LES, calculando el área bajo la curva (AUC).

Este estudio se prolongará durante dos años, y aumentará el número de pacientes reclutados y de genes analizados, con lo que se espera extraer nuevas conclusiones y aumentar la fuerza de las correlaciones ya observadas.

Para realizar todos los cálculos estadísticos que incluyen parámetros analíticos, se han utilizado los rangos de normalidad del laboratorio del HCUV.

RESULTADOS

Descripción de la muestra

De los 22 participantes en el estudio, 20 (90.9%) fueron mujeres y 2 (9.1%) hombres. La media (desviación típica - DT) de edad fue de 45.45 (12.89) años, y la de años de evolución de enfermedad de 22.88 (11.04) años. La media de años de evolución en pacientes con SLEDAI <6 fue de 28.5 (11.9) años, y la de aquéllos con SLEDAI ≥6 fue de 17.25 (7.63) años.

La media de criterios del ACR para LES cumplidos por los pacientes de la muestra fue de 5.14 (1.65), aunque el número más frecuente de criterios cumplidos fue 4 (23.8%). El criterio más frecuente fue la positividad de los ANA (100%), presente en todos los pacientes (n=21, ya que había un valor perdido), seguido de la artritis (76.2%) y los trastornos inmunológicos (71.4%).

La puntuación media que obtuvieron los pacientes en el índice SLEDAI 2K fue de 5.55 (4.77) puntos, perteneciendo el 45.5% de ellos al grupo <6 puntos y el 54.5% al grupo ≥6 puntos. La puntuación más frecuente fueron 4 puntos (22.7%), y el rango de puntuación de 0 a 18. El componente del índice más frecuentemente presentado fue el complemento bajo (36.4%), a expensas de la fracción C4, seguido de la proteinuria (31.8%) y la artritis (27.3%).

El 90.9% de los pacientes presentaban enfermedades importantes concomitantes, y dentro de este grupo las enfermedades más frecuentemente registradas fueron HTA (40%), depresión (35%) y ansiedad (30%). De los

pacientes con enfermedades asociadas, el 60% tenían ≥ 3 enfermedades y el 40% < 3 . El 31.8% presentaban otras enfermedades autoinmunes asociadas, de las cuales la más frecuente fue el hipotiroidismo autoinmune (42.86%).

En cuanto a los tratamientos de los pacientes del estudio, el 95.2% de ellos estaba tomando corticoides en el momento de la entrevista, con una dosis media de 5.29 mg/día, siendo la dosis más frecuente 5 mg/día. El 40.9% tomaba hidroxicloroquina (HCQ), siendo la dosis más frecuente 400 mg/día. El 13.6% tomaba metotrexato (MTX), siendo la dosis más frecuente 15 mg/semana. El 20% tomaba mofetil-micofenolato (MMF) siendo la dosis más frecuente 720 mg/día. El 4.8% estaba tomando azatioprina (AZT), todos ellos a dosis de 150 mg/día. El 4.8% tomaba ciclosporina (CP), todos ellos a dosis de 100 mg/día. El 9.5% estaba en tratamiento con belimumab (BLM) y el 4.8% con inmunoglobulinas. Ningún paciente estaba tomando ciclofosfamida (CF) ni rituximab (RTX). Respecto a tratamientos previos, todos los pacientes habían estado en tratamiento con corticoides en algún momento anterior, el 60% con HCQ, 30% con MTX, 45% con MMF, 35% con CF, 15% con AZT, 5% con CP y 15% con RTX. Ninguno había tomado BLM ni inmunoglobulinas previamente.

