



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biomedicina Molecular

**“Determinación y análisis de linfocitos ABCs en pacientes con
nefropatía lúpica”**

T E S I S

Que presenta

C. Víctor Andrés Sosa Hernández

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la tesis:

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Dr. José Luis Maravillas Montero

DIRECTOR

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Jefe e Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV – IPN

DIRECTOR

Dr. José Luis Maravillas Montero

Investigador Responsable de la Unidad de Metabolómica y Proteómica

RAI – UNAM

ASESORES

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV – IPN

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Investigadora Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV – IPN

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV – IPN

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo del Departamento de Biomedicina Molecular perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav – IPN) y en el laboratorio asignado al Dr. José Luis Maravillas Montero de la Red de Apoyo a la Investigación perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (RAI - INCMNSZ).

Durante la realización de este proyecto de posgrado se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y la beca 632393 otorgada al C. Víctor Andrés Sosa Hernández. Así mismo, el Dr. Maravillas contó con apoyo financiero por parte de los proyectos 240314 (Ciencia Básica) y A3-S-36875 (FOSISS) del CONACyT, al igual que los proyectos IA204316 e IA202318 del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por los consejos, apoyo, tutoría y paciencia a lo largo del proyecto.

Al Dr. José Luis Maravillas Montero por su apoyo incondicional, tutoría, paciencia y confianza.

A la Dra. Carmen Sánchez y al Dr. Vianney Ortiz por su asesoría en la elaboración del proyecto.

A la Dra. Diana, al Dr. Jiram y al Med. Cir. Daniel por su apoyo para desarrollar el proyecto.

Al Dr. David por brindarme los insumos necesarios para la elaboración del proyecto.

Al Dr. Guillermo y al M.C. Víctor por brindarme su apoyo en el área de citometría de flujo.

A mis compañeros Rodrigo, Sandy e Itze por sus palabras de aliento y consejos.

A mis compañeros Erick, Zayda, David, Carlos, Daniel, Peter, Diana y Carolina por sus consejos.

A Lenin y Chuchin por estar dispuestos a ayudar en el área técnica de laboratorio.

A todos mis compañeros de generación (en especial a Karina, Alejandra, Tania, Ramón, David, Mayte, Marce, Zule) por ayudarme a crecer, brindarme su amistad y darme su apoyo incondicional.

A mi familia (Víctor, Isabel, Adrián, Andrea) que siempre ha creído en mí, me ha apoyado, motivado y cuidado de mi para superarme día con día; mis logros son sus logros.

Y a todas las personas, doctores, compañeros y amigos que han sido parte de mi formación y que han creído en mí.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Lupus Eritematoso Generalizado (LEG).....	3
Patogenia de LEG.....	3
Diagnóstico de LEG.....	4
Nefropatía Lúpica (NL).....	6
Epidemiología de la NL.....	6
Patogenia de la NL.....	7
Clasificación de la NL.....	9
Biomarcadores en la NL.....	10
Linfocitos B en la respuesta inmunológica.....	11
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Grupo de estudio.....	18
Criterios de inclusión.....	18

Criterios de exclusión.....	19
Criterio de eliminación.....	19
Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	19
Tinción de superficie.....	20
Determinación del factor de transcripción T-bet.....	21
Adquisición y análisis.....	21
Correlación de variables y análisis estadístico.....	22
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIÓN.....	37
PERSPECTIVAS.....	38
REFERENCIAS.....	39

RESUMEN

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es un trastorno autoinmune caracterizado por una respuesta inmune deletérea. Una de las manifestaciones más frecuentes de esta enfermedad es la nefropatía lúpica (NL). Esta manifestación es un predictor de mal pronóstico que incrementa la morbimortalidad de los pacientes. La patogenia de la NL no se comprende del todo, a consecuencia de ello, el diagnóstico y la terapéutica empleada carecen de efectividad. Por otro lado se sabe que dependiendo del microambiente, se pueden originar diferentes fenotipos celulares, que pueden ser generadas en el contexto de una enfermedad o una respuesta fisiológica. Por tal motivo nosotros analizamos una subpoblación denominada Age-associated B Cells (ABCs), la cual es un subgrupo de linfocitos B que se han encontrado en condiciones de inflamación crónica que engloban enfermedades de tipo autoinmune o en infecciones virales. Esta subpoblación está caracterizada por una baja expresión de CD21, la expresión de CD11c y el factor T-bet. En nuestro estudio analizamos una cohorte de pacientes con LEG (sin daño renal) y NL. Acorde al análisis estadístico, demostramos que la frecuencia de linfocitos ABCs no es significativa. Por otro lado, se realizó un análisis de correlación tomando como variable comparativa la frecuencia de linfocitos ABCs. Con respecto a la cohorte de pacientes con NL no se detectó asociación significativa alguna; no obstante, en los pacientes sin daño renal la actividad de la enfermedad (SLEDAI), los niveles de autoanticuerpos anti-DNAs y la concentración de la fracción C3 del complemento presentan correlación significativa. Por último, a través del análisis de citometría de flujo y del análisis estadístico, se encontró una subpoblación de linfocitos B con fenotipo CD21^{hi} CD11⁺ T-bet⁺, que disminuye notablemente en los pacientes con nefropatía a diferencia de los pacientes que no presentan daño renal.

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder characterized by a deleterious immune response. Lupus nephritis (LN) is one of the most common manifestations of this disease. This manifestation is a predictor of poor prognosis that influences morbidity and mortality. The pathogenesis of LN is not fully understood, for that reason, the diagnosis and the treatment are not very effective. On the other hand it is known that depending on the microenvironment, different cellular phenotypes can be generated, which can be generated in the context of a disease or in a physiological response. For this reason we analyzed a subpopulation called Age-associated B Cells (ABCs), which is a subset of B lymphocytes that have been found in conditions of chronic inflammation that encompass autoimmune diseases or viral infections. Characterized by a low expression of CD21, the expression of CD11c and the T-bet factor. In our study we analyzed a cohort of patients with SLE (without kidney damage) and NL, according to the statistical analysis we showed that the frequency of lymphocytes ABCs is not significant. On the other hand, a correlation analysis was made, taking the frequency of lymphocytes ABCs as a comparative variable. With respect to the cohort of patients with LN, there is no significant association, however, in patients without kidney damage the activity of the disease (SLEDAI), the levels of anti-DNA autoantibodies and the concentration of the complement C3 fraction presented a significant correlation. Finally, through the analysis of flow cytometry and statistics, a subpopulation of B lymphocytes with CD21^{hi} CD11⁺ T-bet⁺ phenotype was found, which decreases markedly in patients with nephropathy, unlike patients who do not present renal damage.

INTRODUCCIÓN

Lupus Eritematoso Generalizado (LEG)

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune sistémica con diversas manifestaciones clínicas. El LEG afecta fundamentalmente a mujeres jóvenes (relación mujeres:hombres 9:1) desde la adolescencia hasta la quinta década de la vida, pero puede aparecer a cualquier edad (durante la infancia o durante la vejez). El LEG puede afectar diversos grupos étnicos, pero se ha descrito que las etnias afro-americana, asiática e hispana tienen un riesgo mayor de presentar la enfermedad.^[1,2] Considerando los criterios diagnósticos del American College of Rheumatology (ACR) la incidencia aproximada es de 0.3-23.7 por cada 100,000 personas/año mientras que la prevalencia es de 6.5-178 por cada 100,000 personas/año. La supervivencia a 10 años es aproximadamente de 70%. El LEG se caracteriza por ser una enfermedad crónica, de gravedad variable, con un curso creciente y decreciente, y con una morbilidad significativa que puede ser fatal, si no es tratada a tiempo.^[3,4]

Patogenia de LEG

La comprensión de la patogenia del LEG sigue siendo difícil de alcanzar; no obstante, a través del tiempo se han descrito interacciones multifactoriales entre factores genéticos y ambientales que proveen una visión mejorada de los eventos. El LEG es un trastorno que involucra una respuesta autoinmune en la cual existe una respuesta del sistema inmune innato y adaptativo defectuosa, que conducen a la pérdida de la tolerancia inmunológica. La patogénesis puede ser dividida en dos fases: (1) la pérdida de la tolerancia hacia los autoantígenos junto con la generación de autoanticuerpos, y (2) los autoanticuerpos patológicos e inmunocomplejos que causan un proceso inflamatorio y subsecuentemente las manifestaciones de la enfermedad; no obstante, es importante mencionar que los autoanticuerpos dirigidos contra los ácidos nucleicos (anticuerpos antinucleares (ANAs)) pueden estar presentes en la población en general, interesantemente, no todos los que poseen títulos detectables de estos autoanticuerpos desarrollan esta enfermedad;

esto sugiere que existen otros mecanismos que promueven el inicio de la enfermedad.^[5] La enfermedad puede iniciar con la exposición de material propio (ácidos nucleicos) a través de factores externos como los rayos UV, los cuales pueden inducir apoptosis, liberando autoantígenos (nucleosomas, ribonucleoproteínas, DNAds), que a su vez pueden ser procesados por células presentadoras de antígeno (APC) como macrófagos o células dendríticas en un ambiente inflamatorio. Estos autoantígenos, al ser presentados en forma de péptidos, estimulan a los linfocitos T promoviendo su diferenciación hacia linfocitos T activados con un perfil secretor de citocinas proinflamatorias. Adicional a ello, también los autoantígenos pueden interactuar con los receptores de los linfocitos B, impulsando la producción de auto-anticuerpos, que posteriormente, al reconocer su blanco forman inmunocomplejos (IC). Los IC pueden dispersarse a través del torrente sanguíneo y vasos linfáticos a diferentes órganos y tejidos, donde forman depósitos a través de su interacción con diferentes moléculas como los receptores Fc, que promueve una cascada de señalización que involucra la secreción de quimiocinas y citocinas inflamatorias como CXCL1, CCL1, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-12. Adicional a ello, se ha documentado que la respuesta inmune se asemeja a una respuesta antiviral, debido a la liberación de interferones de tipo I (IFN- α , IFN- β).^[6,7] Los complejos inmunes que contienen cromatina pueden activar a través de TLR-9 una vía de señalización y promover la liberación de interferones tipo I de células dendríticas plasmocitoides.^[8] Este microambiente genera inflamación a nivel sistémico y en el tejido propiamente dañado, además del reclutamiento y activación de diversas células del sistema inmune. Todos estos factores, producen mayor liberación de autoantígenos y formación de IC, lo cual perpetua el ciclo de daño.

Diagnóstico de LEG

El diagnóstico de LEG es difícil debido a la variabilidad de signos y síntomas de persona a persona. Los signos y síntomas de LEG pueden variar en tiempo y extrapolarse con otros trastornos de tipo autoinmune. El diagnóstico de LEG se fundamenta con la combinación de: I) manifestaciones clínicas, II) hallazgos de laboratorio, III) serología e histología de los órganos afectados (generalmente piel y

riñón). Los criterios del ACR son aplicados para el diagnóstico de LEG, se pueden dividir en criterios clínicos (lesiones cutáneas, úlceras orales, alopecia, sinovitis, serositis, afectación renal, afectación neurológica, hematológicos) y criterios inmunológicos (detección de autoanticuerpos [Anti-DNAs, Anti-SM, Antifosfolípidos], factores de complemento bajos). Se requiere cumplir con 4 criterios de 11 para emitir un diagnóstico confirmatorio de LEG. Se debe considerar que 4 criterios involucran lesiones mucocutáneas, debido a esto puede existir una sobreestimación de la enfermedad si no existe un análisis de autoanticuerpos. En la actualidad, ambos conjuntos de criterios se aplican simultáneamente para el diagnóstico y clasificación de la enfermedad. [9,10,11] Así mismo, debido a la complejidad y heterogeneidad de la enfermedad, se dio origen a varios instrumentos para calcular o al menos definir, el grado de afección del LEG en un momento dado con el fin de instaurar una terapia efectiva. A esto se denominó “índice de actividad”, que define el grado de afección lúpica en cualquier momento dado, y que puede oscilar desde la remisión o actividad mínima o nula, hasta la actividad grave que comprometa la vida del paciente. Esta herramienta, definida como Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) contiene una revisión por sistemas (examen físico, interrogatorio y pruebas de laboratorio) a través del cual determina con cierta certeza la intensidad del brote de la enfermedad lúpica. [12]

SLEDAI - Evalúa 24 manifestaciones del LEG (variables clínicas y de laboratorio).

