

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“ Análisis en orina de moléculas asociadas a
vesículas extracelulares, para el pronóstico de
nefropatía lúpica”**

TESIS

Que presenta

M en C ITZE CECILIA NAVARRO HERNANDEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Directores de la Tesis

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Dr. José Luis Maravillas Montero

Ciudad de México

Noviembre, 2024

Índice

1	Introducción.....	2
1.1	Lupus Eritematoso Generalizado.....	2
1.1.1	Patogenia de LEG.....	2
1.1.2	Diagnóstico de LEG.....	5
1.2	Nefropatía lúpica.....	6
1.2.1	Epidemiología.....	7
1.3	Biopsia renal.....	7
1.3.1	Patrones de lesión glomerular.....	8
1.4	Clasificación de la NL.....	9
1.5	Patogenia de NL.....	11
1.6	Vesículas extracelulares.....	12
1.6.1	Vesículas extracelulares en riñón.....	15
1.7	Tetraspanina 33.....	16
1.7	miRNAs.....	18
1.7.1	miRNAs y LEG.....	21
1.7.1.1	miR-142.....	23
1.7.1.2	miR-155.....	23
1.7.1.3	miR-150.....	23
1.7.1.4	miR-148a.....	24
1.7.1.5	miR-146a.....	24
1.7.1.6	miR-21.....	25
1.8	Justificación.....	26
1.9	Hipótesis.....	27
2	Objetivos.....	29
2.1	General.....	29
2.2	Particulares.....	29
3	Materiales y Métodos.....	31
3.1	Grupo de estudio.....	31
3.1.1	Criterios de inclusión.....	31
3.1.2	Criterios de exclusión.....	31
3.1.3	Criterios de eliminación.....	32
3.2	Obtención de muestras.....	32

3.3	Aislamiento de vesículas extracelulares	33
3.4	Detección y medición de proteínas en vesículas extracelulares	34
3.5	Aislamiento de RNA	34
3.6	Medición de miRNAs.....	35
3.7	Western blot.....	35
3.8	Análisis Estadístico	36
4.0	Resultados	38
5.0	Discusión	56
6.0	Conclusiones.....	62
7.0	Perspectivas.....	64
8.0	Referencias.....	65

Índice de Figuras

Figura 1 Patogenia de LEG.	5
Figura 2 Clasificación de NL.	10
Figura 3 Patogenia de NL.	12
Figura 4 Vesícula extracelular.	13
Figura 5 Generación de VEs.	14
Figura 6 Secreción de VEs.	16
Figura 7 Estructura de la TSPAN33.	17
Figura 8 Biogénesis de miRNA y su entrada a las VEs.	20
Figura 9 Gel de poliacrilamida de las fracciones urinarias y VEs urinarias aisladas por dos diferentes metodologías.	39
Figura 10 Caracterización de VEs aisladas a partir de muestras de orina.	40
Figura 11 Cuantificación de proteína en VEs de individuos con NL, LEG y sanos.	41
Figura 12 Presencia de TSPAN33 en las diferentes fracciones de orina y en VEs.	42
Figura 13 TSPAN33 enriquecido en VEs urinarias en pacientes con NL activa.	43
Figura 14 Validación del citómetro de flujo para discriminar tamaños de 0.1 a 1.0 μm	44
Figura 15 Dot plots de las perlas Megamix.	44
Figura 16 Pacientes con LEG activo presentan mayor cantidad de VEs urinaria.	45
Figura 17 Pacientes con LEG activo presentan menor IMF de las proteínas evaluadas.	47
Figura 18 Pacientes con NL activa presentan mayor cantidad de VEs urinarias.	48
Figura 19 Pacientes con NL activa presentan menor IMF de las proteínas evaluadas.	49
Figura 20 VEs urinarias correlacionan con variables clínicas.	50
Figura 21 Correlaciones estadísticamente significativas entre variables clínicas y resultados obtenidos.	52
Figura 22 Pacientes con NL activa tienen mayor cantidad de VEs urinarias.	54
Figura 23 miR-21 y miR-146a incrementan en NL activa.	54

Índice de tablas

Tabla 1 miRNAs sobreexpresados y disminuidos en biopsias renales NL II provenientes de pacientes chinos.....	21
Tabla 2 Variables clínicas y de laboratorio de los grupos de estudio.	38

Abreviaturas

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADAM10	<i>A disintegrin and metalloprotease domain containing protein-10</i>
AGO2	Proteína argonauta 2
anti-CTLA4	Anticuerpos contra <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
anti-DNA _{dc}	Anticuerpos contra DNA de doble cadena
anti-RMPs	Anticuerpos contra <i>G protein subunit alpha 12</i>
anti-SSA(ro)	Anticuerpos contra <i>Sjogren´s síndrome related antigen A</i>
anti-SSB(la)	Anticuerpos contra proteína la de 45 kDa
APRIL	<i>A proliferation inducing ligand</i>
BAFF	B cell activating factor
BAFF-R	Receptor de BAFF
BCA	Ácido bicinconínico
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BILAG	<i>British Lupus Isles Assessment Group Index</i>
BUN	Nitrógeno ureico en la sangre
CD3	<i>Cluster differentiation 3</i>
CD4	<i>Cluster differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster differentiation 8</i>
CD9	<i>Cluster differentiation 9</i>
CD24	<i>Cluster differentiation 24</i>
CD37	<i>Cluster differentiation 37</i>
CD40	<i>Cluster differentiation 40</i>
CD53	<i>Cluster differentiation 53</i>
CD63	<i>Cluster differentiation 63</i>
CD81	<i>Cluster differentiation 81</i>
cDNA	DNA complementario
CIs	Complejos inmunes
CFM	Ciclofosfamida
CFSE	Succinimidil-carboxifluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ESCRT	<i>The endosomal sorting complexes required for transport</i>
EULAR	<i>European Alliance of Associations for Rheumatology</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GLADEL	Grupo Latinoamericano del Estudio de Lupus
IFN α	Interferón alfa
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IMF	Intensidad media de fluorescencia
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
kDa	Kilo Dalton
LEG	Lupus Eritematoso Generalizado
LEL	<i>Large Extracellular Loop</i>

miRISC	Complejo de silenciamiento inducido por el miRNA
miRNA	micro-RNA
MMF	Micofelonato de mofetilo
mRNA	RNA mensajero
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
NL	Nefropatía lúpica
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDCs	Células dendríticas plasmacitoides
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
SEL	<i>Small Extracellular Loop</i>
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TACI	<i>Transmembrane activator and CAML interactor</i>
TEMs	Microdominios enriquecidos en tetraspaninas
THP	Proteína Tamm-Horsfall
TLR	Receptor tipo Toll
TM	Dominios transmembranales
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tfh	Células T foliculares
Tregs	Células T reguladoras
VEs	Vesículas extracelulares

El presente trabajo de doctorado fue realizado en el laboratorio 19a del departamento de Biología Celular del CINVESTAV, así como en la Red de Apoyo a la Investigación, de la Coordinación de la investigación científica, UNAM, y en el Feinstein Institute for Medical Research; bajo la tutoría del Dr. José Manuel Hernández Hernández y del Dr. José Luis Maravillas Montero. Con el financiamiento de los proyectos CONAHCyT A3-S-36875 y PAPIIT-UNAM IN213020 y IA202318. Durante este periodo fui becaria del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCyT) CVU 706170, número de becario 587790.

-A mis directores de tesis, por permitirme estar en sus laboratorios, brindarme todo el apoyo necesario para la realización de esta tesis, sobre todo gracias por su paciencia al enseñarme y corregirme.

-A mis asesores Dr. Leopoldo Flores Romo†, Dr. Antony Boucard Jr., Dr. José de Jesús Serrano Luna, Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Dra. Diana Gómez Martín por brindarme su tiempo para dudas y seminarios, en la revisión de la tesis.

-A mis padres y hermano, por soportarme todo este camino y alentarme a seguir con mis sueños, ya que sin ellos no hubiera sido posible absolutamente nada.

-Al grupo de trabajo conformado por la Dra. Diana Gómez Martín y por el Dr. Jiram Torres, así como a todos sus estudiantes, por ayudarme con el reclutamiento de los pacientes, entender mejor a la enfermedad, como abordar el tema, y sus valiosos consejos.

-Al Dr. Guillermo Juárez Vega, Dr. David Meza Sánchez gracias por su valiosa ayuda y tiempo en el uso de los equipos de la RAI.

-A la Dra. Betty Diamond, así como a sus estudiantes, por haberme recibido por tres meses en su laboratorio y poder montar nuevas técnicas, tener nuevos enfoques para la investigación y sus grandes enseñanzas.

-A todos mis compañeros de los diferentes laboratorios en los que estuve: Ernesto, Mariana, Sandra, Víctor, Rodrigo, Daniel, Rafael, Laura, Ricardo, Juan, Izamar, Nestor, Alfredo, Abdiel, Fernando, Fabiola, Miguel, Omar, Adriana, Giovanni, Yemil, Ashley, Christina, Joseph, Minakshi, Rodrigo, y todos los que me faltan por nombrar. Gracias por acompañarme, aguantarme y ayudarme cuando lo he necesitado, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

-A Clarita Hernández, ya que sin su ayuda en todos los trámites esta tesis no hubiera sido posible.

-A los doctores del CINVESTAV, por todas las enseñanzas brindadas desde los cursos propedéuticos.

-A mis amigos que me han acompañado en todo momento y brindado su apoyo cuando más lo he necesitado.

Resumen

La nefropatía lúpica (NL) es una complicación del lupus eritematoso generalizado (LEG) en la que se presenta desde proteinuria leve asintomática hasta glomerulonefritis que progresa rápidamente a insuficiencia renal, afectando hasta el 60% de los pacientes que han sido diagnosticados con LEG dentro del primer año. La biopsia renal, utilizada para determinar clase específica y severidad de la NL, es un procedimiento invasivo, presenta riesgos y complicaciones renales severos como hematuria macroscópica, hematoma peri-renal, infección, daño a órganos adyacentes e incluso, en casos extremos pérdida renal y muerte. Una de las células clave en la patogenia de la NL, son las células B, ya que contribuyen de manera importante en la generación y exacerbación de la enfermedad dada por la producción de auto-anticuerpos, presentación de auto-antígenos, secreción de citocinas pro-inflamatorias y vesículas extracelulares. Actualmente se sabe que en varias enfermedades existe un aumento del número de vesículas extracelulares (VEs) en diferentes fluidos, como la orina. Por tanto, se pueden obtener biomarcadores para el pronóstico de la enfermedad. Así, en este trabajo se evaluó la presencia de VEs en orina en pacientes con NL activa, LEG con y sin actividad, y en individuos sanos. Las tetraspaninas (CD37, CD53, tetraspanina33) y ADAM10 se identificaron en VEs mediante citometría de flujo y miRNAs relacionados con células B mediante qPCR. Encontramos una mayor cantidad de VEs, así como de miRNAs en pacientes con NL activo, que en individuos sanos o en pacientes con LEG sin actividad. Además, algunas de estas variables correlacionan con los datos clínicos de enfermedad activa, por lo que se sugiere que se puedan utilizar como biomarcadores para el pronóstico de NL.

Abstract

Lupus nephritis (LN) is a complication of systemic lupus erythematosus (SLE); its clinical presentation ranges from asymptomatic mild proteinuria to glomerulonephritis that progresses rapidly to renal failure, affecting up to 60% of patients who have been diagnosed with SLE. Renal biopsy is useful to establish the specific class and severity of LN, but being an invasive procedure, it presents renal risks and complications such as macroscopic hematuria, peri-renal hematoma, infection, damage to adjacent organs and in severe cases renal loss and death. It is currently known that in several diseases there is an increase in the number of extracellular vesicles (EVs) in different fluids, such as urine. Therefore, biomarkers can be obtained to determine the disease prognosis. Thus, this work, evaluated of urine EVs (uEVs) in patients with active LN, SLE with and without activity, and in healthy individuals. Tetraspanins (CD37, CD53, tetraspanin33), and ADAM10 were identified by flow cytometry and B-cell-related miRNAs by qPCR. We found a greater amount of uEVs, as well as miRNAs in patients with active LN, than in healthy individuals or in patients with SLE without activity. In addition, some of these variables correlate with the clinical data of active disease, therefore, it is suggested that they can be used as biomarkers for the prognosis of LN.

Introducción

1 Introducción

1.1 Lupus Eritematoso Generalizado

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune, en la que se generan auto-anticuerpos, los cuales pueden afectar diversos tejidos entre los que destacan: articulaciones, piel, riñones, corazón, pulmones, vasos sanguíneos e inclusive, el cerebro. Dichas afecciones generan síntomas como eritema malar, úlceras orales y nasales, pérdida de cabello, fiebre, cefalea, pericarditis, pleuritis, artritis, hematuria, anemia, entre otros. Actualmente, se conoce que está enfermedad la padecen principalmente mujeres afroamericanas, hispanas, asiáticas e indígenas americanas, por lo cual, se le ha atribuido a la presencia del receptor de estrógeno 1 y a genes en el cromosoma X que regulan al sistema inmune (1).

1.1.1 Patogenia de LEG

El desarrollo del LEG comprende una serie de fases, entre las que se involucran: la pérdida de la tolerancia inmunológica adaptativa, la generación de linfocitos T y B efectores que reconocen auto-antígenos y/o que producen auto-anticuerpos, así como la falla en la regulación inmunológica y defectos en la inmunidad innata; principalmente en los mecanismos para eliminar restos de células muertas, repercutiendo en una mayor producción de auto-antígenos; inflamación y daño al tejido, Figura 1 (2).

Se ha propuesto que el paso inicial y primordial para el desarrollo del LEG es la pérdida de la tolerancia y la elevación de los niveles de auto-anticuerpos, incluyendo anti-dsDNA, anti-SSA (Ro), anti-SSB (La), anti-Sm y anti-RMPs (2,3).

Para que esta pérdida de la tolerancia se lleve a cabo se ha visto una disminución en la población de células T reguladoras (Tregs) y un

incremento en las células Th17, las cuales secretan tanto IL-17 como IL-21, en médula ósea. Al mismo tiempo existe un aumento en la concentración de BAFF, también conocido como BlyS o CD257, que se puede unir a tres receptores presentes en las células B: TACI, BCMA y BAFF-R. BAFF así como APRIL son secretadas por las células mieloides, afectando así la remoción de células B autoreactivas y promoviendo su supervivencia (4).

IL-17 e IL-21 generan la formación de centros germinales, y al haber una enorme cantidad de estas interleucinas favorecen el desbalance entre la población de células Treg, que se encuentran disminuidas, mientras que las células T foliculares cooperadoras (Tfh), se encuentran incrementadas (2,5). Es importante la presencia de IL-21 para la expansión de células B y su diferenciación hacia células plasmáticas (6). Otras interleucinas que participan en estos procesos son IL-4 e IL-5, secretadas por las células Th2, e IL-2 así como, IFN- γ que las secretan las células Th1. Estas interleucinas se han encontrado incrementadas en suero, hasta 3 años antes de que un individuo sea diagnosticado con LEG (7).

Existen fallas en los puntos de control para el desarrollo y diferenciación de las células B, principalmente entre los estadios de transicional- "naive" y defectos en la anergia de estas células "naive", lo que favorece la generación de células B autoreactivas. Además se conoce que la hipermutación somática participa activamente, ya que los autoanticuerpos están hipermutados y han cambiado de clase hacia IgG (2).

Una vez que se han generado auto-anticuerpos, estos reconocen a los antígenos, formándose complejos inmunes (CIs); debido a que hay defectos funcionales en los macrófagos (fagocitosis y opsonización) se impide la disposición final de los restos apoptóticos. Al mismo tiempo está incrementada la NETosis (secreción de trampas extracelulares por neutrófilos (NETs)) y contribuye a tener más auto-antígenos porque hay un desbalance entre la formación y degradación de NETs. Asimismo, la presencia de auto-anticuerpos y C1q, inhiben a la DNAsa I, responsable de la degradación de cromatina (2,8,9).

La presencia de CIs permite que las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) se activen mediante TLR7/9 y secreten IFN α ; generando una retroalimentación positiva para la producción de más NETs y de CIs. La producción de IFN α también genera que las células dendríticas convencionales se activen y presenten más antígenos a las células T, que producen BAFF para la diferenciación y supervivencia de células B autoreactivas (10).

La inflamación dada en los tejidos esta favorecida por el incremento de la NETosis, la presencia de pDCs que secretan IFN α , esta citocina genera que los monocitos se diferencien hacia macrófagos y células dendríticas convencionales. También al reclutar estas células se favorece el ambiente inflamatorio por la secreción de citocinas como IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-12, TNF (2).

Todos estos mecanismos en conjunto llevan a la generación del LEG, lo cual hace difícil el tratamiento. Además, existen diversas complicaciones a las cuales pueden estar sometidos los pacientes como la nefropatía lúpica (NL), una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad por LEG.

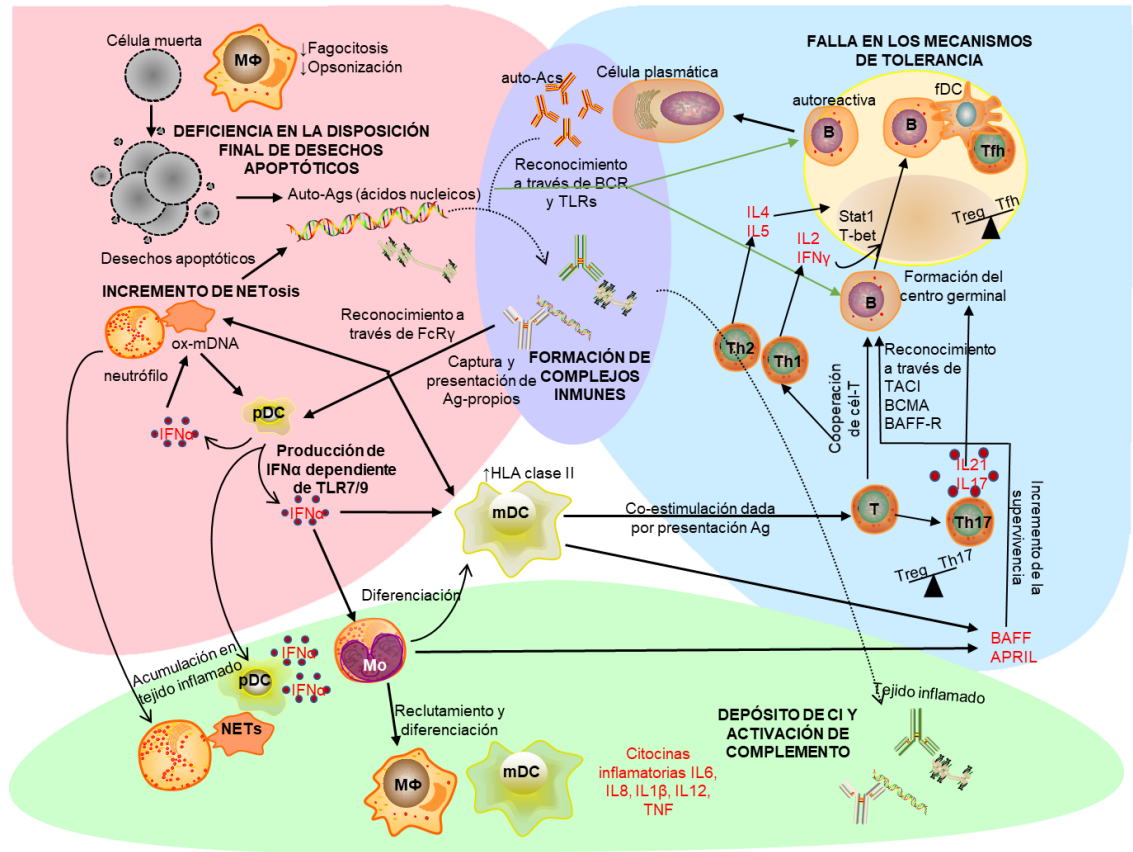


Figura 1 Patogenia de LEG.

El desarrollo del LEG ocurre principalmente por tres mecanismos interconectados. En azul, se representa la pérdida de la tolerancia inmune adaptativa. En rosa, los defectos en la inmunidad innata, y en verde, la inflamación y el daño a tejido. Modificado de Zharkova (2).

1.1.2 Diagnóstico de LEG

Para establecer el diagnóstico de la enfermedad se han decretado diversos criterios de clasificación dispuestos por American College of Rheumatology (ACR)/ European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) y Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus del Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC); conocidos y aceptados como índices de actividad, como el British Lupus Isles Assesment Group Index (BILAG), el Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (11).

El BILAG, actualizado en 2004, separa los signos y síntomas en 8 grupos correspondientes a los daños ocasionados en diversos órganos, haciéndolo muy complejo, ya que evalúa 86 parámetros en total; pero al

final se llega a 4 categorías dependiendo del puntaje obtenido: A (enfermedad grave) =12; B (enfermedad moderada) =8; C (enfermedad leve) = 1; y D (no actividad) (12).

El SLEDAI versión 2000 o SLEDAI-2K, es más sencillo de manejar al tener menos parámetros, permitiendo evaluar diversos signos y síntomas presentados en el mismo órgano, contiene 24 parámetros con puntuación de 1 a 8, que al sumarse se pueden generar tres índices de actividad: leve si es menor de 4, moderada de 4 a 8 y grave arriba de ocho ó hasta 105 (13).

1.2 Nefropatía lúpica

La nefropatía lúpica es una complicación del LEG, presenta desde proteinuria leve asintomática hasta glomerulonefritis que puede progresar rápidamente a insuficiencia renal, que afecta hasta el 60% de los pacientes que han sido diagnosticados dentro del primer año, siendo de muy mal pronóstico (14). Los hallazgos clínicos sugestivos de compromiso renal o también conocida como nefritis silente, son: sedimento urinario anormal, es decir que haya hematuria y cilindros celulares en este, proteinuria persistente, es decir, ≥ 0.5 gramos/día, elevación de creatinina sérica, C3 y C4 bajo, y anticuerpos anti-dsDNA elevados. Presencia de lesiones histológicas leves, pero en algunos casos existe la glomerulonefritis proliferativa difusa, de mal pronóstico, caracterizada por lesiones más severas (15,16).

De acuerdo a los criterios del Colegio Americano de Reumatología, la enfermedad renal se establece si hay proteinuria persistente (≥ 0.5 g/día o $\geq +++$) o cilindros: de eritrocitos, de hemoglobina, granulosos, tubulares o mixtos.

Otro índice de actividad es SLEDAI, la presencia de actividad renal se define como cualquiera de los siguientes puntos:

1. Cilindros urinarios (presencia de cilindros hemáticos o granulosos)
2. Hematuria (> 5 eritrocitos/campo en examen general de orina)
3. Piuria (>5 leucocitos/campo en examen general de orina)

4. Proteinuria (>5g/24h de reciente comienzo o aumento de la proteinuria ya conocida en más de 0.5g/24h).

1.2.1 Epidemiología

El Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus (GLADEL), reporta que la enfermedad renal es significativamente menos frecuente en blancos, siendo los mestizos y afro-latinoamericanos los más afectados, llegándose a presentar hasta en el 70% de estos. La falla renal aguda o crónica y la hipertensión arterial es menos frecuente en blancos. Los afroamericanos y latinoamericanos son más propensos que la población blanca a desarrollar síndrome nefrótico (17).

1.3 Biopsia renal

Desde hace más de 50 se ha utilizado la biopsia renal como procedimiento diagnóstico, ya que provee información directa de cambios morfológicos del parénquima renal ocasionados por diferentes patologías nefrológicas, permitiendo obtener los datos necesarios para llegar al tratamiento específico y conseguir un buen pronóstico. A pesar de esto, existen riesgos como hematuria macroscópica 35%, hematoma peri-renal 65% e incluso, en casos muy raros, pérdida renal <0.1% (18).

La biopsia renal se emplea para determinar la clase específica y la severidad de la NL. Algunas indicaciones en pacientes con LEG y sospecha de NL son, la presencia de eritrocitos dismórficos, es decir una hematuria inexplicable; el hallazgo de cilindros celulares, así como proteinuria > 0.5 gramos al día; y una disminución en la función renal.

El papel de la biopsia renal en la nefropatía del LEG ha sido y sigue siendo muy controvertido. No sólo se plantea la discusión sobre si debe o no realizarse, sino en qué momento de la evolución de la enfermedad, qué aspectos del resultado de una biopsia son relevantes, qué información cabe

esperar en cuanto a evolución y pronóstico de la nefropatía y del propio LEG, e incluso si debe o no repetirse la biopsia y cuándo. Estas controversias no existirían si para establecer el diagnóstico de LEG o el de NL fuera imprescindible la realización de una biopsia; sin embargo, no es ese el caso, puesto que esos diagnósticos pueden establecerse en la mayoría de los casos sobre datos clínicos y serológicos, contrariamente a lo que ocurre en otras enfermedades, como las vasculitis, en las que la confirmación histológica es imprescindible. La controversia existe porque lo que se persigue al realizar una biopsia en un paciente con LEG es fundamentalmente establecer un pronóstico e, indirectamente, contar con una guía que dirija y optimice la utilización de corticosteroides e inmunosupresores, puesto que los casos con peor pronóstico serán tratados más enérgica y prolongadamente que los más leves (19–24).

1.3.1 Patrones de lesión glomerular

Se reconoce que uno de los principales elementos patogénicos en la NL es la deposición de complejos inmunes en el tejido renal. Esta deposición generada por factores como la especificidad antigénica, capacidad de fijar y activar el complemento y otras proteasas serinas, y la capacidad de desencadenar una respuesta celular inflamatoria, da ciertos patrones de lesión glomerular, dividiéndose en tres grupos:

1. Patrón mesangial: como lo indica el nombre es una acumulación de CI en el mesangio, dando origen a una hiper celularidad mesangial como acúmulo de matriz. Característico en la nefropatía por IgA o en la NL mesangial proliferativa.

2. Patrón endotelial: caracterizado por acumulación de glóbulos blancos, lesión de endotelial y una proliferación endocapilar. Existe una destrucción de la pared capilar, depósitos de complejos inmunes grandes o moderados, grados variables de proliferación mesangial y formación de medias lunas.

Característico en glomerulonefritis post-infecciosa, enfermedad anti-membrana basal glomerular y en la glomerulonefritis lúpica proliferativa endocapilar, así como en la hipertensión maligna, microangiopatía trombótica inducida por toxinas bacterianas y eventos trombóticos en el síndrome antifosfolípidos asociado al LEG.

3. Patrón epitelial: daño al podocito por anticuerpos y complemento, ocasionando lesiones no proliferativas y no exudativas de la pared capilar, característico de NL membranosa o glomerulonefritis membranosa idiopática (22,25).

1.4 Clasificación de la NL

En la NL se puede observar lesión en el glomérulo, los vasos, los túbulos y el intersticio. Los hallazgos más frecuentes y que definen los seis diferentes tipos histo-patológicos de NL, definidos por la Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad de Patología Renal en 2003, son los que afectan al glomérulo y que se definen a continuación, Figura 2:

- NL clase I: existe acumulación de CI en el mesangio puesto de manifiesto por inmunofluorescencia, o por microscopía electrónica, por microscopía de luz no se hallan alteraciones. Se denomina NL mesangial mínima.

