



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Nefropatía lúpica: Perfil de citocinas
Th1 y Th2 y su asociación con el daño
renal a nivel histológico”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA INMUNOLOGÍA**

PRESENTA:

M.C. Dalila Rodríguez Juárez

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. MARYCARMEN GODÍNEZ VICTORIA
DR. CITLALTEPETL SALINAS LARA**



MÉXICO, D. F.

ENERO 2012



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Nefropatía lúpica: Perfil de citocinas (Th1 y Th2) y su asociación con el daño renal a nivel histológico”

Presentada por la alumna:

Rodríguez
Apellido paterno

Juárez
Apellido materno

Dalila
Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	6	9	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Marycarmen Godínez Victoria

Dr. Citlalpetl Salinas Lara

Dr. Rafael Campos Rodríguez

Dra. Norma Estela Herrera González

Dr. Ángel Militar García

Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 29 del mes noviembre del año 2011, el que suscribe Rodríguez Juárez Dalila alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A100695 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Marycarmen Godínez Victoria, Dr. Citlaltepétl Salinas Lara y cede los derechos del trabajo intitulado “Nefropatía lúpica: Perfil de citocinas (Th1 y Th2) y su asociación con el daño renal a nivel histológico”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección roddal@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Dalila Rodríguez Juárez

Nombre y firma

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE.....	II
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES PARTICULARES.....	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
JUSTIFICACIÓN.....	36
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	70

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes generales.....	2
1. Factores de riesgo para el desarrollo de LES.....	2
1.1 Factores genéticos.....	3
1.2 Factores epidemiológicos.....	4
1.3 Factores ambientales.....	4
2. Daño tisular ocasionado por los auto-anticuerpos en lupus.....	5
3. Citocinas en LES.....	6
4. Manifestaciones clínicas.....	7
5. Nefritis lúpica.....	12
Epidemiología.....	14
5.1 Patrones glomerulares de lesión en la nefropatía lúpica.....	15
5.1.1 Patrón mesangial.....	15
5.1.2 Patrón endotelial.....	15
5.1.3 Patrón epitelial.....	16
5.2 Clasificación.....	17
5.2.1 Actividad y cronicidad.....	20
5.3 Etiología.....	22
2.4.1 Auto-anticuerpos en LES.....	23
2.4.2 Depósito de complejos inmunes circulantes.....	24
2.4.3 Enfermedad de inmuno-complejos in situ.....	25
6. Perfil de Th1/Th2 y LES.....	26
6.1 Generación de linfocitos Th2.....	28
6.2 Generación de linfocitos Th1.....	29
6.3 Desarrollo de las citocinas inducidas por Th1.....	29
6.3.1 Il-12.....	29
6.3.2 IFN- γ	30

6.4 Desarrollo de las citocinas inducidas por Th2.....	31
6.4.1 IL-13.....	31
6.4.2 IL-4.....	32
7. Respuesta Th1/Th2.....	32
B. Antecedentes particulares	33
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
III. JUSTIFICACIÓN.....	36
IV. HIPÓTESIS.....	37
V. OBJETIVOS.....	38
A. Objetivo general.....	38
B. Objetivos particulares.....	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
A. Diseño del estudio.....	39
B. Universo de estudio.....	39
C. Tamaño de la muestra.....	39
D. Criterios de selección.....	39
E. Abordaje protocolario.....	40
F. Clasificación de la nefropatía lúpica.....	41
G. Arreglo de tejidos.....	42
H. Determinación de la expresión de citocinas Th1 y Th2.....	42
I. Protocolo de inmunohistoquímica indirecta.....	42
J. Análisis y procesamiento de los resultados.....	44
VII. RESULTADOS.....	46
VIII. DISCUSIÓN.....	64
IX. CONCLUSIONES.....	69
X. REFERENCIAS.....	70
Anexos	
a. Hoja de recolección de datos.....	78
b. Registro del protocolo en el comité de investigación institucional.....	79

ABREVIATURAS

AAF: Anticuerpos antifosfolípidos

aCL: anticardiolipina

ACR: Colegio Americano de Reumatología

AL: Anticoagulante lúpico

ANAs: Anticuerpos anti-nucleares

APC: Célula presentadora de antígenos

ICs: Inmunocomplejos

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador
Zubirán

ISN/RPS: Sociedad Internacional de Nefrología/Sociedad de Patología Renal

LES: Lupus eritematoso sistémico

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

NL: Nefritis lúpica

Ro: complejo de ribonucleoproteína, proteína de unión a RNA,

Sm: ribonucleoproteína

TCR: Receptor de la Célula T

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Auto-anticuerpos patogénicos en LES	5
Cuadro 2 Criterios utilizados para la clasificación de LES según el Colegio Americano de Reumatología (ACR)	10
Cuadro 3 Prevalencia de las manifestaciones clínicas en pacientes con LES	11
Cuadro 4. Clasificación de la NL según la Sociedad Internacional de Nefrología/Sociedad de Patología Renal (ISN/RPS) 2004.	19
Cuadro 5 Descripción de las lesiones activas	21
Cuadro 6 Descripción de las lesiones crónicas	22
Cuadro 7 Relación entre la edad y género de acuerdo a la clase histológica	46
Cuadro 8 Asociación entre los marcadores de la actividad y la clase histológica	48
Cuadro 9 Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal según la clase histológica de la NL	49
Cuadro 10 Frecuencia de expresión de IL-12 según la clase histológica de las biopsias renales.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Modelo de la diferenciación de los linfocitos T cooperadores	27
Figura 2	Vías para inducir la expresión de la IL-4	28
Figura 3	Vías para inducir la expresión de IFN- γ	29
Figura 4	Frecuencia de casos según la clase histológica de las biopsias con NL	47
Figura 5	Expresión de IFN- γ en biopsias de casos y controles	52
Figura 6	Porcentaje de casos que expresan INF- γ en biopsias renales	53
Figura 7	Porcentaje de expresión de INF- γ por clase histológica	54
Figura 8	Asociación de la expresión de IFN- γ y con el daño renal (clase histológica).	55
Figura 9	Asociación entre la expresión de IFN- γ y el índice de actividad de la nefropatía lúpica.	56
Figura 10	Asociación entre la positividad de la expresión IFN- γ y el índice de cronicidad.	57
Figura 11	Media del área glomerular positiva para INF- γ según la clase histológica.	58
Figura 12.	Expresión de IL-12 en biopsias de casos y controles	59
Figura 13.	Expresión de IL-4 en biopsias de casos y controles	61
Figura 14	Expresión de IL-13 en biopsias de casos y controles	62
Figura15	Expresión de citocinas en biopsias “cero” procedentes de pacientes transplantados (sin nefropatía lúpica)	63

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES), es una enfermedad compleja, prototipo de la enfermedad autoinmune sistémica. La complicación más grave y frecuente es la enfermedad renal, llamada nefropatía lúpica (NL). En la mayoría de los casos la NL es mediada por el depósito de complejos inmunes (CI) en el glomérulo, seguido por la producción local de citocinas que desencadena la inflamación glomerular y lleva al daño renal irreversible. Durante el proceso inflamatorio existe un desbalance en el perfil de citocinas Th1/Th2. Actualmente existen pocos estudios que relacionen la expresión de estas citocinas con la clase histológica de las lesiones renales y los trabajos publicados muestran resultados contradictorios.