- La manifestación es parte del puntaje cuando esta presente (la mayoría de ellas son atribuidas a lupus activo).

- El puntaje obtenido de la evaluación puede clasificar la actividad de la enfermedad en: leve, moderada y severa.

Tabla 1. Características particulares de la escala para evaluar la actividad de la enfermedad.[12]

Nefropatía Lúpica (NL)

La nefropatía lúpica (NL) es una condición inflamatoria del riñón que abarca varios patrones de la enfermedad renal, incluyendo la patología glomerular, tubulointersticial y vascular; y ciertamente, representa un ejemplo de la asociación entre la producción de autoanticuerpos y daño órgano blanco. La NL Es un importante predictor de mal pronóstico en pacientes con LEG. La NL es una complicación severa que incrementa la mortalidad y morbilidad si no se da un tratamiento oportuno y adecuado. ^[13] Generalmente los pacientes con NL o LEG pueden presentar datos patológicos en un uroanálisis, siendo la proteinuria un rasgo característico de la NL. Para establecer la afectación renal se utilizan los criterios del ACR: proteinuria persistente (≥ 0.5 g/día o $\geq +++$) o cilindros: de eritrocitos, de hemoglobina, granulosa, tubulares o mixtos. ^[14]

Por otra parte, el diagnóstico confirmatorio de esta manifestación es la biopsia renal, que adicionalmente es una herramienta orientativa para establecer el tratamiento inicial acorde a la clase que presente el paciente. Es importante considerar que, en algunos casos, pueden presentar una “nefropatía silente”, la cual se refiere a la presencia de datos histopatológicos de la manifestación en ausencia de manifestaciones clínicas. A pesar del tratamiento, el compromiso renal, afecta significativamente la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Aunque se han efectuado diversos ensayos clínicos para evaluar la eficacia de los distintos tratamientos, el régimen ideal aún no se ha dilucidado. ^[14,15] Considerando los factores descritos previamente, es importante el estudio de esta manifestación para generar un diagnóstico y tratamiento más oportuno.

Epidemiología del NL

Con respecto a la epidemiología de la NL los datos son limitados. Para formar un panorama de la NL es importante considerar que el 15-20% de los pacientes presentan el inicio de LEG antes de los 18 años, así mismo se ha reportado que la frecuencia de afectación renal es particularmente alta cuando el LEG tiene un inicio juvenil. Por otro lado la NL es menos frecuente en pacientes con inicio tardío (≥ 50

años) de LEG, con menos del 30% de pacientes afectados. Aproximadamente el 35 % de los pacientes adultos con LEG tienen evidencia clínica de inflamación renal al momento del diagnóstico, que se convierte en un estimado total del 50-60% de pacientes que desarrollarán nefropatía dentro los primeros 10 años de la enfermedad. Se ha mostrado que los pacientes con LEG de ancestría europea tienen la frecuencia más baja de presentar enfermedad renal (20-45%), mientras que 50-70% de los pacientes afroamericanos y ciertas poblaciones asiáticas, árabes, hispanas, indígenas y mestizas presentan la manifestación renal.^[15,16] Adicionalmente, otros factores demográficos, serológicos, clínicos y genéticos también han sido asociados, así mismo, la educación y los estratos socioeconómicos se identificaron como factores de riesgo para desarrollar NL.

Patogenia de la NL

El desarrollo de la manifestación se asocia con factores extrarrenales e intrarrenales. Dentro de los factores extrarrenales se considera en principio la pérdida de la tolerancia hacia autoantígenos nucleares ubicuos, que es el resultado de la exposición prolongada de ellos a células del sistema inmune. Posteriormente, en linfocitos T y células plasmáticas se genera memoria contra los autoantígenos nucleares, los cuales a través de citocinas y producción de autoanticuerpos perpetúan el daño. Por otra parte, dentro de los factores intrarrenales (ilustrados en la figura 1), existe una activación aberrante de los linfocitos B. Esta activación aberrante, es promovida por el ambiente proinflamatorio en el tejido dañado; la cual genera una producción de autoanticuerpos policlonales. Los autoanticuerpos producen un patrón denominado “Full House” en el tejido renal, que se caracteriza por la formación de depósitos de complejos inmunes (IgG, IgM e IgA).^[17] Es importante mencionar que la formación de depósitos, puede tener dos orígenes, el primero es a través de la formación *in situ*, es decir, autoanticuerpos dirigidos contra auto-antígenos del tejido renal, por otro lado el segundo considera que los inmunocomplejos llegan a través de torrente sanguíneo al tejido renal. La interacción de los IC con las células estructurales del tejido renal (endoteliales, mesangiales, podocitos), estimula la producción de citocinas pro inflamatorias,

quimiocinas y moléculas de adhesión, reclutando células del sistema inmune innato (neutrófilos, monocitos) que perpetúan el ciclo de daño secretando citocinas inflamatorias. Por otro lado, también existe activación de factores del complemento, que se involucran en el proceso inflamatorio del tejido renal.^[18,19] Aunado a esto, la pérdida de mecanismos de tolerancia (anergia, delección), el bajo impacto de citocinas reguladoras y el incremento de factores que ayudan a la perpetuación de linfocitos B autorreactivos, tales como BAFF y APRIL contribuyen a la patogenia dentro del riñón.^[20]

A pesar de que existe este panorama de la patogenia, existen otros factores que aún no están dilucidados completamente, tal es el caso de ciertas subpoblaciones de linfocitos B que han sido detectadas en diversos trastornos de inflamación independientemente de que produzcan o no auto-anticuerpos.

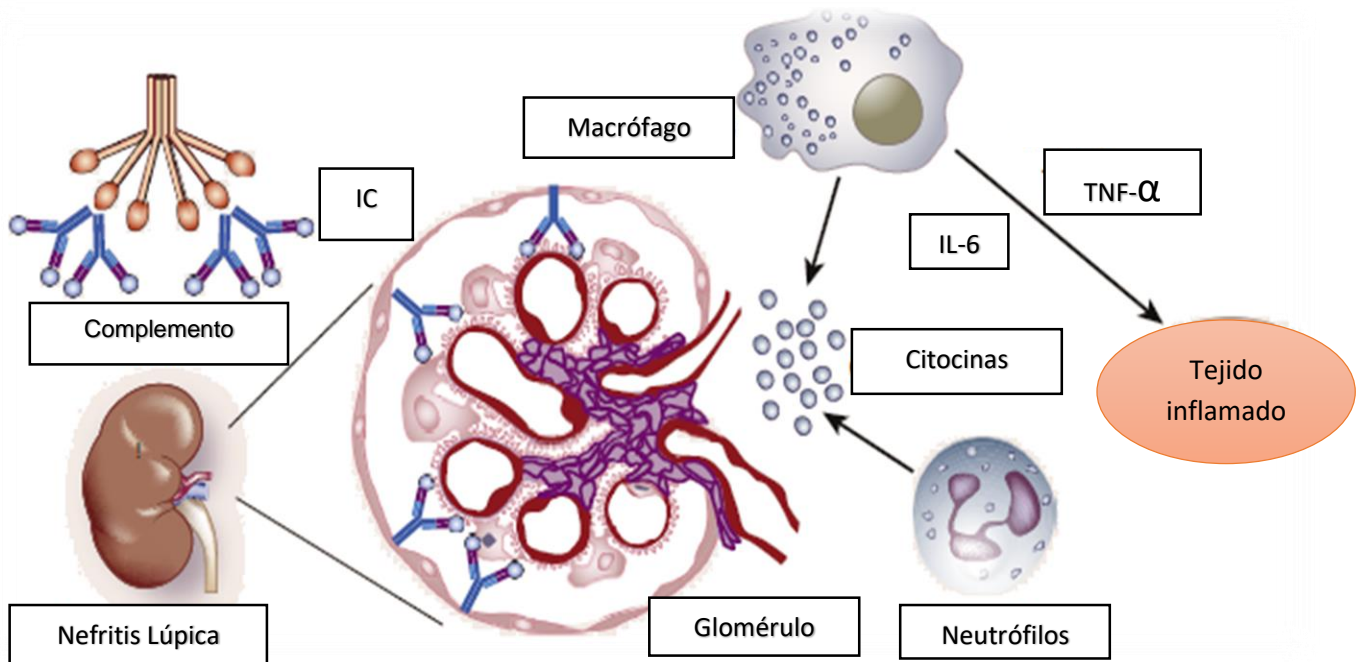


Figura 1. Esquema representativo de los factores celulares y humorales involucrados en la fisiopatología de la nefropatía lúpica.^[21]

Clasificación de la NL

A partir de la biopsia renal es posible observar la estructura histológica del riñón con el fin de confirmar el diagnóstico de NL; además de seleccionar el mejor tratamiento para la lesión renal encontrada. La formación de depósitos se pueden localizar en diferentes sitios de la estructura glomerular como se observa en la figura 2, con base a ello se pueden caracterizar 5 clases de lesiones en el corte histológico: clases I/II identificadas por la presencia de IC en el espacio mesangial, clases III/IV identificadas por la presencia de IC en el espacio subendotelial y clase V por la presencia de IC en el espacio subepitelial. La clase VI se caracteriza principalmente por presentar gloméruloesclerosis (más del 90%). Con respecto a los cambios estructurales pueden ser muy diversos, desde alteraciones mesangiales mínimas hasta estados finales fibróticos, incluyendo lesión endotelial, infiltración de leucocitos, proliferación endocapilar y NL membranosa caracterizada por daño a podocitos y lesión de la pared capilar no proliferativa. Es relevante que diferentes lesiones pueden coexistir en la NL. Debido a ello, han existido esfuerzos por unificar y clasificar biopsias renales con NL acorde al patrón con mayor expresión de anormalidad histológica por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y más recientemente por la Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad de Patología Renal (ISN / RPS). A pesar de que la biopsia establece la clase de NL y el tratamiento inicial, es un procedimiento asociado con la aprensión, el dolor, la morbilidad y, en raras ocasiones, la mortalidad. Las complicaciones que pueden establecerse son hematuria macroscópica, hematoma perirrenal, procesos infecciosos, daño a órganos adyacentes y pérdida del tejido renal. Aunque la biopsia es una herramienta diagnóstica, carece de valor como biomarcador predictivo y pronóstico de la enfermedad. Por tal motivo es importante la búsqueda de nuevos marcadores que permitan ayudar en el diagnóstico, la progresión y el pronóstico de la NL. [18,21,22]

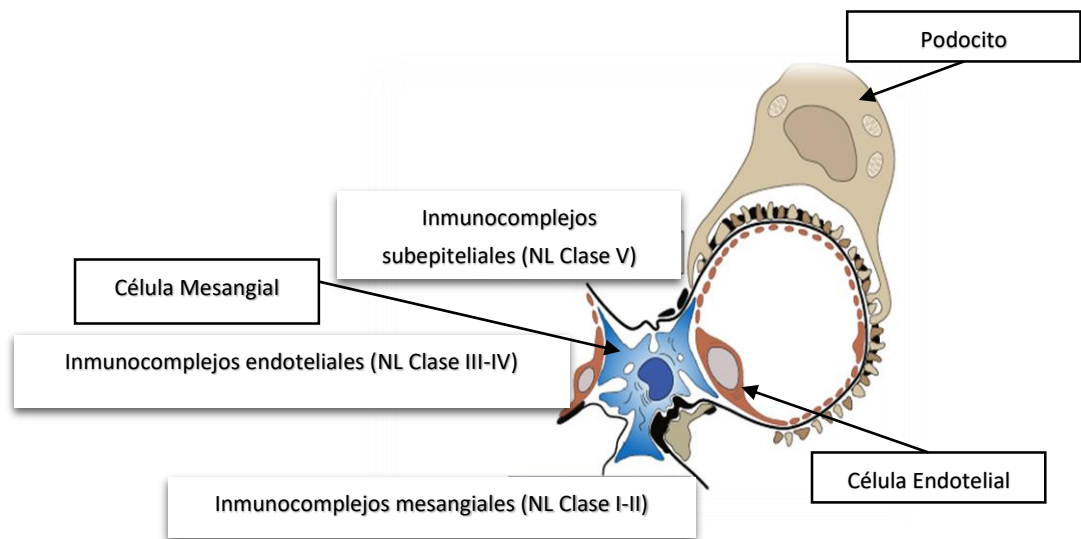


Figura 2. Clasificación de la nefropatía lúpica acorde a la localización de los inmunocomplejos dentro la estructura glomerular. ^[21]