- NL clase II: presenta hiper celularidad mesangial y depósito de CI. A veces puede haber escasos y pequeños CI en la pared capilar. Se denomina NL mesangial proliferativa.

- NL clase III: existen lesiones proliferativas endocapilares segmentarias o cicatrices glomerulares inactivas, con o sin necrosis de la pared capilar y presencia de medias lunas, así como CI con distribución segmentaria en el subendotelio, afectando menos del 50% del glomérulo,

también puede haber una proliferación mesangial con depósito de CI en esta zona.

- NL clase IV: lesiones difusas, es decir, pueden respetar al menos la mitad del penacho glomerular, o afectar más de la mitad de este. Se puede presentar lesiones segmentarias en más del 50% de glomérulo o ser lesiones globales difusas (clase IV-S). Cuando hay proliferación mesangiocapilar, extracapilar, endocapilar global y difusa o asas de alambre difusas se le conoce como clase IV-G.

- NL clase V: complejos inmunes depositados en subepitelio y de manera granular, global o segmentario. Además, puede haber cualquier grado de hiper celularidad mesangial o depósitos subendoteliales, siendo una NL combinada. Se denomina NL membranosa.

- NL Clase VI: presencia de glomeruloesclerosis global al 90% o puede ser mayor a este porcentaje; asimismo puede ser un estadio avanzado de las clases III, IV o V (18,22,25).

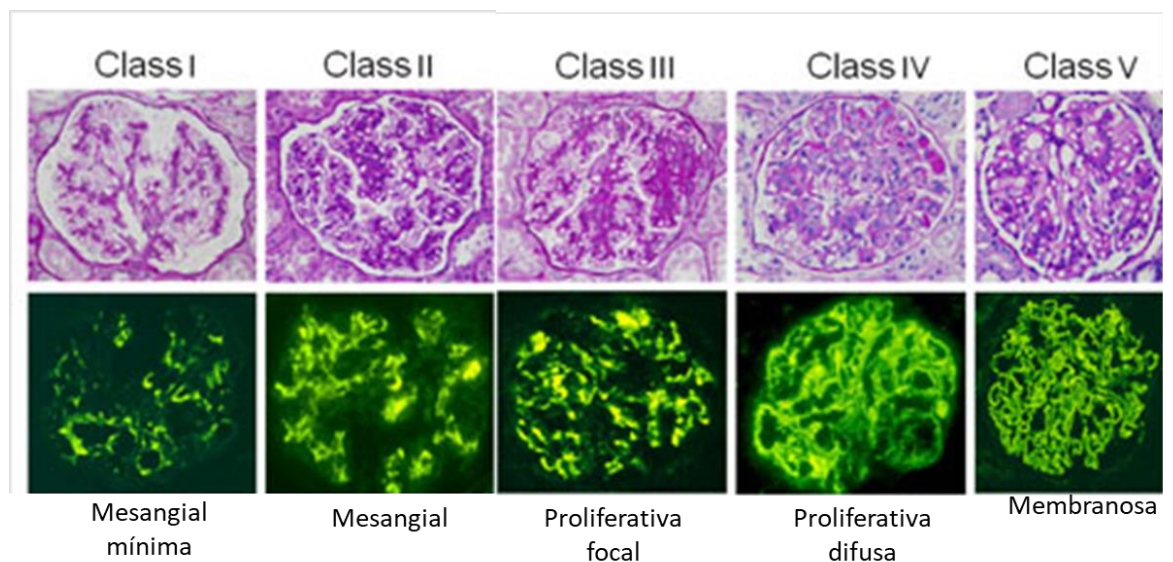


Figura 2 Clasificación de NL.

Existen 6 clases de nefropatía lúpica, se muestran las 5 mejor caracterizadas. Los paneles superiores corresponden a tinciones de hematoxilina-eosina vistos por microscopia de luz. Los paneles inferiores muestran por inmunofluorescencia la presencia de complejos inmunes. Modificado de (25).

1.5 Patogenia de NL

La acumulación de complejos inmunes en los riñones, principalmente dentro de los glomérulos, es el primer paso para el desarrollo de NL en los pacientes con LEG, ya que derivado de los CI se presenta inflamación y daño en los riñones, Figura 3 (26,27).

Se han realizado diversos estudios en ratones para demostrar el papel fundamental de las células plasmáticas y de las células B en la generación de NL; Cheng y colaboradores inyectaron a un ratón deficiente en células plasmáticas y células B, células plasmáticas de un ratón con lupus, las cuales migraron hacia el bazo y médula ósea y a las 21 semanas se encontraron complejos inmunes en los riñones (28). En otro estudio se identificaron células plasmáticas auto-reactivas en los riñones (la mayor cantidad de estas en la médula del riñón), de ratones propensos a desarrollar NL, así como en pacientes con diversos grados de NL (29).

Estas evidencias nos indican que estas células son responsables de la NL, razón por la cual se usa ciclofosfamida, un inmunosupresor para controlar a esta población de células, pero presenta alta toxicidad. Cabe mencionar que las moléculas de señalización participan activamente en la generación de estas clonas auto-reactivas, lo que demostró Ripoll *et al.* en 2013 al usar un siRNA para CD40, disminuyó el grado de NL en los ratones tratados (30). También se ha reportado en humanos que la presencia de BAFF y células B en el intersticio de los riñones, correlaciona con proteinuria, niveles altos de BUN y creatinina en el suero (31). Es importante mencionar, que estas no son las únicas células presentes, normalmente se encuentran acompañadas de células T y dendríticas, formando estructuras donde los linfocitos B se dividen activamente y experimentan hipermutación somática generando ocasionalmente centros germinales ectópicos (27). Dichas estructuras, además de explicar la producción y acumulación *in situ* de auto-anticuerpos y complejos inmunes,

son fuente de otros elementos producidos por células B, entre los que se hallan las vesículas extracelulares.

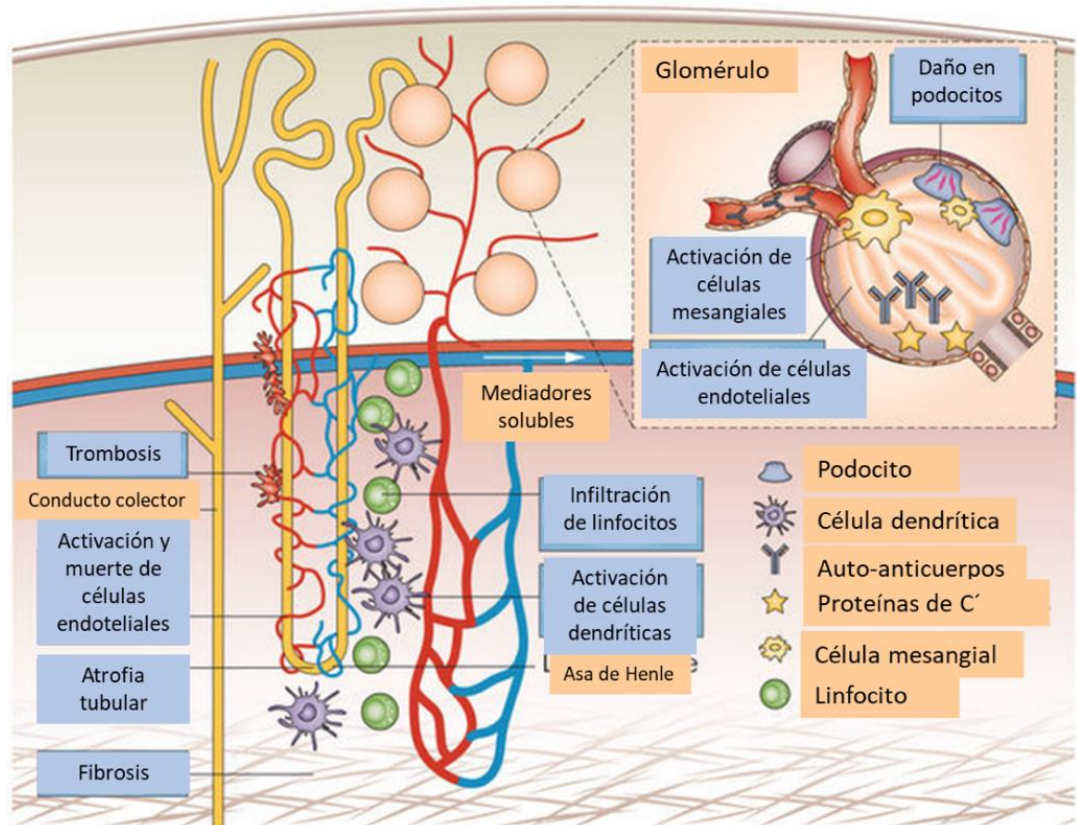


Figura 3 Patogenia de NL.

La enfermedad empieza con la acumulación de complejos inmunes y complemento en el glomérulo, activación de células renales. Se reclutan células inflamatorias, las cuales producen citocinas pro-inflamatorias, y activan a las células epiteliales. El daño en los podocitos causa proteinuria. La inflamación genera atrofia tubular, fibrosis. Modificado de (32).

1.6 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VEs), son fragmentos de membrana liberados por casi cualquier tipo celular. Las vesículas están rodeadas por una bicapa lipídica similar a la de la célula que le dio origen, y pueden contener diversas moléculas como citocinas, receptores, ligandos, DNA, mRNA, miRNA, lípidos. De manera particular se dividen en microvesículas con diámetro de 100 a 1000nm y en exosomas con diámetro entre 40 – 100nm, Figura 4 (33,34).

Se reconoce que las células B activadas son excelentes productoras de exosomas (35). Como se observa en la Figura 5 (panel superior) se generan a través del sistema endosomal, cuerpos multivesiculares (MVB o MVE), secretados hacia el espacio extracelular. Están compuestos de una doble membrana de lípidos, rica en colesterol, ceramidas, y fosfatidilserina distribuidos entre la membrana externa e interna. Los exosomas presentan características de membrana y proteínas citosólicas de la célula de la que les dio origen. También encapsulan mRNAs y algunos tipos de miRNAs, pudiendo ser transferidos de célula a célula modulando el transcriptoma de la célula receptora, (Figura 5, panel inferior). Los exosomas llevan a cabo múltiples funciones sobre la fisiología normal y patológica en diversos procesos. Es importante mencionar que estas VEs han sido aisladas de prácticamente de todos los fluidos corporales, por lo que representan un elemento de fácil aislamiento y una fuente importante de diversas biomoléculas con múltiples usos potenciales, incluidos los de biomarcador de algunas patologías (33,34).

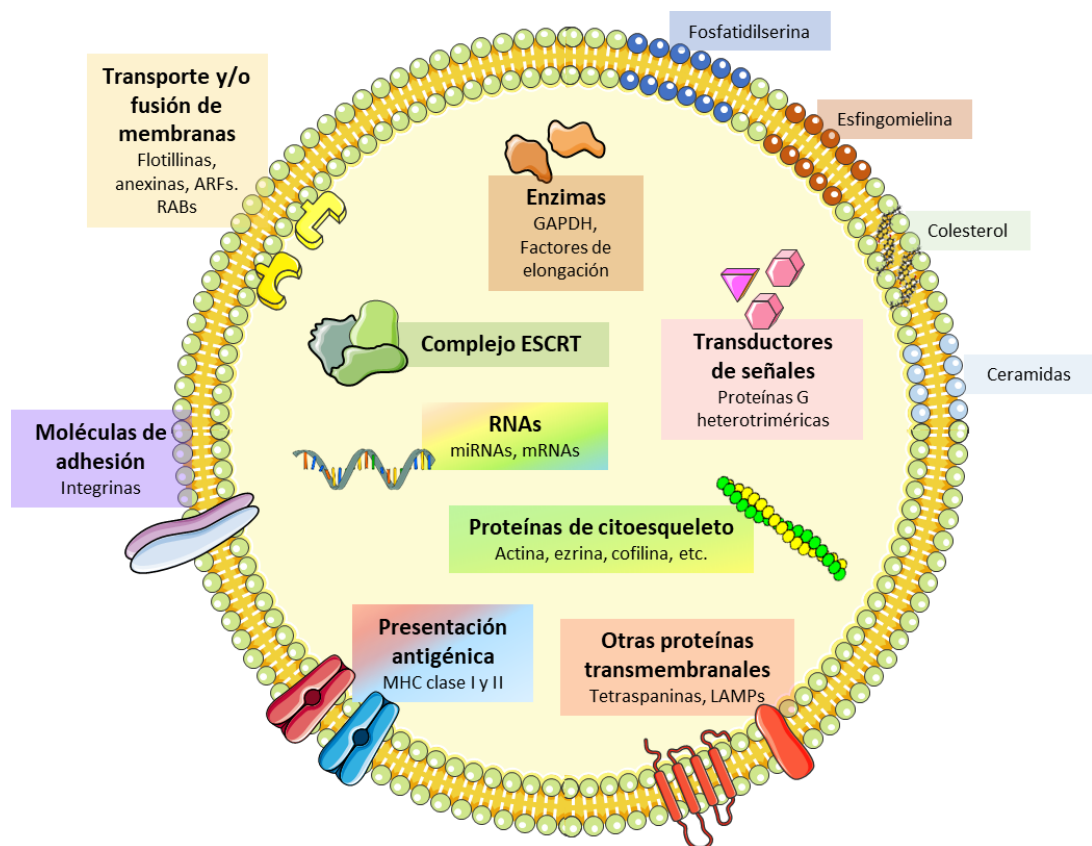


Figura 4 Vesícula extracelular.

Las vesículas extracelulares pueden contener diferente cargo. En la imagen se muestran algunas moléculas presentes entre las que se encuentran las moléculas de adhesión,

proteínas de citoesqueleto, presentación antigénica, transporte y/o fusión de membranas, enzimas, etc. Tomado de (Martínez-Cortés & Maravillas-Montero, 2017).

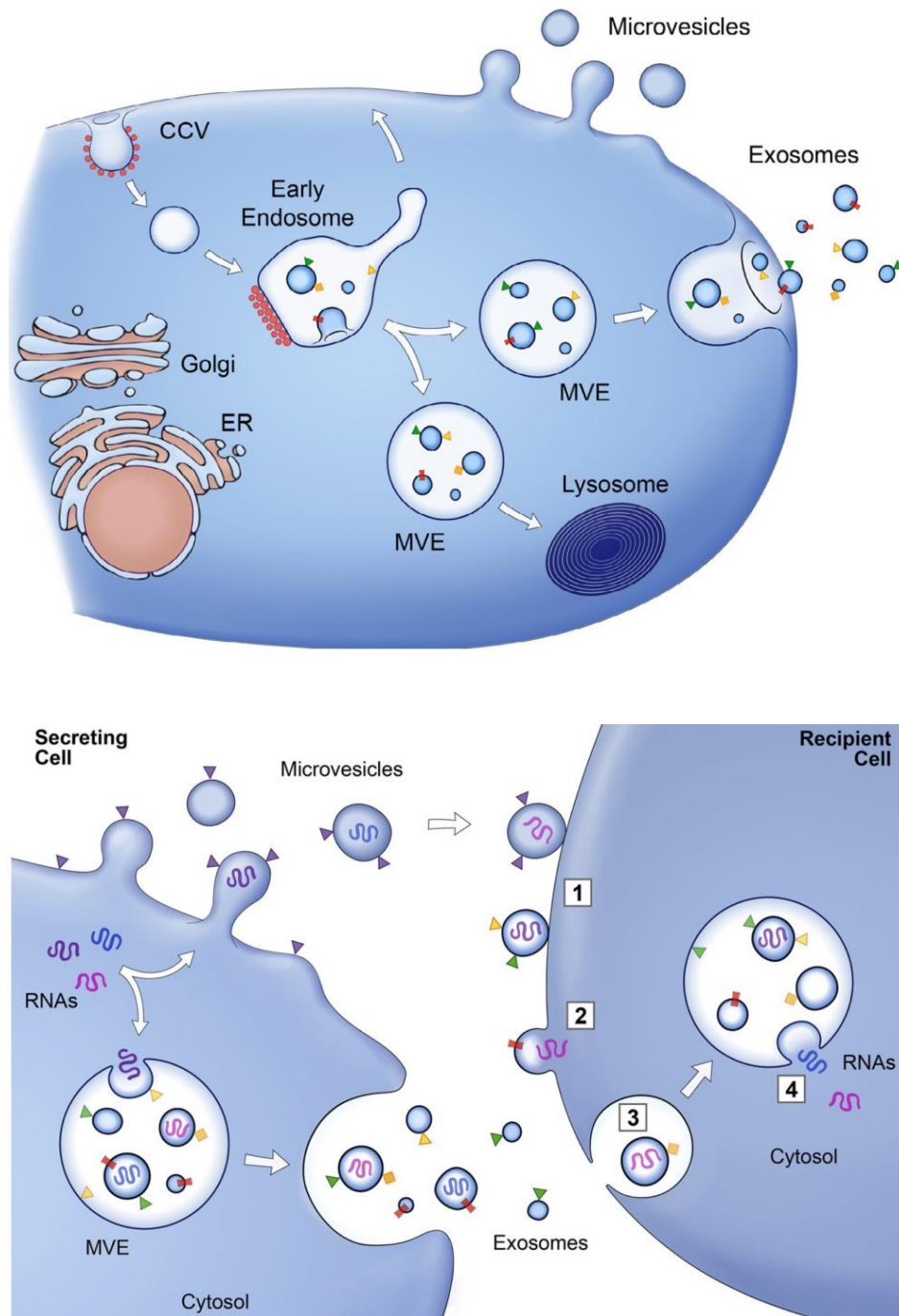


Figura 5 Generación de VEs.

Panel superior. Las microvesículas se originan a partir de ruptura de la membrana plasmática; los exosomas a partir de los cuerpos multivesiculares. **Entrega de proteínas y RNA.** Panel inferior. Se incorpora de manera selectiva a las proteínas asociadas a membrana (Δ), proteínas transmembranales (\blacksquare) y RNAs (\mathcal{S}) ya sea en las vesículas intraluminales de los cuerpos vesiculares que liberarán a los exosomas; o en las microvesículas. Estas VEs serán reconocidas por la célula blanco (1), se fusionarán a la célula blanco (2), o serán endocitadas (3). Las vesículas endocitadas se pueden fusionar

a la membrana de un compartimento endocítico (4). Resultando en la entrega de proteínas o RNA a la célula blanco. Modificado de (34).

1.6.1 Vesículas extracelulares en riñón

Actualmente se conoce que en la orina se pueden aislar vesículas extracelulares, provenientes principalmente de los podocitos, de células: progenitoras renales, del túbulo contorneado proximal y distal, del asa de Henle ascendente, de conductos colectores en condiciones normales, y al existir patologías estas vesículas extracelulares pueden provenir del infiltrado de linfocitos, entre ellos, los linfocitos B (36–38).

Tal como se observa en la Figura 6, las vesículas extracelulares pueden ser generadas por las células que ya se han comentado y ser secretadas en la orina, pero antes de que lleguen a la orina pueden llevar a cabo diversas funciones. Entre ellas, la señalización entre los distintos compartimentos del sistema urinario, ya que pueden ser captadas por las distintas células presentes en los epitelios, por la expresión de CD24 y la presencia de cilios en las células. Una vez captadas, las vesículas extracelulares pueden regular la respuesta del sistema inmune, a través de su contenido de moléculas bactericidas o anti-inflamatorias; controlar el transporte de iones y agua. Finalmente las vesículas extracelulares colaboran en la eliminación de desechos celulares, al ser secretadas en la orina (36–38).

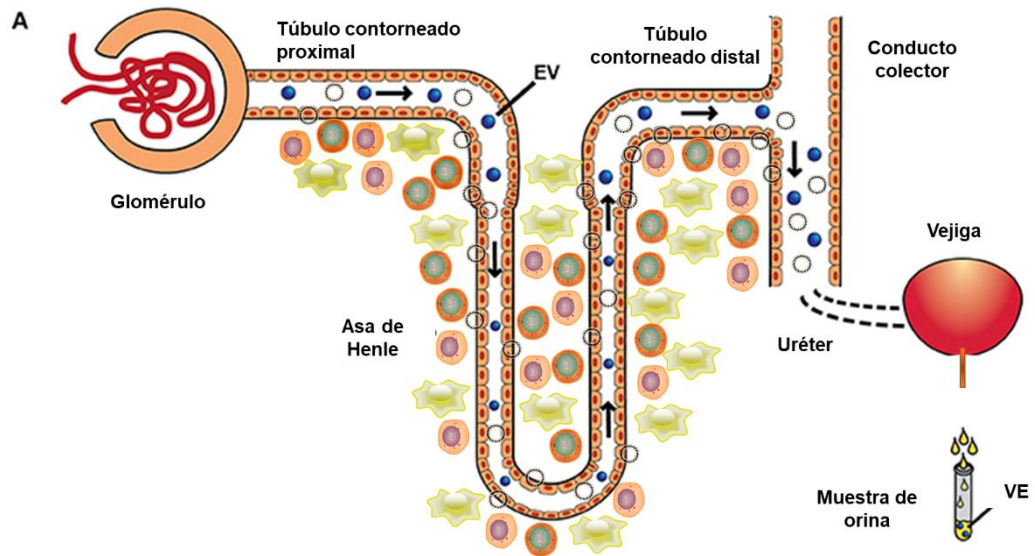


Figura 6 Secreción de VEs

Todos los tipos celulares presentes en el riñón pueden secretar vesículas extracelulares. Y estas pueden ser captadas por las células río abajo, e influir en su comportamiento celular. Además, pueden llegar a otros órganos, como los uréteres, vejiga, próstata, y uretra. Finalmente llegar a la orina. Además, al existir infiltrado de leucocitos, en condiciones patológicas, también contribuyen a la presencia de vesículas extracelulares en la orina. Modificado de (36).

1.7 Tetraspanina 33

Las tetraspaninas son proteínas que forman parte de una familia de 33 miembros reportada en ratón y humano. Se encuentran principalmente en la membrana plasmática, y en algunas membranas de organelos, e inclusive participan activamente en la biogénesis de exosomas (39–43).

Estas proteínas presentan cuatro dominios transmembranales (TM), figura 7, entre los dominios 1 y 2 está el asa extracelular corta (small extracellular loop o SEL, por sus siglas en inglés), y entre los dominios 3 y 4 el asa extracelular larga (large extracellular loop o LEL, por sus siglas en inglés), en esta asa se localiza el motivo CCG característico de esta familia. Tanto el extremo carboxilo y amino son intracelulares, así como existe igualmente un asa intracelular (39,44). También se muestra el sitio de unión al colesterol, ya que Zimmerman *et al* reporta este sitio en la tetraspanina CD81, estableciendo además que las tetraspaninas presentan dos estados conformacionales: abierto y cerrado, regulados por la presencia o ausencia del colesterol (45).

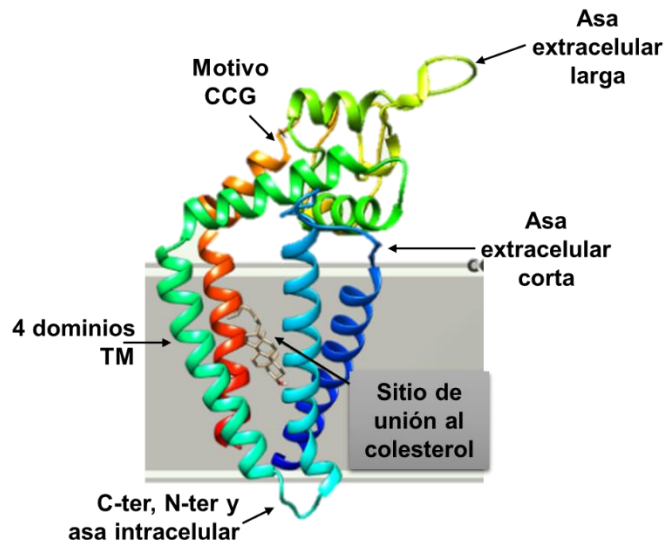


Figura 7 Estructura de la TSPAN33.

La TSPAN33 está compuesta por 4 dominios transmembranales (TM) los cuales contienen residuos conservados. TM1 y TM2 flanquean al asa extracelular corta, TM3 y TM4 flanquean al asa extracelular larga. En el asa extracelular larga se encuentra el motivo CCG conservado en todas las tetraspaninas. También se representa el sitio de unión al colesterol, así como el carboxilo y amino terminal y el asa intracelular. Tomado de Acevedo-Ochoa Ernesto, 2017.

Actualmente se conoce que las tetraspaninas pueden interactuar con otras tetraspaninas e inclusive con otras proteínas, formando lo que se conoce como, microdominios enriquecidos en tetraspaninas (TEMs) (46).

La tetraspanina 33 (TSPAN33) es la última tetraspanina caracterizada en mamíferos y la información sobre las proteínas a las que puede asociarse y sus funciones son aún muy escasas. El gen que codifica para esta proteína fue identificado por la expresión diferencial en eritroblastos y se ubica en una región del cromosoma 7 cuya eliminación ha sido asociada a la generación de síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda (47,48). En un modelo murino deficiente de la proteína, se observó una serie de defectos como: esplenomegalia marcada, glóbulos rojos macrocíticos basofílicos en sangre y otros tejidos, tumoraciones hepáticas con eritropoyesis extra medular y desarrollo de anemia severa durante el crecimiento (48). También se reportó disminución de las poblaciones leucocitarias del bazo de estos ratones, $IgM^+/CD19^+$ (células B) pero no explican este fenómeno. Debido a lo anterior, en 2013 Van Luu y colaboradores caracterizaron la expresión de TSPAN33 en células B

humanas y encontraron la expresión de la proteína después de la activación (49). Además en un estudio reciente caracterizaron la expresión de la proteína en células B de individuos sanos, tras la activación y en diferentes estadios de maduración, encontrándose aumentada y presente en las células B transicionales y de memoria (50). Como ya se ha mencionado las células B juegan un papel importante en la patogenia de LEG, Luu y colaboradores buscaron la expresión relativa de la TSPAN33 en esta enfermedad, encontrando una mayor expresión, asimismo encontraron la tetraspanina en células del riñón de individuo sanos, en túbulo contorneado proximal, distal y colectores (49). La TSPAN33 pertenece a la subfamilia de tetraspaninas C8, la cual incluye a las tetraspaninas 5, 10, 14, 15, 17 y 33. Dicho grupo se caracteriza por tener 8 residuos de cisteínas en el LEL y por su capacidad de unirse directamente a ADAM10, una proteasa con un gran número de sustratos entre los cuales se incluye: el precursor de proteína amiloidea, moléculas inflamatorias (IL-6, TNF- α) (51–54). Además, resultados de nuestro grupo de trabajo, demuestran que al sobre expresar a la TSPAN33 en la línea celular Raji se incrementa la secreción de vesículas extracelulares y esta tetraspanina se encuentra dentro del cargo. Por esto se espera encontrar a la TSPAN33 en el cargo de las vesículas extracelulares, que correlacione con la nefropatía lúpica, y que el cargo pueda proceder de células de los túbulos renales o de las células B, pero no son las únicas moléculas que se buscarán.