Hipótesis: En la nefropatía lúpica: el daño renal manifestado por actividad, cronicidad y clase histopatológica depende del perfil de citocinas (Th1-Th2) secretado. **Materiales y métodos:** el diseño de estudio es retrospectivo, observacional y transversal. Se incluyeron las biopsias de tejido renal con diagnóstico de NL, para evaluar el daño renal se determinó la clase histológica según la clasificación ISN/RPS. El perfil de citocinas Th1 se determinó por expresión de IL-12 e IFN- γ y en el perfil Th2 la IL-4 y la IL-13, por inmunohistoquímica. **Resultados:** El 54.8%(17/31) de las biopsias procesadas expresaron IFN- γ en los glomérulos. La expresión de esta citocina correlacionó positivamente con la clase histológica, la cuál es estadísticamente significativa, ($p=0.035$). El resto de las citocinas evaluadas no se expresaron en las biopsias renales. **Conclusiones:** El perfil de Th1, representado por el IFN- γ , presenta un papel ponderante en el desarrollo de la NL, lo que sugiere que el IFN- γ pueda tener un papel importante en la morfología de las clases histológicas de NL.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE), is a complex disease, is the prototype of systemic autoimmune disease. Renal involvement is the most severe and frequent complication, is called lupus nephritis (LN). The most cases are caused by autoantibodies lead to cell and tissue injury by Fc receptor-mediated inflammation as well as by direct cytotoxicity. Disruption of T helper (Th) 1 and Th2 cytokine homeostasis is a peculiar feature of human and experimental LN. There are few studies than link the expression of this cytokines and the histological class of NL.

Hypothesis: In lupus nephritis, kidney damage manifested by activity, chronicity and histopathologic class depends on the profile of cytokines (Th1-Th2) secreted.

Materials and Methods. The design of this study was retrospective, observational and transversal. Kidney biopsies from patients who met clinical and laboratory criteria of LES of the INCMNSZ were included, histological damage was classified according to the ISN/RPS histological classification. The Th1 cytokine profile was determined by expression of IL-12 and IFN- γ and the Th2 profile of IL-4 and IL-13 by immunohistochemistry. **Results:** 54.8% (17/31) of the biopsies expressed IFN- γ processed in the glomeruli. The expression of this cytokine correlated positively with histological class, which is statistically significant ($p = 0.035$). **Conclusion** According to these results, the profile Th1, represented by INF- γ has an important role, suggest this cytokine has an important role in LN evolution by promoting Th1 response in the generation of class IV LN a diffuse proliferative, and usually active glomerulonephritis.

INTRODUCCIÓN

La autoinmunidad se define cómo la pérdida de la tolerancia a lo propio, es definido como la reacción inmunitaria en contra de auto-antígenos, son una causa importante de morbilidad en los seres humanos.¹ La lesión autoinmune puede ser órgano-específica, es decir cuando los autoanticuerpos y las células autoinmunes destruyen un solo tipo celular, como el caso de la diabetes tipo 1 o autoinmunidad sistémica, cuando afecta a múltiples órganos cómo el caso de lupus eritematoso sistémico (LES).²

El LES prototipo de enfermedad autoinmune, es un padecimiento sistémico del tejido conectivo que tiene varias presentaciones clínicas.³ Es una enfermedad de etiología desconocida en dónde participan diversos mecanismos inmunológicos de daño tisular entre los que destaca la presencia de un amplio espectro de auto-anticuerpos dirigidos contra antígenos celulares, particularmente anticuerpos antinucleares (ANAs), aunque no son los únicos, que se producen.¹ El LES puede tener un inicio agudo o insidioso, es una enfermedad crónica, que remite y presenta recaídas, a menudo se presenta como una entidad febril,¹ y se caracteriza principalmente por afección de la piel, articulaciones, riñón, serosas, sistema nervioso central, vasos, y huesos, entre otros.^{4, 5}

La prevalencia del LES varía de aproximadamente 40 casos por cada 100 000 personas en países europeos a más de 200 por 100 000 habitantes entre personas de raza negra. En el caso de los Estados Unidos la prevalencia de la enfermedad excede 250, 000.⁶ La incidencia del LES se ha triplicado desde los

años setenta, de 1.51 por cada 100 000 habitantes (1950-1979) a 5.56 por cada 100 000 habitantes (1980-1992).⁷ Este incremento parece ser debido a un diagnóstico más temprano de la enfermedad y a la inclusión de casos leves. Su incidencia y prevalencia varían según las poblaciones estudiadas, siendo una enfermedad más común en poblaciones afroamericanas (200 por cada 100 000 habitantes) y en poblaciones asiáticas que en poblaciones caucásicas (aproximadamente 40 casos por cada 100 000 habitantes)⁸

Se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres en una relación de 9:1. Aparece generalmente en la edad reproductiva sobre todo a final de la segunda y principio de la tercera década de la vida. El curso clínico de la enfermedad también varía entre las poblaciones. La nefritis lúpica (NL) así como la pericarditis y las lesiones discoides son más frecuentes y producen un daño orgánico más rápido en las poblaciones hispana y afroamericana que en caucásicos.^{9, 10}

A. Antecedentes Generales

1. Factores de riesgo para el desarrollo de LES

No se ha identificado sólo una causa única para LES, existen ciertas condiciones ambientales como la luz solar o ciertos fármacos que pueden precipitar esta condición y además existen ciertas bases genéticas que hacen más susceptible a una población determinada, refiriendo una etiología multifactorial.¹¹ Aunque la herencia tiene un papel importante en el desarrollo de LES, el factor genético por sí solo no explica la etiología de la enfermedad, existen otros factores de riesgo,

incluyendo endócrinos, ambientales, infecciosos y farmacológicos que pueden actuar sinérgicamente en el desarrollo de LES en un huésped genéticamente susceptible.

A continuación se comentará sobre algunos de estos factores de riesgo, para facilitar el entendimiento de su fisiopatología y el por qué son considerados importantes en el desarrollo o predisposición para LES.

1.1. Factores Genéticos

La tasa de concordancia para LES es de 25% en gemelos monocigóticos y aproximadamente 2% en gemelas dicigóticos,¹² lo cual señala que la contribución genética es importante pero no suficiente para causar la enfermedad. Se han identificado algunos genes que probablemente podrían contribuir, al estudiar el genoma de varias familias en las cuáles múltiples miembros tienen lupus.

Los genes del complejo principal de histocompatibilidad, (MHC), particularmente *HLA-A*, *B8* y *DR3*, se han asociado con lupus,¹³ El genotipo del MHC determina cuál molécula del MHC está disponible para los antígenos presentes y así determina que tan bien son reconocidos por los linfocitos T. Por esta razón, los genes del MHC particularmente están asociados con un riesgo de una respuesta inmunitaria contra auto-antígenos y aumenta el riesgo de enfermedades como el lupus.

Las deficiencias de los componentes tempranos del complemento, C1q, C2, o C4 son un factor de riesgo para el desarrollo de LES.¹⁴ Algunos estudios familiares han identificado genes los cuáles son más probables que se presenten en pacientes con lupus que en los familiares sanos. Muchos de estos genes codifican componentes del sistema inmunitario. La carencia de ciertos componentes del complemento puede repercutir en la remoción de los complejos inmunes circulantes a través del sistema mononuclear-fagocítico, favoreciendo así el depósito tisular de estos.