Biomarcadores en la NL

El término biomarcador caracteriza una particularidad molecular específica (RNAm, micro RNA, proteína, metabolito, etc.) que puede medirse y proporciona información sobre el estado biológico del individuo. La fuente más específica de un biomarcador es el tejido que manifiesta el daño, en este caso, el riñón en la nefritis lúpica. Sin embargo, la biopsia renal es un procedimiento invasivo y costoso que no se puede repetir con frecuencia. Por lo tanto, sería ventajoso definir formas no invasivas para mejorar la efectividad y disminuir los efectos adversos de la inmunosupresión. Sería ideal poder predecir el curso y la patología de la nefritis lúpica y ajustar la terapia de manera adecuada, esto requerirá biomarcadores que reflejen la actividad de la enfermedad. Los compartimentos no invasivos que son potencialmente informativos para la nefritis provocada por lupus incluyen plasma, sangre y orina. Sin embargo, en el LEG, los niveles de biomarcadores no invasivos en la orina y el plasma reflejan no solo las alteraciones en el riñón, sino también una gran cantidad de factores no asociados con la nefritis. Por ejemplo, los biomarcadores clínicos tradicionales para

LEG, incluidos los componentes del complemento fracciones 3 y 4 (C3, C4) y los autoanticuerpos anti-DNAs tienen una baja sensibilidad (49 a 79%) y especificidad (51 a 74%) para el brote renal concurrente y no predicen de forma fiable los destellos inminentes cuando se miden en serie, con sensibilidades y especificidades en torno al 50 y 70%, respectivamente. Considerando que la biopsia de tejido renal no es conveniente que se repita en cada brote por las condicionantes previamente mencionadas, un predictor no invasivo de la patología renal sería muy útil para elegir la terapia. En efecto, sería una herramienta valiosa un biomarcador que pueda pronosticar un brote de nefritis lúpica mucho antes de que se alcancen los umbrales de proteinuria, deterioro de la función renal y la presencia de sedimentos urinarios, que señalan un brote clínico.^[23,24]

Linfocitos B en la respuesta inmunológica

A través del tiempo, la respuesta inmunológica se puede clasificar en celular y humoral. La respuesta celular pueden estar mediadas por linfocitos T, los cuales ejercen su efecto a través de la producción de citocinas, atacando y reclutando células del sistema inmune; mientras que la respuesta humoral se caracteriza por la producción de anticuerpos por las células plasmáticas generadas por los linfocitos B. En este contexto, los linfocitos B se han asociado tradicionalmente con respuesta humoral, pero acorde a las últimas contribuciones, sabemos que ejercen un papel crítico para la inmunidad celular. Los linfocitos B participan a través de la presentación antigénica, coestimulación y producción de citocinas, generando efectos en la defensa antimicrobiana e inflamación de los tejidos como se observa en la figura 3; así mismo, pueden modular la respuesta celular y humoral. Acorde a ello, existen subpoblaciones de linfocitos B definidas, caracterizadas por marcadores de superficie que son útiles para identificar su función; no obstante es importante señalar que las subpoblaciones descritas pueden tener un papel en el origen o en el desarrollo de las enfermedades. De igual forma, acorde al microambiente, estas subpoblaciones pueden ser generadas o moduladas.^[25] En este contexto, uno de los factores que se han asociado a problemas de autoinmunidad son ciertas subpoblaciones de linfocitos B, que pueden modular

tanto negativamente como positivamente a la enfermedad, o que su presencia o ausencia se relaciona con un patrón más agresivo de la enfermedad. Considerando que los linfocitos B bajo ciertas condiciones, como una estimulación inflamatoria crónica, puede dirigir a perturbaciones del compartimento celular que puede contribuir a una respuesta deletérea autoinmune. Recientemente, se ha identificado a un subgrupo distinto e inusual de linfocitos B, que se ha caracterizado por una baja expresión de CD21^{low} (receptor de complemento 2, CR2), la expresión del factor T-bet⁺ (factor de transcripción, identificado originalmente para promover la diferenciación de linfocitos T_{H1}) y la expresión de CD11c⁺ (cadena alfa de integrina). Se ha descrito que para generar esta subpoblación, se requieren citocinas como IFN- γ , IL-21 y la estimulación vía TLRs (TLR-7/TLR-9). Se ha mostrado que la presencia de esta subpoblación se encuentra incrementada en las muestras de sangre periférica de pacientes con infecciones crónicas (malaria, tuberculosis, VIH), así como severas condiciones autoinmunes incluyendo LEG, artritis reumatoide (AR), inmunodeficiencia común variable, entre otras.^[26,27,28]

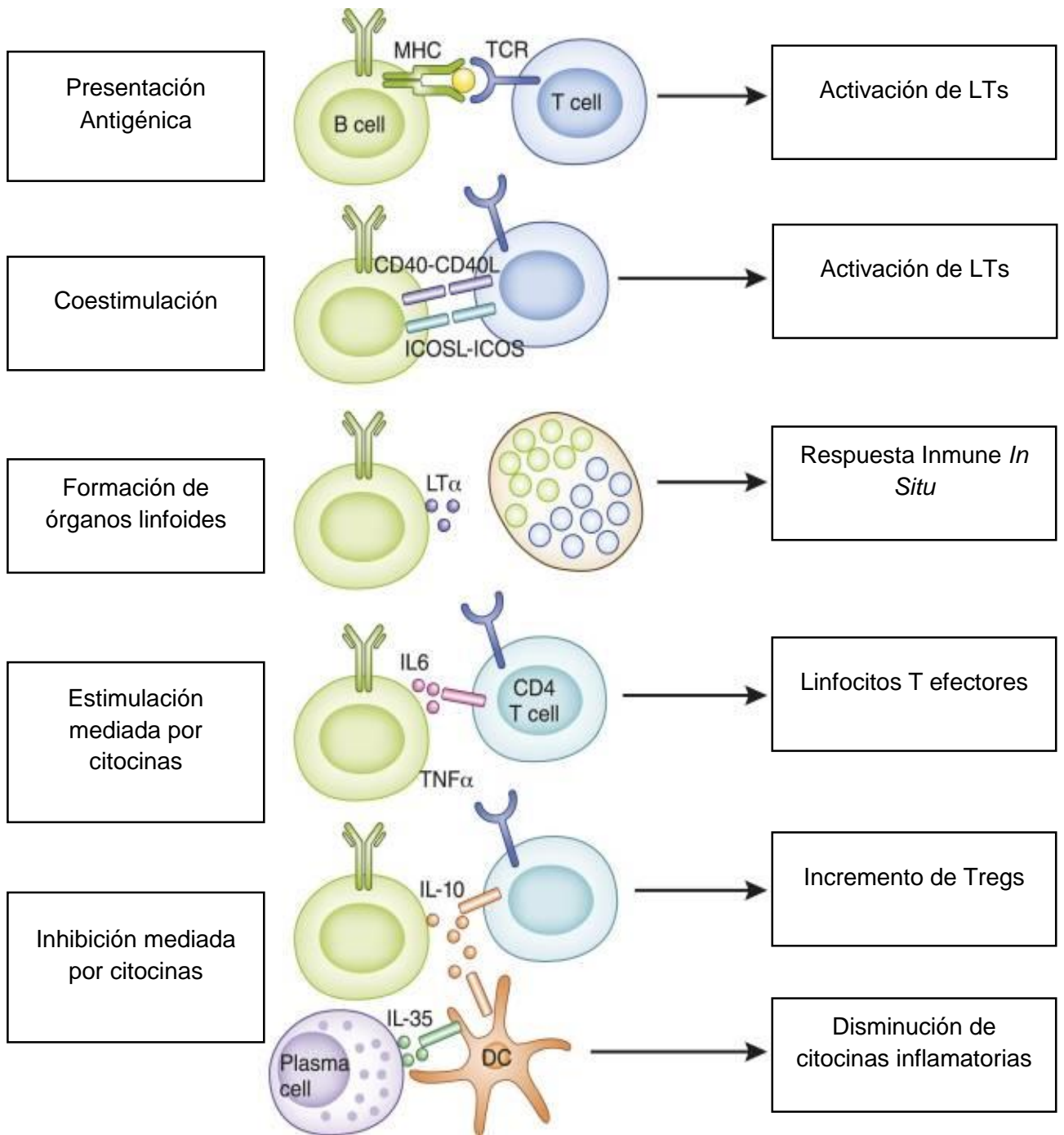


Figura 3. Funciones celulares de los linfocitos B, a través de la interacción de moléculas de superficie o de citocinas. [25]

ANTECEDENTES

Dentro de los primeros trabajos acerca de la diversidad de subpoblaciones de linfocitos B, se encuentra la investigación realizada por el grupo de Philippa Marrack, el cual realizó una de las primeras descripciones de los linfocitos ABCs tanto en un modelo murino como en humanos. La primera contribución al fenotipo de estas células fue la expresión de la cadena alfa de integrina CD11c. Adicional a ello, esta subpoblación estaba presente en ratones hembras de edad avanzada, e interesantemente aparecían en modelos murinos de lupus a corta edad. Por otro lado, realizaron una comparación de pacientes con enfermedades autoinmunes e individuos sanos, encontrando una diferencia significativa, observado por un incremento en las condiciones de autoinmunidad que se ilustra en la figura 4 (más notable en artritis reumatoide y escleroderma).^[29]

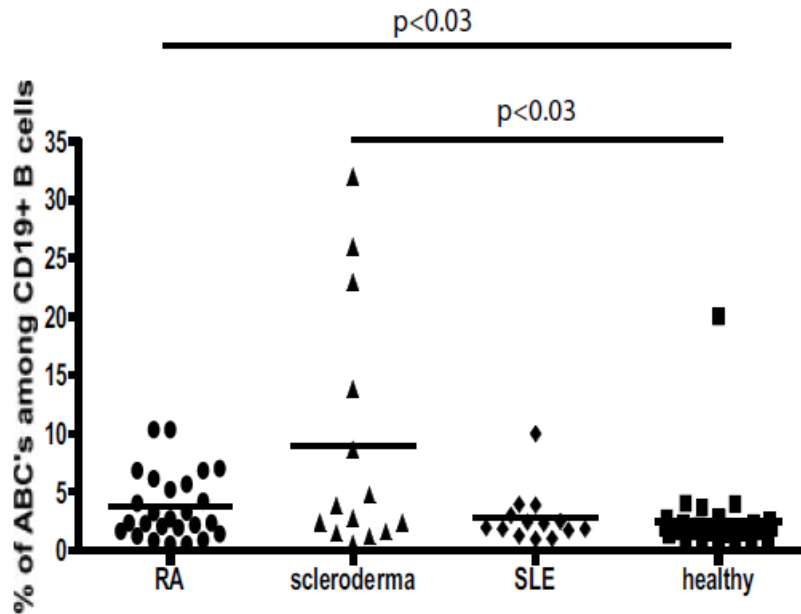


Figura 4. Porcentaje de ABCs correspondiente al total de linfocitos B en artritis reumatoide (RA), escleroderma, lupus eritematoso generalizado (SLE) y controles sanos (healthy). Prueba estadística: U Mann Whitney.^[29]