En cuanto a los parámetros analíticos, el recuento celular está expresado como porcentaje de los valores absolutos, y los paréntesis se refieren a las citopenias relativas. El 18.2% de los pacientes de la muestra presentaban leucopenia y otro 18.2% leucocitosis. El 13.6% (27.3%) tenía linfopenia, el 18.2% (9.1%) neutropenia y el 9.1% (4.5%) neutrofilia. El 9.1% de pacientes presentaba trombocitopenia. Un 9.5% de pacientes tenía piuria, todos ellos con resultado de 50 leucocitos/campo, así como el 9.5% tenía hematuria y el 33.3% proteinuria. El título de ANA estaba elevado en el 59.1% de las muestras de sangre de los pacientes.

Subpoblaciones linfocitarias (n=21)	Disminución	Aumento
LTCD3	-	28.6%
LThCD4	14.3%	4.8%
LTsCD8	-	14.3%
LBCD19	28.6%	-
Células NK	-	-

Tabla 2. Resultado de la determinación de subpoblaciones linfocitarias, expresado como porcentaje de pacientes que muestran valores alterados, tanto por aumento como por disminución.

Inmunoglobulinas (n=21)	Disminución	Aumento
IgG	18.2%	4.5%
IgM	31.8%	9.1%
IgA	18.2%	13.6%

Tabla 3. Resultado de la medición de inmunoglobulinas en sangre, expresado como porcentaje de pacientes que muestran valores alterados, tanto por aumento como por disminución.

Complemento (n=21)	Disminución	Aumento
C3	-	31.8%
C4	36.4%	-

Tabla 4. Resultado de la medición de fracciones C3 y C4 de complemento sérico, expresado como porcentaje de pacientes que muestran valores alterados, tanto por aumento como por disminución.

Estudios de correlación estadística

Se llevaron a cabo mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson para observar la relación entre el SLEDAI y los datos analíticos.

Parámetros analíticos	Score SLEDAI 2K		
	Correlación (Pearson)	Significación (p-valor)	N
Linfocitos	-0.245	0.272	22
Piuria (leucocitos/campo)	0.354	0.116	21
Hematuria (hematíes/campo)	0.305	0.179	21
Proteinuria (g/24h)	0.421	0.057	21
Título ANA	-0.431	0.045*	22
LTCD3 (células/μl)	-0.116	0.617	21
LThCD4 (células/μl)	0.171	0.459	21
LTsCD8 (células/μl)	-0.331	0.143	21
LBCD19 (células/μl)	0.124	0.593	21
Células NK (células/μl)	-0.017	0.941	21
IgA (mg/dl)	-0.530	0.011*	22
C4 (mg/dl)	-0.175	0.437	22

Tabla 5. Tabla resumen de estudio de correlación del SLEDAI con diversos parámetros analíticos. Se recogen los resultados significativos, cercanos a la significación, y aquéllos que resultan de interés por el tipo de correlación establecida. En amarillo se señalan los valores de correlación significativos, y en naranja los cercanos a la significación (p-valor <0.1). *: correlación significativa en el nivel 0.05.

Como podemos comprobar, en cuanto al recuento celular se halló correlación negativa entre el SLEDAI y los linfocitos absolutos, así como con las subpoblaciones LTCD3, LTsCD8 y NK, y correlación positiva con las subpoblaciones LThCD4 y LBCD19. Además, se encontró correlación estadísticamente significativa entre el SLEDAI y el título de los ANA, así como con el nivel de IgA, ambas de signo negativo. Asimismo observamos correlación positiva con parámetros como la piuria, hematuria y proteinuria (cercana a la significación), y negativa con el valor del complemento.

En los test que relacionaron el número de transcritos de mRNA del gen TWEAK y el índice SLEDAI se obtuvo correlación positiva y estadísticamente significativa, tanto para el valor absoluto como para el normalizado por el gen de referencia GAPDH. Este hecho se refleja en los siguientes diagramas de

dispersión de puntos, acompañados de una tabla resumen con los coeficientes de correlación de Spearman y la significación asociada:

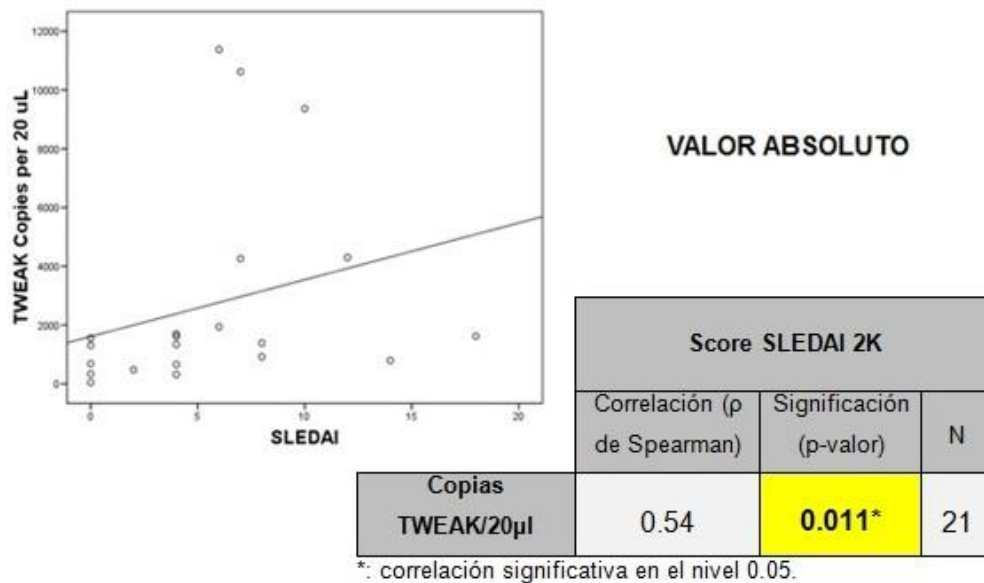


Figura 1. (A). Diagrama de dispersión. Correlación del SLEDAI con el número de copias mRNA del gen TWEAK por 20 μ l. Análisis con valor absoluto. **(B).** Tabla resumen del estudio de correlación aplicado.

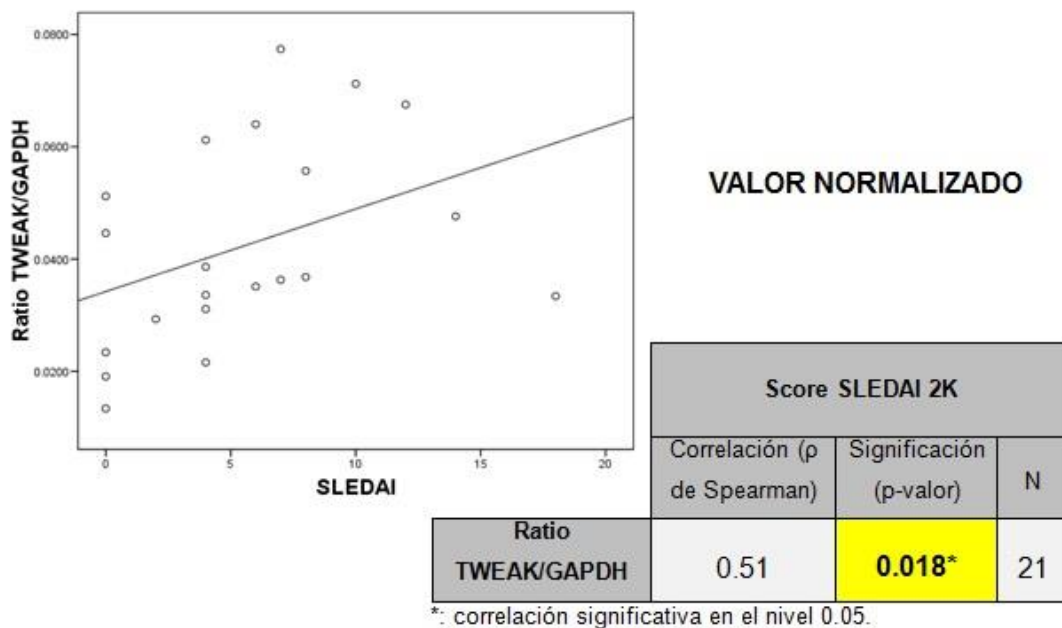


Figura 2. (A). Diagrama de dispersión. Correlación del SLEDAI con la ratio del número de copias de mRNA del gen TWEAK entre el número de copias del gen de referencia GAPDH. Análisis con valor normalizado. **(B).** Tabla resumen del estudio de correlación aplicado.