1.2. Factores Epidemiológicos

El LES afecta predominantemente a mujeres, 90% de los pacientes que padecen lupus son mujeres, parece probable e importante el papel de los estrógenos en el desarrollo de LES.¹⁵ El Lupus se presenta en edades que van de 15 a 40 años, es decir durante los picos de fertilidad, al comparar la relación de prevalencia que existe durante la infancia o después de los 65 años, mujer:hombre, 2:1, se observa un aumento de 9:1 a partir de la adolescencia hasta la menopausia.¹ Por lo cual los estrógenos, se consideran como un factor clave en el desarrollo del Lupus, aun cuando no se sabe cual es el papel exacto en la génesis de la enfermedad.

1.3. Factores Ambientales

Existen algunos factores ambientales que podrían estar involucrados en la patogénesis del LES. La radiación ultravioleta (UV) es el factor ambiental más obvio que esta ligado al lupus. La exposición a luz ultra-violeta (UV) exacerba la

enfermedad en algunos individuos. Los rayos UV inducen apoptosis en células y pueden alterar el DNA, pudiendo llegar a ser inmunogénico, quizá a través del reconocimientos de los TLR's (Receptores tipo Toll).¹

Algunos fármacos causan una variante de lupus llamada lupus medicamentoso, los medicamentos mejor conocidos que lo ocasionan, son procainamida, hidralazina y quinidina. Estos pacientes usualmente presentan manifestaciones dermatológicas y articulares, mientras que las manifestaciones renales y neuronales son raras.¹⁶

2. Daño Tisular Ocasionado Por Los Auto-anticuerpos en Lupus

Aún cuando la etiología del LES no está completamente entendida, las diferentes formas de daño tisular sí están bien establecidas. Depósito de anticuerpos con llevan a daño celular y tisular por medio de inflamación mediada vía receptor de la porción Fc y complemento,¹⁷ así como por medio de citotoxicidad directa, la cual es dependiente del complemento.

A continuación se presenta un cuadro de los auto-anticuerpos presentes en LES.

Cuadro 1. Auto-anticuerpos patogénicos en LES¹⁸

Especificidad del Ag	Prevalencia %	Efectos clínicos principales
Ac-anti DNA doble cadena	70-80	Enfermedad renal y cutánea ¹⁹
Nucleosomas	60-90	Enfermedad renal y cutánea ²⁰
Ro	30-40	Enfermedad cutánea, renal y problemas cardiacos fetales. ²¹

Sm	20-30	Enfermedad renal ²²
La	15-20	Problemas cardiacos fetales. ²³
Fosfolípidos	20-30	Trombosis y abortos recurrentes ²⁴
α-actina	20	Enfermedad renal ²⁵
C1q	40-50	Enfermedad renal ²⁶

Ro complejo de ribonucleoproteína, La proteína de unión a RNA, Sm ribonucleoproteína.

3. Citocinas en LES

La producción de citocinas en pacientes con LES difiere de la que ocurre en individuos sanos o pacientes con otras EAI como en la AR, incluso esta producción difiere entre los diversos fenotipos de la enfermedad.²⁷ Por ejemplo, los niveles de interleucina 6 (IL-6) están aumentados en el líquido cerebro espinal de pacientes con LES que presentan síntomas neurológicos, sin embargo este incremento no ocurre en pacientes que no presentas estos síntomas.²⁸ Parece ser que en esta enfermedad el balance de citocinas es más importante en determinar el fenotipo o severidad de la enfermedad que en determinar la susceptibilidad de la misma.

Las células Th CD4+ pueden dividirse en dos subpoblaciones principales basándose en las citocinas producidas por estas células. Las células Th1 que producen principalmente IFN- γ e IL-2 (citocinas pro-inflamatorias) y que promueven la inmunidad mediada por células, y las células Th2 que secretan IL-4, IL-5 e IL-10 (citocinas anti-inflamatorias) están asociadas con la respuesta inmune

humoral, lo cual induce la producción de auto-anticuerpos.²⁹ En muchas enfermedades autoinmunes, como el caso del LES, se ha demostrado que el desbalance entre la producción de citocinas Th1 y Th2 juega un papel clave en la inducción y el desarrollo de la enfermedad.³⁰ En pacientes con LES, los niveles en suero de citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-6 e IL-10 están elevados, mientras que se produce una disminución en los niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-2. Debido a esto, el LES ha sido considerado históricamente como una enfermedad tipo Th2, sin embargo, esta hipótesis se está poniendo en entredicho en los últimos tiempos, ya que se ha demostrado que los niveles de INF- γ en el suero de pacientes con LES están aumentados significativamente y que un desequilibrio hacia la predominancia de la respuesta tipo Th1 está asociada con una aceleración del síndrome lupus-like en ratones.

4. Manifestaciones Clínicas

Debido al comportamiento sistémico de la enfermedad, en pacientes con LES se pueden presentar afección en múltiples órganos y sistemas lo que genera una amplia gama de manifestaciones y la particularidad de cada paciente. Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran:

- Síntomas generales: son cansancio, fiebre, anorexia y pérdida de peso; estos síntomas casi siempre acompañan a manifestaciones más específicas cuando aparecen los brotes de la enfermedad.

- Manifestaciones cutáneas: son muy frecuentes en LES, manifestaciones tales como rash malar, lupus discoide, fotosensibilidad y úlceras orales, están incluidas dentro de los criterios de clasificación del LES. Estas manifestaciones varían dependiendo de la raza, ya que el lupus discoide y la alopecia son más comunes en población afroamericana; mientras que el exantema malar y las úlceras orales son más frecuentes en población caucásica. Aproximadamente el 60% de los pacientes con LES presentan exantema malar que es eritematoso, fotosensible, se puede localizar en mejillas, puente de la nariz y mentón.³¹
- Manifestaciones músculoesqueléticas: La gran mayoría de los pacientes afectados por esta enfermedad presentan artralgias y/o mialgias. Cuando existe artritis, generalmente no erosiva, se suelen afectar las articulaciones interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, carpos y rodillas.³²
- Manifestaciones hematológicas: La más frecuente es anemia de tipo normocítico-normocrómico; leucopenia, generalmente con linfopenia; anemia hemolítica y trombocitopenia moderada.³²
- Manifestaciones cardiopulmonares: La pleuritis y el derrame pleural son frecuentes y en ocasiones, pueden ser la forma de presentación de la enfermedad o una complicación durante los períodos de activación. La pericarditis es la manifestación cardíaca más frecuente, cursando generalmente con derrame pericárdico leve, aunque en alguna ocasión se puede llegar a taponamiento cardíaco.³²

- Manifestaciones del sistema nervioso: La afección del sistema nervioso central aparece habitualmente durante la actividad de la enfermedad y se acompaña de síntomas a nivel de otros órganos. Se pueden afectar distintas zonas del cerebro, meninges, médula y nervios craneales y periféricos. La manifestación más frecuente es la disfunción cognoscitiva, junto con alteraciones del ánimo como ansiedad y depresión.
- Manifestaciones vasculares: La complicación más importante es la trombosis, esta manifestación se relaciona con los anticuerpos antifosfolípidos (AAF), ya sea anticoagulante lúpico (AL) o anticuerpos anticardiolipina (aCL). Otras manifestaciones son: la vasculitis, el síndrome de Raynaud, hipertensión arterial secundaria y coagulación intravascular diseminada.³²
- Manifestaciones renales: La mayoría de los pacientes con LES tienen depósitos de inmunocomplejos (ICs) en los glomérulos, y hasta el 50% de ellos presentan datos clínicos de nefritis con edema, proteinuria y hematuria.