Más adelante, en un estudio realizado por el grupo de Nan Shen, se investigó el papel que ejerce esta subpoblación en un modelo murino de autoinmunidad (lupus-like) y se analizó si existía una diferencia significativa entre un grupo de pacientes con LEG y controles sanos. Este grupo encontró que esta subpoblación promueve la producción de autoanticuerpos anti-cromatina en el ratón. Por otro lado, en la determinación de esta subpoblación en humanos, a través del análisis estadístico, se denoto un incremento significativo de la subpoblación caracterizada por la expresión de CD19 T-bet CD11c, en pacientes con LEG a diferencia de los individuos sanos (Figura 5).^[30]

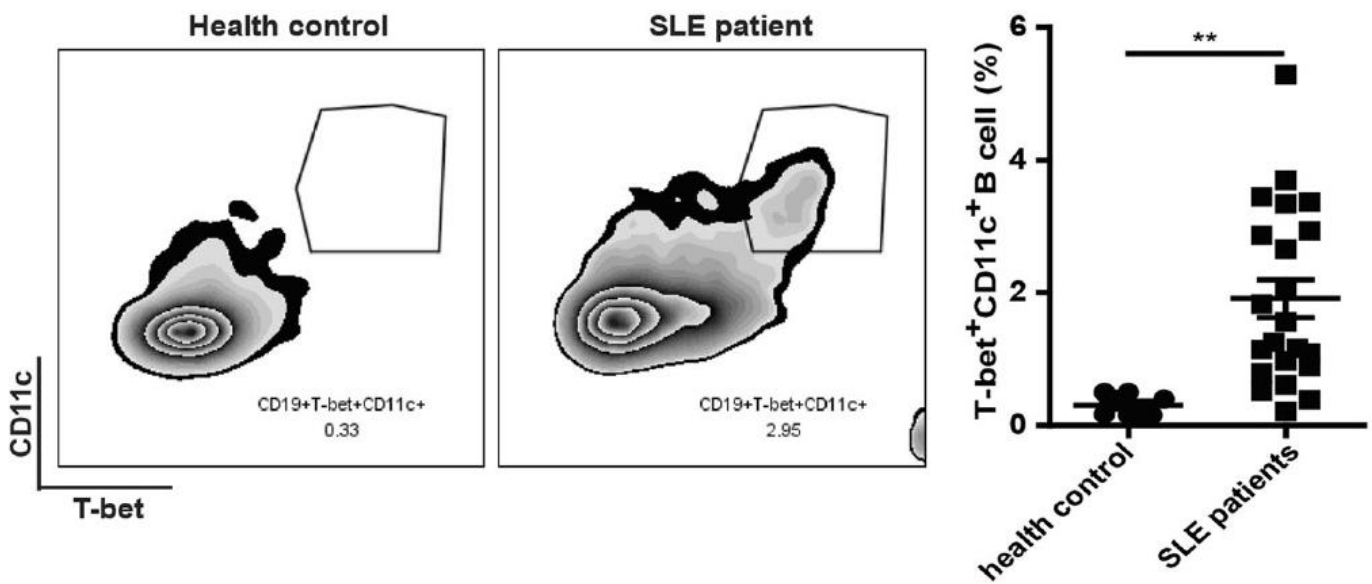


Figura 5. Análisis representativo de citometría de flujo de linfocitos B CD11c⁺ T-bet⁺ de sangre periférica en controles sanos y pacientes con LEG. Porcentaje de ABCs correspondiente al total de linfocitos B en pacientes con lupus eritematoso generalizado (SLE) y controles sanos (health control). Prueba estadística: U Mann Whitney.^[30]

Posteriormente, en el grupo de Rachel Ettinger, se corroboró que había un incremento de esta subpoblación en pacientes con LEG; sin embargo, a diferencia del estudio anterior, los individuos sanos presentan un mayor porcentaje de esta subpoblación y algunos pacientes tienen porcentajes más elevados (5-30%) con respecto a lo reportado. Otro punto que describieron fue un análisis de cortes histológicos de riñón, de 11 pacientes con nefropatía lúpica, en los cuales hicieron la detección de linfocitos B ($CD20^+ CD11c^+$). Se detectaron en 6 pacientes la presencia de linfocitos B que expresaban $CD11c^+$ de los cuales presentaban tres clases de nefropatía lúpica: clase II, clase III y clase IV (Figura 6).^[31]

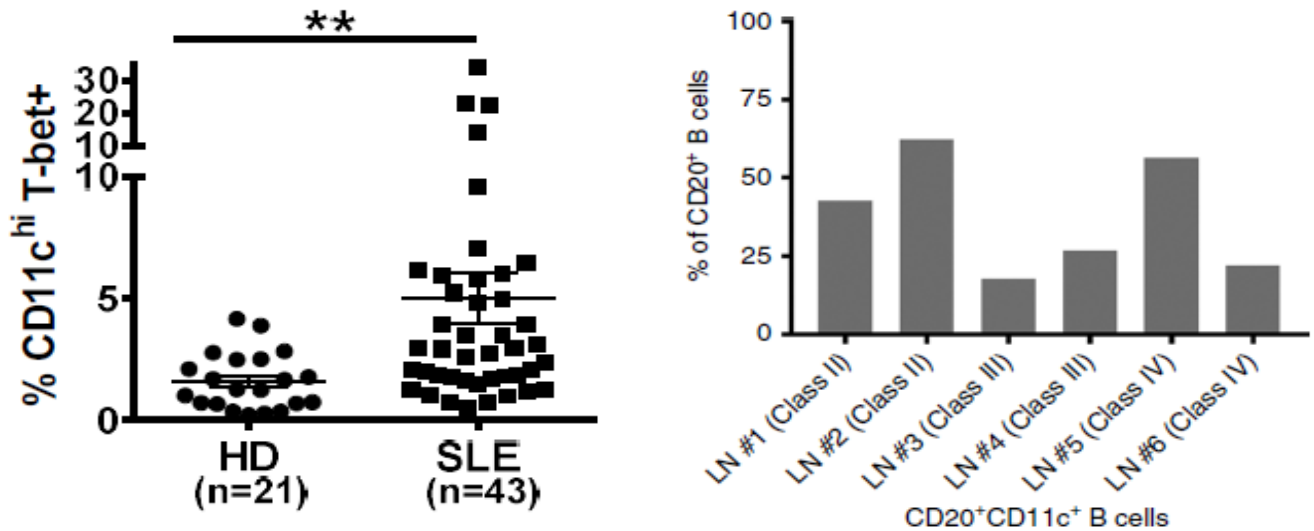


Figura 6. Porcentaje de ABCs correspondiente al total de linfocitos B en pacientes con lupus eritematoso generalizado (SLE) y controles sanos (HD). Prueba estadística: t Student. Porcentaje de linfocitos B ($CD20^+ CD11c^+$) presentes en tejido renal de 6 pacientes con nefropatía lúpica (Clase II n: 2 Clase III n: 2 Clase IV n: 2).^[31]

JUSTIFICACIÓN

La NL es una manifestación clínica grave en LEG, que incrementa la morbimortalidad y puede producir daño irreversible en el tejido renal provocando la pérdida total de su función.

Considerando que los porcentajes de linfocitos ABCs se han encontrado incrementados en LEG y otras enfermedades autoinmunes; adicional a ello, la presencia de linfocitos B con el marcador CD11c en tejido renal, es posible que esta subpoblación de linfocitos pueda tener un valor como biomarcador en la nefropatía lúpica.

HIPÓTESIS

La frecuencia de los linfocitos ABCs en sangre periférica en los pacientes nefrópatas estará incrementada en comparación con los pacientes sin nefropatía; adicionalmente, la variación numérica de los linfocitos ABCs correlaciona con parámetros de daño renal y con variables inmunológicas en pacientes nefrópatas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de los linfocitos ABCs en pacientes con nefropatía lúpica y correlacionarla con parámetros clínicos y de laboratorio para establecer su utilidad como biomarcador de monitoreo de la manifestación renal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Reclutar cohortes de pacientes con LEG/NL acorde a los criterios clínicos establecidos.
- Medir la frecuencia de los linfocitos ABCs (CD19⁺ CD21^{lo/-} CD11c⁺ T-bet⁺).
- Determinar la existencia de correlaciones entre la frecuencia de los linfocitos ABCs en sangre periférica y las variables clínicas y de laboratorio de los pacientes en estudio mediante análisis estadísticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupo de estudio

Se reclutaron pacientes de entre 18 a 50 años, diagnosticados acorde a los criterios de clasificación del American College of Rheumatology (ACR) y a los criterios del Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC), provenientes del departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de NL clases III o IV (con o sin presencia de Clase V) confirmado por biopsia renal percutánea (BRP) de reciente diagnóstico de NL (<1 mes de diagnóstico por BRP) que se encuentren o no con tratamiento inmunosupresor.

Pacientes con diagnóstico de LEG que se encuentren o no con tratamiento inmunosupresor.

Se reclutarán individuos sanos ajustados por edad (± 5 años) y género. Su estado de salud se verificó mediante interrogatorio y exploración física.

* Todos los sujetos deberán otorgar consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio.

Aprobación del protocolo, comité de ética e investigación INCMNSZ: REF2555

Criterios de exclusión

Pacientes con diagnóstico de LEG de inicio tardío (>50 años al diagnóstico).

Pacientes con diagnóstico concomitante de neoplasias, infecciones virales crónicas o inmunodeficiencias primarias.

Pacientes con diagnóstico de proceso infeccioso activo al momento de la toma de muestra.

Mujeres embarazadas o en puerperio.

Pacientes bajo cualquier tratamiento inmunosupresor de tipo biológico (anti CD20, anti-BAFF, anti-CTLA4).

Pacientes con diagnóstico de otras enfermedades autoinmunes concomitantes, excepto síndrome antifosfolípidos.

Para los pacientes con LEG que presenten evidencia clínica o de laboratorio de compromiso o daño renal de tipo crónico.

Para los controles sanos, antecedentes de patología autoinmune en familiares de primer grado.

Criterio de eliminación

Muestra insuficiente para el análisis contemplado.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

A través de punción venosa se obtuvieron 20-30 mL de sangre periférica con sistema Vacutainer™ con tubos heparinizados (Becton, Dickinson and Company) (BD). Se hizo una dilución de la sangre con PBS (Phosphate-buffered saline) 1x a una relación 1:2. En un tubo cónico de 15 mL se añadieron 3 mL de Ficoll-Paque (δ1.077 g/mL), después de ello, cuidadosamente se añadieron 10 mL de la muestra diluida con PBS. Se colocó el tubo con la muestra cuidadosamente en la centrifuga y se centrifugo durante 30 minutos, a 2000 rpm, para la obtención del gradiente celular. Posteriormente se retiró cuidadosamente el tubo cónico que contenía la

muestra de la centrifuga. El siguiente paso fue retirar el anillo que contenía las células mononucleares de sangre periférica (linfocitos, monocitos), el cual se encuentra por debajo de la fase que contiene plasma y por arriba de la fase que contiene Ficoll-Paque. Se realizó un lavado de las células obtenidas con PBS (Miltenyi Biotec protocol [MACS], 2008). Una vez terminado el lavado, la muestra se resuspendió en 1 mL de PBS y se recolectaron 10 μ L de la muestra; en un tubo de microcentrífuga se colocó la muestra recolectada y se añadieron 90 μ L de azul tripano. Se realizó un conteo celular y se valoró la viabilidad de la muestra previamente descrita a través de la cámara de Neubauer. Posterior al conteo celular, se colocaron 1×10^6 células de cada una de las muestras procesadas en tubos de poliestireno de fondo redondo (para citometría de flujo).

Tinción de superficie

En cada tubo de poliestireno con suspensión celular de la muestra procesada se le añadieron 5 μ L de Human TruStain FcX™ (solución de bloqueo) durante 10 minutos a 4°C. Con el fin de evitar tinciones inespecíficas. La solución de bloqueo contiene anticuerpos dirigidos contra CD16, CD32 y CD64 (receptores Fc con afinidad contra IgG).