1.7 miRNAs

Los miRNAs son RNAs no codificantes de 17-24 nucleótidos, codificados por genes nucleares de 70-150 nucleótidos, pueden silenciar genes, uniéndose a la región 3'UTR o al marco abierto de lectura (ORF) de su mRNA blanco, provocando su degradación o inhibición transcripcional. Se han aislado de saliva, orina, líquido amniótico, leche materna y sangre (55). Los miRNA pueden ser empaquetados en vesículas extracelulares, Figura 8, en lipoproteínas de alta densidad o unirse a la proteína AGO2 presente fuera de las vesículas. Actualmente se conoce que participan en

proliferación, diferenciación, migración, inicio y progresión de enfermedades (56).

Goldie *et al.* demostró que los miRNAs se encuentran más enriquecidos en los exosomas que en las células parentales (57).

La generación de los miRNAs, inicia en el núcleo (Figura 8). La RNA Pol II realiza la transcripción de los genes para miRNA, formando pri-miRNAs, después el complejo Drosha rompe al pri-miRNA generando al pre-miRNA y este será llevado hacia el citoplasma por la exportina 5. Una vez ahí el complejo Dicer genera un intermediario miRNA de doble hebra, una de estas se incorpora en el complejo silenciador inducido por RNA (RISC) para formar un miRNA maduro, el cual impedirá la transcripción de su mRNA blanco. Durante el proceso de generación de exosomas, se incorporan miRNAs maduros, algunos pre-miRNAs y otras moléculas como RNA, proteínas y lípidos; dentro de los exosomas los pre-miRNAs presentes pueden ser procesados para obtener miRNAs maduros (58).

Para que se lleve a cabo la entrada de los miRNAs a los exosomas, se han planteado cuatro posibles mecanismos: 1) A través de la vía dependiente de esfingomielinasa neutra 2 (nSMase2), ya que al sobreexpresarla se incrementa la cantidad de miRNAs y al inhibirla se reduce el número de miRNAs (59); 2) por la vía dependiente de hnRNPs, al sumoizarse hnRNPA2B1 se reconoce el motivo GGAG en la porción 3' de los miRNAs y esto genera que sean empaquetados en los exosomas (60); 3) a través de la vía dependiente de secuencia del extremo 3' del miRNA, ya que se encontró que los miRNAs con el extremo 3' uridinilados se empaquetaban en los exosomas secretados de células B o en la orina, mientras que los miRNAs con el extremo 3' adenilados están en las células B (60). 4) por la vía del complejo de silenciamiento inducido por el miRNA (miRISC), se ha reportado que el miRNA maduro puede interactuar con las proteínas del complejo miRISC: mRNA blanco, GW182, y AGO2, siendo esta última la

responsable de la unión del miRNA con su mRNA blanco, ya que se une preferentemente a U o A del extremo 5' terminal del miRNA (61).

Actualmente se sabe que a través de los exosomas se transfieren miRNAs hacia otras células, y estos pueden llevar a cabo diversas funciones en las células receptoras, de ahí su importancia para estudiarlas (56).

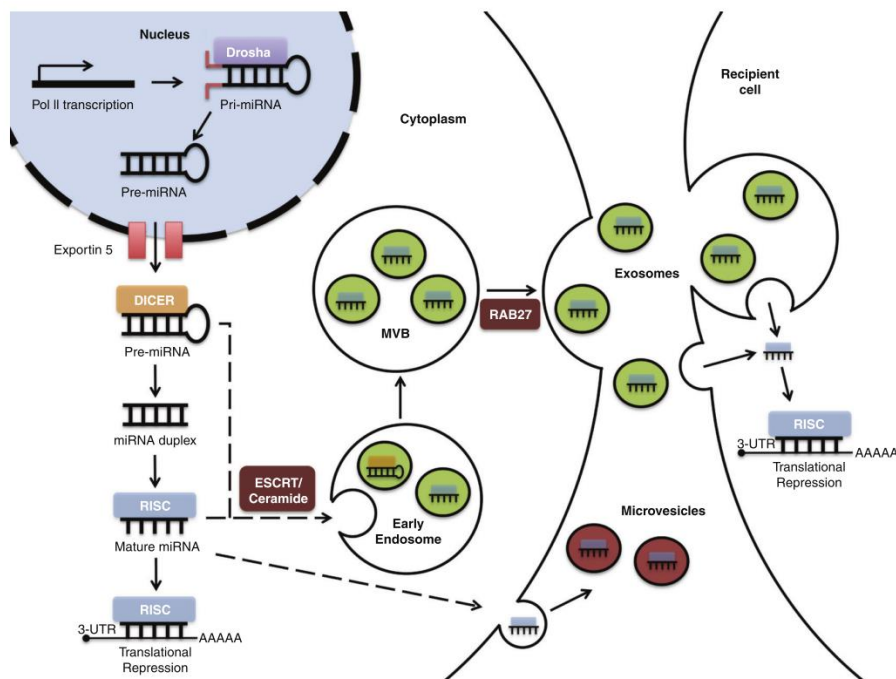


Figura 8 Biogénesis de miRNA y su entrada a las VEs.

Los genes para miRNA se transcriben por la RNA Pol II, formando pri-miRNAs en el núcleo. El complejo Drosha rompe al pri-miRNA generando al pre-miRNA, que es transportado hacia el citoplasma por la exportina 5. Después el complejo Dicer genera un intermediario miRNA de doble hebra, una hebra se incorpora en el complejo RISC para formar un miRNA maduro, el cual impedirá la transcripción de su mRNA blanco. Durante el proceso de generación de VEs, se incorporan miRNAs maduros, algunos pre-miRNAs y otras moléculas como RNA, proteínas y lípidos. Modificado de (58).

1.7.1 miRNAs y LEG

El primero en reportar que los miRNAs participan en el desarrollo del LEG fue Dai *et al*, al utilizar células periféricas mononucleares (CMNs), encontró disminuidos a los miRNAs miR-196a, miR-17_5p, miR-409_3p y sobreexpresados a los miRNAs miR-21, miR-142_3p, miR-342, miR-299_3p, miR-198, miR-298 (62). Asimismo, al buscar en biopsias renales de pacientes chinos con LEG y NL de clase II encontró diversos miRNAs sobreexpresados y disminuidos, tal como se muestra en la tabla (63).

Tabla 1 miRNAs sobreexpresados y disminuidos en biopsias renales NL II provenientes de pacientes chinos.

miRNAs sobreexpresados	miRNAs disminuidos
miR-518c, miR-23a, miR-638, miR-198, miR-583, miR-200c, miR-612, miR-516-5p, miR-142-5p, miR-320, miR-657, miR-184, miR-197_MM2, miR-134, miR-494, miR-513, miR-575, miR-658, miR-600, miR-433, miR-185, miR-324-5p, miR-325_MM2, miR-662, miR-208, miR-130b, miR-30a-5p, miR-601, miR-622, miR-608, miR-195, miR-124a, miR-15b_MM1	miR-296, miR-150_MM1, miR-365, miR-324-3p, miR-518b, miR-346, miR-637, miR-133a_MM1, miR-557, miR-615, miR-345_MM1, miR-642, miR-654, miR-484, miR-99a, miR-223, miR-611, miR-30d, miR-500, miR-663, miR-423, miR-381_MM1, miR-602, miR-210, miR-596, miR-486, miR-769-3p, miR-629, miR-92b_MM2, miR-150

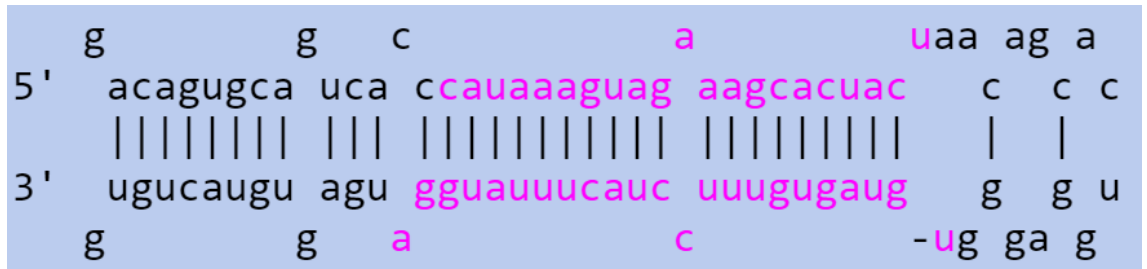
Como se puede observar se han encontrado una gran cantidad de miRNAs en estos pacientes, así que se ha continuado con la búsqueda de estas moléculas en diversas etnias. Por otro lado, Te *et al.*, busco en PBMCs y en líneas de células B generadas a partir de pacientes américo-africanos y euro-americanos con LEG y NL e identificó 5 miRNAs: miR-371-5P, miR-423-5P, miR-638, miR-1224-3P, miR-663 (64). En otro estudio chino, encontraron disminuidos a los miRNAs miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429, miR-205 y miR-192 en el suero e igualmente disminuidos en orina a miR-200a, miR-200c, miR-141, miR-429 y miR-192 (65), pero en otro estudio, al analizar orina de pacientes estadounidenses con daño en riñón encontraron incrementados a los miR-21 y miR-155 (66).

Con la cantidad de datos generados en estudios previos, es fácil perderse en cuál o cuáles de todos los miRNAs podrían servir como biomarcadores. Además todos estos estudios se han realizado a partir de muestras invasivas para el paciente, razón por la cual Perez-Hernandez *et al* determinaron miRNAs presentes en exosomas aislados de orina de pacientes españoles con LEG y NL. Buscando miR-302d, miR-335 en orina y cuando hay daño en riñones, se encontraron a miR-200c y miR146 aumentados en los exosomas provenientes de los pacientes con NL activa (67).

Como se ha mencionado anteriormente las células B juegan un papel importante en el desarrollo del LEG y NL, y por esta razón es importante estudiar en VEs provenientes de éstas células la presencia de miRNAs. Por lo anterior, se propuso estudiar a los miRNAs, miR-142-5p, miR-146a-5p, miR-148a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-21-5p (68).

1.7.1.1 miR-142

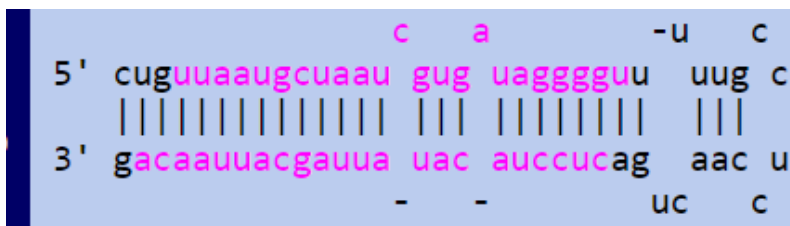
Es uno de los miRNAs implicados en la hematopoyesis de linfocitos, reportado en modelos de ratón, indispensable para el desarrollo de células B, ya que controla la expresión de BAFF-R (69). Asimismo, se la ha vinculado a procesos de migración y proliferación células renales (70).



http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000458

1.7.1.2 miR-155

Este miRNA regula la función y desarrollo de las células B (71), se ha encontrado incrementado en células mononucleares de pacientes con LEG, de manera particular en células B (72). También en el sedimento urinario se encontró sobreexpresado (73)

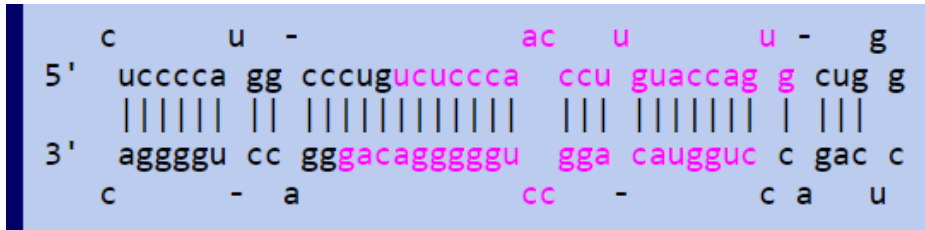


http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000681

1.7.1.3 miR-150

miR-150 está implicado en el desarrollo y diferenciación de células B, en células mononucleares de pacientes con LEG este miRNA se encuentra disminuido (72). Al buscar el miRNA en biopsias renales de pacientes con NL, existe correlación positiva entre cronicidad de NL con aumento del miRNA, presente en las células mesangiales y del túbulo contorneado

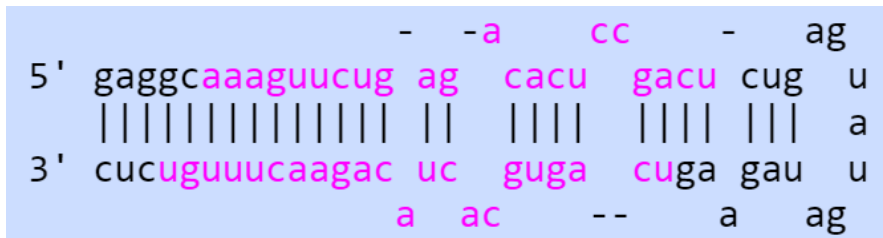
proximal (74). Además, se ha visto que el miRNA se encuentra enriquecido en exosomas (56).



http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000479

1.7.1.4 miR-148a

Este miRNA en particular regula a DNA metiltransferasa 3b (DNMT3b) (75), que podría estar involucrada en las modificaciones epigenéticas del LEG, ya que hay hipometilaciones en el DNA (74). Además, se conoce que el miRNA es un potente regulador de la tolerancia de células B, porque su presencia genera la supervivencia de células B inmaduras, al protegerlas de la apoptosis (76). Por lo cual al encontrarse elevado correlacionaría con la enfermedad activa y posiblemente con NL.

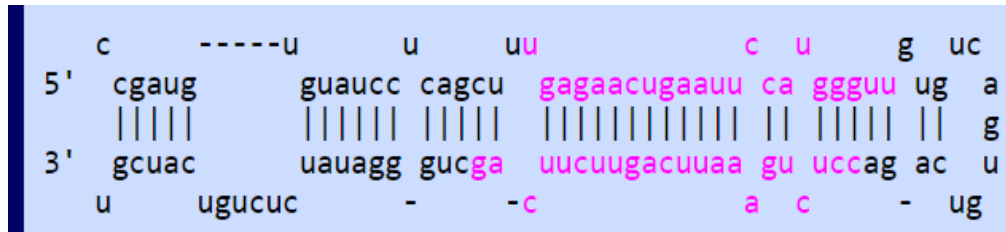


http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000253

1.7.1.5 miR-146a

Este miRNA considerado un regulador de la inmunidad innata, ya que regula de manera negativa la vía de IFN, ha sido reportado que se encuentra disminuido en algunos estudios realizados en células mononucleares de pacientes con LEG y que correlaciona de manera negativa con la actividad de la enfermedad (77); pero no siempre se han

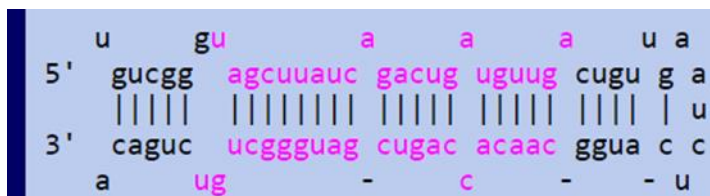
encontrado estas diferencias (64). Aunque al buscar a este miRNA en sedimento urinario y en exosomas urinarios, está sobreexpresado y correlaciona con el filtrado glomerular, es decir, con LEG y NL (67,73,78). Se sobre expresa al estimular a células humanas inmunes, CD3, CD4 y CD8 (79).



http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000477

1.7.1.6 miR-21

Este miRNA se ha visto sobreexpresado en células B y T de ratones con lupus, además regula a PDCD4 implicada en diferenciación, ciclo celular y apoptosis de las células B (68,71).



http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000077

1.8 Justificación

Como se ha descrito anteriormente, la nefropatía lúpica es una de las complicaciones en el LEG con mal pronóstico, debido a que hasta el 70% de los casos progresan a un estado de enfermedad renal crónica, afectando a hombres y mujeres en edad reproductiva. En vista de la dificultad para predecir el daño renal clínicamente o usando parámetros del laboratorio, además del riesgo e invasividad inherente a la toma de biopsias, la búsqueda de biomarcadores pronósticos útiles para NL resulta de gran interés e impacto en el manejo de estos pacientes. El perfil de biomarcador de NL ideal implica la detección de enfermedad de manera temprana, la predicción más precisa de la histopatología renal y una alta sensibilidad al cambio de la actividad durante el seguimiento de estos pacientes. En este sentido, a pesar de que se han identificado algunos biomarcadores para NL, ninguno cumple con todas estas características o resulta de difícil detección en las muestras de pacientes, por lo que no ha sido posible su aplicación rutinaria en la práctica clínica. Es aquí donde se propone la búsqueda de nuevos biomarcadores para NL, en este caso, los obtenidos de orina. Existen evidencias que en presencia de LEG con nefropatía lúpica hay incremento de vesículas extracelulares y de miRNAs en orina, pero no se han caracterizado moléculas ni miRNAs que estén relacionadas con las células B, importantes en la patogenia de la enfermedad.

1.9 Hipótesis

La composición del contenido de las vesículas extracelulares en orina es distinta en pacientes con nefropatía lúpica con respecto a individuos sanos, y este contenido se asociará con el pronóstico de la enfermedad.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 General

Identificar biomarcadores potenciales en vesículas extracelulares con valor pronóstico en orina de pacientes con nefropatía lúpica.

2.2 Particulares

1. Establecer una cohorte.
2. Estandarizar la purificación de vesículas extracelulares.
3. Purificar vesículas extracelulares a partir de muestras de orina.
4. Determinar niveles de expresión de tetraspanina 33, CD37, CD53, ADAM10 en vesículas extracelulares.
5. Determinar niveles de expresión relativa de los miRNAs en las vesículas extracelulares.
6. Realizar análisis de asociación entre los niveles de expresión con variables clínicas y del laboratorio.

Materiales y Métodos

3 Materiales y Métodos

3.1 Grupo de estudio

Se reclutaron pacientes mayores de 18 años diagnosticados con LEG, acorde a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y/o a los criterios SLICC (11), provenientes de la consulta externa y hospitalización del INCMNSZ, CDMX y del Instituto Feinstein, Manhasset, EUA. Todos los sujetos firmaron carta de consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio, REF 2555 Comité de ética en Investigación INCMNSZ.

3.1.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico confirmado por biopsia de NL clases III o IV de reciente diagnóstico (<3 meses de diagnóstico).
2. Pacientes con diagnóstico de LEG y sin evidencia clínica o de laboratorio compatible con actividad renal.
3. Controles sanos ajustados por edad y género. Su estado de salud se verificará mediante interrogatorio y exploración física completa.

3.1.2 Criterios de exclusión

1. Pacientes con diagnóstico de LEG de inicio tardío (>50 años al diagnóstico).
2. Pacientes con diagnóstico concomitante de neoplasias, infecciones virales crónicas o inmunodeficiencias primarias.
3. Pacientes con diagnóstico de proceso infeccioso activo al momento de la toma de muestra.
4. Mujeres embarazadas o en puerperio.
5. Pacientes bajo cualquier tratamiento inmunosupresor de tipo biológico (anti-CD20, anti-BAFF, anti-CTLA4).
6. Pacientes con diagnóstico de otras enfermedades autoinmunes

concomitantes, excepto el síndrome antifosfolípidos.

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

3.1.3 Criterios de eliminación

1. Pérdida de seguimiento (pacientes con NL).
2. Muestra insuficiente para el análisis contemplado.

3.2 Obtención de muestras

De cada paciente se obtuvo la primera orina de la mañana (100mL) en tubos estériles, se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento para la extracción de vesículas extracelulares, con enfermedad activa (SLEDAI ≥ 6), tras seis meses de inducción a la remisión (con prednisona a dosis alta y ciclofosfamida (CFM) o micofenolato de mofetilo (MMF), y luego a los tres meses posteriores de mantenimiento (con dosis menores de MMF), esperando algunos casos con remisión completa y otros con remisión parcial.

Para el cálculo del número de individuos a incluir en el estudio, se consideraron los datos epidemiológicos reportados en la literatura para NL, en donde el estudio más reciente disponible a la fecha (generado en 2016) que involucra una cohorte internacional multiétnica reporta una incidencia anual del 38.3% de NL en pacientes con LEG. Como se mencionó con anterioridad, para el caso de nuestro país no existen estudios epidemiológicos que reflejen con exactitud estos valores, sin embargo, disponemos de algunas referencias que implican el estudio de pacientes hispanos con NL, indicando una incidencia superior de alrededor del 61% (80).

Con dichos valores se procedió a calcular el tamaño de la muestra, con poder estadístico del 80%, como se indica a continuación:

$$N = \frac{p_0 q_0 \left\{ z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta} \sqrt{\frac{p_1 q_1}{p_0 q_0}} \right\}^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

$$q_0 = 1 - p_0$$

$$q_1 = 1 - p_1$$

$$N = \frac{0.383 * 0.617 \left\{ 1.96 + 0.84 \sqrt{\frac{0.61 * 0.39}{0.383 * 0.617}} \right\}^2}{(0.61 - 0.383)^2}$$

$$N = 36$$

Donde:

p0 = Incidencia en la población global

p1 = Incidencia en la población de estudio

N = Tamaño de muestra

α = Probabilidad de error tipo I (típico de 0.05)

β = Probabilidad de error tipo II (típico de 0.2)

z = Valor z crítico para α o β dadas.

Así, definimos que se requiere de un mínimo de 36 pacientes con NL para integrar el grupo correspondiente de dichos individuos ya mencionado. Paralelamente, se buscó el reclutamiento de números equivalentes para los otros dos grupos de estudio.

Además, de los expedientes clínicos, se obtuvieron las variables a correlacionar con los niveles de los biomarcadores potenciales que incluyeron: edad, sexo, fecha de diagnóstico de LEG, fecha de diagnóstico de la NL (en su caso), tratamiento de inducción a la remisión y de mantenimiento administrados (en su caso), parámetros bioquímicos: creatinina sérica, sedimento urinario; y variables inmunológicas, anticuerpos antinucleares, anti-dsDNA, C3 y C4.

3.3 Aislamiento de vesículas extracelulares

Se llevo a cabo el aislamiento de vesículas extracelulares tal y como lo establece, (78), con modificaciones: para eliminar células urinarias y debris y obtención de la primera fracción, orina libre de células, se centrifugó a 2500rpm por 10 minutos a 4°C. Después, se transfirió la orina y se centrifugó a 10,000 × g por 45 min a 4°C para eliminar vesículas grandes.

El pellet fue tratado con solución aisladora y con 5µL de β-mercaptoetanol, para disociar la proteína THP, ya que puede asociarse con las vesículas extracelulares y bajar el rendimiento de aislamiento. El sobrenadante se centrifugó a 48,300rpm por 70 min a 4°C, para obtener sobrenadante sin vesículas extracelulares. El pellet que contiene las vesículas extracelulares se lavó dos veces con PBS frío estéril libre de RNAsas y se centrifugó a 48,300 rpm por 70 min a 4°C. El pellet se re suspendió con 200µL de PBS estéril para la cuantificación de proteína usando el kit de BCA, para la determinación de diversas moléculas analizadas por citometría de flujo, y para el aislamiento de RNA.

3.4 Detección y medición de proteínas en vesículas extracelulares

Las fracciones de vesículas extracelulares (20µL) purificadas de orina se analizaron para detectar y evaluar niveles de las tetraspaninas 33, CD37 y CD53, ADAM10 mediante anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos (APC anti human TSPAN33 (BAAM) antibody, BioLegend, Cat 395406; FITC anti human CD37 antibody, BioLegend, Cat 356304; PE anti human CD53 antibody, BioLegend, Cat 325406; APC anti human CD156c (ADAM10) antibody, BioLegend, Cat 352706. La tinción se dejó toda la noche, se resuspendió con 200µL de PBS frío y estéril, para ser analizados mediante citometría de flujo usando el BD Accuri C6, y con la ayuda de las perlas Megamix para establecer el área de interés. Los datos obtenidos se procesaron con el programa FlowJo (TreeStar Inc).

3.5 Aislamiento de RNA

Para extraer RNA de 50µL de vesículas extracelulares, se trataron previamente con 0.1 µg/µL de RNAsa A (garantizando que el RNA que se obtuvo provenía de las vesículas extracelulares), enseguida se usó el kit de aislamiento de RNA miRNeasy micro kit Qiagen y se almacenó a -20°C. Se cuantificó el RNA total utilizando NanoDrop y a continuación, se obtuvo cDNA usando el kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit. Thermo Fisher Cat. A28007.

3.6 Medición de miRNAs

Los miRNAs humanos candidatos: miR142, miR-148a, miR-146a, miR-150, miR-155 y miR-21, y como housekeeping miR-16, se midieron realizando qPCR en el termociclador Light Cycler Roche 480, usando como sonda FAM y los hsa-miR-155-5p Thermo Fisher Cat: A25576 ID: 483064_mir, hsa-miR-150-5p Thermo Fisher Cat: A25576 ID: 477918_mir, hsa-miR-148a-5p Thermo Fisher Cat: A25576 ID: 478718_mir, hsa-miR-146-5p Thermo Fisher Cat: A25576 ID: 478399_mir, hsa-miR-142-5p Thermo Fisher Cat: A25576 ID: 477911_mir, hsa-miR-21-5p Thermo Fisher Cat: A25576 ID: 477975_mir, hsa-miR-16-5p Thermo Fisher Cat: A25576 ID: 477860_mir.

Las condiciones de corrida fueron: 1 ciclo, activación de enzima 95°C, 20 segundos. 45 ciclos, desnaturalización 95°C, 3 segundos, alineación/extensión 60°C, 30 segundos. Adquisición Sencilla 72°C, 1 segundo. 1 ciclo 4°C

3.7 Western blot

Tanto a las fracciones de orina total, orina libre de células, con vesículas extracelulares y el sobrenadante sin vesículas extracelulares fueron lisados con buffer RIPA con inhibidores de proteasas. Se cuantificó la proteína con el kit BCA (Thermo), se cargaron 20 µg de proteína, después se hizo la electroforesis en geles de 12% y se transfirió a membrana PVDF. Se utilizaron los anticuerpos CD9 (C-4) mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Cat sc-13118, TSG101 (C-2) mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Cat sc-7964, CD63 (MX-49.129.5) mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Cat sc-5275; para demostrar que la purificación de las vesículas extracelulares es correcta, y TSPAN33 como biomarcador.

3.8 Análisis Estadístico

Las variables se describen con media y desviación estándar. Las variables entre los grupos se compararon a través de Kruskal Wallis, seguido de un análisis post hoc de Dunn, o prueba de Wilcoxon. Se llevaron a cabo pruebas no paramétricas mediante Rho de Spearman y la generación de una matriz para determinar si existen asociaciones entre los datos obtenidos y las variables clínicas. Se tomo como significativo un valor de $p \leq 0.05$ y el análisis se llevo a cabo con la ayuda del software Graphpad Prism 6.0.

Resultados

4.0 Resultados

En el presente protocolo se cuentan con cuatro grupos de estudio: el grupo de pacientes con nefropatía lúpica (NL) a los cuales se les dio seguimiento de 6 meses, teniendo dos muestras en total (10); el grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) sin actividad (7), el grupo de LEG con actividad (14), y el grupo de individuos sanos (11). En la siguiente tabla se anexa la información obtenida del expediente de los grupos NL y LEG, y algunas características de los individuos sanos.

Tabla 2 Variables clínicas y de laboratorio de los grupos de estudio.