En el análisis de contraste vemos la distribución diferencial del número de transcritos de mRNA en las categorías SLEDAI <6 y ≥ 6 . Se aprecia mayor

expresión de TWEAK en pacientes con SLEDAI ≥ 6 . El p-valor fue de 0.004 para el valor absoluto de número de copias por 20 μ l, y de 0.014 para el valor normalizado por el gen de referencia, expresado como ratio TWEAK/GAPDH.

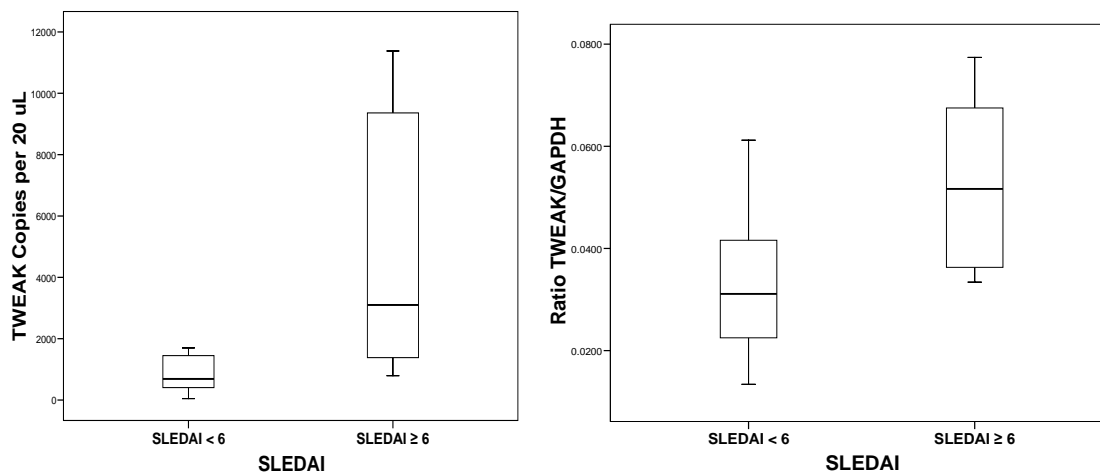


Figura 3. Diagramas de cajas del análisis de contraste realizado con la prueba U de Mann-Whitney. Se expone la distribución diferencial del número de transcritos de mRNA del gen TWEAK en las categorías SLEDAI <6 y SLEDAI ≥ 6 . **(A).** Valor absoluto. **(B).** Valor normalizado por el gen de referencia GAPDH.

La construcción de la curva ROC para evaluar la capacidad discriminativa de esta técnica, y por ende su aplicabilidad en la práctica, mostró un área bajo la curva de 0.873 (IC al 95% 0.723-1.023), y significación estadística (p-valor) de 0.004.

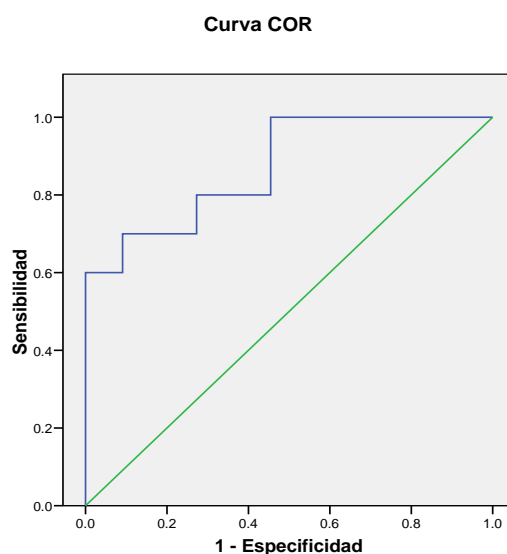


Figura 4. Curva ROC para la cuantificación de la expresión de TWEAK por PCR digital.