Una vez que se cumplió el tiempo de incubación de la solución bloqueadora, se adiciono 1 μ g de los anticuerpos marcados con fluorocromos para detectar las moléculas CD19, CD11c y CD21 (Tabla 2). Las muestras se incubaron a 4°C por 25 minutos protegidos de la luz. Para terminar el proceso de tinción de superficie se adiciono 1 mL de PBS para realizar un lavado de la muestra.

FITC / CD19	[200 µg/mL]	Cat. 363008
APC / CD11c	[300 µg/mL]	Cat. 301614
PE / CD21	[50 µg/mL]	Cat. 354904
BV711 / T-bet	[200 µg/mL]	Cat. 644820

Tabla 2. Anticuerpos marcados para la detección de nuestras moléculas de interés.

Determinación del factor de transcripción T-bet

Posterior al último lavado de la muestra, se utilizó el kit True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend) de la siguiente forma. Para fijar la muestra, se resuspendió en 500 µL de solución fijadora 1x del kit previamente comentado, la muestra con la solución fijadora se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados a la muestra con 1 mL de solución permeabilizante 1x del kit. Al finalizar los lavados la muestra se resuspendió en 100 µL de solución permeabilizante y se añadió 1 µg del anticuerpo dirigido contra el factor de transcripción T-bet (Tabla 2), la muestra se incubó durante 25 minutos a 4°C protegidos de la luz. Al finalizar el periodo de incubación de la muestra, se realizaron 2 lavados, el primero de ellos se adicionó 1 mL de solución permeabilizante 1x y el segundo lavado se adicionó 1mL de PBS. Finalmente para poder realizar la lectura en el citómetro de flujo, la muestra se resuspendió en 550 µL de Cell Staining Buffer™ (BioLegend).

Adquisición y análisis

Previamente a la lectura de las muestras, en el citómetro de flujo LSRFortessa® (BD Biosciences) se realizó una compensación, de los anticuerpos marcados (Tabla 2) para evitar el traslape de la emisión producida por los fluorocromos visto en el

programa Fluorescence Spectra Analyzer (BioLegend ®) (Figura 7), esto se realizó con ayuda del kit BD™ CompBeads. Por otro lado, para adquirir los eventos de interés, se hizo una plantilla en la ventana de adquisición del citómetro de flujo que fue utilizada en todas las muestras.

Al finalizar el protocolo completo de tinción, las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo, adquiriendo aproximadamente de entre 500,000 – 1,000,000 eventos para el análisis de las poblaciones leucocitarias de sangre periférica. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 10 (TreeStar Inc). De igual forma, en el análisis con software, se realizó una estrategia de selección para todas las muestras (Figura 8).

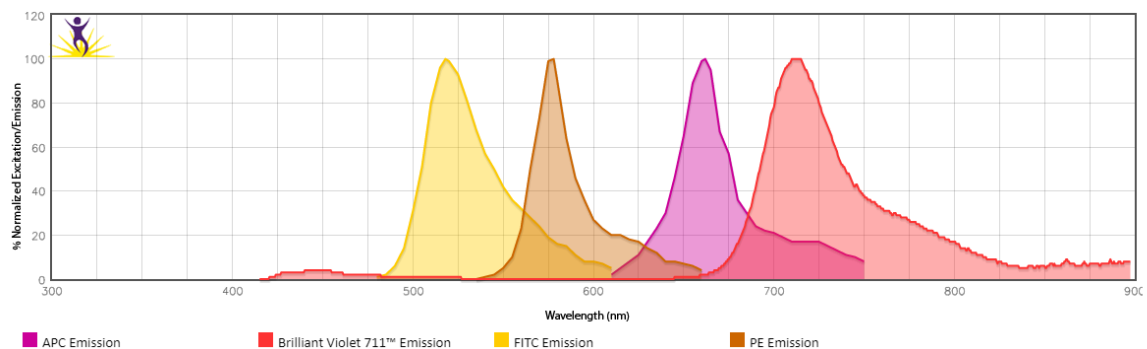


Figura 7. Representación esquemática de las emisiones generadas por los fluorocromos.

Correlación de variables y análisis estadístico

La frecuencia (%) obtenida de los linfocitos ABCs, las variables clínicas y de laboratorio fueron comparadas entre los grupos de estudio a través de las pruebas estadísticas U Mann Whitney y Kruskal Wallis. El análisis de correlación entre 2 variables se realizó con la prueba estadística del coeficiente de Spearman. Todos los análisis fueron desarrollados a través del software GraphPad Prism 6 ®.

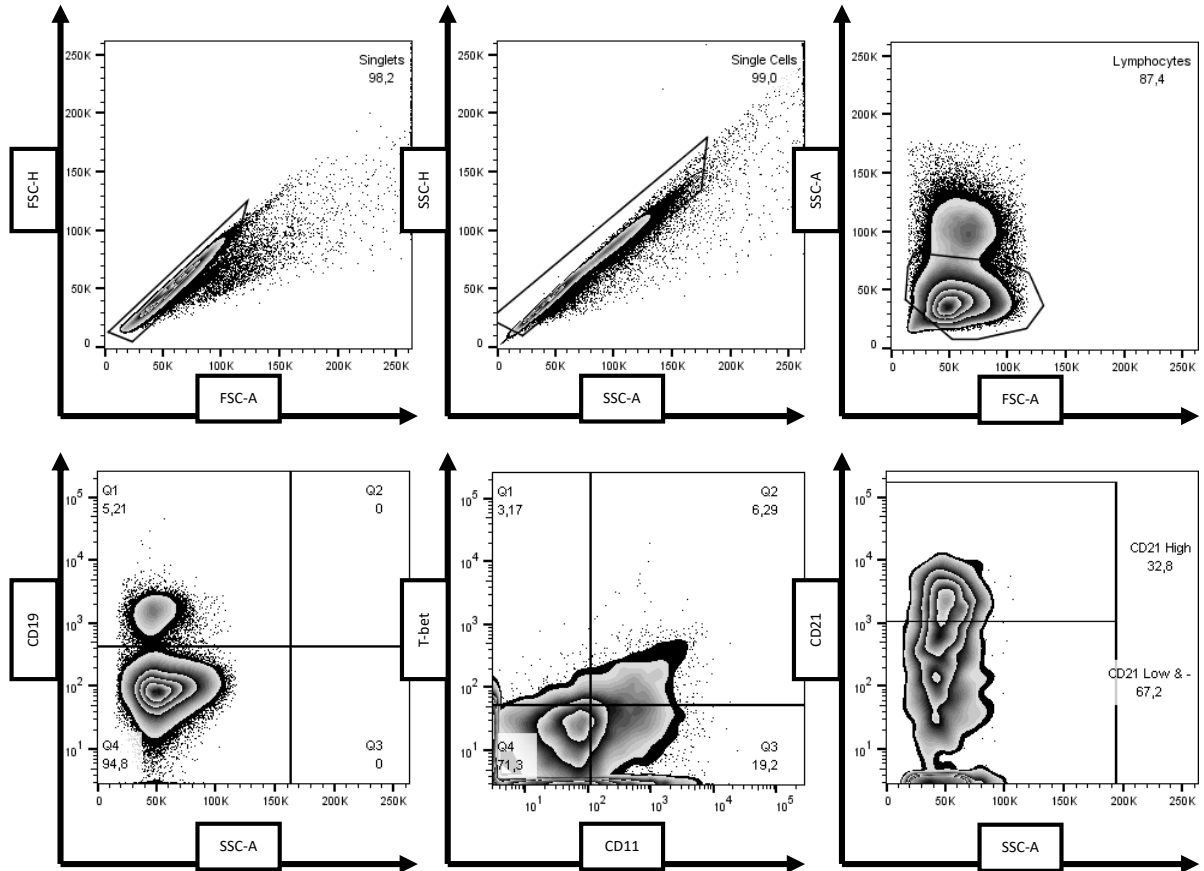


Figura 8. “Zebra plot” representativo de la estrategia de selección para la subpoblación en estudio. Se realizó en primer plano la selección de eventos simples, a través de la comparación de Tamaño (altura contra área) y Granularidad (altura contra área), posteriormente se seleccionó el área de linfocitos a través de tamaño contra granularidad. Se selecciona la población para CD19, se analizó posteriormente la expresión de CD11c y T-bet, seleccionando las dobles positivas; por último se seleccionó la región de CD21 bajo y negativo.

RESULTADOS

Selección y caracterización de pacientes lúpicos sin daño renal, pacientes con nefropatía lúpica y controles sanos.

Respecto a nuestras cohortes de pacientes, se han reclutado un mayor número de pacientes del género femenino en las dos cohortes. Con respecto a la edad, ambas cohortes de pacientes cursan entra la tercera y la cuarta década de vida. Acorde a la actividad de la enfermedad (SLEDAI), los pacientes nefrópatas presentan mayor actividad de la enfermedad con respecto a los pacientes sin deterioro renal. Los niveles de las fracciones C3 y C4 del complemento, se encuentran disminuidos en ambas cohortes de pacientes, en comparación con los niveles normales establecidos. En cuanto a los niveles de autoanticuerpos anti-DNAs, existe en ambas cohortes de pacientes un incremento, no obstante en los pacientes con nefropatía hay cifras notablemente altas, que sobrepasan las 1000 unidades a diferencia de los pacientes lúpicos sin daño renal que se encuentran por debajo de 220 unidades. Las variables asociadas a la función renal, con respecto a los pacientes nefrópatas, la creatinina sérica se encuentra incrementada y la tasa de filtrado glomerular se encuentra disminuida, en contraste con los pacientes sin nefropatía, que no muestran alteraciones en esas variables. Por otro lado en cuanto a la biometría hemática, el número de eritrocitos se encuentran disminuidos en los pacientes con nefropatía a diferencia de los pacientes sin deterioro renal, los cuales se encuentran dentro los intervalos normales. La cuenta total de leucocitos en la mayoría de los pacientes de ambas cohortes se encuentran dentro el intervalo normal. Por otro lado en cuanto al porcentaje de linfocitos se encuentra en intervalos fisiológicos en pacientes sin deterioro renal, mientras que en los pacientes nefrópatas cerca de la mitad presentan linfopenia. Con respecto al porcentaje de monocitos, en ambas cohortes de pacientes no presentan alteración en el porcentaje. Mientras que, en el porcentaje de neutrófilos, la mayoría de los pacientes nefrópatas presentan porcentajes elevados, de los cuales algunos sobrepasan el rango máximo superior (85%); los pacientes sin nefropatía no presentan alteraciones en esta variable.

	LEG	NL
GENERO (M/F)	1/8	6/10
EDAD	29 (22-44)	27 (19-47)
SLEDAI	6 (2-16)	23 (16-35)
C3 (MG/DL)	94 (55-124)	48 (19-70)
C4 (MG/DL)	19 (8-29)	10 (4-32)
ANTI-DNA DS(UI/ML)	95.81 (7.80-219.70)	704.24 (11.8-4790)
CREATININA	0.65 (0.53-0.80)	3.13 (1.18-10.75)
TFG (ML/MIN)	134.27 (83.89-174.13)	38.50 (7.76-76.74)
ABC (%)	7.36 (2.34-21.20)	7.02 (1.98-14.8)
CLASE III	---	2
CLASE IV	---	14
CLASE V	---	16
ERITROCITOS (10*6/UL)	4.8 (4.2-5.8)	3.3 (2.0-4.3)
LEUCOCITOS (10*3/UL)	5.5 (2.6-10.0)	7.1 (3.8-13.2)
LINFOCITOS (%)	26.9 (6.0-56.0)	11.6 (2.6-24.8)
MONOCITOS (%)	7 (4.7-9.3)	6.4 (2.0-10.1)
NEUTRÓFILOS (%)	63.3 (37.0-88.7)	81.0 (65.4-95.4)
PLAQUETAS (K/UL)	229 (140-275)	169 (3-458)

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes con LEG y NL. Se muestran las variables que se cuantificaron para el análisis estadístico con su unidad respectiva de medición. Se muestra la media de la variable, y el valor mínimo y máximo entre paréntesis.