Variable	NL activa (n=10)	LEG inactivo (n=7)	LEG activo (n=4)	Control (n=11)	Valores de referencia
Edad (Años±DE)	27.5±8.81	29±9	27±8	24.75±4.02	6
Género (Masculino/ Femenino)	4/6	1/6	0/4	5/6	
SLEDAI (Puntos±DE)	19.5±3.5	3.4±1.0	13.8±7.2	-	≥6 Enfermedad activa
Nefropatía lúpica	(10)	-	-	-	
Biopsia renal	IV + V A13 C6 FIAT 30% (9) III + V (1)	-	-		
Cr sérica (mg/dL±DE)	2.6±1.2	0.69±0.08	1.00±0.34	-	0.6-1.3
IFG (mL/min/1.73 m ² ±DE)	52.2±23.5	117±6.2	85.3±32.6	-	90-130
anti-DNAc (UI/mL±DE)	426.8±309	23.8±17.1	291±239	-	≤9.6
C3 (mg/dL±DE)	55.2±23.5	107±22	74±17	-	87-200
C4 (mg/dL±DE)	10.6±5.6	16±4	13±9	-	19-52
Sedimento urinario	Activo (10)	Inactivo (7)	Inactivo (4)	-	Inactivo
Eritocitos dismórficos	Presencia (1)			-	Ausencia

A=actividad C=cronicidad FIAT=fibrosis intersticial, atrofia tubular

Uno de los objetivos del presente estudio fue la estandarización para el aislamiento de vesículas extracelulares (VEs), el cual ya se encuentra publicado (81). Para realizar este objetivo se evaluaron dos metodologías distintas, como se observa en la Figura 9. El uso de polietilenglicol (PEG) 8000 (carriles 5, 6 y 7) o la ultracentrifugación (carriles 8, 9 y 10). Además, se usaron dos distintos agentes reductores ditioneitol (DTT) (carriles 6 y 9) o β -mercaptoetanol (carriles 7 y 10). En el carril 1 se tiene el marcador de peso molecular, carril 2 la fracción de orina total, carril 3 fracción de células urinarias, carril 4 fracción de sobrenadante libre de VEs, carriles 5 y 8 corresponden a la fracción de VEs aisladas por alguna de las metodologías ya mencionadas sin agregar algún agente reductor. Se observa que al usar la ultracentrifugación más β -mercaptoetanol (carril 10) se obtiene un mejor bandeo de proteína característico de un buen aislamiento de VEs.

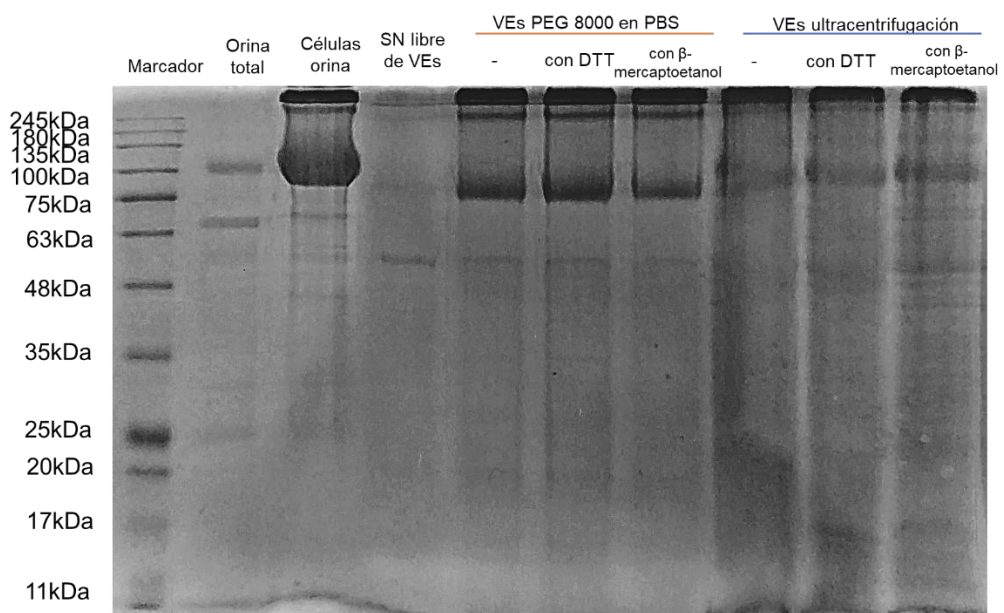


Figura 9 Gel de poliacrilamida de las fracciones urinarias y VEs urinarias aisladas por dos diferentes metodologías.

Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: orina total. Carril 3: células urinarias. Carril 4: sobrenadante libre de VEs. Carriles 5, 6 y 7 corresponde a las VEs obtenidas al usar PEG 8000, carril 5 sin usar ningún agente reductor, carril 6 con DTT como agente reductor, carril 7 con β -mercaptoetanol. Carriles 8, 9 y 10 corresponde a las VEs aisladas por ultracentrifugación, carril 8 sin usar ningún agente reductor, carril 9 con DTT como agente reductor, carril 10 con β -mercaptoetanol.

A partir de 15mL de orina se lograron aislar las VEs. Se optó por el método de ultra centrifugación más β -mercaptoetanol como agente reductor, como

el mejor rendimiento de obtención de VEs. La fracción de VEs se resuspendió en PBS para el análisis por citometría de flujo y para el ensayo de Western blot, se resuspendió en buffer de lisis. En la Figura 10, inciso A se muestra un gel de poliacrilamida al 15% teñido con nitrato de plata, donde se pone de manifiesto las bandas de proteínas. El carril 1 corresponde a las células de orina de un individuo sano, de los carriles 2 al 5 corresponden a la fracción de VEs, el carril 2 son VEs aisladas de una línea celular de células B, los carriles 3 al 5 corresponden a VEs de orina de diferentes individuos sanos, donde se nota que la cantidad de proteína varía entre individuos. El inciso B muestra diferentes fracciones de orina y a las VEs, donde se evaluaron los diferentes marcadores de VEs, CD9, CD81 y TSG101. Estas proteínas están enriquecidas en la fracción de VEs. Además, CD9 y CD81 se encuentran también en las células de orina, pero no Tsg101. El inciso C corresponde a un histograma obtenido por citometría de flujo, donde se observa que las VEs con tamaño de 0.1µm están enriquecidas, al compararlos con los otros tamaños.

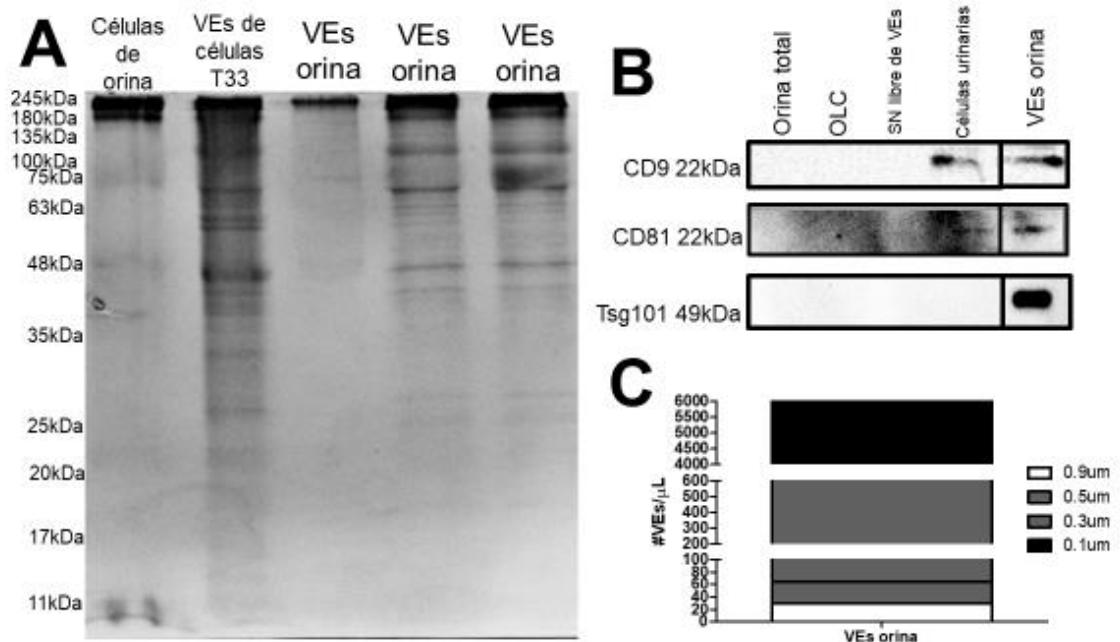


Figura 10 Caracterización de VEs aisladas a partir de muestras de orina

A. gel de poliacrilamida al 15% teñido con nitrato de plata. Carril 1: células urinarias. Carril 2: VEs de células con sobreexpresión de TSPAN33. Carriles 3, 4 y 5 VEs obtenidas de orina de diferentes individuos sanos. **B.** Western blot revelando marcadores de VEs (CD9, CD81 y Tsg101) carril 1: orina total, carril 2: orina libre de células, carril 3: sobrenadante libre de VEs, carril 4: células urinarias, carril 5: VEs de orina. **C.** Histograma que muestra la cantidad de VEs/µL para cada uno de los diferentes tamaños de VEs.

Estos resultados demuestran que se obtuvieron VEs de individuos sanos, por lo tanto, se procedió a procesar las muestras de los pacientes con NL y LEG. Es importante mencionar que a todos los datos obtenidos se normalizaron con respecto a la creatinina urinaria presente en cada una de las muestras analizadas, para evitar sesgos o malas estimaciones, y poder hacer comparables los datos entre sí. Lo primero que se realizó fue la cuantificación de proteína de las VEs urinarias, tal como se muestra en la Figura 11, tenemos las muestras de los grupos de LEG (A), NL con el seguimiento de los 6 meses (B), en ambas gráficas se comparan respecto al grupo control o de individuos sanos.

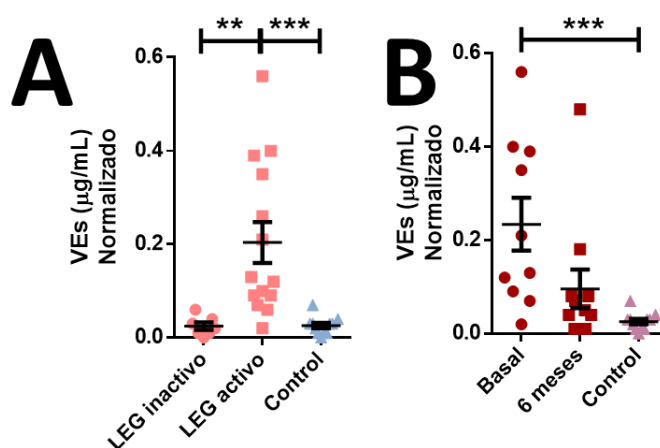


Figura 11 Cuantificación de proteína en VEs de individuos con NL, LEG y sanos
A. Histograma que muestra la cantidad de proteína en VEs de los grupos de LEG (inactivo y activo) contra los individuos sanos (control). **B.** Histograma que muestra la cantidad de proteína en VEs de pacientes con NL (basal y a los 6 meses de seguimiento) contra los individuos sanos (control). *** $p \leq 0.001$ ** $p \leq 0.005$.

Los datos indican que tanto en los pacientes con LEG activo como en el tiempo basal del grupo NL, hay mayor cantidad de proteína en las VEs urinarias. La cantidad de proteína disminuyó a los 6 meses de seguimiento, y en el grupo de LEG inactivo, estos datos son parecidos a los que se obtuvieron en el grupo control, bajos niveles de proteínas.

Lo siguiente a evaluar fue la presencia de la proteína Tetraspanina 33 por Western blot, para lo cual se cargaron 20µg del extracto proteico. En la

Figura 12 se muestran 2 imágenes representativas de dos individuos distintos por grupo. Por cada individuo se tiene un carril con orina total, sobrenadante libre de VEs y el carril con la fracción de VEs, además los pacientes del grupo NL se muestra el seguimiento a los 6 meses.

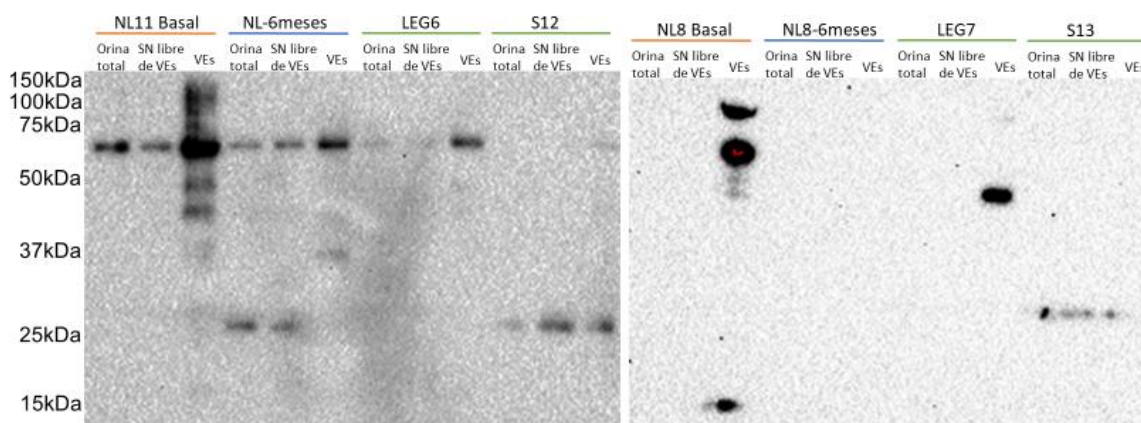


Figura 12 Presencia de TSPAN33 en las diferentes fracciones de orina y en VEs

Western blot de TSPAN33. Panel izquierdo. Carriles 1, 2 y 3 perteneciente a un paciente con NL basal, carril 1: orina total, carril 2: sobrenadante libre de VEs, carril 3: VEs. Carriles 4, 5 y 6 perteneciente al mismo paciente a los 6 meses de seguimiento, carril 4: orina total, carril 5: sobrenadante libre de VEs, carril 6: VEs. Carriles 7, 8 y 9 perteneciente a un paciente con LEG, carril 7: orina total, carril 8: sobrenadante libre de VEs, carril 9: VEs. Carriles 10, 11 y 12 perteneciente a un individuo sano, carril 10: orina total, carril 11: sobrenadante libre de VEs, carril 12: VEs. Panel derecho. Carriles 1, 2 y 3 perteneciente a otro paciente con NL basal, carril 1: orina total, carril 2: sobrenadante libre de VEs, carril 3: VEs. Carriles 4, 5 y 6 perteneciente al mismo paciente a los 6 meses de seguimiento, carril 4: orina total, carril 5: sobrenadante libre de VEs, carril 6: VEs. Carriles 7, 8 y 9 perteneciente a otro paciente con LEG, carril 7: orina total, carril 8: sobrenadante libre de VEs, carril 9: VEs. Carriles 10, 11 y 12 perteneciente a otro individuo sano, carril 10: orina total, carril 11: sobrenadante libre de VEs, carril 12: VEs.

Usando esta metodología podemos observar la presencia de diferentes bandas de la proteína tetraspanina 33, manteniéndose la banda con peso de 60kDa en las VEs de los pacientes con nefropatía lúpica, mientras que a los 6 meses de seguimiento esta banda tiende a desaparecer; encontrándose pobremente expresada en los controles de LEG como de sanos. Así mismo se observan otras bandas de menor peso molecular, tratándose de isoformas de la proteína, que solo se encuentran en individuos sanos. Es importante mencionar que la tetraspanina 33 también se puede encontrar en las fracciones de orina, pero, este fenómeno solo se observó en un par de pacientes.

Dado que la figura anterior es una observación inferencial, nos dimos a la tarea de realizar la densitometría de la Tetraspanina 33 (60kDa) y graficarla

como expresión relativa, tal como se observa en la Figura 13. En el inciso A, están representadas cada una de las fracciones de orina evaluadas. La mayor cantidad de expresión relativa de TSPAN33 fue en la fracción de VEs urinarias basal, aunque en todas las fracciones se encuentra expresada la proteína; en el inciso B solo se muestra la fracción de VEs urinarias para cada uno de los grupos analizados, observándose que hay mayor expresión relativa de TSPAN33 y esta diferencia es significativa.

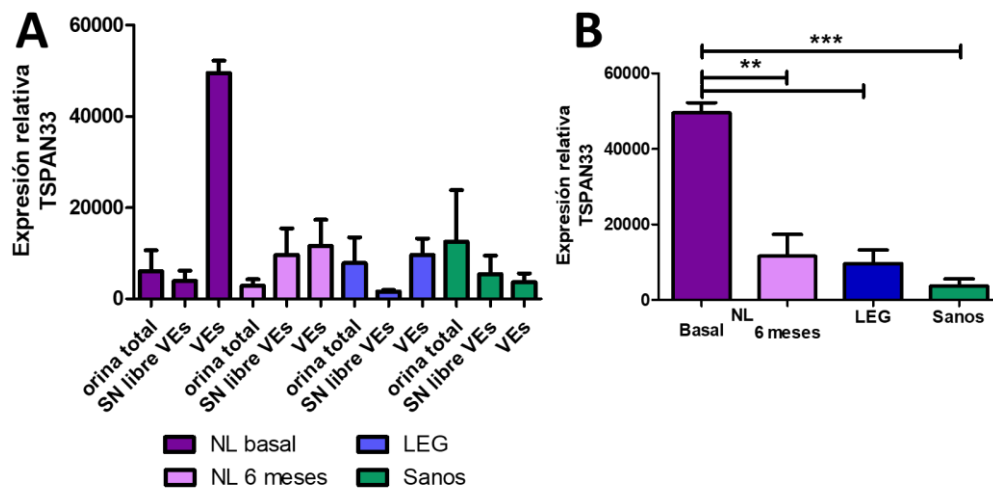


Figura 13 TSPAN33 enriquecido en VEs urinarias en pacientes con NL activa. Histogramas que muestran la expresión relativa de TSPAN33, en el grupo de individuos con NL basal, a los 6 meses de seguimiento, individuos con LEG y sanos; en cada una de las fracciones evaluadas (orina total, sobrenadante libre de VEs y VEs) (A), y en las VEs (B). ***p<0.001 **p<0.005.

Para poder validar estos resultados, y además poder analizar más proteínas en menor cantidad de volumen, se procedió a estandarizar la citometría de flujo para el análisis de las vesículas extracelulares, usando el citómetro de flujo BD Accuri C6, y las perlas megamix plus FSC, perlas que tienen tamaño de 0.1, 0.3, 0.5 y 0.9 μm y emiten fluorescencia en FL1, en la Figura 14 se muestra los gráficos obtenidos donde se valida que el citómetro usado puede distinguir entre los tamaños previamente mencionados, siendo sensible y específico para realizar análisis por tamaño de las VEs urinarias, ya que las r^2 obtenidas son muy cercanas a 1.00, además de evaluarse con las perlas megamix (línea negra), específicas para esto, se pasaron otras perlas fluorescentes de 0.1, 0.5 y

1.0 μm (línea roja), y los resultados fueron similares, y este protocolo ya se encuentra publicado (81).

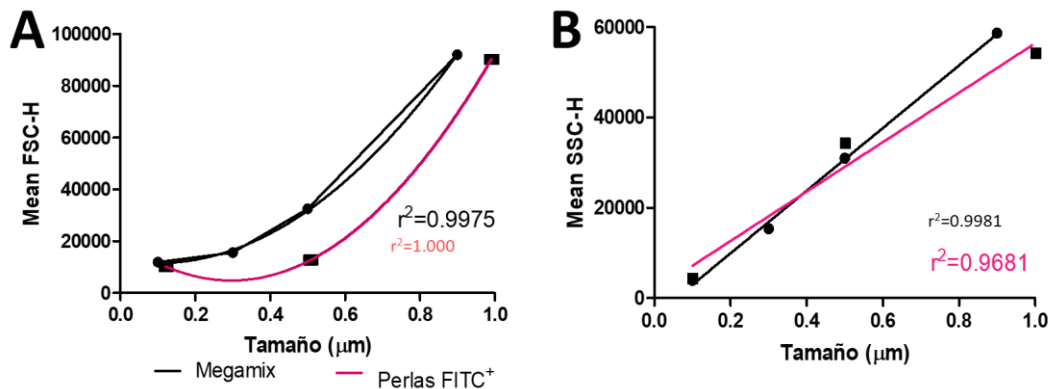


Figura 14 Validación del citómetro de flujo para discriminar tamaños de 0.1 a 1.0 μm . Histogramas creados al usar perlas Megamix (0.1, 0.3, 0.5 y 0.9 μm) representado por la línea negra y perlas FITC⁺ (0.1, 0.5 y 1.0 μm) representado por la línea roja. Se evaluó tanto la media de FSC-H (**A**), como la media de SSC-H (**B**). Todo esto para verificar y validar que el citómetro de flujo puede discernir entre diferentes tamaños.

Una vez corroborado que en el citómetro de flujo podemos analizar partículas pequeñas, se procedió a generar la Figura 15, donde se muestran las perlas megamix analizadas por fluorescencia (**A**) y por tamaño (**B**), el inciso B nos sirvió para analizar por tamaño las VEs urinarias.

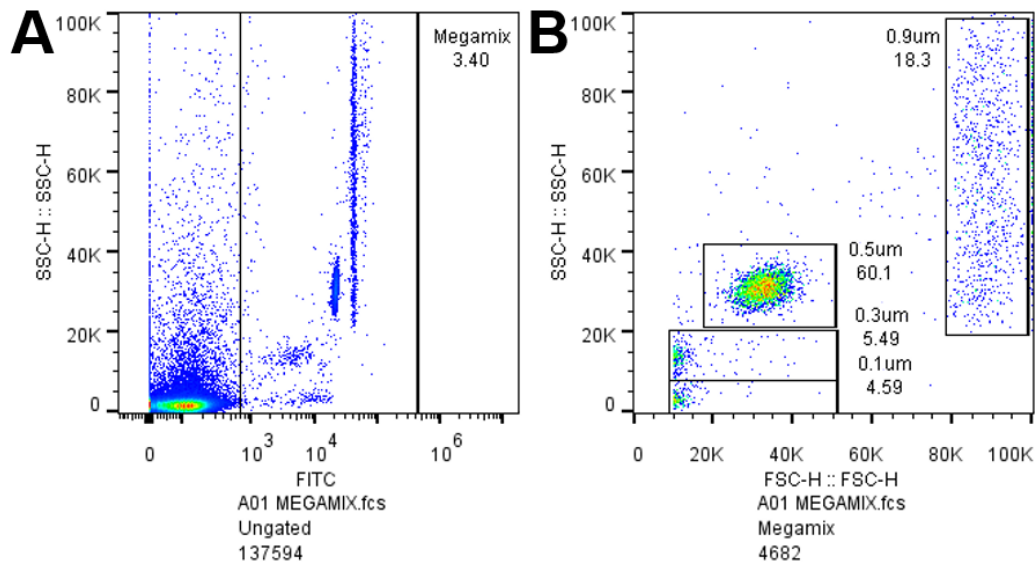


Figura 15 Dot plots de las perlas Megamix

A. Dot plot de SSC-H vs FITC (canal en el que fluorescen las perlas Megamix), el recuadro seleccionado muestra las perlas Megamix, del cual se origina el dot plot mostrado en (**B**) SSC-H vs FSC-H, mostrándose las perlas de diferentes tamaños. Estos recuadros generados sirvieron para establecer los tamaños en las VEs analizadas.

Con esta metodología se determinó en los diferentes grupos la cantidad de VEs por μL , así como la cantidad de VEs positivas para diferentes tetraspaninas como CD37, CD53, tetraspanina 33 y la metaloproteasa ADAM10.

Primero se decidió analizar al grupo de pacientes con LEG sin actividad y con actividad, y al grupo control, tal como se muestra en la Figura 16, se realizó el análisis Kruskal Wallis con post hoc de Dunn. En el inciso A hay diferencia significativa, el grupo control presenta mayor cantidad de VEs, comparadas con el grupo de LEG inactivo, en el caso del grupo de LEG activo se observa una tendencia a secretar mayor cantidad de VEs, este fenómeno se repite en los demás incisos (B, C, D, E).

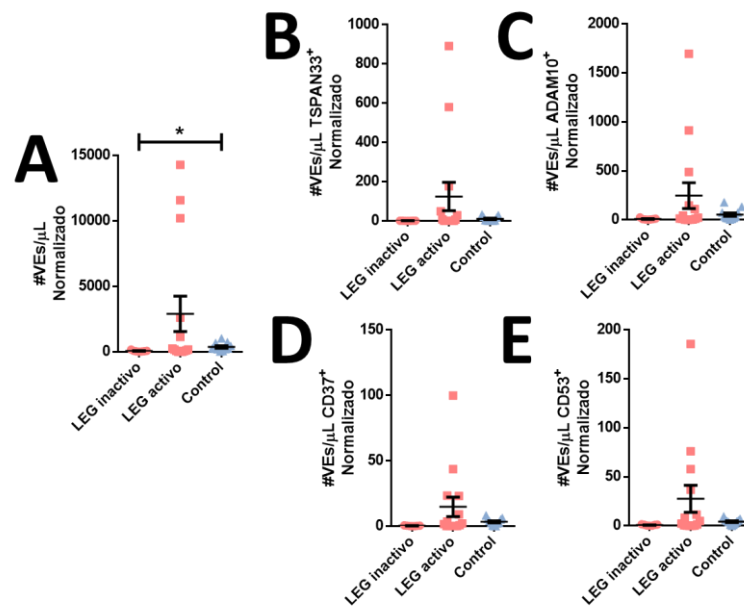
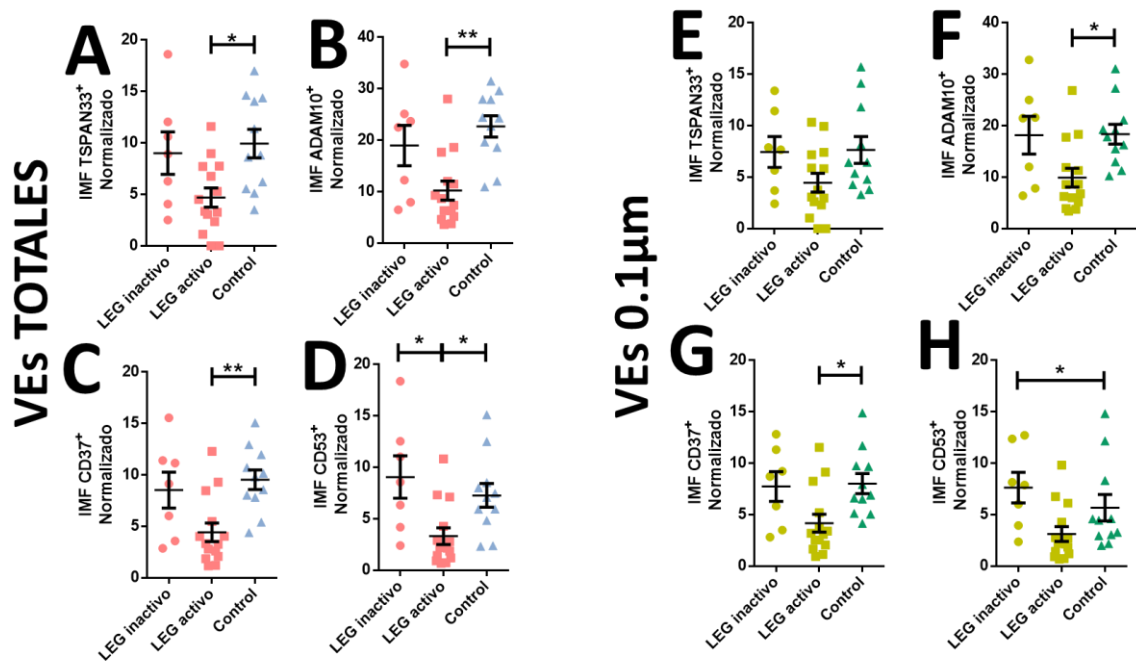


Figura 16 Pacientes con LEG activo presentan mayor cantidad de VEs urinaria.