Como se observa la presentación clínica es variable, debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas y a la alternancia entre períodos de exacerbación y remisión, el diagnóstico de LES puede no ser evidente. Por lo que el Colegio Americano de Reumatología ha establecido una serie de criterios para poder realizar el diagnóstico de esta entidad. La presencia de 4 o más criterios, en

forma sucesiva o simultánea durante cualquier período de observación permite clasificar a un paciente con LES³²

Como se demuestra el padecimiento afecta prácticamente a todos los aparatos y sistemas; sin embargo, las manifestaciones cutáneas son las más comunes (90%) y la afección renal le confiere mal pronóstico.³³

En el cuadro 3 se muestra la frecuencia de las manifestaciones clínicas en un estudio europeo prospectivo en una cohorte de 1000 pacientes, que reporta a las manifestaciones articulares y dermatológicas como las más frecuentes, seguido de la manifestación renal, las cuáles tienen una repercusión clínica más grave en estos pacientes.

Cuadro 2. Criterios utilizados para la clasificación de LES según el Colegio Americano de Reumatología (ACR)

Criterio	Definición
1. Eritema facial	Eritema fijo, plano o elevado sobre eminencias malares
2. Lupus discoide	Lesiones cutáneas eritematosas, con cambios en la pigmentación cicatrices residuales.
3. Fotosensibilidad	Rash malar causado por exposición a luz UV
4. Úlceras orales	En la cavidad oral o nasofaríngea, usualmente poco dolorosas, observadas por un facultativo.
5. Artritis	No erosiva, que afecte a dos o más articulaciones periféricas con dolor inflamación o derrame articular.
6. Serositis	Pleuritis o pericarditis, roce o evidencia de derrame pericárdico.
7. Alteración renal	Proteinuria >0.5g/dl, >3+ o cilindros celulares o hemáticos

Cuadro 2. Criterios utilizados para la clasificación de LES según el Colegio Americano de Reumatología (ACR)

8. Alteración neurológica	Convulsiones o psicosis, sin otra causa
9. Alteración hematológica	Anemia hemolítica; leucopenia ($<4000/\text{mm}^3$) o linfopenia ($<1500/\text{mm}^3$) en dos o más ocasiones o trombocitopenia ($<10000/\text{mm}^3$), en ausencia de fármacos que las produzcan.
10. Alteración inmunológica	Anticuerpos anti-ADN (anticuerpos contra el ADN nativo), anti-Sm (anticuerpos frente al antígeno nuclear Sm) y/o anticuerpos antifosfolípidos.
11. Anticuerpos antinucleares	Título elevado de ANAs detectados por inmunofluorescencia o ensayo equivalente, en algún momento de la evolución, en ausencia de fármacos que los induzcan.

Cuadro 3. Prevalencia de las manifestaciones clínicas en pacientes con LES³⁴

Manifestación clínica	n (%)
Exantema malar	311(31.1)
Lesiones discoides	78 (7.8)
Lesiones cutáneas subagudas	67 (6.7)
Fotosensibilidad	229 (22.9)
Úlceras orales	125 (12.5)

Artritis	481 (48.1)
Serositis	160 (16)
Nefropatía	<u>279(27.9)</u>
Neurolupus	194 (19.4)
Trombocitopenia	134 (13.4)
Anemia Hemolítica	48 (4.8)
Fiebre	166 (16.6)
Fenómeno de Reynaud	163 (16.3)
Lívedo reticularis	70 (7.0)
Trombosis	92 (9.2)
Miositis	43 (4.3)

De acuerdo al cuadro anterior, por la elevada frecuencia y gravedad que las manifestaciones renales confieren al paciente con lupus, el presente trabajo se enfoca en dichas manifestaciones.

2. Nefritis Lúpica (NL)

La enfermedad renal o nefritis lúpica se presenta en aproximadamente 66% de los

pacientes con LES y es una de las complicaciones más serias, siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.³⁵ La presentación varía desde una proteinuria subnefrótica asintomática hasta una glomerulonefritis rápidamente progresiva, con insuficiencia renal, considerándose un factor predictivo de mal pronóstico.³⁶ Histológicamente existe un amplio espectro de lesiones glomerulares en la NL que van desde una biopsia sana o sin anormalidades, proliferación mesangial leve hasta GN proliferativa. Dentro los signos clínicos de nefropatía que se encuentran la hematuria y/o proteinuria variable con o sin síndrome nefrótico y/o insuficiencia renal;

Sin embargo, la frecuencia de lesiones renales a nivel histológico es mucho mayor, pues existen casos de lesión histológica en la microscopia óptica y electrónica sin evidencia clínica de nefropatía.^{37,38} La mayoría de pacientes lúpicos tienen evidencia histológica de daño renal, aunque muchos de ellos no presentan hallazgos clínicos sugerentes de compromiso renal (nefritis silente), como: sedimento urinario anormal (hematuria, cilindros celulares), proteinuria persistente (>0,5 gramos/día), valores elevados de creatinina sérica, hipocomplementemia y títulos altos de anticuerpos anti DNA de doble cadena (anti DNA-ds).³⁹ Por lo tanto, mientras el compromiso clínico renal se presenta entre un 40% y un 75% de los pacientes con LES, el compromiso histológico renal puede presentarse en casi todos los pacientes.⁴⁰

2.1 Epidemiología

La prevalencia de NL varía entre 29% y 65% en diferentes series.³¹ Igualmente, la prevalencia de NL difiere según los grupos de edad y el curso de la enfermedad, siendo más frecuente en adultos jóvenes (39%) y más rara en mayores de 50 años (22%).⁴¹

La raza es otro factor de riesgo para el desarrollo de daño renal y severidad de las lesiones. En un estudio multirracial la incidencia de daño renal, en el 2002, fue de 43.1% en hispanos, 50.5% en afroamericanos y 14.3% en caucásicos ($p < 0.0001$). En otro estudio se demostró que los afroamericanos además de tener mayor incidencia de daño renal, las lesiones fueron más severas siendo la NL proliferativa difusa la lesión más frecuente.^{42,43} Bastian *et al.* observaron en 2002 en un estudio multirracial que la incidencia de la nefritis lúpica es del 54% en los pacientes con diagnóstico clínico de LES: en 65 sujetos hispanos se observó una incidencia del 43.1% (50.5% en 93 afroamericanos y 14.3% en 91 caucásicos, $p < 0.0001$).⁴⁴

Del 5% al 20% de los pacientes con NL progresan a enfermedad renal terminal (ERT) en los primeros diez años luego del diagnóstico de la NL.^{45,46} La nefropatía lúpica es causa importante de insuficiencia renal crónica terminal y es mayor su incidencia en poblaciones similares a la nuestra: Korbett *et al.*⁴⁷ informan una menor supervivencia renal a 10 años en poblaciones hispanas con nefritis lúpica en comparación a caucásicos: 73% vs 81% respectivamente y 59% en negros; $p = 0.029$.