DISCUSIÓN

Con este estudio se pretendía analizar los perfiles de expresión génica y los mediadores inmunológicos implicados en la evolución clínica del LES, y asociarlos a distintos grados de actividad de la enfermedad. Concretamente buscábamos evaluar la asociación entre la expresión del gen TWEAK (copias de mRNA), definido y utilizado en estudios previos, y la puntuación del índice de actividad SLEDAI 2K. El objetivo final era valorar si la medición de este parámetro puede utilizarse, en el contexto del seguimiento de los pacientes con LES, como marcador precoz de actividad para la optimización del manejo.

Se pudo demostrar mediante análisis de contraste y de correlación que, efectivamente, existe una expresión génica de TWEAK significativamente mayor en pacientes con enfermedad en estado de actividad moderado-severo, definido por SLEDAI ≥ 6 , respecto a aquéllos con enfermedad en estado de actividad leve, definido por SLEDAI < 6 . Por tanto, la cuantificación mediante PCR digital de la expresión de este gen, es un método válido para predecir el grado de actividad de LES y la eventual aparición de un brote, y en consecuencia poner en marcha un tratamiento de forma precoz, que evite la instauración de daño tisular irreversible.

En cuanto a los test de correlación entre el SLEDAI y los parámetros analíticos, los resultados no permiten extraer datos concluyentes. Sin embargo, se han encontrado algunas correlaciones interesantes. Los linfocitos en valor absoluto y las subpoblaciones linfocitarias LTCD3, LTsCD8 y células NK mantenían correlación negativa con la puntuación del SLEDAI, mientras que las subpoblaciones LThCD4 y LBCD19 mostraban correlación positiva con el índice de actividad. Es decir, a mayor actividad de LES, los niveles de cada subpoblación linfocitaria se modifican según lo expuesto, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos. A pesar de ello, sí son concordantes con la teoría aceptada acerca de la patogénesis del LES, según la cual los defectos en la apoptosis de linfocitos B prolongan su vida, y se produce un aumento de linfocitos T cooperadores (Th) CD4+ que intervienen en la estimulación de los primeros. De forma contraria, disminuyen los linfocitos T citotóxicos y supresores (Ts). Otro resultado interesante es la correlación

positiva entre el SLEDAI y la piuria, hematuria y proteinuria, muy cercana a la significación en el caso de la proteinuria.

Es probable que algunos de los resultados poco concluyentes de estos análisis estadísticos respondan a la principal limitación del estudio, el bajo tamaño muestral (n=22). Sin embargo, el estudio continuará y se aumentará el número de pacientes reclutados y de genes analizados mediante PCR digital, entre ellos algunos de la vía de señalización del interferón (IFN), ya conocidos por otros estudios, con lo que se espera extraer nuevas conclusiones así como aumentar la fuerza de las correlaciones ya existentes.

CONCLUSIONES

- El lupus eritematoso sistémico (LES) evoluciona de forma intermitente con periodos inactivos y brotes de actividad, durante los cuales se produce el daño tisular, en ocasiones irreversible si se perpetúa el estado inflamatorio.
- El índice de actividad SLEDAI 2K es ampliamente utilizado para el seguimiento del grado de actividad en pacientes con LES, no obstante tiene algunas limitaciones que podrían superarse combinándolo con los nuevos marcadores en estudio, más precoces y objetivos en la medición.
- Existen estudios que han demostrado la expresión diferencial de determinados genes en muestras tomadas de pacientes con LES respecto a controles sanos o con otras enfermedades autoinmunes, incluso se ha evidenciado su capacidad para discriminar el grado de actividad de la enfermedad. Estos resultados sugieren la implicación directa de dichos genes en la patogénesis del LES.
- Los avances en las técnicas de biología molecular, como es el caso de la PCR digital, permiten una mayor precisión en la cuantificación de la expresión génica en muestras biológicas de pacientes enfermos.