Los histogramas muestran el número absoluto de VEs urinarias totales positivas a biomarcadores por microlitro en los pacientes con LEG inactivo, activo e individuos sanos (control). **A.** Número total de VEs urinarias por microlitro. **B.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a TSPAN33. **C.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a ADAM10. **D.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a CD37. **E.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a CD53. * $p \leq 0.05$.

Después se decidió analizar la intensidad media de fluorescencia (IMF) para las VEs totales por biomarcador, tal como se muestra en la Figura 17 incisos A, B, C y D. El grupo control presenta mayor cantidad de moléculas evaluadas (TSPAN33, ADAM10, CD37 y CD53) por vesícula extracelular, esto dado por la IMF, y es estadísticamente significativo al compararlos con el grupo de LEG activo, mientras que se observa una tendencia a alcanzar niveles similares al grupo control en el grupo de LEG inactivo, resultados similares se obtuvieron al analizar a las VEs por tamaño 0.1 μ m (E,F,G y H), 0.3 μ m (I,J,K y L), 0.5 μ m (M,N, O y P).



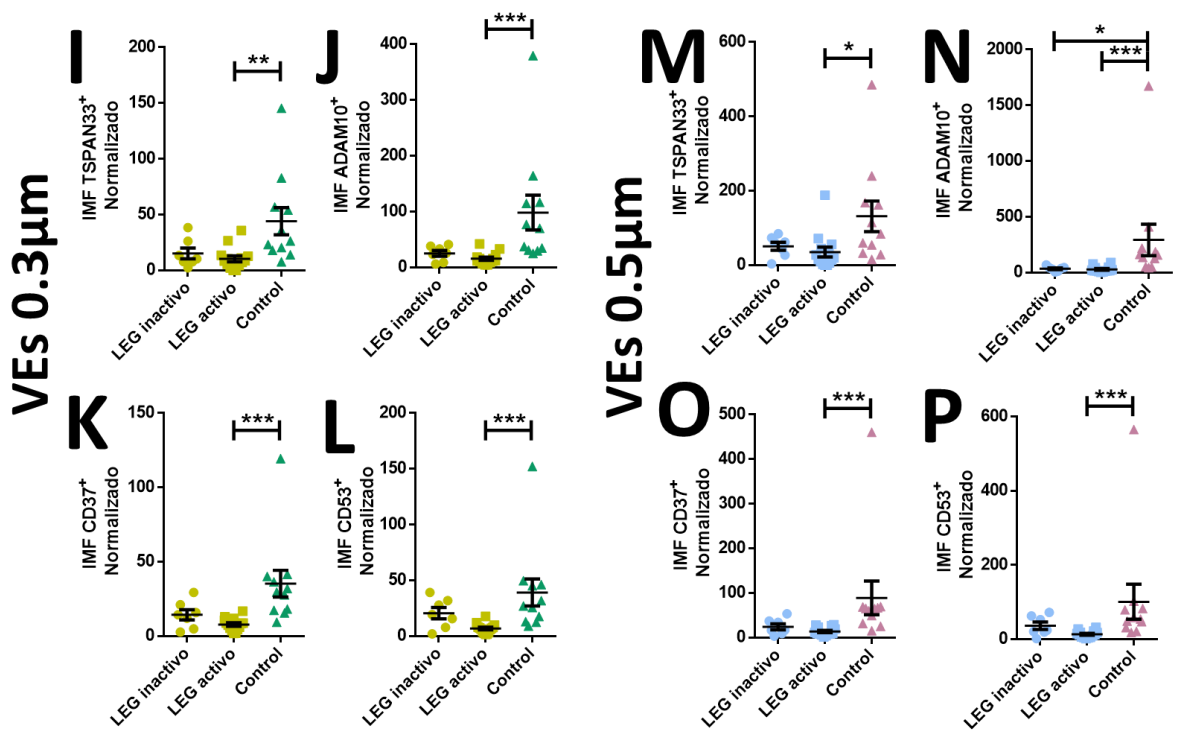


Figura 17 Pacientes con LEG activo presentan menor IMF de las proteínas evaluadas.

Los histogramas muestran la intensidad media de fluorescencia de VEs urinarias por tamaño en los pacientes con LEG inactivo, activo y sanos. Paneles A, B, C y D corresponden a VEs urinarias totales, IMF de TSPAN33⁺ (A), IMF de ADAM10⁺ (B), IMF de CD37⁺ (C), IMF de CD53⁺ (D). Paneles E, F, G y H corresponden a VEs urinarias de 0.1µm, IMF de TSPAN33⁺ (E), IMF de ADAM10⁺ (F), IMF de CD37⁺ (G), IMF de CD53⁺ (H). Paneles I, J, K y L corresponden a VEs urinarias de 0.3µm, IMF de TSPAN33⁺ (I), IMF de ADAM10⁺ (J), IMF de CD37⁺ (K), IMF de CD53⁺ (L). Paneles M, N, O y P corresponden a VEs urinarias de 0.5µm, IMF de TSPAN33⁺ (M), IMF de ADAM10⁺ (N), IMF de CD37⁺ (O), IMF de CD53⁺ (P). ***p<0.001 **p<0.005. *p<0.05.

Posteriormente se realizó el análisis de los pacientes con NL activa en el tiempo cero, comparándolo con el seguimiento a los 6 meses, y a su vez comparando ambos grupos con el grupo control. Tal como se observa en la Figura 18, hay una tendencia a presentar mayor cantidad de VEs/µL totales, así como para cada una de las proteínas evaluadas, cabe mencionar que los puntos que representan mayores niveles corresponden a los pacientes que no respondieron al tratamiento de inducción a la remisión, y el grupo control presento los niveles más bajos de VEs.

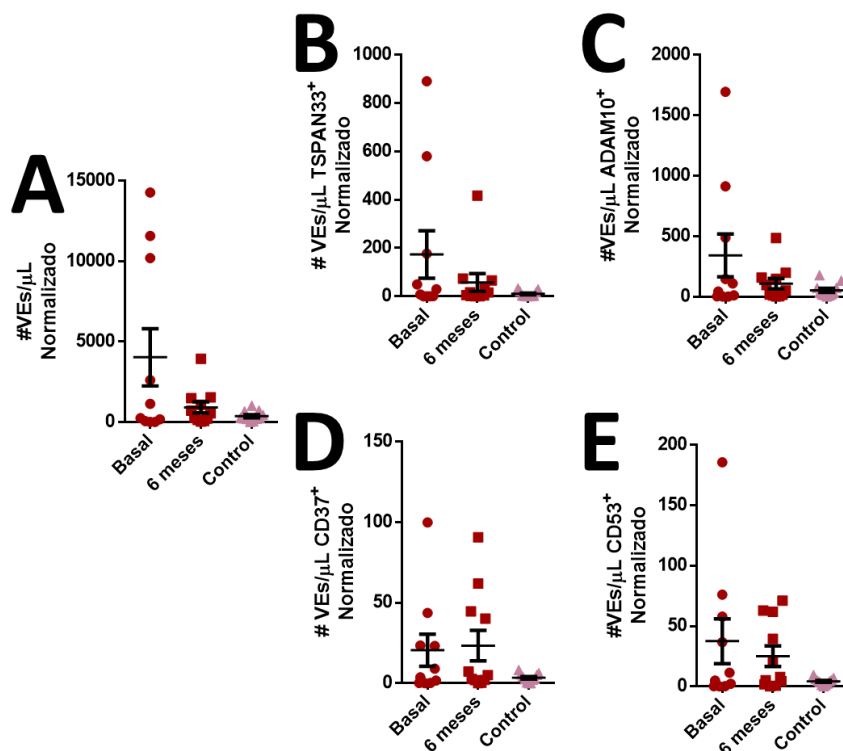


Figura 18 Pacientes con NL activa presentan mayor cantidad de VEs urinarias

Los histogramas muestran el número absoluto de VEs urinarias totales positivas a biomarcadores por microlitro en los pacientes con NL activo, seguimiento a los 6 meses e individuos sanos (control). **A.** Número total de VEs urinarias por microlitro. **B.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a TSPAN33. **C.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a ADAM10. **D.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a CD37. **E.** Número de VEs urinarias por microlitro positivas a CD53.

Asimismo, se decidió analizar la IMF para las diferentes proteínas, Figura 19, primero se realizó un análisis estadístico usando la prueba de Wilcoxon para comparar a cada uno de los pacientes en el tiempo cero y el seguimiento a los 6 meses, entre ellos hay diferencias significativas, es decir, a los 6 meses presentan mayores niveles de IMF para TSPAN33 y ADAM10, tanto en las VEs totales (A, B), y 0.1 μ m (E), para los otros tamaños y otras proteínas se observan tendencias. Al comparar el grupo control con el grupo de NL activa se tiene diferencia significativa, es decir, el grupo control presenta más IMF para cada una de las proteínas evaluadas, resultado que se mantiene constante en las VEs totales (A, B, C y D), 0.1 μ m (E, F, G y H), 0.3 μ m (I, J, K y L), 0.5 μ m (M, N, O y P).

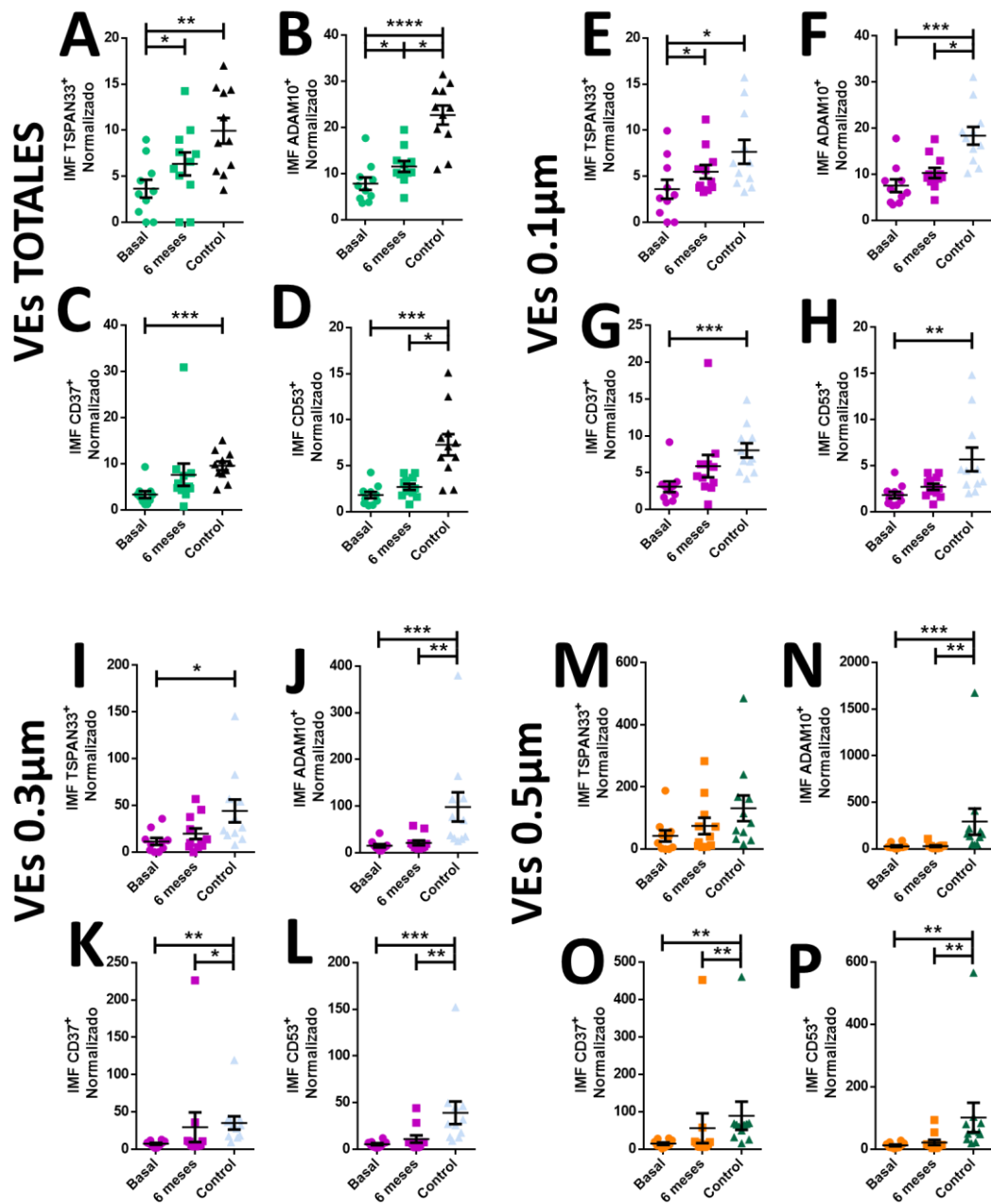


Figura 19 Pacientes con NL activa presentan menor IMF de las proteínas evaluadas. Los histogramas muestran la intensidad media de fluorescencia de VEs urinarias por tamaño en los pacientes con NL activa, seguimiento a los 6 meses e individuos sanos (control). Paneles A, B, C y D corresponden a VEs urinarias totales, IMF de TSPAN33⁺ (A), IMF de ADAM10⁺ (B), IMF de CD37⁺ (C), IMF de CD53⁺ (D). Paneles E, F, G y H corresponden a VEs urinarias de 0.1µm, IMF de TSPAN33⁺ (E), IMF de ADAM10⁺ (F), IMF de CD37⁺ (G), IMF de CD53⁺ (H). Paneles I, J, K y L corresponden a VEs urinarias de 0.3µm, IMF de TSPAN33⁺ (I), IMF de ADAM10⁺ (J), IMF de CD37⁺ (K), IMF de CD53⁺ (L). Paneles M, N, O y P corresponden a VEs urinarias de 0.5µm, IMF de TSPAN33⁺ (M), IMF de ADAM10⁺ (N), IMF de CD37⁺ (O), IMF de CD53⁺ (P). ***p≤0.001 **p≤0.005. *p≤0.05.

Para saber si los resultados tienen correlaciones con las variables clínicas, se procedió a obtener la matriz correspondiente que se muestra en la Figura 20, donde se muestra con números a la r de Spearman, un color azul indica que la correlación es positiva, y un color rojo que la correlación es negativa. Se puede observar que existen tanto correlaciones positivas como negativas con las variables clínicas, fenómenos que corresponden con la presencia de enfermedad activa.

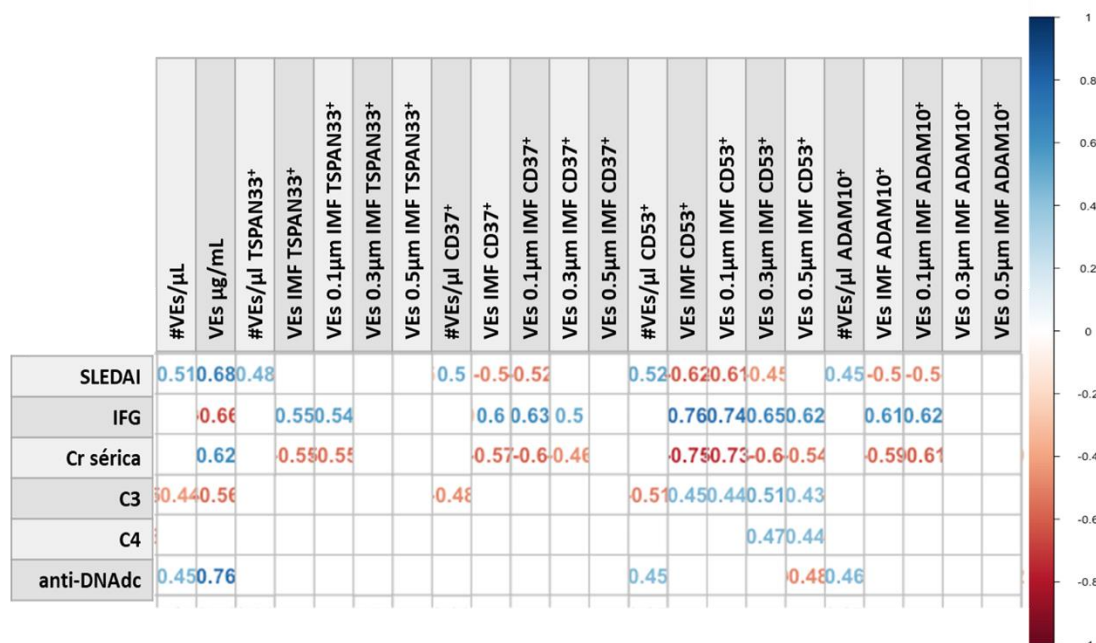
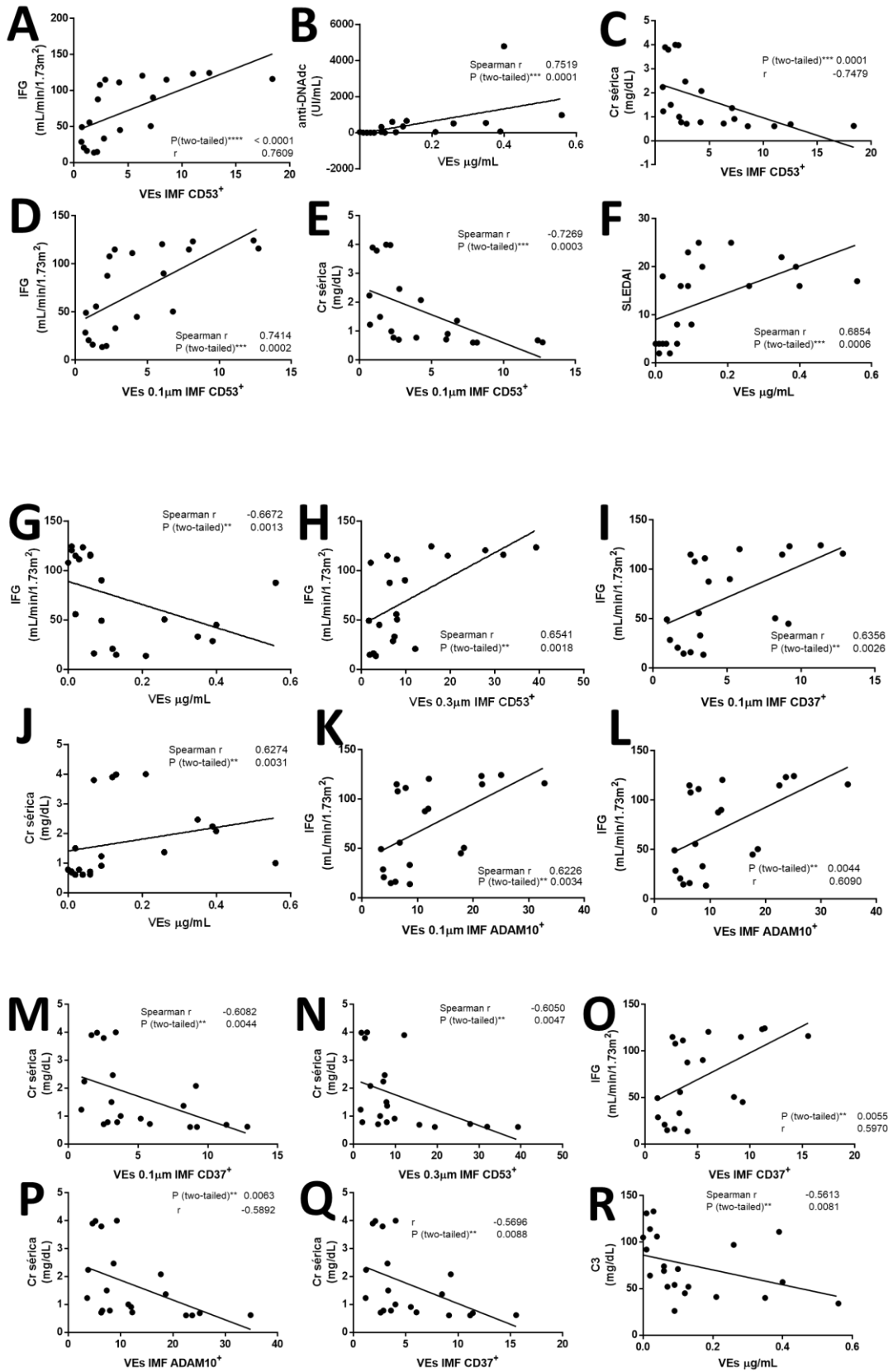


Figura 20 VEs urinarias correlacionan con variables clínicas

Matriz de correlación entre las variables clínicas y los resultados obtenidos. Número en azul indican correlación positiva, número en rojo indican correlación negativa.

Para poder entender mejor la matriz de correlación previamente mencionada, se muestran en la Figura 21, cada una de las correlaciones estadísticamente significativas, partiendo de la que tiene mayor diferencia significativa a la menor, siendo el valor de IFG como la creatinina sérica las variables clínicas con mayores correlaciones con los resultados obtenidos.



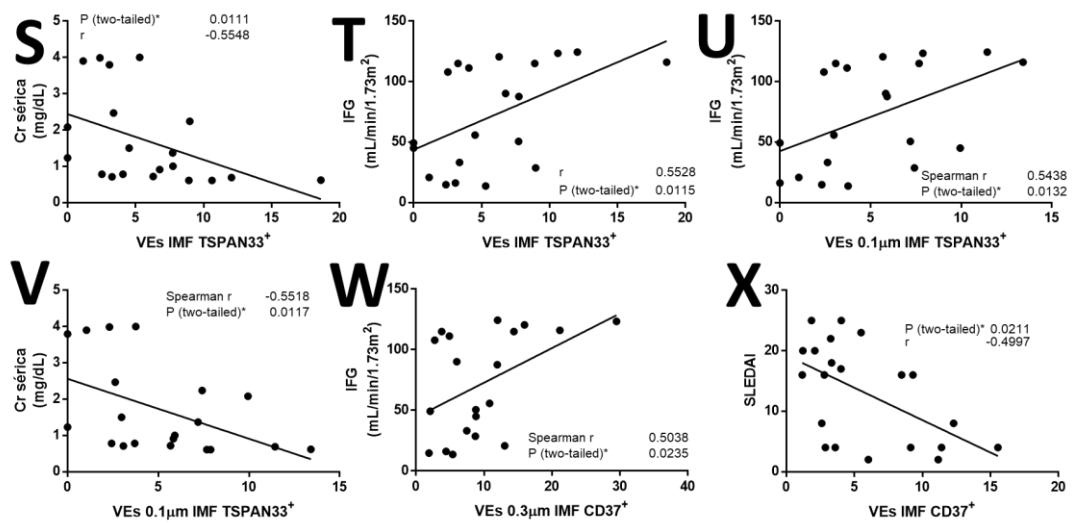


Figura 21 Correlaciones estadísticamente significativas entre variables clínicas y resultados obtenidos.

Las gráficas muestran las regresiones lineales, de la que tiene mayor diferencia significativa, a las que tienen menor diferencia significativa. **A.** IFG vs VEs IMF CD53⁺. **B.** anti-DNAdc vs VEs μg/mL. **C.** Creatinina sérica vs VEs IMF CD53⁺. **D.** IFG vs VEs 0.1μm IMF CD53⁺. **E.** Creatinina sérica vs VEs 0.1μm IMF CD53⁺. **F.** SLEDAI vs VEs μg/mL. **G.** IFG vs VEs μg/mL. **H.** IFG vs VEs 0.3μm IMF CD53⁺. **I.** IFG vs VEs 0.1μm IMM CD37⁺. **J.** Creatinina sérica vs VEs μg/mL. **K.** IFG vs VEs 0.1μm IMF ADAM10⁺. **L.** IFG vs VEs IMF ADAM10⁺. **M.** Creatinina sérica vs VEs 0.1μm IMF CD37⁺. **N.** Creatinina sérica vs VEs 0.3μm IMF CD53⁺. **O.** IFG vs VEs IMF CD37⁺. **P.** Creatinina sérica vs VEs IMF ADAM10⁺. **Q.** Creatinina sérica vs VEs IMF CD37⁺. **R.** C3 vs VEs μg/mL. **S.** Creatinina sérica vs VEs IMF TSPAN33⁺. **T.** IFG vs VEs IMF TSPAN33⁺. **U.** IFG vs VEs 0.1μm IMF TSPAN33⁺. **V.** Creatinina sérica vs VEs 0.1μm IMF TSPAN33⁺. **W.** IFG vs VEs 0.3μm IMF CD37⁺. **X.** SLEDAI vs VEs IMF CD37⁺.

Con estos resultados, podemos inferir que en las VEs urinarias existen correlaciones con las variables clínicas presentes en la nefropatía lúpica activa al determinar IMF para las proteínas CD53, CD37, ADAM10 y TSPAN33, tanto en VEs totales como por tamaño, así como cantidad de estas. Aunque es importante mencionar, que se requiere analizar una mayor cantidad de muestras para corroborar estos hallazgos.

Para poder cumplir con el objetivo de analizar miRNAs presentes en las VEs urinarias, se realizó una estancia de tres meses en el Instituto Feinstein con la Dra Betty Diamond, se procesaron 100 muestras de orina, provenientes de mujeres, divididas en tres grupos: individuos sanos,

pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado sin actividad y evidencia clínica o de laboratorio compatible con actividad renal (LEG), y pacientes con nefropatía lúpica activa (NL). A partir, de por lo menos 15mL de orina se procedió a obtener vesículas extracelulares (VEs), usando la técnica previamente estandarizada de ultracentrifugación, y la fracción de VEs se resuspendió en 200µL de PBS filtrado y estéril. Se verificó la obtención de las VEs por la técnica de Western blot, al revelar las proteínas CD63 y CD9. Posteriormente se obtuvo el RNA total usando el kit RNA miRNeasy micro kit Qiagen y se almacenó a -20°C. Se cuantificó el RNA total utilizando NanoDrop. Para después obtener el cDNA usando el kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit. Una vez obtenido esto, se realizó la detección de miRNAs humanos candidatos: miR142, miR-148a, miR-146a, miR-150, miR-155 y miR-21, y como gen de referencia a miR-16, mediante qPCR en el termociclador Light Cycler Roche 480, usando como sonda FAM. Posteriormente, se calculó la expresión relativa de los miRNAs.