Con respecto a las clases de NL, la cohorte de pacientes con nefropatía muestra una mayor prevalencia de la NL clase IV, y adicionalmente la clase V está presente en clase III y clase IV. Por último, la cohorte de pacientes sanos consta de 10 controles, 3 hombres y 7 mujeres, pareados por edad y género, acorde al grupo de pacientes con nefropatía. A este grupo de individuos sanos únicamente se realizó el análisis de citometría de flujo.

El porcentaje de ABCs no presenta diferencia significativa en los tres grupos de estudio

Acorde al resultado del análisis estadístico, como se observa en la Figura 9, no existe diferencia significativa con respecto al porcentaje de linfocitos ABCs. Es importante considerar que la presencia de los linfocitos ABCs no es exclusivo de pacientes con enfermedades de tipo autoinmune; en efecto, esta subpoblación debe ser investigada más a fondo pensando en que pueden ser detectadas en condiciones fisiológicas (controles sanos). Por otro lado, es notorio la existencia de una separación en las cohortes de pacientes con enfermedad autoinmune, por un lado se observa un grupo que se asemeja al grupo de individuos sanos, mientras que otro presenta un incremento en la población con respecto a los individuos sanos; es importante mencionar que esto no presenta una asociación con respecto a la actividad de la enfermedad o la clase de la nefropatía que presentan los pacientes estudiados.

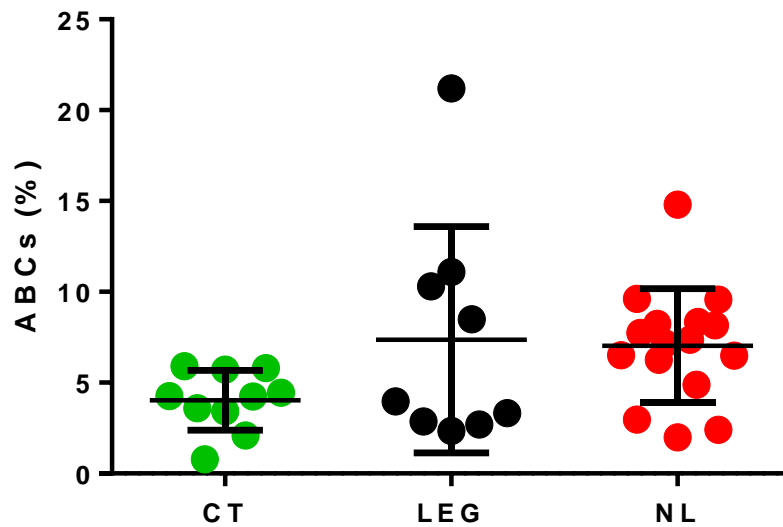


Figura 9. Porcentaje de ABCs correspondiente al total de linfocitos B en controles sanos (CT/n:10), pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG/n:9) y pacientes con nefropatía (NL/n:16). Prueba estadística: Kruskal Wallis ($p=0.0790$).

La subpoblación de linfocitos B CD21^{hi} CD11c⁺ T-bet⁺ disminuye notablemente en los pacientes con Nefropatía Lúpica

El análisis de citometría generó un dato interesante con respecto a las subpoblaciones de linfocitos B. Se detectó la presencia de una subpoblación similar a los linfocitos ABCs, con la diferencia que esta subpoblación presenta una alta expresión de CD21 como se observa en la Figura 10. Esta subpoblación de linfocitos B CD21^{hi} disminuye drásticamente en los pacientes con nefropatía lúpica, en contraste con los pacientes sin deterioro renal, los cuales acorde al análisis estadístico (Figura 11), presentan un mayor porcentaje de esta subpoblación de linfocitos B CD21^{hi}. Por tal motivo, sería importante realizar un análisis particular a esta subpoblación y comparar tanto genotípica como fenotípicamente con la subpoblación de los linfocitos ABCs.

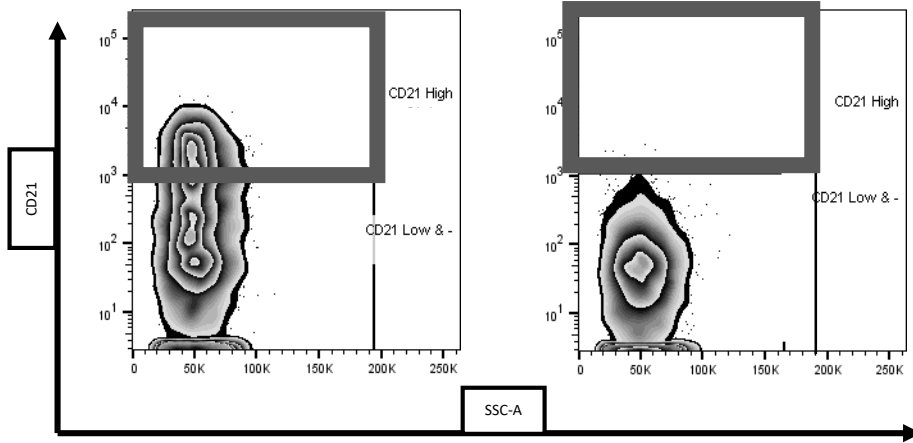


Figura 10. “Zebra plots” representivos de pacientes con y sin nefropatía con respecto a los linfocitos B CD11c⁺ T-bet⁺ CD21^{hi}.

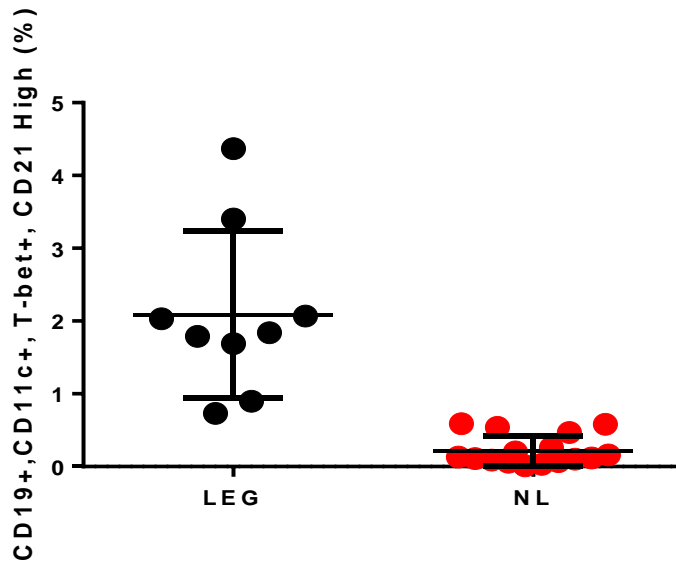


Figura 11. Porcentaje de linfocitos B CD11c⁺ T-bet⁺ CD21^{hi} correspondiente al total de linfocitos B en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG/n:9) y pacientes con nefropatía (NL/n:16). Prueba estadística: U Mann Whitney ($p=0.0001$).

La cohorte de pacientes lúpicos sin deterioro renal presenta correlaciones significativas con el porcentaje de linfocitos ABCs, en contraste con los pacientes con nefropatía lúpica, no obstante presentan diferencias significativas en algunas variables clínicas.

En la tabla 4, se presenta el análisis de correlación de variables, el cual se realizó a través de la prueba estadística de Spearman. Las variables analizadas fueron seleccionadas con respecto a su valor informativo que proporcionan del lupus eritematoso y del daño renal. En la cohorte de pacientes lúpicos sin nefropatía las variables de fracción del complemento C3, niveles de autoanticuerpos anti-DNAbs, SLEDAI y TFG presentan una correlación significativa cuando se analizan con el porcentaje de los linfocitos ABCs. En contraste, los pacientes con nefropatía lúpica no presenta correlaciones significativas con el porcentaje de linfocitos ABCs en las variables evaluadas.

En la figura 12 podemos observar que la mayoría de los pacientes con nefropatía lúpica presentan niveles bajos de la fracción C3 del complemento en comparación con los pacientes lúpicos sin daño renal.

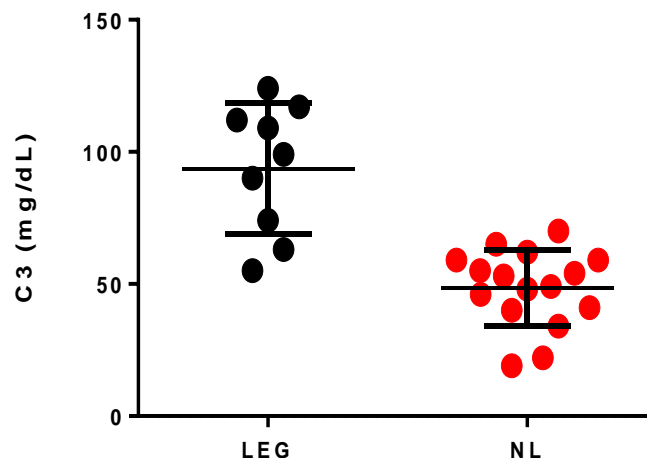


Figura 12. Niveles de la fracción C3 del complemento en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG/n:9) y pacientes con nefropatía (NL/n:16). Prueba estadística: U Mann Whitney ($p=0.0001$).

ABCs(%)	LEG (r)	LEG (p)	NL (r)	NL (p)
C3	-0.7167	0.0369	-0.4238	0.1015
C4	-0.6276	0.0718	-0.1876	0.2165
Anti-DNA ds	0.8095	0.0218	-0.1412	0.6015
SLEDAI	0.7711	0.0198	0.1317	0.6247
TFG	0.8667	0.0045	-0.0617	0.8222
Creatinina	-0.5000	0.1777	0.0838	0.7566
Leucocitos	0.1167	0.7756	-0.1943	0.4646
Linfocitos	-0.5667	0.1206	-0.0382	0.8910
Eritrocitos	-0.0502	0.8868	0.0324	0.9060
Monocitos	0.01695	0.9818	-0.2664	0.3134
Neutrófilos	0.6167	0.0857	0.1339	0.6188
Plaquetas	-0.2667	0.4933	-0.2088	0.4363

Tabla 4. Valores del análisis de correlación de variables clínicas y de laboratorio en pacientes con LEG y NL en comparación con los linfocitos ABCs.

Tomando en cuenta el análisis de correlación, podemos observar en la Figura 13 que la correlación presente en los pacientes lúpicos sin nefropatía es negativa, es decir, que el incremento del porcentaje de los linfocitos ABCs se asocia a menores cantidades de la fracción C3 del complemento. Por otro lado, a pesar de que en los pacientes con nefropatía no hay valor estadísticamente significativo con respecto a la fracción C3, presentan una tendencia negativa al igual que los pacientes sin daño renal.

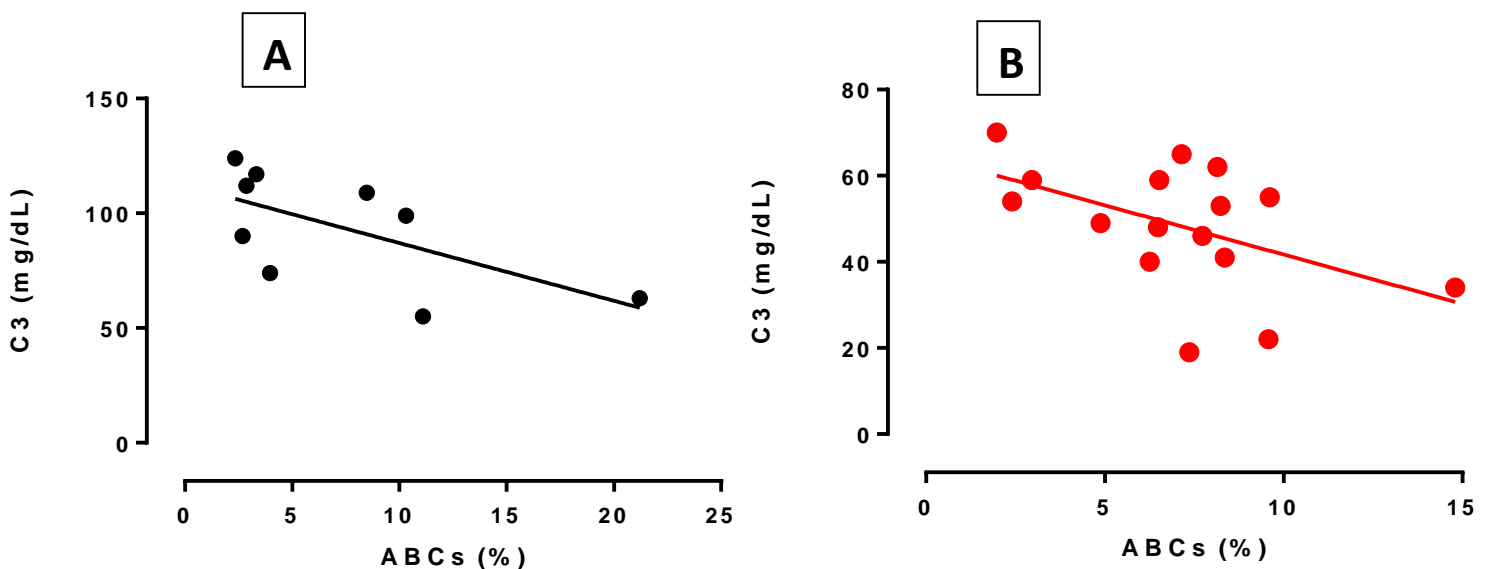


Figura 13. Correlación de los niveles de la fracción C3 del complemento con el porcentaje de ABCs en pacientes con lupus eritematoso generalizado (A) y pacientes con nefropatía (B). Prueba estadística: Coeficiente de Spearman.