- El gen TWEAK ha demostrado en otros estudios estar relacionado con el grado de actividad de LES, especialmente en pacientes con enfermedad renal. En nuestro estudio, su medición en sangre periférica ha mostrado correlación positiva y significativa con la actividad de la enfermedad según el índice SLEDAI 2K. Su capacidad discriminativa como marcador de actividad está avalada por el resultado de la curva ROC.

- Actualmente, la investigación en LES se encamina hacia la búsqueda y estudio de nuevos marcadores, poco o no invasivos, para detectar el grado de actividad y la aparición de brotes precozmente, y de esta forma establecer tratamiento antes de la instauración del daño tisular irreversible.

Agradecimientos

- Grupo de Investigación Clínica en Autoinmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, dirigido por la Dra. Julia Barbado.
- Unidad de Investigación Médica en Infección e Inmunidad, dirigido por el Dr. Jesús Bermejo.
- Josefa Soler, Jesús Bermejo, Raquel Almansa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nikpour M, Dempsey AA, Urowitz MB, Gladman DD, Barnes DA. Association of a gene expression profile from whole blood with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67 (8): 1069-1075.
2. Arasappan D, Tong W, Mummaneni P, Fang H, Amur S. Meta-analysis of microarray data using a pathway-based approach identifies a 37-gene expression signature for systemic lupus erythematosus in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Medicine.* 2011; 9: 65.
3. Rai G, Rai R, Saeidian AH, Rai M. Microarray to deep sequencing: transcriptome and miRNA profiling to elucidate molecular pathways in systemic lupus erythematosus. *Immunol Res.* 2016; 64 (1): 14-24.

4. Liu Z-C, Zhou Q-L, Li X-Z, Yang J-H, Ao X, Veeraragoo P, Zuo X-X. Elevation of human tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells is correlated with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2011; 53 (3): 295-300.
5. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison Principios de Medicina Interna: Vol. 2. 16ª ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2006.*
6. Regueiro JR, López C, González S, Martínez E. *Inmunología: biología y patología del sistema inmune. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.*