Los resultados obtenidos, fueron los siguientes. A pesar de haber procesado 100 muestras de orina en total, no se pudo obtener VEs en todas, debido a que algunas muestras de orina no correspondían a la primera orina de la mañana, estaban más diluidas y por ende, fue imposible detectar VEs, por lo tanto, en el grupo de NL correspondió a 21 pacientes, el grupo de LEG 25, y el de sanos 10. En la Figura 22 se muestra la cantidad de proteína presente en las VEs, hay mayor cantidad de proteínas en el grupo con NL al compararlo con los otros grupos; lo que corroboró los resultados obtenidos en la cohorte de pacientes mexicanos.

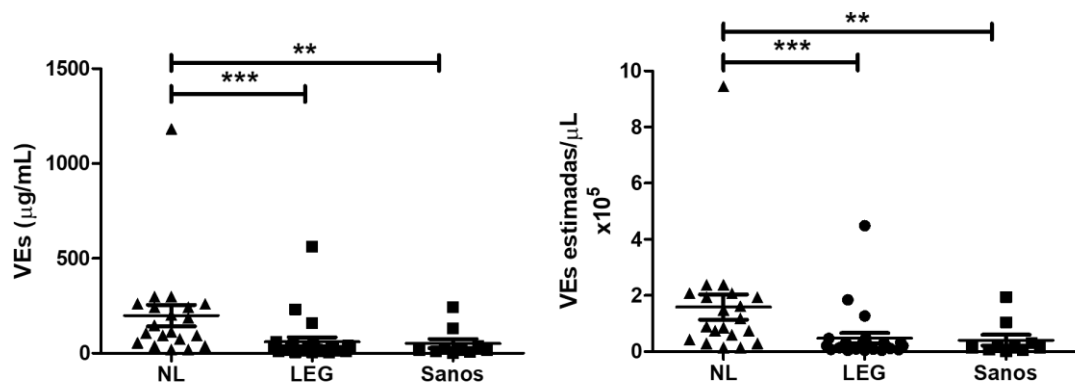


Figura 22 Pacientes con NL activa tienen mayor cantidad de VEs urinarias
 Cuantificación de las vesículas extracelulares urinarias de individuos con NL, LEG y sanos. Panel izquierdo muestra la cantidad de proteína presente en las VEs. Panel derecho muestra la cantidad de VEs estimadas. *** $p \leq 0.001$ ** $p \leq 0.005$.

En estas muestras sólo fue posible identificar a los miRNAs, miR-21 y miR-146a, mostrados en la Figura 23, donde se observa que hay mayor expresión relativa de miR-21 en el grupo de NL, y una tendencia de miR146a en el grupo de NL.

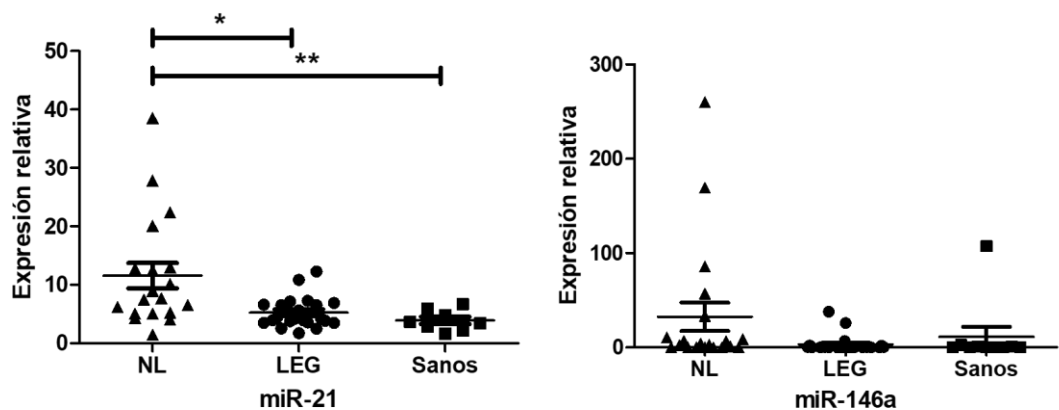


Figura 23 miR-21 y miR-146a incrementan en NL activa.
 Expresión relativa de miR21 (panel izquierdo) y miR146a (panel derecho) proveniente de las VEs aisladas de orina en individuos con NL, LEG y sanos.

Con estos resultados se alcanzaron los objetivos planteados en la estancia de 3 meses, observando que efectivamente las VEs se encuentran enriquecidas en la orina de pacientes con nefropatía lúpica activa, y que además se pueden usar miRNAs como posibles biomarcadores para la enfermedad.

Discusión

5.0 Discusión

En el presente estudio, fueron planteadas diversas interrogantes, desde elegir la metodología para poder obtener vesículas extracelulares urinarias con el mejor rendimiento, y posteriormente la tinción para la citometría de flujo, hasta el análisis correcto de los datos obtenidos.

Debido al interés aumentado por identificar biomarcadores útiles en las vesículas extracelulares, así como el uso de diversos fluidos biológicos para su búsqueda, se han implementado diversas metodologías para el aislamiento y sus posteriores usos.

Nosotros decidimos aislar VEs de orina, principalmente por ser un fluido de fácil obtención, no invasivo, y al estudiar a la nefropatía lúpica el principal daño ocurre en el riñón, aunque se ha visto que el análisis de VEs urinarias permite conocer el estado de un individuo sano, así como de otras enfermedades no relacionadas con el riñón (14,38,90,91,82–89).

Después de una revisión exhaustiva de la literatura, se decidió probar dos metodologías para el aislamiento de las VEs urinarias: PEG y ultracentrifugación (67,82,92,93) más el uso o no de algún agente reductor. El uso del agente reductor se justifica para eliminar a la proteína Tamm-Horsfall, cuya presencia se incrementa cuando hay daño renal, y esta proteína genera que las VEs urinarias se peguen entre ellas, disminuyendo la obtención de estas (94–97). La metodología más usada por ser de las más baratas y reportada en diversos estudios es la ultracentrifugación (98,99), la cual también se usó en este estudio, ya que se obtuvo un mejor rendimiento de VEs urinarias, al compararse con el uso de PEG, sumado al hecho de que posteriormente se realizó una comparación por tamaño de las VEs por citometría de flujo y el que las muestras fueran lo más puras posibles, es decir sin la presencia de PEG era lo ideal (93,100).

Una vez estandarizada la metodología, se demostró el aislamiento de las VEs urinarias tal y como lo establece (99), usando Western blot para evidenciar la presencia de moléculas enriquecidas en VEs como lo son CD9, CD81 y Tsg101, y su ausencia en las fracciones urinarias, así como el cuantificar y clasificar por tamaño a las VEs por citometría de flujo.

Una vez ya obtenidas las VEs urinarias, se lisaron para su cuantificación de proteína, aproximación que nos permite conocer la cantidad de VEs presentes en la muestra (101) y poder realizar la comparación entre los diferentes grupos; tanto los pacientes con LEG activo como con NL activa presentaron mayor cantidad de proteína, así como de número aproximado de VEs totales, resultado esperado ya que tanto el LEG como su complicación la NL son enfermedades autoinmunes favorecidas por la activación celular y la estimulación lleva a generar VEs (102), así como en estos pacientes se conoce que presentan mayor cantidad de esfingolípidos y ceramidas (103,104), que posiblemente interactúan con Rab31 y flotilina generando mayor secreción de VEs y en consecuencia el incremento de la cantidad de proteína (105,106).

Debido a que en el grupo de trabajo al cual pertenezco, se investiga el papel de las células B en LEG, y por los antecedentes directos (49,107), decidimos buscar la presencia de tetraspanina 33 en las VEs urinarias usando Western blot, la cual está incrementada, encontrando diversas bandas, es decir a la proteína con diferentes conformaciones, debido a las glicosilaciones que presenta, sumado al estar presente en los microdominios enriquecidos de tetraspaninas (TEMs), que no se separan tan fácilmente (54,107). Además al estar incrementada ADAM10 en VEs urinarias de pacientes con NL (108), confirma el resultado obtenido, y los pacientes en remisión presentan menor cantidad de TSPAN33.

Aunado a la caracterización de TSPAN33 en las VEs urinarias, decidimos analizar también a la metaloproteasa ADAM10, y a las tetraspaninas presentes en VEs de células B, CD37 y CD53. Por lo cual, se tuvo que

estandarizar la tinción directa de las VEs urinarias para su posterior captura en el citómetro de flujo BD Accuri C6, un citómetro que al usar una bomba peristáltica para la generación del flujo, permite controlar la cantidad de muestra a analizar, así como se demostró que puede diferenciar entre los distintos tamaños de las VEs (81). Y con el uso de la molécula fluorescente denominada éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE), la cual al ser hidrolizada fluoresce uniéndose a las aminas, y ya no sale de la VE (109–111), permitiéndonos distinguir entre VE y ruido de fondo.

Nos preguntamos si tan solo la presencia de LEG activo era suficiente para poder encontrar diferencias entre la cantidad absoluta de VEs, y VEs positivas a las proteínas buscadas, no se obtuvo diferencia significativa, pero si una tendencia a mayor número de VEs totales, así como VEs positivas a las proteínas buscadas en los pacientes con LEG activo, mientras que los individuos sanos y pacientes con LEG inactivo presentaban menor número, debido a que no presentan células activadas y por ende la producción de VEs está disminuida (112–115).

Al no tener resultados concluyentes, decidimos evaluar la intensidad media de fluorescencia (IMF), para cada una de las proteínas, tanto en VEs totales, como por tamaño, encontrando que las VEs urinarias de pacientes con LEG activo presentan menor IMF para cada una de las proteínas evaluadas al compararlas con los pacientes con LEG inactivo y los individuos sanos, nuestra hipótesis es que al secretar mayor cantidad de VEs urinarias en los pacientes con LEG activo, las proteínas evaluadas se diluyan en la superficie de las VEs, mientras que en los sanos como LEG inactivo al haber menor secreción de VEs, las proteínas se concentren.

Una vez visto que, si hay diferencias en LEG activo contra inactivo, se procedió a comparar las VEs urinarias de los pacientes con NL activa, contra los seis meses de seguimiento y los individuos sanos. Los pacientes con NL activa presentaron mayor número absoluto de VEs urinarias (116), y una tendencia en VEs positivas a TSPAN33, ADAM10, CD37 y CD53.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gutwein, et al., incrementó de ADAM10 en las VEs urinarias aisladas de pacientes con NL activa, aunque es evaluado por Western blot (108). Asimismo, se obtuvo la IMF para las proteínas evaluadas en VEs totales, como por tamaño, los individuos sanos presentaron mayor IMF para TSPAN33, ADAM10, CD37 y CD53 al compararlo con NL activa y a los 6 meses de seguimiento, es mayor la diferencia significativa con NL activa. Nuestra hipótesis es que tanto CD37 como CD53 son tetraspaninas importantes en las células B, principalmente para el mantenimiento y supervivencia de las células plasmáticas, las cuales están generando in situ los autoanticuerpos, exacerbando la NL. Por consiguiente, la célula B está usando las tetraspaninas y por lo tanto no las está reclutando en las VEs, debido a la patogenia de esta enfermedad. Además de la participación in situ de las tetraspaninas en la patogenia, también pudiera ser que las VEs con alto contenido de estas tetraspaninas en lugar de secretarse en la orina se estén quedando en el parénquima renal, favoreciendo la enfermedad (116–121). Lo mismo podríamos argumentar para TSPAN33 y ADAM10, siendo ADAM10 responsable también a su vez de la patogenia de la enfermedad, así como TSPAN33 regula la actividad metaloproteasa de ADAM10 (122–125).

Una manera más fidedigna de saber si lo encontrado puede impactar directamente con la presencia de enfermedad, así como de si las variables evaluadas correlacionan o no, es mediante la generación de una matriz de asociación. Encontramos que SLEDAI correlaciona positivamente con número de VEs, la cantidad de proteína, número de VEs positivas para TSPAN33, CD37, CD53 y ADAM10. El SLEDAI es el dato que nos indica presencia de enfermedad activa, así que con esto podemos concluir que estas variables evaluadas son de mal pronóstico para nuestros pacientes. también es importante mencionar que las mayores asociaciones se dieron con CD53, como ya se mencionó anteriormente es una tetraspanina involucrada en el desarrollo y mantenimiento de tolerancia de células B, lo que explicaría estas asociaciones.

Desafortunadamente se tiene que señalar que se tuvo una muestra muy pequeña de pacientes, por lo cual es importante ampliar la muestra y verificar que los datos obtenidos en la presente tesis sean reproducibles.

Parte del proyecto consideraba la búsqueda de miRNAs presentes en las VEs urinarias de pacientes con NL activa, LEG inactivo e individuos sanos. El abordaje fue realizado en una estancia en el Instituto Feinstein. Debido a la pandemia de COVID-19, solamente se obtuvieron resultados sin el historial médico de los pacientes. A pesar de esto, observamos que los resultados obtenidos con la cohorte mexicana se reproducen, es decir al tener NL activa hay mayor secreción de VEs urinarias. También encontramos mayor expresión del miR-21 y miR146a en los pacientes con NL activa, resultados que ya se han reportado en otras cohortes (126–130), aunque en nuestro caso en particular se uso un housekeeping como control, para normalizar los datos obtenidos.

Conclusiones

6.0 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y de lo expuesto anteriormente se puede

concluir de este trabajo de tesis que:

- El número y cantidad de proteína de VEs correlaciona con parámetros clínicos en LEG y NL.
- La presencia de TSPAN33, ADAM10, CD37 y CD53 en las VEs correlaciona, se pueden proponer como biomarcadores.
- El número y cantidad de proteína en las VEs de la cohorte de pacientes afroamericanas con NL activa se encuentran incrementados, así como miR-21 y miR-146a

Perspectivas

7.0 Perspectivas

La NL al ser una de las principales complicaciones del LEG, ha hecho que se sigan buscando maneras no invasivas para anticipar si los pacientes están respondiendo al tratamiento o no, el presente proyecto nos aporta que la orina se puede usar para aislar vesículas extracelulares, y estas pudieran usarse como biomarcadores de pronóstico, así como la presencia de TSPAN33, ADAM10, CD37 y CD53. Sin embargo, hace falta demostrarlo en una mayor cohorte de pacientes, con seguimiento de por lo menos un año.

Asimismo, se deben realizar experimentos con ratones humanizados con LEG y sin la enfermedad, marcando las VEs positivas a las proteínas evaluadas, y observar donde se quedan estas VEs o si son excretadas en orina.

8.0 Referencias

1. Rubtsov A V., Rubtosva K, Kappler JW, Marrack P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2010;9(7):494–8.
2. Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, Satterthwaite AB, Fairhurst A-M, Davis LS. The SLE review series: working for a better standard of care Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology [Internet].* 2017 [cited 2017 Jul 31];56:i55–66. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5410978/pdf/kew427.pdf>
3. Franceschini F, Cavazzana I. Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies. *Autoimmunity.* 2005;38(1):55–63.
4. Meffre E. The establishment of early B cell tolerance in humans: Lessons from primary immunodeficiency diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1246(1):1–10.
5. Park H-J, Kim D-H, Lim S-H, Kim W-J, Youn J, Choi Y-S, et al. Insights into the Role of Follicular Helper T Cells in Autoimmunity. *Immune Netw [Internet].* 2014;14(1):21–9. Available from:
<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2014.14.1.21>
6. Taher TE, Bystrom J, Ong VH, Isenberg DA, Renaudineau Y, Abraham DJ, et al. Intracellular B Lymphocyte Signalling and the Regulation of Humoral Immunity and Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol [Internet].* 2017 [cited 2017 Jul 31]; Available from:
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12016-017-8609-4.pdf>
7. Lu R, Munroe ME, Guthridge JM, Bean KM, Fife DA, Chen H, et al. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. *J Autoimmun [Internet].* 2016;74:182–93. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.06.001>
8. Lee KH, Kronbichler A, Park DD-Y, Park Y, Moon H, Kim H, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review [Internet]. *Autoimmunity Reviews.* Elsevier B.V; 2017. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997217302367>

9. Torres-Ruiz J, Rull-Gabayet M, Mejía-Domínguez NR, Carrillo-Vázquez DA, Reyes-Islas JA, Cassiano-Quezada F, et al. Disease activity is associated with changes in the innate immune function in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2024;43(1):501–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10067-023-06810-6>
10. Berggren O, Hagberg N, Alexsson A, Weber G, Rönnblom L, Eloranta ML. Plasmacytoid dendritic cells and RNA-containing immune complexes drive expansion of peripheral B cell subsets with an SLE-like phenotype. *PLoS One*. 2017;12(8):1–16.
11. Uribe AG, Vilá LM, McGwin G, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2004;31(10):1934–40.
12. Yee CS, Cresswell L, Farewell V, Rahman A, Teh LS, Griffiths B, et al. Numerical scoring for the BILAG-2004 index. *Rheumatology*. 2010;49(9):1665–9.
13. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002;29(2):288–91.
14. Zhang W, Yuan M, Hong L, Zhou Q, Chen W, Yang S, et al. Clinical outcomes of lupus nephritis patients with different proportions of crescents. *Lupus*. 2016;25(14):1532–41.
15. Touma Z, Urowitz MB, Ibañez D, Gladman DD. Time to recovery from proteinuria in patients with lupus nephritis receiving standard treatment. *J Rheumatol*. 2014;41(4):688–97.
16. Tang Y, Qin W, Peng W, Tao Y. Development and validation of a prediction score system in lupus nephritis. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017;96(37):e8024. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28906386>
17. Pons-Estel GJ, Catoggio LJ, Cardiel MH, Bonfa E, Caeiro F, Sato E, et al. Lupus in Latin-American patients: Lessons from the GLADEL cohort. *Lupus*. 2015;24(6):536–45.
18. Walker PD. The Renal Biopsy. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(2):181–8.

19. Lewis EJ, Kawala K, Schwartz MM. Histologic features that correlate with the prognosis of patients with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 1987;10(3):192–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3631068
20. Markowitz GS, D'Agati VD. Classification of lupus nephritis. Vol. 18, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2009. p. 220–5.
21. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Lupus nephritis: Pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. Vol. 19, *Lupus*. 2010. p. 557–74.
22. Barrera-Cruz A, Prieto-Parra RE, Sánchez-Barbosa JL, Yáñez-Sánchez P. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y tratamiento de la nefropatía lúpica en pacientes mayores de 18 años de edad [Internet]. 2010. 1–82 p. Available from: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/037GER.pdf>
23. Polanco-Flores NA, Soto-Abraham MV, Rodríguez-Castellanos FE. Biopsia renal seriada en nefropatía lúpica: ¿es necesaria? *Diálisis y Traspl.* 2014;35(3):90–7.
24. Bajaj S, Albert L, Gladman DD, Urowitz MB, Hallett DC, Ritchie S. Serial renal biopsy in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2000;27(12):2822–6.
25. Stillman IE. The Pathology of Lupus Nephritis. In: *Systemic Lupus Erythematosus: Basic, Applied and Clinical Aspects* [Internet]. Elsevier; 2016. p. 351–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801917-7.00041-3>
26. Schwartz N, Goilav B, Putterman C. The pathogenesis, diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2014;26(5):502–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002281-201409000-00007>
27. Rovin BH, Parikh S V. Lupus nephritis: the evolving role of novel therapeutics. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2014;63(4):677–90. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272638613015692>

28. Cheng Q, Mumtaz IM, Khodadadi L, Radbruch A, Hoyer BF, Hiepe F. Autoantibodies from long-lived “memory” plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2013;72(12):2011–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114925> <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/annrheumdis-2013-203455>
29. Espeli M, Bokers S, Giannico G, Dickinson HA, Bardsley V, Fogo AB, et al. Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *Am Soc Nephrol* [Internet]. 2011;22(2):296–305. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2010050515>
30. Ripoll È, Merino A, Goma M, Aran JM, Bolaños N, de Ramon L, et al. CD40 Gene Silencing Reduces the Progression of Experimental Lupus Nephritis Modulating Local Milieu and Systemic Mechanisms. *PLoS One*. 2013;8(6).
31. Sun CY, Shen Y, Chen XW, Yan YC, Wu FX, Dai M, et al. The characteristics and significance of locally infiltrating B Cells in lupus nephritis and their association with local BAFF expression. *Int J Rheumatol*. 2013;2013.
32. Chan TM. Treatment of severe lupus nephritis: The new horizon. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2014;11(1):46–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2014.215>
33. Zomer A, Vendrig T, Hopmans ES, van Eijndhoven M, Middeldorp JM, Pegtel DM. Exosomes. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2010;3(5):447–50. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cib.3.5.12339>
34. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* [Internet]. 2013 Feb 18;200(4):373 LP – 383. Available from: <http://jcb.rupress.org/content/200/4/373.abstract>
35. Raposo G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* [Internet]. 1996;183(3):1161–72. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.183.3.1161>
36. Pomatto MAC, Gai C, Bussolati B, Camussi G. Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2017;4(June):1–22. Available from:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2017.00037/full>

37. Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borràs FE. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Front Immunol*. 2015;6(JAN):1–10.
38. Ranghino A, Dimuccio V, Papadimitriou E, Bussolati B. Extracellular vesicles in the urine: Markers and mediators of tissue damage and regeneration. *Clin Kidney J*. 2015;8(1):23–30.
39. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2014 Sep 16];6(10):801–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314869>
40. Huang S, Yuan S, Dong M, Su J, Yu C, Zhang S, et al. The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell – cell interactions from unicellular to multicellular organisms i. 2005;86:674–84.
41. Stipp CS, Kolesnikova T V, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. 2003;28(2):23–5.
42. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2005 Feb [cited 2014 Dec 19];5(2):136–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688041>
43. Garcia-España A, Chung P-J, Sarkar IN, Stiner E, Sun T-T, DeSalle R. Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics* [Internet]. 2008 [cited 2017 May 31];91(4):326–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754307003084>
44. Yáñez-Mó M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol*. 2009;19(9):434–46.
45. Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, et al. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell* [Internet]. 2016;167(4):1041-1051.e11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056>
46. van Deventer SJ, Dunlock V-ME, van Spriël AB. Molecular interactions shaping the tetraspanin web. *Biochem Soc Trans* [Internet].

- 2017;45(3):741–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28620035>
47. Chen Z, Pasquini M, Hong B, DeHart S, Heikens M, Tsai S. The human Penumbra gene is mapped to a region on chromosome 7 frequently deleted in myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2005 Oct 15 [cited 2017 May 31];162(2):95–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213355>
 48. Heikens MJ, Cao TM, Morita C, DeHart SL, Tsai S. Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis. *Blood*. 2007;109(8):3244–52.
 49. Luu VP, Hevezi P, Vences-Catalan F, Maravillas-Montero JL, White CA, Casali P, et al. TSPAN33 is a novel marker of activated and malignant B cells. *Clin Immunol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2014 Dec 19];149(3):388–99. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3956131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 50. Pérez-Martínez CA, Maravillas-Montero JL, Meza-Herrera I, Vences-Catalán F, Zlotnik A, Santos-Argumedo L. Tspan33 is Expressed in Transitional and Memory B Cells, but is not Responsible for High ADAM10 Expression. *Scand J Immunol* [Internet]. 2017;86(1):23–30. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/sji.12559>
 51. Dornier E, Coumailleau F, Ottavi JF, Moretti J, Boucheix C, Mauduit P, et al. Tspanc8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *J Cell Biol*. 2012;199(3):481–96.
 52. Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ, Gooz M. A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 1$ integrin in kidney mesangial cells. *PLoS One*. 2012;7(3):1–9.
 53. Matthews AL, Noy PJ, Reyat JS, Tomlinson MG. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* [Internet]. 2016;7104(July):1–9. Available from:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537104.2016.1184751%5C>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27256961>

54. Noy PJ, Yang J, Reyat JS, Matthews AL, Charlton AE, Furnston J, et al. TspanC8 tetraspanins and a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) interact via their extracellular regions: Evidence for distinct binding mechanisms for different TspanC8 proteins. *J Biol Chem.* 2016;291(7):3145–57.
55. Keller S, Ridinger J, Rupp A-K, Janssen JW, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* [Internet]. 2011;9(86):1–9. Available from: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-86>
56. Zhang J, Li S, Mi S, Li L. Exosome and Exosomal MicroRNA : Trafficking , Sorting , and Function. *Genomics Proteomics Bioinforma.* 2015;13:17–24.
57. Goldie BJ, Dun MD, Lin M, Smith ND, Verrills NM, Dayas C V., et al. Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(14):9195–208.
58. Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles.* 2016;5(1):1–11.
59. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrnas regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem.* 2013;288(15):10849–59.
60. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp I V., van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 2014;8(6):1649–58.
61. Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* [Internet]. 2010;465(7299):818–22. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09039>
62. Dai Y, Huang Y-S, Tang M, Lv T-Y, Hu C-X, Tan Y-H, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* [Internet]. 2007;16(12):939–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042587> <http://lup.sagepub.co>

m/cgi/doi/10.1177/0961203307084158

63. Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int.* 2009;29(7):749–54.
64. Te JL, Dozmorov IM, Guthridge JM, Nguyen KL, Cavett JW, Kelly JA, et al. Identification of unique MicroRNA signature associated with lupus nephritis. *PLoS One.* 2010;5(5):1–7.
65. Wang G, Tam L, Li E, Kwan B, Chow K, Luk C, et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2011;20(5):493–500. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0961203310389841>
66. Ramachandran K, Saikumar J, Bijol V, Koyner JL, Qian J, Betensky RA, et al. Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clin Chem.* 2013;59(12).
67. Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R, Redon J. Increased urinary exosomal micrnas in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2015;10(9):1–16.
68. Chafin CB, Reilly CM. MicroRNAs implicated in the immunopathogenesis of lupus nephritis. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013.
69. Kramer NJ, Wang W Le, Reyes EY, Kumar B, Chen CC, Ramakrishna C, et al. Altered lymphopoiesis and immunodeficiency in miR-142 null mice. *Blood.* 2015;125(24):3720–30.
70. Liu L, Liu S, Duan Q, Chen L, Wu T, Qian H, et al. MicroRNA-142-5p promotes cell growth and migration in renal cell carcinoma by targeting BTG3. *Am J Transl Res.* 2017;9(5):2394–402.
71. Li J, Wan Y, Ji Q, Fang Y, Wu Y. The role of microRNAs in B-cell development and function. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2013;10(2):107–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2012.62>
72. Stagakis E, Bertias G, Verginis P, Nakou M, Hatzia Apostolou M, Kritikos H, et al. Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: MiR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(8):1496–506.