En México, en el Instituto de Ciencias Médicas y de la Nutrición, Salvador Zubirán centro de referencia de pacientes con LES, se realizó un reporte local retrospectivo realizado con 154 pacientes con NL (1984-1990) en el que 144 pacientes completaron un seguimiento de 140 meses, observándose una mortalidad del 15%, deterioro de la función renal no terminal en el 28.9% e insuficiencia renal crónica terminal en el 30% de los pacientes al final del seguimiento.⁴⁸

2.2 Patrones Glomerulares de Lesión en la Nefropatía Lúpica

De acuerdo a modelos experimentales de enfermedad renal autoinmune mediada por complejos inmunes y en biopsias renales en humanos, es bien reconocido que los patrones de lesión glomerular se relacionan con el sitio de depósito y acumulación de anticuerpos, a su especificidad antigénica y su capacidad para unir y activar la cascada del complemento así como a su habilidad para evocar una respuesta inflamatoria celular⁴⁹, de este modo los patrones de lesión en la nefropatía lúpica han sido divididos en tres grupos:

2.2.1 Patrón Mesangial. Se caracteriza por hiper celularidad mesangial y expansión de la matriz mesangial, resultado del depósito y acumulación de complejos inmunes, cómo ocurre en la nefropatía por IgA o en la nefropatía mesangial proliferativa de NL.⁵⁰

2.2.2 Patrón Endotelial. Corresponde a una lesión proliferativa caracterizada por leucostasis, daño a las células endoteliales y proliferación endocapilar. Este patrón

es asociado a menudo con la destrucción de la pared capilar, depósito de complejos inmunes moderado a severo y varios grados de proliferación mesangial e incluso formación de semilunas en ciertos casos. Dentro de este patrón endotelial de daño glomerular, la forma difusa y global suele ser separada de la forma focal y segmentaria, ya que algunos autores han sugerido mecanismos fisiopatológicos diferentes. Este patrón de daño endotelial puede ser causado también por mecanismos no inmunológicos, tales como hipertensión maligna, toxinas bacterianas asociadas a microangiopatía trombótica, eventos trombóticos relacionados con anticoagulante lúpico. La acumulación persistente de complejos inmunes en el espacio subendotelial a su vez, conlleva a mayor daño y a cambios histopatológicos crónicos, tales como interposición celular y replicación de la membrana basal glomerular. Estos cambios endocapilares pueden presentarse en asociación con alteraciones mesangiales ya que el mesangio está adyacente al espacio subendotelial y por lo tanto existe acceso directo de complejos inmunes circulantes. Este patrón mesangiocapilar o membranoproliferativo es particularmente común en fases crónicas de la nefritis lúpica.⁴⁸

2.2.3 Patrón Epitelial. En este patrón, tanto anticuerpos como el complemento se encuentran involucrados en el daño citotóxico sobre el podocito, resultando en una lesión de pared capilar no proliferativa y no exudativa.⁴⁸

Las manifestaciones clínicas de estos tres patrones morfológicos principales se pueden predecir con base a la topografía y al carácter de las lesiones glomerulares, de tal manera, que la mesangiopatía se asocia a síndrome de hematuria y/o proteinuria subnefrótica con preservación de la función glomerular.

El patrón endocapilar se puede caracterizar típicamente por reducción aguda en la tasa de filtración glomerular, hematuria y proteinuria subnefrótica, mientras que el patrón membranoso se asocia a proteinuria importante con preservación o reducción gradual de la función renal.⁴⁸

En la nefritis lúpica, tal como en otras glomerulonefritis, no es infrecuente la coexistencia de otros patrones morfológicos, tales como las lesiones vasculíticas, podocitopatías, o lesiones tubulointersticiales, lo que lleva finalmente a una expresión clínica más compleja de la enfermedad.⁴⁸

2.3 Clasificación

Con base en la clasificación histológica de la Sociedad Internacional de Nefrología/Sociedad de Patología Renal (ISN/RPS, por sus siglas en inglés, International Society of Nephrology/Renal Pathology Society), publicada en el 2004, la nefropatía lúpica se clasifica en 6 clases morfológicas (Cuadro 4). En esta nueva clasificación Clase I y II son caracterizadas por lesiones glomerulares mesangiales. NL Clase I mesangial mínima, normal a la microscopía de luz pero con depósitos inmunes mesangiales evidenciado mediante inmunofluorescencia. NL Clase II, mesangial en microscopía de luz hay una expansión o hiper celularidad puramente mesangial con IC's mesangiales. Tanto la clase I como la II son raramente asociadas con manifestaciones clínicas severas o de disfunción renal.

Las clases III y IV refieren GN lúpica proliferativa. La clase III es una NL focal que puede combinar con lesiones proliferativas globales o segmentarias que afecten menos del 50% del total de glomérulos evaluados. Clase IV NL difusa es definida cuantitativamente por cualquier combinación de lesiones proliferativas globales o segmentarias que afecten más del 50% del total de glomérulos evaluados. Esta última es el tipo de biopsia más común en casi todas las series y representa del 40-60% del total de casos. Esta clase IV es dividida a su vez en dos subclases: GN proliferativa difusa segmentaria (IV-S) cuando \geq del 50% de los glomérulos afectados tengan lesiones segmentarias, y la GN proliferativa difusa global (IV-G) cuando \geq 50% de los glomérulos afectados tengan lesiones globales. La clase V es definida por CI's subepiteliales o intramembranosos con lesiones morfológicas vistas a microscopio de luz con o sin alteraciones mesangiales.

Esta clasificación considera las lesiones mediadas por depósitos de complejos inmunes, sin embargo no incluye otros mecanismos de daño como coagulopatías, podocitopatías o necrosis capilar glomerular (vasculitis) las cuáles no son mediadas por depósitos de complejos inmunes.⁵¹

Cuadro 4. Clasificación de la NL Sociedad Internacional de Nefrología/Sociedad de Patología Renal (ISN/RPS) 2004.¹⁷

Clase I Nefritis lúpica mesangial mínima

Glomérulo normal por ML, y presencia de depósitos inmunes mesangiales por IF.

Clase II Nefritis lúpica mesangial proliferativa

Hipercelularidad puramente mesangial de cualquier grado o expansión de la matrix mesangial por ML, con depósitos inmunes mesangiales. Depósitos subepiteliales o subendoteliales escasos y aislados que pueden ser visibles por IF o ME, pero no por ML.

Clase III Nefritis lúpica focal.

Glomerulonefritis focal, que afecta <50% de los glomérulos analizados, de manera segmentaria o global endo o extracapilar, activa o inactiva que afecta <50% del glomérulo. Típicamente presenta depósitos inmunes subendoteliales focales, con o sin alteraciones mesangiales.

Clase III(A) NL proliferativa focal, activa.

Clase III(A/C) NL proliferativa focal, activa y crónica

Clase III(C) NL esclerosante focal.