ANEXO 1 – Escalas utilizadas

Fecha: __/__/__		NOMBRE:	
Puntuación	SLEDAI	Descriptor	Definición
8		Convulsiones	De comienzo reciente. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos.
8		Psicosis	Habilidad alterada para la función diaria debido a alteración grave en la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, asociaciones ilógicas, contenido mental escaso, pensamiento ilógico, raro, desorganizado y comportamiento catatónico. Excluir I. renal y fármacos
8		Sdme orgánico-cerebral	Función mental alterada con falta de orientación, memoria, u otras funciones intelectuales, de comienzo rápido y manifestaciones clínicas fluctuantes. Incluye disminución del nivel de conciencia con capacidad reducida para focalizar, e inhabilidad para mantener la atención en el medio, más, al menos dos de los siguientes: alteración de la percepción, lenguaje incoherente, insomnio o mareo matutino, o actividad psicomotora aumentada o disminuida. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos..
8		Alteraciones visuales	Retinopatía lúpica. Incluye cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos y hemorragias en la coroides, o neuritis óptica. Excluir HTA, infección o fármacos.
8		Alt. Pares craneales	De reciente comienzo, motor o sensitivo.
8		Cefalea lúpica	Grave, persistente; puede ser migrañosa pero no responde a analgésicos narcóticos.
8		AVC	De reciente comienzo. Excluir arteriosclerosis.
8		Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos sensibles, infartos periungueales, hemorragias en astilla o biopsia o angiografía que confirme la vasculitis.
4		Miositis	Debilidad proximal/dolor asociado a elevación de las CPK/aldolasa o EMG sugestivo o miositis comprobada por biopsia.
4		Artritis	Más de dos articulaciones dolorosas y con signos inflamatorios.
4		Cilindros urinarios	Cilindros hemáticos o granuloso.
4		Hematuria	>5 hematíes/c. Excluir litiasis, infección u otras causas.
4		Proteinuria	> 0,5 g/24 h. De reciente comienzo o aumento de la proteinuria ya conocida en más de 0,5 g/24 h.
4		Piuria	> 5 leucocitos/c. Excluir infección.
2		Exantema nuevo	Comienzo reciente o recurrente. Exantema inflamatorio.
2		Alopecia	De comienzo reciente o recurrente. Pérdida difusa o en placas.
2		Úlceras bucales	De comienzo reciente o recurrente. Úlceras bucales o nasales.
2		Pleuritis	Dolor pleurítico con roce o derrame, o engrosamiento pleural.
2		Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes: roce, derrame, cambios electrocardiográficos o confirmación ecocardiográfica.
2		Complemento	Descenso de CH50, C3, C4 por debajo del límite inferior del laboratorio.
2		Anti DNA	> 25%. Técnica de Farr o por encima del valor habitual del laboratorio.
1		Fiebre	> 38°C. Excluir infección.
1		Trombopenia	< 100.000 plaquetas/mm3.
1		Leucopenia	< 3.000 células/mm3. Excluir fármacos.
PUNTAJACION TOTAL		<i>Nota: puntúa en la escala SLEDAI si el descriptor está presente en el día de la visita o 10 días antes.</i>	

Escala 1. Índice de actividad de lupus eritematoso sistémico SLEDAI 2K. Esta escala puede aplicarse asumiendo la presencia de los parámetros descriptores en los 10 o 28 días previos. En este estudio se utilizó la versión para los 28 días previos.

ANEXO 2 – Criterios utilizados

1. Rash malar	Eritema fijo plano o elevado sobre eminencia malar con tendencia a respetar pliegues nasolabiales
2. Rash discoide	Placas eritematosas elevadas con escamas queratósicas adherentes y tapones foliculares, a veces retracción en las lesiones antiguas
3. Fotosensibilidad	Rash cutáneo como resultado de reacción anormal a la luz solar, según historia clínica o examen físico
4. Úlceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, habitualmente indolora, observada por un médico
5. Serositis	Pleuritis (historia de dolor pleurítico, roce pleural o derrame pleural) o pericarditis (documentada por electrocardiograma, roce pericárdico o derrame pericárdico)
6. Artritis	No erosiva en ≥ 2 articulaciones periféricas. Caracterizada por dolor a la presión, hinchazón o derrame articular
7. Trastornos renales	Proteinuria persistente >500 mg/día (o $>3+$) o cilindros celulares (eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos)
8. Trastornos neurológicos	Convulsiones o psicosis (en ausencia de toxicidad medicamentosa y alteraciones metabólicas)
9. Trastornos hematológicos	Anemia hemolítica con reticulocitosis, o leucopenia (<4.000) o linfopenia (<1.500) o trombocitopenia (<100.000)
10. ANA positivos	Título anormal de anticuerpos antinucleares (ANA) por inmunofluorescencia o prueba equivalente en cualquier momento y en ausencia de medicamentos implicados en Síndrome Lupus Inducido
11. Trastornos inmunológicos	Anticuerpos anti-DNA nativo positivos o anticuerpos anti-Sm positivos o anticuerpos antifosfolípido positivos (anticuerpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico o VDRL falso positivo)

Tabla 1. Tabla de criterios de clasificación de LES, revisada en 1997 por el American College of Rheumatology (ACR).