73. Wang G, Tam L, Kwan BC, Li EK, Chow K, Luk CC, et al. Expression of miR-146a and miR-155 in the urinary sediment of systemic lupus erythematosus. *2012;(June 2008):435–40.*
74. Wang Z, Chang C, Peng M, Lu Q. Translating epigenetics into clinic: focus on lupus. *Clin Epigenetics [Internet]. 2017;9(1):78.* Available from: <http://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-017-0378-7>
75. Li Y, Zhao M, Yin H, Gao F, Wu X, Luo Y, et al. Overexpression of the growth arrest and DNA damage-induced 45 α gene contributes to autoimmunity by promoting DNA demethylation in lupus T cells. *Arthritis Rheum. 2010;62(5):1438–47.*
76. Gonzalez-Martin A, Adams BD, Lai M, Shepherd J, Salvador-Bernaldez M, Salvador JM, et al. The microRNA miR-148a functions as a critical regulator of B cell tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol. 2016;17(4):433–40.*
77. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146a Contributes to Abnormal Activation of the Type I Interferon Pathway in Human Lupus by Targeting the Key Signaling Proteins. *2009;60(4):1065–75.*
78. Perez-Hernandez J, Cortes R. Extracellular vesicles as biomarkers of systemic lupus erythematosus. *Dis Markers. 2015;2015.*
79. Rodríguez-Galán A, Fernández-Messina L, Sánchez-Madrid F. Control of immunoregulatory molecules by miRNAs in T cell activation. *Front Immunol. 2018;9(SEP):1–10.*
80. Hanly JG, O’Keeffe AG, Su L, Urowitz MB, Romero-Diaz J, Gordon C, et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: Results from an international inception cohort study. *Rheumatol (United Kingdom). 2015;55(2):252–62.*
81. Navarro-Hernandez IC, Acevedo-Ochoa E, Juárez-Vega G, Meza-Sánchez DE, Hernández-Hernández JM, Maravillas-Montero JL. Size Determination and Phenotypic Analysis of Urinary Extracellular Vesicles using Flow Cytometry. *J Vis Exp [Internet]. 2021 Apr 23 [cited 2021 Apr 28];(170):e61695.* Available from: <https://www.jove.com/v/61695/size-determination-phenotypic-analysis-urinary-extracellular-vesicles>
82. Royo F, Zuñiga-Garcia P, Sanchez-Mosquera P, Egia A, Perez A, Loizaga

- A, et al. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J Extracell vesicles* [Internet]. 2016;5(7):29497. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4759834&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Wang S, Kojima K, Mobley JA, West AB. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles reveal biomarkers for neurologic disease. *EBioMedicine* [Internet]. 2019;45:351–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.021>
 84. Anca MD, Fenoglio C, Serpente M, Arosio B, Cesari M, Scarpini EA, et al. Exosome Determinants of Physiological Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. 2019;11(August):1–13.
 85. Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. Microvesicles and exosomes: New players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol*. 2016;228(2):R57–71.
 86. Lee S, Mankhong S, Kang J-H. Extracellular Vesicle as a Source of Alzheimer’s Biomarkers: Opportunities and Challenges. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019;20(7):1728. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/7/1728>
 87. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab* [Internet]. 2019;8:1–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413119303845>
 88. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(12):731–49.
 89. Thongboonkerd V. Roles for exosome in various kidney diseases and disorders. *Front Pharmacol*. 2020;10(January):1–14.
 90. Svenningsen P, Sabaratnam R, Jensen BL. Urinary extracellular vesicles: Origin, role as intercellular messengers and biomarkers; efficient sorting and potential treatment options. *Acta Physiologica*. 2019. 0–2 p.
 91. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, et al. Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary

- biomarkers. *Nephrology*. 2005;10(3):283–90.
92. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG. ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2016;6(March):1–14.
 93. Lv C, Ding W, Wang Y, Zhao Z, Li J, Chen Y, et al. A PEG-based method for the isolation of urinary exosomes and its application in renal fibrosis diagnostics using cargo miR-29c and miR-21 analysis. *Int Urol Nephrol* [Internet]. 2018;(0123456789). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11255-017-1779-4>
 94. Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int*. 2010;77(8):736–42.
 95. Micanovic R, Lafavers K, Garimella PS, Wu XR, El-Achkar TM. Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): Guardian of urinary and systemic homeostasis. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35(1):33–43.
 96. Xu X, Barreiro K, Musante L, Kretz O, Lin H, Zou H, et al. Management of Tamm–Horsfall Protein for Reliable Urinary Analytics. *Proteomics - Clin Appl*. 2019;13(6):1–10.
 97. Wu TH, Li KJ, Yu CL, Tsai CY. Tamm–Horsfall protein is a potent immunomodulatory molecule and a disease biomarker in the urinary system. *Molecules*. 2018;23(1).
 98. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1).
 99. Erdbrügger U, Blijdorp CJ, Bijnsdorp I V, Borràs FE, Burger D, Bussolati B, et al. Urinary extracellular vesicles: A position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles Metka Lenassi □□ Janne Leivo □□ Inge Mertens □□ Luca Musante □. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1002/jev2.12093>
 100. Musante L, Bontha SV, Salvia S La, Fernandez-piñeros A, Lannigan J, Le TH, et al. Rigorous characterization of urinary extracellular vesicles (uEVs

-) in the low centrifugation pellet - a neglected source for uEVs. *Sci Rep.* 2020;10(3701):1–14.
101. Freyssinet JM, Toti F. Membrane microparticle determination: At least seeing what's being sized! *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):311–4.
 102. Maione F, Cappellano G, Bellan M, Raineri D, Chiocchetti A. Chicken-or-egg question: Which came first, extracellular vesicles or autoimmune diseases? *J Leukoc Biol.* 2020;(January):1–16.
 103. Li Y, Liang L, Deng X, Zhong L. Lipidomic and metabolomic profiling reveals novel candidate biomarkers in active systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2019;12(3):857–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31933894><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6945160>
 104. Harden OC, Hammad SM. Sphingolipids and Diagnosis, Prognosis, and Organ Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2020;11(September):1–14.
 105. Wei D, Zhan W, Gao Y, Huang L, Gong R, Wang W, et al. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Res* [Internet]. 2021;31(2):157–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-020-00409-1>
 106. Kenific CM, Zhang H, Lyden D. An exosome pathway without an ESCRT. *Cell Res.* 2020;31:105–6.
 107. Navarro-Hernandez IC, López-Ortega O, Acevedo-Ochoa E, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Sosa-Hernández VA, et al. Tetraspanin 33 (TSPAN33) regulates endocytosis and migration of human B lymphocytes by affecting the tension of the plasma membrane. *FEBS J.* 2020;33:1–23.
 108. Gutwein P, Schramme A, Abdel-Bakky MS, Doberstein K, Hauser IA, Ludwig A, et al. ADAM10 is expressed in human podocytes and found in urinary vesicles of patients with glomerular kidney diseases. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):1–9.
 109. Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, Lasič E, Zorec R, Plemenitaš A, et al. PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2018;1860(6):1350–61.

110. Morales-Kastresana A, Telford B, Musich TA, McKinnon K, Clayborne C, Braig Z, et al. Labeling extracellular vesicles for nanoscale flow cytometry. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–10.
111. van der Pol E, Coumans FAW, de Rond L, Hau CM, Sturk A, Varga Z, et al. Comparison of Generic Fluorescent Markers for Detection of Extracellular Vesicles by Flow Cytometry. *Clin Chem*. 2018;64(4):680–9.
112. López P, Rodríguez-Carrio J, Caminal-Montero L, Suárez A. Relationship Between T-Cell Exosomes and Cellular Subsets in SLE According to Type I IFN-Signaling. *Front Med*. 2020;7(November):1–10.
113. Tan L, Wu H, Liu Y, Zhao M, Li D, Lu Q. Recent advances of exosomes in immune modulation and autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2016;49(6):357–65.
114. López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, Caminal-Montero L, Suárez A. Circulating microparticle subpopulations in systemic lupus erythematosus are affected by disease activity. *Int J Cardiol* [Internet]. 2017;236:138–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.02.107>
115. Lee JY, Park JK, Lee EY, Lee EB, Song YW. Circulating exosomes from patients with systemic lupus erythematosus induce a proinflammatory immune response. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2016;18(1):264. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-1159-y>
116. Zhao Y, Wei W, Liu ML. Extracellular vesicles and lupus nephritis - New insights into pathophysiology and clinical implications. *J Autoimmun* [Internet]. 2020;115(July):102540. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102540>
117. Van Sriel AB, Sofi M, Gartlan KH, Van Schaaf A Der, Verschueren I, Torensma R, et al. The tetraspanin protein CD37 regulates IgA responses and anti-fungal immunity. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):1–11.
118. van Sriel AB, Sofi M, Gartlan KH, van der Schaaf A, Verschueren I, Torensma R, et al. The tetraspanin protein CD37 regulates IgA responses and anti-fungal immunity. *PLoS Pathog* [Internet]. 2009 Mar [cited 2014 Dec 19];5(3):e1000338. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2650281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

119. Dunlock VE. Tetraspanin CD53: an overlooked regulator of immune cell function. *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 2020;209(4):545–52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00677-z>
120. Demaria MC, Yeung L, Peeters R, Wee JL, Mihaljcic M, Jones EL, et al. Tetraspanin CD53 Promotes Lymphocyte Recirculation by Stabilizing L-Selectin Surface Expression. *iScience* [Internet]. 2020;23(5):101104. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101104>
121. Greenberg ZJ, Monlish DA, Bartnett RL, Yang Y, Shen G, Li W, et al. The Tetraspanin CD53 Regulates Early B Cell Development by Promoting IL-7R Signaling. *J Immunol*. 2020;204(1):58–67.
122. Orme JJ, Du Y, Vanarsa K, Mayeux J, Li L, Mutwally A, et al. Heightened cleavage of Axl receptor tyrosine kinase by ADAM metalloproteases may contribute to disease pathogenesis in SLE. *Clin Immunol*. 2016;169:58–68.
123. Eschenbrenner E, Jouannet S, Clay D, Chaker J, Boucheix C, Brou C, et al. TspanC8 tetraspanins differentially regulate ADAM10 endocytosis and half-life. *Life Sci Alliance*. 2020;3(1):1–19.
124. Saint-Pol J, Eschenbrenner E, Dornier E, Boucheix C, Charrin S, Rubinstein E. Regulation of the trafficking and the function of the metalloprotease ADAM10 by tetraspanins. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2017;45(4):937–44. Available from: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST20160296>
125. Ruiz-García A, López-López S, García-Ramírez JJ, Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, López-Sanz L, et al. The Tetraspanin TSPAN33 Controls TLR-Triggered Macrophage Activation through Modulation of NOTCH Signaling. *J Immunol*. 2016;197(8):3371–81.
126. Miao C, Wang X, Zhou W, Huang J. The emerging roles of exosomes in autoimmune diseases , with special emphasis on microRNAs in exosomes. *Pharmacol Res* [Internet]. 2021;169(April):105680. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105680>
127. Li Y, Xu X, Tang X, Bian X, Shen B, Zhao H, et al. MicroRNA expression profile of urinary exosomes in Type IV lupus nephritis complicated by

- cellular crescent. *J Biol Res*. 2018;25(1):1–13.
128. Li W, Liu S, Chen Y, Weng R, Zhang K, He X, et al. Circulating exosomal micrnas as biomarkers of systemic lupus erythematosus. *Clinics*. 2020;75(13):1–6.
129. Solé, Moliné, Vidal, Ordi-Ros, Cortés-Hernández. An Exosomal Urinary miRNA Signature for Early Diagnosis of Renal Fibrosis in Lupus Nephritis. *Cells*. 2019;8(8):773.
130. Perez-Hernandez J, Martinez-Arroyo O, Ortega A, Galera M, Solis-Salguero MA, Chaves FJ, et al. Urinary exosomal miR-146a as a marker of albuminuria, activity changes and disease flares in lupus nephritis. *J Nephrol* [Internet]. 2020;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s40620-020-00832-y>

*Productos
publicados del
trabajo
experimental*



CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

The certificate of acceptance for the manuscript (**diagnostics-3141893**) titled:
Urine Extracellular Vesicles Size Subsets as Lupus Nephritis Biomarkers.

Authored by:

Itze Cecilia Navarro-Hernandez; Raúl F. Reyes-Huerta; Mariana Cañez-Hernández; Jiram Torres-Ruiz; Daniel
Alberto Carrillo-Vázquez; Laura Patricia Witthall-García;
David Eduardo Meza-Sánchez; Guillermo Juárez-Vega; Diana Gómez-Martín; José Manuel Hernández-
Hernández; José Luis Maravillas Montero

was accepted in *Diagnostics* (ISSN 2075-4418) on 05 September 2024

Brief Report

Urine Extracellular Vesicles Size Subsets as Lupus Nephritis Biomarkers.

Itze C. Navarro-Hernandez ^{1,2}, Raúl F. Reyes-Huerta ^{1,3}, Mariana Cañez-Hernández ¹, Jiram Torres-Ruiz ⁴, Daniel A. Carrillo-Vázquez ⁴, Laura P. Whittall-García ⁴, David E. Meza-Sánchez ^{1,5}, Guillermo Juárez-Vega ⁵, Diana Gómez-Martin ⁴, José M. Hernández-Hernández ^{2,*} and José L. Maravillas-Montero ^{1,5,*}

¹ B cell Immunobiology Laboratory, Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

² Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico.

³ Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

⁴ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.

⁵ Red de Apoyo a la Investigación, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

⁶

* **Correspondence:** José Luis Maravillas-Montero, E-mail: maravillas@unam.mx; José Manuel Hernández Hernández, E-mail: manolo@cell.cinvestav.mx

Citation: Navarro-Hernandez, I.C.; Reyes-Huerta, R.F.; Cañez-Hernández, M.; Torres-Ruiz, J.; Carrillo-Vázquez, D.A.; Whittall-García, L.P.; Meza-Sánchez, D.E.; Juárez-Vega, G.; Gómez-Martin, D.; Hernández-Hernández, J.M.; et al. Urine Extracellular Vesicles Size Subsets as Lupus Nephritis Biomarkers. *Diagnostics* **2024**, *14*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editors: Ranjan Ramasamy, Corrado Campochiaro and Durga Prasanna Misra

Received: 29 July 2024

Revised: 28 August 2024

Accepted: 5 September 2024

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder that often leads to kidney injury, known as lupus nephritis (LN). Although renal biopsy is the primary way to diagnose LN, it is invasive and not practical for regular monitoring. As an alternative, several groups have proposed urinary extracellular vesicles (uEVs) as potential biomarkers for LN, as recent studies have shown their significance in reflecting kidney-related diseases. As a result, we developed a flow cytometry approach that allowed us to determine that LN patients exhibited a significantly higher total uEV concentration compared to SLE patients without kidney involvement. Additionally, an analysis of different-sized uEV subsets revealed that microvesicles ranging from 0.3 to 0.5 μm showed the most promise for distinguishing LN. These findings indicate that evaluating uEV concentration and size distribution could be a valuable diagnostic and monitoring tool for LN, pending further validation in more comprehensive studies.

Keywords: extracellular vesicles; lupus nephritis; urine; biomarker

1. Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-contained structures secreted by most cell types and are considered central messengers for intercellular communication [1]. These EVs typically contain definite proteins, lipids, and nucleic acids such as microRNAs, tRNA-derived small RNAs, and long non-coding RNAs [2]. They can be categorized into three main classes depending on their cellular source and relative size: exosomes (30–100 nm), microvesicles (100 nm–1 μm), and apoptotic bodies (1–5 μm) [3]. EVs are typically obtained from bodily fluids, such as blood (plasma or serum), saliva, and urine. This accessibility allows for non-invasive sample collection [4,5]. Moreover, EVs represent highly stable particles contained in many samples, besides their molecule enrichment degree or specific molecule presence, which can correlate with the status of many health disorders [6–10].

Urinary EVs (uEVs) present a unique advantage for studying renal diseases, as they can reflect significant pathological changes in the kidneys [11–14]. These vesicles are produced by different cell types within the kidney, such as podocytes, tubular epithelial cells, and endothelial cells. Their composition can vary depending on kidney physiological and pathological conditions [15,16].

Lupus nephritis (LN) is one of the most severe complications and a leading cause of death in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). LN is a form of glomerulonephritis with deposition of immune complexes (ICs) and complement, which results in renal tissue damage in the kidneys of LN patients, endothelial damage, and microthrombi formation [17]. Although renal biopsy has long been considered the “gold standard” for diagnosis of LN [18], its invasive nature and limited scope of renal tissue analysis warrant a more advanced approach. The need for non-invasive and sensitive diagnostic and prognostic methods is evident. Hence, discovering new biomarkers would improve diagnosis and offer additional insights into disease activity, treatment selection, and patient follow-up [19,20].

Interestingly, it has been reported that EVs play a role in developing LN through various mechanisms. These mechanisms include EVs as a source of extracellular or intracellular autoantigens and complement activators [21]. Beyond their pathogenic implications, these uEVs could be proposed as a “liquid biopsy” approach alternative in LN beyond or with conventional blood-associated variables. Recent works have reported their utility in identifying or following up on LN patients by analyzing specific content of the uEVs [22] but ignoring their intrinsic properties, such as their size distribution or abundance. Thus, we decided to study these urinary EVs’ features that could represent potential biomarkers for LN patients, employing a simple flow cytometry approach.

2. Methods

2.1. Sample Collection

First morning urines (15 mL) were collected from 15 LN patients and 11 SLE patients with no kidney involvement at the time of sampling. All the samples were stored at -20°C until used. Laboratory and clinical features confirmed SLE patients without kidney involvement. Besides using the same approach to assess a diagnostic, the patients with LN were assessed by a percutaneous renal biopsy and then classified by their displayed glomerular disease type by means of the criteria established by the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) [23]. Remarkably, all urine samples were obtained from patients no longer than three weeks after performing the renal biopsy procedure. Exclusion criteria included pregnancy or puerperium, any ongoing acute or chronic infection, neoplasia, or patients treated with any biological therapy. All patients in both groups were under immunosuppressive treatment at the time of recruitment. The majority were under prednisone treatment (LN 81 vs. non-LN 90%) and hydroxychloroquine (LN 73.1 vs. non-LN 80%) in both groups. The other most frequent treatments in the lupus nephritis group were cyclophosphamide (LN 35 vs. non-LN 0%) and mycophenolate mofetil (LN 23 vs. non-LN 0%), and in the non-lupus nephritis group were azathioprine (non-LN 25 vs. LN 12%) and methotrexate (non-LN 30 vs. LN 3.8%). None were under B cell-depleting drugs. The characteristics of all these individuals are depicted in Table 1.

All recruited patients signed informed consent forms before being included in our study. The Institutional Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán reviewed and approved our protocol (Ref. 2555) in compliance with the Helsinki Declaration.

Table 1. Main demographics, clinical and laboratory features of SLE/LN patients.

Variable	SLE, Median (IQR) <i>n</i> = 11	SLE with LN, Median (IQR) <i>n</i> = 15	<i>p</i> -Value
Age	28 (21–37)	27 (20–34)	0.3898
Female	10/11	8/15	0.2691
SLEDAI	4 (4–8)	20 (16–22)	0.0001
White blood cell count	4.45 (4.13–5.00)	7.10 (3.55–9.98)	0.2141
Creatinine (serum)	0.72 (0.62–0.81)	2.47 (1.50–3.99)	<0.0001
eGFR	103.50 (115.10–121.20)	28.70 (15.80–49.30)	<0.0001
Creatinine (random urine)	51.00 (37.00–127.00)	76.00 (44.00–171.80)	0.2753
C3	97.00 (71.00–114.00)	48.50 (37.75–58.75)	0.0001
C4	15 (11–21)	8 (8–13)	0.0663
Anti-dsDNA	35.80 (10.38–117.00)	425.00 (33.48–746.90)	0.0428
Classification of Lupus Nephritis by ISN/RPS (<i>n</i>)			
Class IV	-	2	
Class III + V	-	2	-
Class IV + V	-	11	

The differences among groups were analyzed with Mann–Whitney or χ^2 tests. Statistically significant values are shown in bold text. IQR—interquartile range; SLEDAI—Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; eGFR—estimated Glomerular Filtration Rate; C3—complement component 3; C4—complement component C4; anti-dsDNA—antibodies anti-double stranded DNA.

2.2. Extracellular Vesicles Isolation

The urinary extracellular vesicles were isolated, as we previously described, with a protocol validated to minimize the loss and deterioration of EVs [24]. In brief, whole urine (15 mL) was centrifuged at 3000× *g* for 10 min at 4 °C to remove all cell debris and urinary cells. Subsequently, the supernatant was collected and centrifuged at 10,000× *g* for 45 min at 4 °C to dispose of considerable molecular weight particle contamination. The pellet was treated with β -mercaptoethanol to remove the interfering Tamm–Horsfall (THP) protein to obtain a good yield of uEVs. The residual supernatant was then centrifuged at 160,000× *g* for 70 min at 4 °C. Finally, the supernatant was discarded, and the pellet containing uEVs was washed and resuspended in 1 mL of 1X PBS buffer with protease inhibitors (uEVs “stock”). Isolated uEVs were stored at −70 °C until use.

2.3. Flow Cytometry

A total of 20 μ L of each uEVs prepared stock was stained with 0.4 μ L of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [5 nM] for 10 min at 37 °C to allow discrimination between the “background noise” (debris) in the flow cytometry analysis. Samples were then diluted with 400 μ L of cold sterile PBS 1x for immediate analysis on an Accuri C6 cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The usage of this type of cytometer is highly relevant since it is equipped with a fixed flow rate with peristaltic pumps that allow fine-tuning and control of sample volumes. Cytometer capture parameters were set at 100 μ L of total volume at a slow flow rate. Defined-size gating was achieved employing Megamix Plus-FSC (BioCytex, Marseille, France) fluorescent (FL1) beads with the following diameters: 0.1 μ m, 0.3 μ m, 0.5 μ m and 0.9 μ m. This mix was used to establish the area of interest covering each most approximate EV size. This method is also detailed by Navarro-Hernandez et al. [24]. Finally, all data were processed using FlowJo v10.10 software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and the acquired results were normalized using the creatinine in the urine values of each sample to obtain the relative uEV concentration (total or defined by particle size).

2.4. Statistical Analysis

Differences in uEVs between groups were assessed with a Mann–Whitney U test. Additionally, we generated a correlation matrix using Spearman’s rank correlation test between uEV concentrations and the clinical features of SLE/LN patients. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to calculate the area under the curve (AUC) for discernment between LN or non-LN groups. All performed analyses were accomplished using the Prism (GraphPad) v. 10.3.0 software and the R platform, v. 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; available online: <http://www.R-project.org/> (accessed on 4 July 2024).

3. Results

3.1. Urinary EV Concentrations Are Elevated in LN

Employing a previously standardized method that allows setting our flow cytometer to study uEVs within delimited size gates and obtaining reproducible counts, we defined four bead size-defined plot regions to identify particles from 0.1 to 0.9 μm (Figure 1A). Then, we analyzed the enriched uEV preparations from patients’ samples using these parameters, excluding most of the associated debris. Once normalized, uEV counts were compared between lupus and LN-exhibiting patients, finding that 0.1 μm EVs were the most represented ones in both groups but exhibited no differences in the percentual size distribution of urinary vesicles regarding any subset analyzed (Figure 1B). However, we found that the total (all evaluated sizes) uEV concentration was significantly higher in LN patients (Figure 1C). When we analyzed each size-subset concentration, we also found that each of the 0.1, 0.3, and 0.5 μm EVs were significantly more abundant in LN patients’ urine (Table 2).

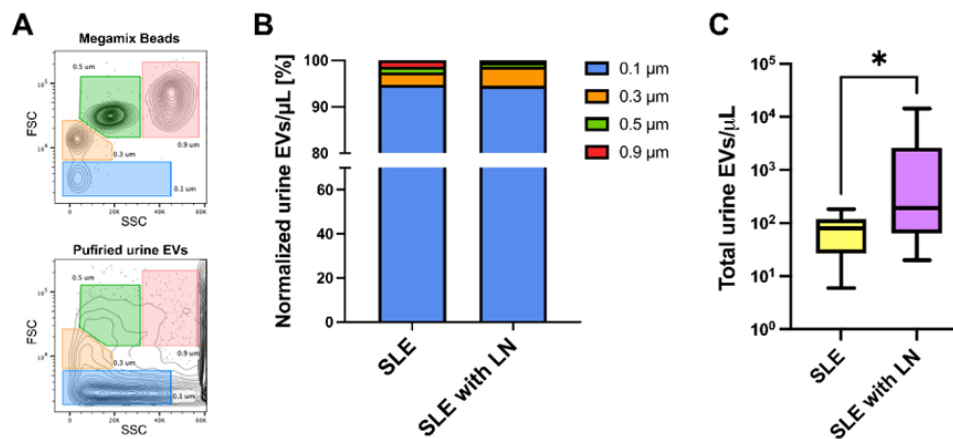


Figure 1. uEVs display no differences in size distribution but exhibit increased concentration in LN. (A) Gates for each bead size (upper panel) employed as a reference to define the relative size of purified uEVs in patient samples (lower panel, showing a representative contour plot). FSC—forward scatter (size); SSC—side scatter (granularity). (B) Size distribution plot displaying normalized mean frequencies of each uEV size subset in SLE vs. LN patients. (C) Total uEV concentration in SLE vs. LN patients. The data were analyzed using the Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$.

Table 2. EV size-subset concentrations in SLE/LN patients.

EV Size-Subset	SLE [EVs/ μ L], Median (IQR)	SLE with LN [EVs/ μ L], Median (IQR)	<i>p</i> -Value
0.1 μ m	28.84 (3.59–43.70)	112.40 (36.34–1573.00)	0.0128
0.3 μ m	0.80 (0.10–1.46)	7.41 (1.07–64.86)	0.0019
0.5 μ m	0.38 (0.05–0.57)	1.44 (0.43–16.21)	0.0031
0.9 μ m	0.24 (0.09–0.46)	0.72 (0.16–9.28)	0.0589

The differences among groups were analyzed with Mann–Whitney U test. Statistically significant values are shown in bold text.

3.2. uEV Concentrations Correlate with Clinical and Laboratory Variables in SLE and LN

To evaluate the clinical relevance of determining the uEV concentrations, we performed analyses of the correlation between the amounts of uEVs and clinical and laboratory features typically assessed in lupus in non-LN/LN patients (Figure 2). Remarkably, all uEV size-subset concentrations displayed significant positive and strong correlations with the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and most of them also exhibited strong but negative correlations with serum concentration of the complement C3 subunit. Additionally, only the concentrations of total uEVs and 0.3 μ m subset displayed moderated correlations with the serum amounts of antibodies' anti-double stranded DNA (anti-dsDNA).

Interestingly, as shown in Figure 2, only the larger uEV subsets of 0.3, 0.5, and 0.9 displayed significant moderate to strong correlations with classical parameters used to evaluate renal status, such as serum creatinine levels (positive correlation) or the estimated glomerular filtration rate (eGFR, negative correlation).

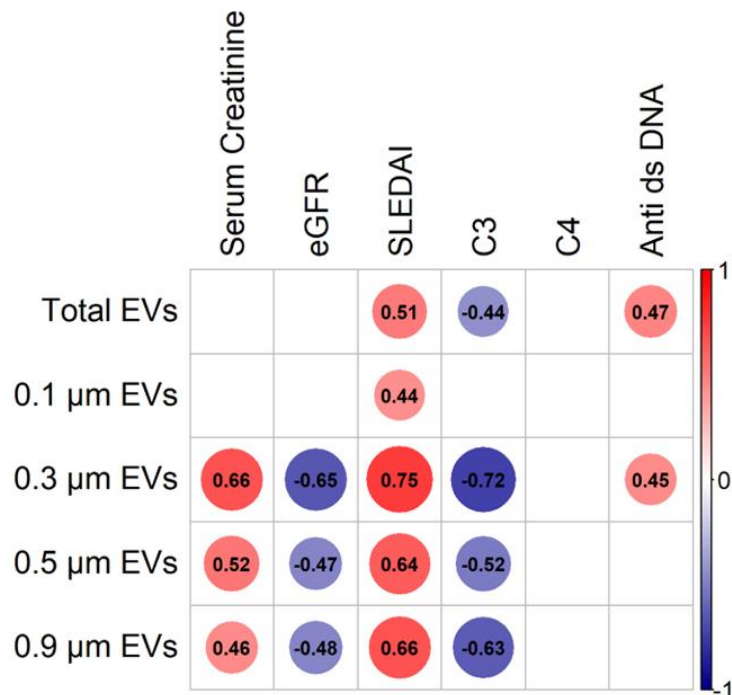


Figure 2. uEV levels correlate with different clinical features in SLE/LN patients. Correlation matrix of the calculated Spearman coefficient between uEV concentrations of different sizes (left side) and clinical characteristics of SLE/LN patients (upper side). The sidebar color scale (right side) indicates

the magnitude of a positive correlation (red) or a negative correlation (blue). The size of each circle represents the correlation coefficient enclosed. All the displayed correlations in the plot are significant ($p < 0.05$), besides the non-significant correlations that are represented with empty white squares.