Por otro lado, independientemente del incremento de los niveles de autoanticuerpos anti-DNAs en ambas cohortes de pacientes, existe una mayor concentración de autoanticuerpos en los pacientes con nefropatía lúpica (Figura 14). Con respecto a al análisis de correlación, en los pacientes lúpicos sin nefropatía, existe una correlación positiva significativa, es decir, que a mayor concentración de autoanticuerpos mayor porcentaje de linfocitos ABCs (Figura 15). De igual forma, los pacientes con nefropatía presentan un tendencia positiva similar.

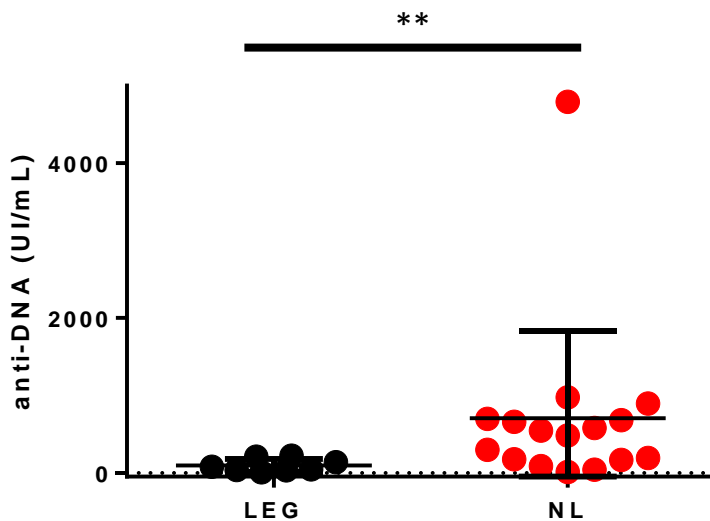


Figura 14. Niveles de auto-anticuerpos anti-DNAs en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) y pacientes con nefropatía (NL). Prueba estadística: U Mann Whitney ($p=0.0070$).

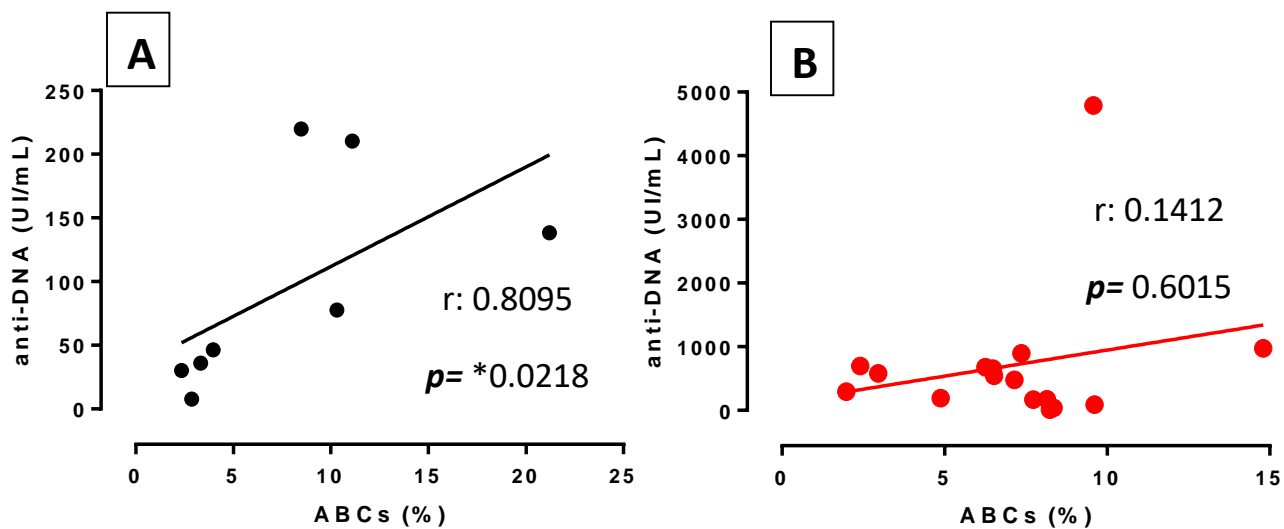


Figura 15. Correlación de los niveles de autoanticuerpos anti-DNAs con el porcentaje de ABCs en pacientes con lupus eritematoso generalizado (A) y pacientes con nefropatía (B). Prueba estadística: Coeficiente de Spearman .

Con respecto a la actividad de la enfermedad, es notable el alto puntaje que presentan los pacientes nefróticos en comparación con los pacientes sin daño renal (Figura 16). No obstante, en los pacientes sin nefropatía presentan una correlación positiva significativa, en contraste con los pacientes con nefropatía lúpica, los cuales no presentan asociación o tendencia alguna con el porcentaje de linfocitos ABCs (Figura 17).

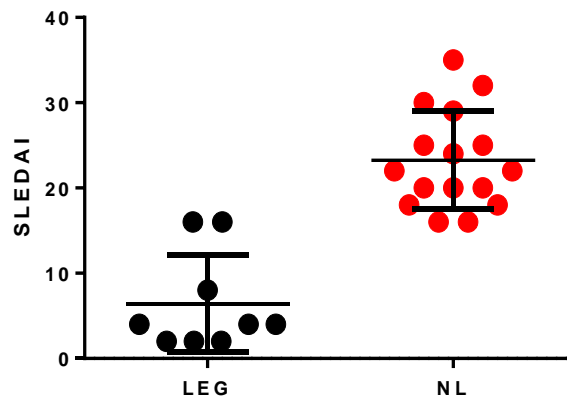


Figura 16. Actividad de la enfermedad (SLEDAI) en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) y pacientes con nefropatía (NL). Prueba estadística: U Mann Whitney ($p=0.0001$).

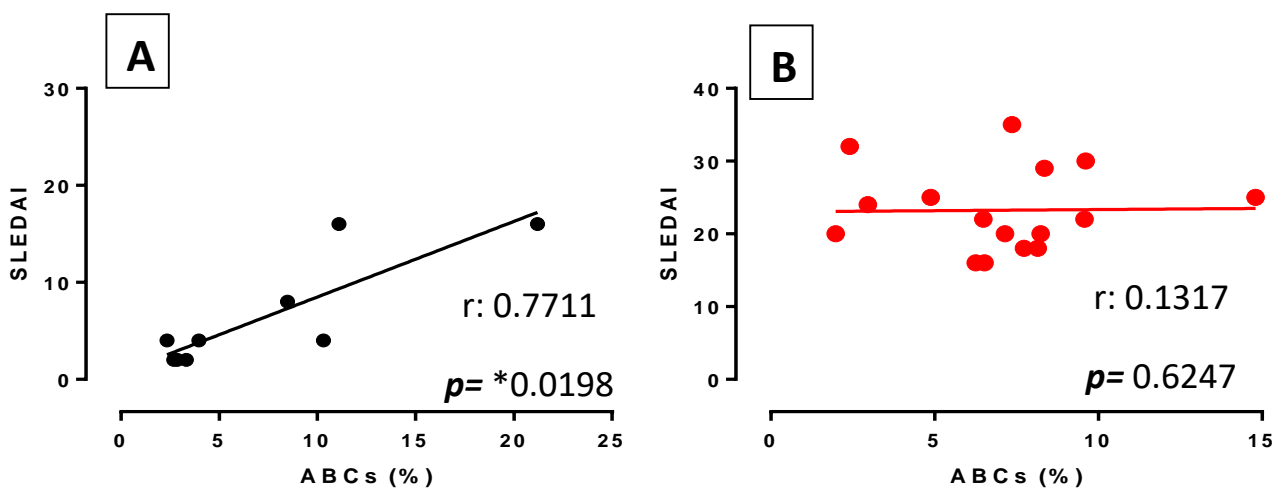


Figura 17. Correlación de la actividad de la enfermedad SLEDAI con el porcentaje de ABCs en pacientes con lupus eritematoso generalizado (A) y pacientes con nefropatía (B). Prueba estadística: Coeficiente de Spearman.

DISCUSIÓN

En este trabajo, en primer instancia, se compararon los porcentajes de linfocitos ABCs de los tres grupos reclutados (controles sanos, pacientes lúpicos y pacientes lúpicos con nefropatía), denotando que no existe diferencia significativa acorde al test de Kruskal-Wallis. No obstante, es importante considerar que no se alcanzó el tamaño muestral idóneo de nuestra población en estudio para generar un poder estadístico confiable, esto basado en el cálculo utilizado por Hanly JG y colaboradores. Este cálculo considera un poder estadístico adecuado mayor o igual a 85 %, el cual sería alcanzado con una N de 36 individuos por cada grupo. Por tal motivo, sería importante completar la cohorte con la N adecuada. Considerando los estudios previos de Nan Sheen y Rachel Ettinger, donde el análisis comparativo del porcentaje de los linfocitos ABCs muestra un incremento significativo en pacientes con LEG en comparación con individuos sanos; en nuestro estudio, a pesar de que no hay diferencia se puede observar un patrón similar tanto en los pacientes con enfermedad autoinmune y los individuos sanos. Es importante recalcar que en el estudio elaborado por el grupo de Nan Sheen los porcentajes de linfocitos ABCs en los individuos sanos son casi imperceptibles y en la cohorte de pacientes el máximo alcanzado es un porcentaje de 6 %. A diferencia del estudio elaborado por el grupo de R. Ettinger y nuestro estudio, los porcentajes de linfocitos ABCs en individuos sanos se aproximan al 6 %, mientras que en pacientes pueden sobrepasar el 10%. Esta diferencia podría explicarse por componentes genéticos asociados a la ancestría, dado que nuestro estudio y las investigaciones mencionadas previamente, las cohortes de individuos sanos y de pacientes poseen diferentes etnias. Esto, considerando que acorde a la etnia puede variar la gravedad de la enfermedad, lo cual puede modificar la frecuencia de los linfocitos ABCs.

Otros factores importantes a considerar, que pueden modificar la frecuencia de esta subpoblación, es el tiempo de evolución de la enfermedad, el tratamiento y la actividad de la enfermedad, estos factores de cierta forma pueden modificar el microambiente inflamatorio en el momento en el que se realiza el análisis comparativo. En el contexto que pueda haber disminución o incremento de los estímulos necesarios para la generación de los linfocitos ABCs, como la presencia

de ácidos nucleicos propios que puedan interactuar con los receptores tipo Toll (TLRs), así como la producción de IL-21 e IFN- γ que son liberados en respuesta a una infección de tipo viral.