Clase IV Nefritis lúpica difusa

Glomerulonefritis difusa que afecta $\geq 50\%$ de los glomérulos, de manera segmentaria o global endo o extracapilar, activa o inactiva. Típicamente presenta depósitos inmunes subendoteliales difusos, con o sin alteraciones mesangiales. Se divide en segmentaria difusa (IV-S) cuando $\geq 50\%$ del glomérulo afectado tiene lesiones segmentarias, y global difusa (IV-G) cuando $\geq 50\%$ del glomérulo afectado tiene lesiones globales. Afección segmentaria se define como una lesión que afecta menos de la mitad del penacho glomerular.

Clase IV-S (A) NL proliferativa difusa, segmentaria, activa.

Clase IV-G (A) NL proliferativa difusa, global, activa.

Clase IV-S (A/C) NL proliferativa difusa, segmentaria activa y crónica.

Clase IV-G (A/C) NL proliferativa global difusa, global, activa y crónica.

Clase IV-S (C) NL esclerosante difusa segmentaria.

Clase IV-G (C) NL esclerosante difusa, global.

Clase V Nefritis lúpica membranosa

Depósitos de ICs subepiteliales segmentarios o globales por ML, IF, o ME con o sin alteraciones mesangiales. La NL clase V puede ocurrir en combinación con la clase III o clase IV.

Clase VI Nefritis lúpica esclerosante avanzada

$\geq 90\%$ de los glomérulos se encuentran globalmente esclerosados sin actividad residual.

2.3.1 Actividad y Cronicidad de la NL

La ISN/RPS clasifica las lesiones renales con base a criterios histopatológicos y a su vez las subdivide en lesiones activas o crónicas de acuerdo a los aspectos señalados en el cuadro 5. Las lesiones activas representan una inflamación actual o reciente, y las cicatrices o lesiones crónicas hablan o se relacionan con episodios previos de actividad de la enfermedad, las clases III o IV pueden tener lesiones tanto crónicas como activas o una mezcla de ambas, este tipo de lesiones, activas y crónicas, tienen distinto pronóstico e implicaciones terapéuticas. Tradicionalmente se han empleado los índices de actividad y cronicidad de Austin modificados, para la evaluación de estas lesiones.

Lesiones activas glomerulares	
Proliferación endocapilar, con o sin leucostasis y reducción de la luz capilar	Hipercelularidad endocapilar debido al incremento del número de células mesangiales, endoteliales e infiltrado por macrófagos que causa el estrechamiento de la luz del capilar
Cariorrexis	Fragmentos del núcleo celular, cuerpos apoptóticos o picnóticos
Necrosis fibrinoide	Lesión caracterizada por la fragmentación del núcleo o disrupción de la membrana basal glomerular, a menudo asociada con la presencia de material fibrinoide.
Ruptura de membrana basal glomerular	
Medias lunas celulares o proliferación extracapilar	Proliferación extracapilar de más de dos capas de células, que ocupan $\frac{1}{4}$ o más de la circunferencia capsular glomerular.
Asas de alambre	Depósitos subendoteliales identificados por microscopía de luz
Agregados inmunes intraluminales (trombos hialinos)	Material intracapilar eosinófilico homogéneo el cual consiste en depósitos de ICs observados por inmunofluorescencia.

Cuadro 5. Descripción de las lesiones activas

Esclerosis Glomerular global	Colapso o fibrosis de los capilares
Medias lunas fibrocelulares	Capas de tejido fibroso que retraen la cápsula de Bowman
Atrofia Tubular	
Fibrosis Intersticial	

Cuadro 6. Descripción de las lesiones crónicas

2.4 Etiología

Aunque el conocimiento de la etiología del LES no está del todo comprendida, es claro que existen un número de mecanismos efectores diferentes pueden actuar solos o en conjunto para producir los patrones pleomórficos de la NL y las distintas presentaciones clínicas de los pacientes con lupus y enfermedad renal. La lesión renal en el LES es debida tanto al proceso inflamatorio desencadenado por los mecanismos autoinmunes, como a la respuesta de los diversos componentes del tejido renal a dicha inflamación. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos descritos se encuentra el depósito de complejos inmunes e infiltrados celulares. Los depósitos inmunes pueden localizarse en el glomérulo, en los vasos y a lo largo de la membrana basal tubular.⁵²

2.4.1 Auto-anticuerpos en LES

La característica de esta enfermedad es la producción de auto-anticuerpos nucleares o citoplásmicos. Aparte de su valor en el diagnóstico y manejo de los pacientes con LES, estos anticuerpos son el principal determinante patogénico.¹

Los auto-anticuerpos pueden llevar al daño tisular y celular a través del receptor Fc mediando inflamación,⁵³ así como también por citotoxicidad directa, la cuál es usualmente complemento dependiente, como se ha observado en la anemia hemolítica mediada por anticuerpos o en la trombocitopenia. En el riñón, los antígenos intrínsecos, tales como componentes de la matriz extracelular o celulares como glicoproteínas de superficie pueden actuar como blancos para la unión con auto-anticuerpos. Además, el daño renal en la NL puede resultar de la unión de auto-anticuerpos que se unen a antígenos circulantes, formando complejos inmunes circulantes o de auto anticuerpos que se unen a antígenos en la circulación glomerular y paredes capilares, causando formación *in situ* de los complejos inmunes, como se ha observado para los nucleosomas y anticuerpos anti-DNA de doble cadena.

Tanto los agregados inmunes como componentes del complemento están presentes en el sitio de daño glomerular y en los túbulos en alrededor de 2/3 de las biopsias renales. Aun no está claro si estos agregados son derivados de los complejos circulantes o de la combinación *in situ* de antígeno y anticuerpo.¹⁶

La formación de anticuerpos antinucleares, especialmente contra DNA de doble cadena (dsDNA), es un hallazgo patognomónico de LES. Tradicionalmente se

había pensado que NL era iniciada por el depósito glomerular de complejos DNA/antiDNA, sin embargo los complejos DNA/anti-DNA son difícilmente nefritogénicos.⁵⁴

Se cree que la NL es iniciada por el depósito glomerular de complejos inmunes y que existen otros eventos esenciales tales como: aquellos mediados por la señalización del receptor Fc, la producción de citocinas, necesarias para desencadenar la inflamación glomerular y promover el daño tisular. Sin embargo el papel específico de estos componentes patogénicos no está claro en la actualidad.⁵⁵

A través del receptor Fc y la unión de complemento subsecuente, es entonces que se inicia una reacción citotóxica e inflamatoria, dicha citotoxicidad puede estar dirigida hacia los podocitos como en el establecimiento de la nefropatía membranosa, dónde ocurre la formación de complejos inmunes subepiteliales a lo largo de la membrana basal glomerular o hacia células endoteliales de los capilares como es el caso de la NL proliferativa endocapilar con una reacción inflamatoria exudativa que sigue a la formación de los depósitos subendoteliales.