3.3. uEVs as Urine Biomarkers of LN

Finally, to evaluate the utility of uEV concentration measurements as potential LN biomarkers, we generated receiver operating characteristic (ROC) curves for each vesicle size subset to determine their discriminative capacity in SLE vs. LN patients (Figure 3). We calculated the corresponding areas under the curve (AUC), and we concluded that both uEVs of 0.3 and 0.5 μm displayed significant outstanding discriminative values (AUC of 0.849 and 0.833, respectively). Still, even the 0.1 μm subset or total uEV concentration displayed significant, good values (AUCs above 0.7).

displayed significant, good values (AUCs above 0.7).

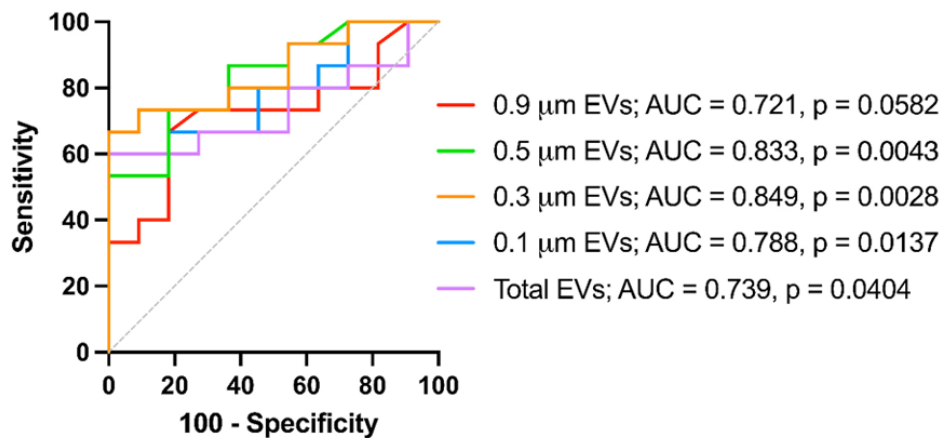


Figure 3. ROC curves of uEV concentrations for discrimination of LN patients and non-kidney affected SLE patients. The values of each AUC and p -values are depicted. p -values < 0.05 were considered significant. SLE patients ($n = 11$) and LN ($n = 15$).

4. Discussion

Kidney damage leading to LN is one of the most common complications of SLE. In adult patients with SLE, as many as 5 out of 10 will develop kidney disease, increasing up to 8 out of 10 in children [25].

Percutaneous renal biopsy is considered the “gold standard” for diagnosing and classifying LN, besides its degree of activity or chronicity [26]. However, renal biopsy is a risky, invasive, and expensive surgical procedure that is not practical for monitoring LN due to the necessity of repetition [26]. Consequently, several serum and urinary biomarkers have been proposed to study SLE patients, focusing on LN.

While numerous molecules have been suggested as LN diagnostic or prognostic biomarkers, such as metabolites, cytokines and chemokines, autoantibodies, and cell adhesion-related or micro-RNA molecules [27], the landscape of serum or uEVs has only recently started to receive attention [22]. However, these studies primarily obtained insight into the specific contents of these structures rather than the EVs themselves. This context led us to focus on the relative abundance and size distribution of these membranous entities, a novel and potentially impactful approach.

uEVs are secreted from urothelial cells, including those from the kidneys, ureters, bladder, urethra, and the male reproductive tract [28], with those derived from kidneys being the most abundant [29].

As expected, changes in uEV abundances have been marginally documented in the urinary tract or organ-associated related diseases, varying from no concentration differences among healthy subjects and prostate cancer patients [30] to an evident increase in acute kidney injury in cardiac surgery patients [31]. However, beyond the proposal of specific biomarker molecules associated with uEVs, such as different miRNAs or HMGB1 [21], there is a lack of information regarding the potential of determining the concentration or size distribution of uEVs in LN. Our study, which used a simple flow-cytometry-based method to stain and analyze EVs enriched from urine samples, found that the concentration of total or size-specific subsets of uEVs differs from LEG and LN-exhibiting patients. This result suggests the practical potential of uEVs as diagnostic or monitoring biomarkers for LN.

First, we found that although no changes in size distribution were observed, the urine of individuals with LN exhibited a significant increase in total EV concentration. As mentioned before, there are only a few reports indicating concentration changes in uEVs during some chronic, deleterious kidney disorders, including their increased amounts in the urine of diabetic nephropathy [32]. Supporting the idea that urinary tract tissue damage induces these vesicles in urine, it has been reported that radiotherapy significantly increases uEV concentrations relative to pre-radiotherapy levels in patients with prostate cancer who develop bladder toxicity [33]. Interestingly, this study indicates that pretreatment urine samples displayed stable and normally distributed EV amounts, thus making plausible its usage to monitor biomarkers upon detection of aberrant vesicle concentrations. In this way, although our results are limited because of the cross-sectional type of the observations, the evident differences in the concentration of uEVs in LN patients and their correlation with different SLE or nephritis-associated variables point to a promising

value of these structures as a diagnostic biomarker, with other potential applications that need to be evaluated by longitudinal approaches.

Another aspect that our approach considers is the individual uEV size; accordingly, besides determining total EVs, we could analyze and divide these structures into four subsets ranging from 0.1 to 0.9 μm (100 to 900 nm). Independently of the apoptotic bodies, the consensus indicates that EVs can be broadly classified into small and large extracellular vesicles. The small subset, typically referred to as exosomes, exhibits a diameter of 30–150 nm and originates from the endocytic pathway, while the large ones (microvesicles) have a mean diameter of 200–1000 nm and bud directly off the plasma membrane of the originating cells [3].

Although our results indicate that the most represented uEVs are the 0.1 μm -sized, the larger, less abundant 0.3 and 0.5 μm -sized subsets exhibited a more robust significance differentiating LN. This fact is supported by the results given by the constructed ROC curves, which confirmed that the 0.3 and 0.5 μm uEV concentrations constitute the best-analyzed parameters to differentiate the LN outcome, exhibiting significant and robust AUCs. Remarkably, the concentration of these larger microvesicles better correlates with renal-function-associated variables such as eGFR or creatinine, besides classical SLE descriptors such as SLEDAI, complement, or autoantibodies levels. Despite displaying similar correlation patterns, the largest analyzed uEVs of 0.9 μm are so scarce that their determination would become technically complex compared with the rest of the subsets.

While we do not generate any data that could explain the differential concentration and size changes of uEVs during LN, it is interesting that all of them could be related to the inflammatory status of damaged kidneys. Accordingly, in different cell or organ contexts, it has been reported that inflammation induces altered EV biogenesis and release, including an increased size distribution of microglial cells upon lipopolysaccharide-induced activation [34] or during the progression of prostate cancer, where increased plasmatic exosome levels were detected [35].

Interestingly, some inflammatory mediators have been directly related to the cellular endocytic pathways controlling EV secretion. One of them is IL-13, a cytokine that has been found in high levels in active LN patients [36], and is known to positively regulate

the expression of ALG-2-interacting protein X (ALIX) [37], which is a multifunctional player involved in multivesicular body biogenesis, endocytic membrane trafficking, and apoptosis [38]. Some studies have also documented that the overexpression of ALIX or its interactor, the tumor susceptibility gene 101 (TSG101), which is part of the endosomal sorting complex required for transport I (ESCRT-I), directly affects the size or the concentration of secreted EVs by HEK293 cells [39]. Accordingly, the inflammatory microenvironment in LN could favor the morphological and numerical changes in uEVs through the direct modulation of the endocytic pathways. This fascinating idea could be further analyzed in dedicated and independent studies.

Finally, and as mentioned before, uEVs constitute promising candidates for the discovery of noninvasive biomarkers to predict and monitor the evolution of kidney pathologies. Beyond their usefulness as stand-alone parameters, these vesicles could be incorporated into multiplex diagnostic platforms that overcome the limited sensitivity and specificity of classical kidney-damage-related biomarkers. Changes in EVs might occur even before there are variations in traditional blood-measured indicators of kidney function, such as creatinine and urea concentrations, thus allowing early diagnostic approaches. In this way, we propose that the concentration analysis of mid-size microvesicles (0.3–0.5 μm) in urine samples, followed by the concentration of total uEVs, could represent a useful LN biomarker. However, standardizing and validating our results in more extensive and prospective cohorts to gain insight into the value of these proposed parameters, even during the monitoring of nephritis response in patients upon treatment, is contingent on obtaining a better understanding of their value.

Author Contributions: Conceptualization, I.C.N.-H., D.G.-M., J.M.H.-H., and J.L.M.-M.; methodology, I.C.N.-H., M.C.-H., and G.J.-V.; formal analysis, I.C.N.-H. and R.F.R.-H.; resources and technical support, D.E.M.-S. and G.J.-V.; sampling and data curation, J.T.-R., D.A.C.-V., and L.P.W.-G.; writing—original draft preparation, I.C.N.-H. and J.L.M.-M.; writing—review and editing, R.F.R.-H.; project administration and funding acquisition, D.G.-M., J.M.H.-H., and J.L.M.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT Program (grant: IN215424).

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Ref. 2555 approved on 4 June 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Acknowledgments: Itze C. Navarro-Hernandez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Celular, Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, and has received the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) fellowship 587790. We also received assistance from the Flow Cytometry Unit at the Red de Apoyo a la Investigación, UNAM/INCMNSZ.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflicts of interest.

References

1. Colombo, M.; Raposo, G.; Thery, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
2. Kalluri, R.; LeBleu, V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* **2020**, *367*, eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
3. Thery, C.; Witwer, K.W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M.J.; Anderson, J.D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G.K.; et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7*, 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.

4. Kalra, H.; Simpson, R.J.; Ji, H.; Aikawa, E.; Altevogt, P.; Askenase, P.; Bond, V.C.; Borrás, F.E.; Breakefield, X.; Budnik, V.; et al. Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>.
5. Armstrong, D.; Wildman, D.E. Extracellular Vesicles and the Promise of Continuous Liquid Biopsies. *J. Pathol. Transl. Med.* **2018**, *52*, 1–8. <https://doi.org/10.4132/jptm.2017.05.21>.
6. Boukouris, S.; Mathivanan, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin. Appl.* **2015**, *9*, 358–367. <https://doi.org/10.1002/prca.201400114>.
7. Kahlert, C.; Kalluri, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med.* **2013**, *91*, 431–437. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1020-6>.
8. Peinado, H.; Aleckovic, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; Garcia-Santos, G.; Ghajar, C.; et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>.
9. Watanabe, Y.; Hirao, Y.; Kasuga, K.; Tokutake, T.; Semizu, Y.; Kitamura, K.; Ikeuchi, T.; Nakamura, K.; Yamamoto, T. Molecular Network Analysis of the Urinary Proteome of Alzheimer's Disease Patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra* **2019**, *9*, 53–65. <https://doi.org/10.1159/000496100>.
10. Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Schapira, A.H.; Gardiner, C.; Sargent, I.L.; Wood, M.J.; Cooper, J.M. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *42*, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.029>.
11. Grange, C.; Bussolati, B. Extracellular vesicles in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2022**, *18*, 499–513. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00586-9>.
12. Thongboonkerd, V. Roles for Exosome in Various Kidney Diseases and Disorders. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1655. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01655>.
13. Jing, H.; Tang, S.; Lin, S.; Liao, M.; Chen, H.; Zhou, J. The role of extracellular vesicles in renal fibrosis. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 367. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1605-2>.
14. Liu, X.; Miao, J.; Wang, C.; Zhou, S.; Chen, S.; Ren, Q.; Hong, X.; Wang, Y.; Hou, F.F.; Zhou, L.; et al. Tubule-derived exosomes play a central role in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Kidney Int.* **2020**, *97*, 1181–1195. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.11.026>.
15. Li, M.; Li, S.; Du, C.; Zhang, Y.; Li, Y.; Chu, L.; Han, X.; Galons, H.; Zhang, Y.; Sun, H.; et al. Exosomes from different cells: Characteristics, modifications, and therapeutic applications. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *207*, 112784. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112784>.
16. Gurunathan, S.; Kang, M.H.; Jeyaraj, M.; Qasim, M.; Kim, J.H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* **2019**, *8*, 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>.
17. Anders, H.J.; Saxena, R.; Zhao, M.H.; Parodis, I.; Salmon, J.E.; Mohan, C. Lupus nephritis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2020**, *6*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0141-9>.
18. Rodriguez-Ramirez, S.; Wiegley, N.; Mejia-Vilet, J.M. Kidney Biopsy in Management of Lupus Nephritis: A Case-Based Narrative Review. *Kidney Med.* **2024**, *6*, 100772. <https://doi.org/10.1016/j.xkme.2023.100772>.
19. Rovin, B.H.; Parikh, S.V.; Alvarado, A. The kidney biopsy in lupus nephritis: Is it still relevant? *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **2014**, *40*, 537–552. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2014.04.004>.
20. Maravillas-Montero, J.L.; Reyes-Huerta, R.F. Update on Novel Blood-Based Biomarkers for Lupus Nephritis Beyond Diagnostic Approaches. *Rev. Investig. Clin.* **2022**, *74*, 227–231. <https://doi.org/10.24875/RIC.22000209>.
21. Zhao, Y.; Wei, W.; Liu, M.L. Extracellular vesicles and lupus nephritis—New insights into pathophysiology and clinical implications. *J. Autoimmun.* **2020**, *115*, 102540. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102540>.
22. Burbano, C.; Gomez-Puerta, J.A.; Munoz-Vahos, C.; Vanegas-Garcia, A.; Rojas, M.; Vasquez, G.; Castano, D. HMGB1(+) micro-particles present in urine are hallmarks of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* **2019**, *49*, 323–335. <https://doi.org/10.1002/eji.201847747>.
23. Bajema, I.M.; Wilhelmus, S.; Alpers, C.E.; Bruijn, J.A.; Colvin, R.B.; Cook, H.T.; D'Agati, V.D.; Ferrario, F.; Haas, M.; Jennette, J.C.; et al. 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.* **2018**, *93*, 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.11.023>.
24. Navarro-Hernandez, I.C.; Acevedo-Ochoa, E.; Juarez-Vega, G.; Meza-Sanchez, D.E.; Hernandez-Hernandez, J.M.; Maravillas-Montero, J.L. Size Determination and Phenotypic Analysis of Urinary Extracellular Vesicles using Flow Cytometry. *J. Vis. Exp.* **2021**, *170*, e61695. <https://doi.org/10.3791/61695>.
25. Liu, C.C.; Kao, A.H.; Manzi, S.; Ahearn, J.M. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: Challenges and prospects for the future. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2013**, *5*, 210–233. <https://doi.org/10.1177/1759720X13485503>.
26. Aragon, C.C.; Tafur, R.A.; Suarez-Avellaneda, A.; Martinez, M.T.; Salas, A.L.; Tobon, G.J. Urinary biomarkers in lupus nephritis. *J. Transl. Autoimmun.* **2020**, *3*, 100042. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2020.100042>.
27. Palazzo, L.; Lindblom, J.; Mohan, C.; Parodis, I. Current Insights on Biomarkers in Lupus Nephritis: A Systematic Review of the Literature. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5759. <https://doi.org/10.3390/jcm11195759>.

28. Gonzales, P.A.; Pisitkun, T.; Hoffert, J.D.; Tchapyjnikov, D.; Star, R.A.; Kleta, R.; Wang, N.S.; Knepper, M.A. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 363–379. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008040406>.
29. Svenningsen, P.; Sabaratnam, R.; Jensen, B.L. Urinary extracellular vesicles: Origin, role as intercellular messengers and biomarkers; efficient sorting and potential treatment options. *Acta Physiol.* **2020**, *228*, e13346. <https://doi.org/10.1111/apha.13346>.
30. Garcia-Flores, M.; Sanchez-Lopez, C.M.; Ramirez-Calvo, M.; Fernandez-Serra, A.; Marcilla, A.; Lopez-Guerrero, J.A. Isolation and characterization of urine microvesicles from prostate cancer patients: Different approaches, different visions. *BMC Urol.* **2021**, *21*, 137. <https://doi.org/10.1186/s12894-021-00902-8>.
31. Miller, D.; Eagle-Hemming, B.; Sheikh, S.; Joel-David, L.; Adebayo, A.; Lai, F.Y.; Roman, M.; Kumar, T.; Aujla, H.; Murphy, G.J.; et al. Urinary extracellular vesicles and micro-RNA as markers of acute kidney injury after cardiac surgery. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10402. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13849-z>.
32. Barutta, F.; Tricarico, M.; Corbelli, A.; Annaratone, L.; Pinach, S.; Grimaldi, S.; Bruno, G.; Cimino, D.; Taverna, D.; Deregibus, M.C.; et al. Urinary exosomal microRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073798>.
33. Molony, R.D.; Kerns, S.L.; Marples, B.; Oshodi, E.; Chen, Y.; Lee, Y.-F. Postradiotherapy Urinary Extracellular Vesicle Concentrations Predict Late Bladder Toxicity in Patients with Prostate Cancer. *JU Open Plus* **2023**, *1*, e00007. <https://doi.org/10.1097/jju9.000000000000009>.
34. Yang, Y.; Boza-Serrano, A.; Dunning, C.J.R.; Clausen, B.H.; Lambertsen, K.L.; Deierborg, T. Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 168. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1204-7>.
35. Logozzi, M.; Mizzoni, D.; Di Raimo, R.; Giuliani, A.; Maggi, M.; Sciarra, A.; Fais, S. Plasmatic Exosome Number and Size Distinguish Prostate Cancer Patients From Healthy Individuals: A Prospective Clinical Study. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 727317. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.727317>.
36. Chen, X.; Zhang, Z.; Jiang, L.; Ye, F.; Wang, J.; Wu, P. Elevated interleukin-13 in patients with active lupus nephritis. *Chin. Med. J.* **2001**, *114*, 1022–1025.
37. Xu, C.; Sun, G.; Yang, J.; Sun, Q.; Tong, Z. Interleukin-13 promotes expression of Alix to compromise renal tubular epithelial barrier function. *Cell Biol. Int.* **2015**, *39*, 548–553. <https://doi.org/10.1002/cbin.10433>.
38. Odorizzi, G. The multiple personalities of Alix. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3025–3032. <https://doi.org/10.1242/jcs.03072>.
39. Boker, K.O.; Lemus-Diaz, N.; Rinaldi Ferreira, R.; Schiller, L.; Schneider, S.; Gruber, J. The Impact of the CD9 Tetraspanin on Lentivirus Infectivity and Exosome Secretion. *Mol. Ther.* **2018**, *26*, 634–647. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.008>.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



CD11c⁺ T-bet⁺ CD21^{hi} B Cells Are Negatively Associated With Renal Impairment in Systemic Lupus Erythematosus and Act as a Marker for Nephritis Remission

OPEN ACCESS

Edited by:

Trine N. Jorgensen,
Case Western Reserve University,
United States

Reviewed by:

Scott E. Wenderfer,
Baylor College of Medicine,
United States
Hao Li,
Beth Israel Deaconess Medical Center
and Harvard Medical School,
United States

*Correspondence:

José L. Maravillas-Montero
maravillas@cic.unam.mx

Víctor A. Sosa-Hernández^{1,2}, Sandra Romero-Ramírez^{1,3}, Rodrigo Cervantes-Díaz^{1,3}, Daniel A. Carrillo-Vázquez⁴, Itze C. Navarro-Hernandez^{1,5}, Laura P. Whittall-García⁶, Abdiel Absalón-Aguilar⁴, Ana S. Vargas-Castro⁶, Raúl F. Reyes-Huerta¹, Guillermo Juárez-Vega¹, David E. Meza-Sánchez¹, Vianney Ortiz-Navarrete², Jiram Torres-Ruiz⁶, Nancy R. Mejía-Domínguez¹, Diana Gómez-Martín⁶ and José L. Maravillas-Montero^{1*}

¹ Red de Apoyo a la Investigación, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico, ³ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁴ Departamento de Medicina Interna, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y

Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ⁵ Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico, ⁶ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Specialty section:
This article was submitted to
Autoimmune and
Autoinflammatory Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 08 March 2022

Accepted: 22 April 2022

Published: 19 May 2022

Citation:

Sosa-Hernández VA,
Romero-Ramírez S,
Cervantes-Díaz R,
Carrillo-Vázquez DA,
Navarro-Hernandez IC,
Whittall-García LP, Absalón-Aguilar A,
Vargas-Castro AS, Reyes-Huerta RF,
Juárez-Vega G, Meza-Sánchez DE,
Ortiz-Navarrete V, Torres-Ruiz J,
Mejía-Domínguez NR,
Gómez-Martín D
and Maravillas-Montero JL (2022)
CD11c⁺ T-bet⁺ CD21^{hi} B Cells Are
Negatively Associated With Renal
Impairment in Systemic Lupus
Erythematosus and Act as a Marker for
Nephritis Remission.
Front. Immunol. 13:892241.
doi: 10.3389/fimmu.2022.892241

Lupus nephritis (LN) is one of the most common manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE), characterized by abnormal B cell activation and differentiation to memory or plasma effector cells. However, the role of these cells in the pathogenesis of LN is not fully understood, as well as the effect of induction therapy on B cell subsets, possibly associated with this manifestation, like aged-associated B cells (ABCs). Consequently, we analyzed the molecules defining the ABCs subpopulation (CD11c, T-bet, and CD21) through flow cytometry of blood samples from patients with lupus presenting or not LN, following up a small sub-cohort after six months of induction therapy. The frequency of ABCs resulted higher in LN patients compared to healthy subjects. Unexpectedly, we identified a robust reduction of a CD21^{hi} subset that was almost specific to LN patients. Moreover, several clinical and laboratory lupus features showed strong and significant correlations with this undefined B cell subpopulation. Finally, it was observed that the induction therapy affected not only the frequencies of ABCs and CD21^{hi} subsets but also the phenotype of the CD21^{hi} subset that expressed a higher density of CXCR5. Collectively, our results suggest that ABCs, and more importantly the CD21^{hi} subset, may work to assess therapeutic response since the reduced frequency of CD21^{hi} cells could be associated with the onset of LN.

Keywords: B cells, aged-associated B cells, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, induction therapy

Size Determination and Phenotypic Analysis of Urinary Extracellular Vesicles using Flow Cytometry

Itze Cecilia Navarro-Hernandez¹, Ernesto Acevedo-Ochoa², Guillermo Juárez-Vega², David Eduardo Meza-Sánchez², José Manuel Hernández-Hernández³, José Luis Maravillas-Montero⁴


Affiliations + expand

PMID: 33970146 DOI: [10.3791/61695](https://doi.org/10.3791/61695)

Abstract

Extracellular vesicles, EVs, are a heterogeneous complex of lipidic membranes, secreted by any cell type, in any fluid such as urine. EVs can be of different sizes ranging from 40-100 nm in diameter such as in exosomes to 100-1000 nm in microvesicles. They can also contain different molecules that can be used as biomarkers for the prognosis and diagnosis of many diseases. Many techniques have been developed to characterize these vesicles. One of these is flow cytometry. However, there are no existing reports to show how to quantify the concentration of EVs and differentiate them by size, along with biomarker detection. This work aims to describe a procedure for the isolation, quantification, and phenotypification of urinary extracellular vesicles, uEVs, using a conventional cytometer for the analysis without any modification to its configuration. The method's limitations include staining a maximum of four different biomarkers per sample. The method is also limited by the amount of EVs available in the sample. Despite these limitations, with this protocol and its subsequent analysis, we can obtain more information on the enrichment of EVs markers and the abundance of these vesicles present in urine samples, in diseases involving kidney and brain damage.

Tetraspanin 33 (TSPAN33) regulates endocytosis and migration of human B lymphocytes by affecting the tension of the plasma membrane

Itze C. Navarro-Hernandez, Orestes López-Ortega, Ernesto Acevedo-Ochoa, Rodrigo Cervantes-Díaz, Sandra Romero-Ramírez, Víctor A. Sosa-Hernández, David E. Meza-Sánchez, Guillermo Juárez-Vega, César A. Pérez-Martínez, Bibiana Chávez-Munguía, Arturo Galván-Hernández, Armando Antillón, Iván Ortega-Blake, Leopoldo Santos-Argumedo, José M. Hernández-Hernández, José L. Maravillas-Montero  ... [See fewer authors](#) ^

First published: 20 January 2020 | <https://doi.org/10.1111/febs.15216> | Citations: 11

Abstract

B lymphocytes are a leukocyte subset capable of developing several functions apart from differentiating into antibody-secreting cells. These processes are triggered by external activation signals that induce changes in the plasma membrane properties, regulated by the formation of different lipid-bilayer subdomains that are associated with the underlying cytoskeleton through different linker molecules, thus allowing the functional specialization of regions within the membrane. Among these, there are tetraspanin-enriched domains. Tetraspanins constitute a superfamily of transmembrane proteins that establish lateral associations with other molecules, determining its activity and localization. In this study, we identified TSPAN33 as an active player during B-lymphocyte cytoskeleton and plasma membrane-related phenomena, including protrusion formation, adhesion, phagocytosis, and cell motility. By using an overexpression model of TSPAN33 in human Raji cells, we detected a specific distribution of this protein that includes membrane microvilli, the Golgi apparatus, and extracellular vesicles. Additionally, we identified diminished phagocytic ability and altered cell adhesion properties due to the aberrant expression of integrins. Accordingly, these cells presented an enhanced migratory phenotype, as shown by its augmented chemotaxis and invasion rates. When we evaluated the mechanic response of cells during fibronectin-induced spreading, we found that TSPAN33 expression inhibited changes in roughness and membrane tension. Contrariwise, TSPAN33 knockdown cells displayed opposite phenotypes to those observed in the overexpression model. Altogether, our data indicate that TSPAN33 represents a regulatory element of the adhesion and migration of B lymphocytes, suggesting a novel implication of this tetraspanin in the control of the mechanical properties of their plasma membrane.

Research Funding

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Grant Numbers: A3-S-36875, CB 240314

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. Grant Numbers: PAPIIT IA202318, PAPIIT IA204316, PAPIIT IG100920, PAPIIT IN213020

Publication History

Issue Online:

17 August 2020

Version of Record online:

05 February 2020

Accepted manuscript online:

20 January 2020

Manuscript accepted:

16 January 2020

Manuscript revised:

20 November 2019

Manuscript received:

13 June 2019