Como se mencionó en el apartado de resultados, a través del análisis de citometría de flujo, detectamos una subpoblación de linfocitos B que a diferencia de los linfocitos ABCs expresa CD21^{hi}, esta subpoblación está presente tanto en individuos sanos como en pacientes sin nefropatía, no obstante, en los pacientes nefrópatas disminuye drásticamente. El motivo por el cual existe una disminución de CD21 en la superficie de los linfocitos B en esta enfermedad autoinmune aún no está descrita. No obstante, en la literatura está descrito que este receptor puede interactuar con diferentes ligandos como C3d/iC3b, la proteína gp350 o CD23, o más recientemente Holers VM y colaboradores han descrito su interacción con IFN- α y DNA. Por tal motivo, podemos especular que dependiendo del ligando con el que interactúe, puede generar un efecto diferente en el linfocito B que probablemente pueda estar asociado a una respuesta inmune fisiológica o patológica. De tal modo, sería importante dilucidar el origen y función de esta subpoblación que aún no ha sido descrita con anterioridad.

Por otro lado, a pesar de que el análisis de correlación no fue significativo en los pacientes con nefropatía lúpica; de manera interesante, en algunas variables como fracción C3 del complemento o niveles de autoanticuerpos anti-DNAs presentan tendencias similares a las correlaciones en los pacientes lúpicos sin daño renal. Los pacientes que no presentan daño renal, en cuanto a las variables de SLEDAI y niveles de autoanticuerpos anti-DNAs presentan una correlación positiva significativa, mientras que los niveles de la fracción C3 del complemento presenta una correlación negativa significativa con respecto al incremento del porcentaje de las ABCs. Esto sugiere que probablemente el microambiente que existe inicialmente en los pacientes con LEG, tenga una mayor asociación con los linfocitos ABCs, y puede que esta asociación, permita la participación de esta subpoblación en la patogenia de la enfermedad.

Es importante denotar, que a pesar de que se ha descrito que los componentes del complemento fracciones 3 y 4 (C3, C4) y los autoanticuerpos anti-DNAs tienen una baja sensibilidad y especificidad para predecir la manifestación renal, en nuestro estudio los pacientes nefrópatas poseen una marcada diferencia de estas variables en comparación con los pacientes lúpicos sin nefropatía. Adicional a ello, existe una tendencia a la linfopenia (decremento de linfocitos) en pacientes con NL mientras que en los pacientes sin nefropatía no presenta el mismo patrón. En neutrófilos, los pacientes nefrópatas presenta un porcentaje incrementado (65.4 – 95.4 %) en comparación con los intervalos normales (40 – 60%), mientras que los pacientes sin daño renal presentan porcentajes más bajos (37.0 – 88.7 %) en comparación con los pacientes con NL. Por tal motivo, estas variables podrían ser de utilidad para caracterizar al paciente nefrópata independientemente del decremento de la tasa de filtrado glomerular y el incremento de los niveles séricos de creatinina.

Por último, un enfoque adicional a la caracterización de esta subpoblación, sería dilucidar la función (independientemente de la generación de anticuerpos). Este enfoque se podría apoyar con diversos análisis transcriptómicos realizados en los trabajos de P. Marrack y R. Ettinger, en los cuales se describe el incremento de transcritos de diversas moléculas de superficie y citocinas (CD95, CD80, CD86, Granzima A, Perforina 1, entre otras), las cuales pudieran estar involucradas en la fisiopatogenia de la enfermedad y sus manifestaciones.

CONCLUSIÓN

Acorde a los resultados de este trabajo, se concluye que la frecuencia de los linfocitos ABCs de sangre periférica no poseen un valor como marcador de esta manifestación secundaria.

Las variables de autoanticuerpos anti-DNAs, fracciones C3 y C4 del complemento, neutrófilos y linfocitos pueden utilizarse para caracterizar a los pacientes con deterioro renal dada su diferencia significativa con respecto a los pacientes sin nefropatía.

Ciertamente no hay correlaciones significativas con respecto a la frecuencia de linfocitos ABCs en pacientes nefrópatas; no obstante, eso no exime a esta subpoblación de su probable participación en la fisiopatogenia de la enfermedad. Esto fundamentado en las correlaciones significativas en los pacientes sin deterioro renal.

Por último, la subpoblación de linfocitos B que expresa CD21^{hi} CD11c⁺ T-bet⁺ puede tener un valor predictivo en la manifestación renal en LEG, debido a la notable disminución en los pacientes nefrópatas y su valor significativo en el análisis comparativo.

PERSPECTIVAS

Realizar un análisis longitudinal de los pacientes con y sin nefropatía de la subpoblación de ABCs considerando que dependiendo de las manifestaciones presentes y la evolución pueda modificar la frecuencia de esta subpoblación.

Realizar un análisis profundo de los linfocitos B CD21^{hi} CD11c⁺ T-bet⁺, con respecto a su fenotipo y nivel de transcriptoma, para orientar la búsqueda de la función de esta subpoblación.

Valorar los ligandos y los mecanismos que pueden producir la disminución de CD21, pensando en un efecto regulador o estimulante dependiente del ligando.

Analizar biopsias de tejido renal para completar el fenotipo de los linfocitos ABCs con el fin de buscar su valor como marcador *in situ*.

REFERENCIAS.

1. D’Cruz DP, Khamashta MA and Hughes GR. (2007) Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 369 (9561): 587-596. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60279-7
2. Benseler SM and Silverman ED. (2007) Systemic Lupus Erythematosus. *Rheum Dis Clin of North Am*. 33 (3): 471-498. doi: 10.1016/j.rdc.2007.07.008
3. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L and Cooper GS. (2010) Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin in Arthritis and Rheum*. 39 (4): 257-68. doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.10.007
4. Tsokos GC. (2011) Mechanisms of Disease Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 365 (22): 2110-2121. doi: 10.1056/NEJMra1100359
5. Flores-Mendoza G, Sansón SP, Rodríguez-Castro S, Crispín JC and Rosetti F. (2018) Mechanisms of Tissue Injury in Lupus Nephritis. *Trends Mol Med*. 24 (4): 364-378. doi: 10.1016/j.molmed.2018.02.003
6. Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, Satterthwaite AB, Fairhurst AM and Davis LS. (2017) Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 56 (suppl_1): i55-i66. doi: 10.1093/rheumatology/kew427
7. Chung AC and Lan HY. (2011) Chemokines in Renal Injury. *J Am Soc Nephrol*. 22 (5): 802-809. doi: 10.1681/ASN.2010050510
8. Anders HJ. (2009) Pseudoviral immunity – a novel concept for lupus. *Trends Mol Med*. 15 (12): 553-561. doi: 10.1016/j.molmed.2009.10.004
9. Kuhn A, Bonsmann G, Anders HJ, Herzer P, Tenbrock K and Schneider M. (2015) The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int*. 112 (25): 423–432. doi: 10.3238/arztebl.2015.0423
10. Thong B and Olsen NJ. (2017) Systemic lupus erythematosus diagnosis and management. *Rheumatology (Oxford)*. 56 (suppl_1): i3 – i13. doi: 10.1093/rheumatology/kew401

11. Lisnevskaja, L, Murphy G and Isenberg D. (2014) Systemic lupus Erythematosus. *Lancet*. 384 (9957): 1878-1888. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60128-8
12. Miniño M. (2008) Índice de actividad lúpica y tratamiento del lupus eritematoso en dermatología. *Dermatología Rev Mex*. 52 (1): 20-28.
13. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, Karpouzas GA, Merrill JT, Wallace DJ, Yazadany J, Grossman JM and et al. (2012) American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 64 (6): 797-808. doi: 10.1002/acr.21664
14. Lewis JB and Neilson EG. (2012) Glomerulopatías. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, et al. 18^a ed., *Harrison Principios de Medicina Interna* (pp. 2334 - 2354). McGraw Hill.
15. Imran TF, Yick F, Verma S, Estiverne C, Ogbonnaya-Odor C, Thiruvarudsothy S, Reddi AS and Kothari N. (2016) Lupus nephritis: an update. *Clin Exp Nephrol*. 20 (1): 1-13. doi: 10.1007/s10157-015-1179-y
16. Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y and Gershwin ME. (2012) Lupus nephritis: A critical review. *Autoimmun Rev*. 12 (2): 174-194. doi: 10.1016/j.autrev.2012.08.018
17. Lech M and Anders HJ. (2013) The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 24 (9): 1357-1366. doi: 10.1681/ASN.2013010026
18. Yu F, Haas M, Glassock R and Zhao MH. (2017) Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes. *Nat Rev Nephrol*. 13 (8): 483-495. doi: 10.1038/nrneph.2017.85
19. Schwartz N, Goilav B and Putterman C. (2014) The pathogenesis, diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol*. 26 (5): 502-509. doi: 10.1097/BOR.0000000000000089
20. Neusser MA, Lindenmeyer MT, Edenhofer I, Gaiser S, Kretzler M, Regele H, Segerer S and Cohen CD. (2011) Intrarenal production of B-cell survival factors in human lupus nephritis. *Mod Pathol*. 24 (1): 98-107. doi: 10.1038/modpathol.2010.184

21. Anders HJ and Rovin B. (2016) A pathophysiology-based approach to the diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Kidney Int.* 90 (3): 493-501. doi: 10.1016/j.kint.2016.05.017
22. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, Brujin JA, Colvin RB, Fogo AB, et al. (2018) Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney Int.* 93 (4): 789-796. doi: 10.1016/j.kint.2017.11.023
23. Rovin BH and Zhang X. (2009) Biomarkers for Lupus Nephritis: The Quest Continues. *Clin J Am Soc Nephrol.* 4 (11): 1858-1865. doi: 10.2215/CJN.03530509
24. Anne Davidson, et al. 2013. Pathogenic Mechanisms in Lupus Nephritis. Daniel J. Wallace, Bevra Hannahs Hahn. 8^a ed., Dubois' Lupus Erythematosus Related Syndromes (pp. 237-255). Elsevier.
25. Hoffman W, Lakkis FG and Chalasani G. (2016) B cells, Antibodies and More. *Clin J Am Soc Nephrol.* 11 (1): 137-154. doi: 10.2215/CJN.09430915
26. Karnell JL, Kumar V, Wang J, Wang S, Voynova E and Ettinger R. (2017) Role of CD11c⁺ T-bet⁺ B cells in human health and disease. *Cell Immunol.* 321: 40-45. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.05.008
27. Phalke S and Marrack P. (2018) Age (autoimmunity) associated B cells (ABCs) and their relatives. *Curr Opin Immunol.* 55: 75-80. doi: 10.1016/j.coi.2018.09.007
28. Naradikian MS, Myles A, Beiting DP, Roberts KJ, Dawson L, Herati RS, Bengsch B, Linderman SL, Stelekati E, Spolski R, Wherry EJ, Hunter C, Hensley SE, Leonard WJ and Cancro MP. (2016) Cutting Edge: IL-4, IL-21 and IFN- γ Interact To Govern T-bet and CD11c Expression in TLR-Activated B Cells. *J Immunol.* 197 (4): 1023-1028. doi: 10.4049/jimmunol.1600522
29. Rubtsov AV, Rubtsova K, Fischer A, Meehan RT, Gillis JZ, Kappler JW and Marrack P. (2011) Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c⁺ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood.* 118 (5): 1305-1315. doi: 10.1182/blood-2011-01-331462

30. Liu Y, Zhou S, Qian J, Wang Y, Yu X, Dai D, Dai M, Wu L, Liao Z, Xue Z, Wang J, Hou G, Ma J, Harley JB, Tang Y and Shen N. (2017) T-bet⁺ CD11c⁺ B cells are critical for antichromatin immunoglobulin G production in the development of lupus. *Arthritis Res Ther.* 19 (1): 225-236. doi: 10.1186/s13075-017-1438-2
31. Wang S, Wang J, Kumar V, Karnell JL, Naiman B, Gross PS, Rahman S, Zerrouki K, Hanna R, Morehouse C, Ettinger R and et al. (2018) IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c^{hi} T-bet⁺ B cells in SLE. *Nat Commun.* 9 (1): 1-14. doi: 10.1038/s41467-018-03750-7