2.4.2 Depósito de Complejos Inmunes Circulantes

El depósito de complejos inmunes circulantes en la vasculatura renal fue el primer mecanismo patogénico descrito en la daño glomerular de LES,⁵⁶ lo cuál fue confirmado por la presencia de altos niveles séricos de complejos inmunes circulantes, anti-DNA de doble cadena y otros antígenos nucleares así como el

consumo de componentes de la vía clásica del complemento (C1, C4 y C3)⁵⁷ apoyan un mecanismo de complejos inmunes en pacientes con glomerulonefritis lúpica activa. La presencia de reactantes inmunológicos en el glomérulo, tales como inmunoglobulinas del tipo IgG, IgM y fracciones de complemento como C3, representado por los depósitos electron-densos en estudios histológicos apoyan también este mecanismo de daño. Los hallazgos histológicos asociados con el depósitos de inmuno-complejos incluyendo asas de alambre, trombos hialinos, trombos capilares y macrófagos glomerulares son signos de inflamación glomerular activa y que únicamente son vistos en las clases III y IV.

La NL membranosa, (clase V ISN/RPS) se encuentra mediada también por depósitos de ICs, pero los depósitos observados en esta clase no se asocian usualmente con inflamación glomerular. De hecho, los depósitos inmunes subepiteliales e intramembranosos de la NL membranosa están en la misma localización que los depósitos observados en la GN membranosa idiopática y que el modelo experimental de GN de Heymann donde, la carga de los depósitos en la pared del capilar es alta sin una inflamación glomerular significativa.

Los mecanismos responsables de la localización subepitelial los depósitos inmunes en unos pacientes y la subendoteliales en otros, no está totalmente comprendida, sin embargo se ha asociado al tipo de anticuerpos y a la naturaleza y localización de los antígenos.⁵⁸

Así se muestran 2 mecanismos de la localización de los ICs asociados con una nefropatía proliferativa y membranosa de NL. Esta dicotomía es importante

también clínicamente, ya que el tratamiento y el pronóstico asociado a estas 2 formas de enfermedad mediada por CIs es muy diferente.

6. Perfil de TH1/TH2 y LES

Es ampliamente reconocido que los linfocitos Th, cuando son activadas se diferencian en al menos 2 clases, Th1 y Th2, caracterizadas por los distintos perfiles de citocinas que producen.

Después del reconocimiento del antígeno acoplado a la molécula del MHC apropiada, por el TCR inicia rápidamente una expansión clonal de linfocitos T cooperadores, la cual ocurre bajo a una diferenciación programada. Este proceso de diferenciación puede resultar en una respuesta inmunológica altamente polarizada.⁵⁹ Los linfocitos T cooperadores naive, pueden diferenciarse en al menos dos clases funcionales durante una respuesta inmunológica, linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1), los cuáles secretan una citocina llamada interferón- γ (IFN- γ), y linfocitos cooperadores tipo 2 (Th2), los cuáles secretan la citocina IL-4.⁶⁰ Los linfocitos Th1 son responsables de la inmunidad celular, mientras que los linfocitos Th2 son responsables de la inmunidad humoral o extracelular.

En el proceso por el cuál un linfocito cooperador puede diferenciarse en un Linfocito Th1 o Th2 maduro influyen muchos factores, las citocinas IL-12 e IL-4 que actúan a través de los factores de transcripción STAT 4 y STAT 6 respectivamente, por sus nombres en inglés (signal transducer and activator of transcription), que son determinantes en el resultado, (ver figura8). Se han

propuesto otros factores como la dosis del antígeno, la participación de las moléculas co-estimuladoras, modificadores genéticos del huésped y factores no relacionados con citocinas los cuáles tienen papeles cruciales en la determinación del tipo de linfocitos Th que se generen.

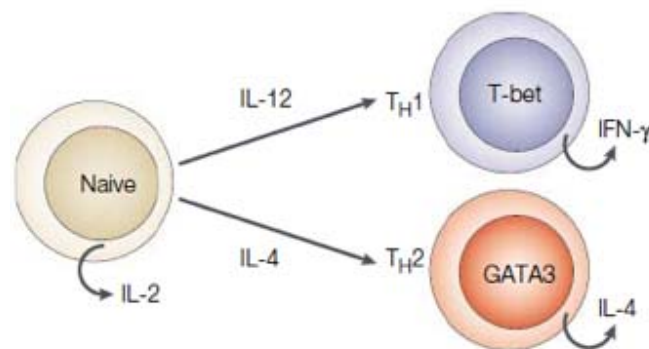


Figura 1. Modelo de la diferenciación de los linfocitos T cooperadores

Sin embargo, los factores definidos con más claridad que determinan la subpoblación de linfocitos T son las citocinas presentes al inicio de la respuesta inmunológica. IL-12 e IFN- γ son factores importantes que inducen el desarrollo de linfocitos Th1, y la producción de altos niveles de IFN- γ por parte de los linfocitos Th1. Los linfocitos Th1 son efectores importantes involucrados en la erradicación de patógenos intracelulares, pero si son activados de manera inadecuada pueden ser causa de autoinmunidad órgano-específica. Por otro lado los linfocitos Th2, los cuáles se desarrollan en presencia de IL-4 han sido involucrados en la respuesta humoral y en la erradicación de helmintos, pero su respuesta también puede resultar en un daño inflamatorio como en las manifestaciones alérgicas y atopia.

6.1 Generación de Linfocitos Th2

IL-4 fue la primera citocina reconocida en promover el desarrollo de la subpoblación Th2.⁶¹ Posteriormente se observó que sus funciones operan a través de las acciones del factor de transcripción STAT 6. Figura 9. Un segundo factor de transcripción, considerado factor de transcripción Th2-específico, es GATA 3, identificado originalmente como regulador de la expresión de la gama de citocinas Th2. La expresión de GATA 3, es inducida rápidamente por IL-4, a través de STAT6, incrementado de un bajo porcentaje en linfocitos T naive a un alto porcentaje de linfocitos Th2.

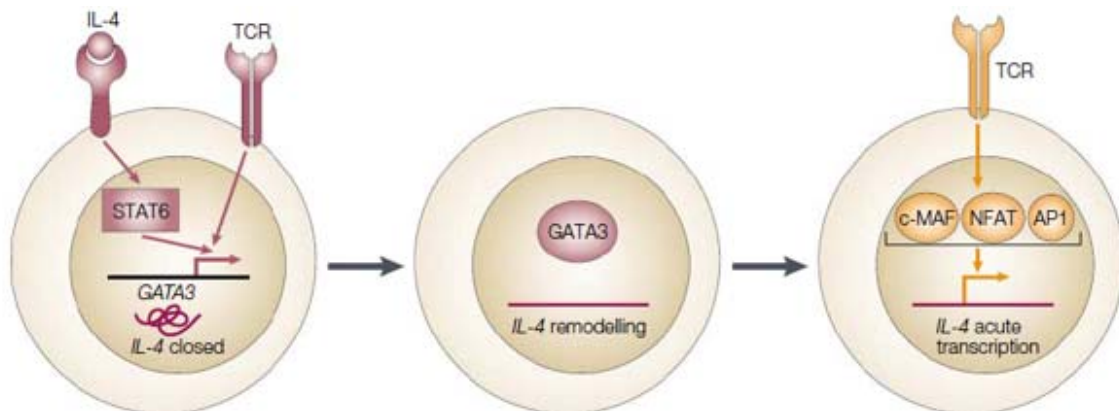


Figura 2. Vías para inducir la expresión de la IL-4

6.2 Generación de Linfocitos Th1

El factor de transcripción T-bet fue identificado, como un factor específico inductor de Th1, el cuál puede inducir la producción de IFN- γ . El factor de transcripción T-bet, miembro de la familia de los factores de transcripción T-box, es expresado en linfocitos Th1 ya desarrollados, véase figura 10. Sin embargo, aún se desconoce cómo T-bet induce la expresión de IFN- γ , por lo cuál aún es un área de amplia investigación. La expresión de T-bet parece ser inducida en Linfocitos T naive, por la señalización de IFN- γ , mediada por STAT-1.⁶²

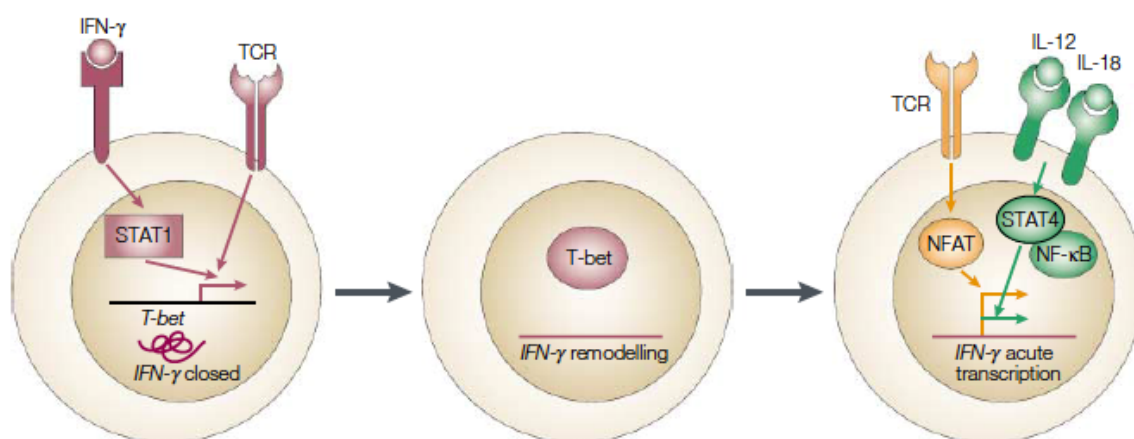


Figura 3. Vías para inducir la expresión de IFN- γ

6.3 Desarrollo de las Citocinas Inducidas por Th1

6.3.1 Interleucina-12 (IL-12)

IL-12 es un factor dominante para dirigir el desarrollo de los linfocitos Th1, los cuáles son productores de altos niveles de IFN- γ . IL-12 es una citocina de 75kDa, formada por un heterodímero, dos cadenas glicosiladas unidas covalentemente, p35 y p40. Esta citocina es producida principalmente por macrófagos activados y

otras APC's cómo células dendríticas, y también como otras células como neutrófilos una vez que se encuentran con productos microbianos incluyendo el lipopolisacárido y componentes de virus, bacterias intracelulares y protozoarios. IL-12 dirige el desarrollo de los linfocitos Th1 desde la estimulación antigénica en linfocitos T naive y activa el factor de transcripción STAT 4.⁶³ Esta citocina, mejora la proliferación celular y la actividad citotóxica de células NK y linfocitos T y estimula su producción de IFN- γ . Pero principalmente IL-12 induce el desarrollo de linfocitos Th1 in vitro e in vivo. Además es un co-factor importante estimulador de crecimiento y síntesis de IFN- γ y adhesión celular de linfocitos T ya diferenciados. Por lo tanto, IL-12 es una citocina crítica en la inmunoregulación. La poderosa actividad de IL-12 requiere un control preciso, el cual es realizado por las APC's.⁶⁴

6.3.2 Interferón- γ (IFN- γ)

También conocido como interferón de tipo II, es un gen de una sola copia, localizado en el cromosoma 12. Es una proteína que consiste en 166 aminoácidos, el INF- γ , inicialmente se creía que era producido por linfocitos Th1, CD8+ y NK exclusivamente. Sin embargo, ahora existe evidencia que otras células, tales cómo linfocitos B, NKT y APC's secretan IFN- γ . Este interferón producido por las APC's (macrófagos y células dendríticas) que actúan localmente pueden ser importantes en la autoactivación celular y activación de células vecinas. En linfocitos Th1 diferenciados, la expresión reiterada de IFN- γ , puede ocurrir experimentalmente a través de 2 vías, mediante la unión del TCR y su

receptor o mediante la estimulación de citocinas (IL-12 e IL-18). IL-18 aumenta la producción de IFN- γ , por los linfocitos Th1 diferenciados a pesar de su incapacidad de dirigir el desarrollo de linfocitos Th1 por sí misma.⁶⁵ La combinación de IL-12 e IL-18 puede inducir la producción de IFN- γ por linfocitos T diferenciados en ausencia de la señalización a través de TCR. Los detalles transcripcionales de cómo IL-12 e IL-18 inducen la producción de IFN- γ aún son desconocidos. El IFN- γ , producido por las células NK y posiblemente las APC's es importante en la defensa temprana del huésped contra alguna infección, mientras que el producido por los linfocitos T es la fuente principal en la respuesta inmunológica adaptativa. La producción de IFN- γ , es regulada por algunas citocinas secretadas por las APC's tales como IL-12 e IL-18. Los reguladores negativos de su producción incluyen IL-4, IL-10, TGF- β y los glucocorticoides.⁶⁶

6.4 Desarrollo de las Citocinas Inducidas por Th2

6.4.1 Interleucina-13

Es una citocina pleiotrópica, que fue originalmente identificada como una proteína producida por linfocitos murinos Th2 y referida como P600⁶⁷. IL-13 es una proteína de 12-17 kDa, se localiza en el cromosoma 5 muy cercano al gen que codifica IL-4. Esta citocina tiene una actividad anti-inflamatoria al inhibir la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1, TNF, IL-8 e IL-6 por parte de los monocitos de sangre periférica humana estimulados con lipopolisacárido.⁶⁸

Además IL-13 mejora la diferenciación y proliferación de linfocitos B y monocitos, incrementa la expresión de CD23 e induce el cambio de clase de IgG4 a IgE.

6.4.2 IL-4

Esta citocina es expresada como una proteína de 15-19kDa, que existe como dímero. El gen de IL-4 se localiza en el cromosoma 5. Es producida por Linfocitos Th2, mastocitos y basófilos, e induce la diferenciación de linfocitos Th0 a Th2 mientras suprime el desarrollo de linfocitos Th1. Actúa también sobre linfocitos B y T, mejora la expresión de las moléculas del MHC clase II en linfocitos B y promueve el cambio de clase en las inmunoglobulinas de IgG1 a IgE. IL-4 estimula la producción de IL-6 y colágeno por los fibroblastos de la dermis humana y puede así tener un papel en la patogénesis de enfermedades fibrosas como la esclerosis sistémica.⁶⁹

7. Respuesta Th1/Th2

El balance entre células Th1 y Th2 parece ser importante en muchas enfermedades autoinmunes⁷⁰ y este balance juega un papel importante en la respuesta inmunológica. Así mismo tiene función protectora en la inmunidad del huésped, ambas clases de linfocitos han sido implicados en respuestas patológicas. Los linfocitos Th1 pueden mediar respuestas autoinmunes órgano-específicas, por otra parte los linfocitos Th2 han sido implicados en la patogénesis

de asma y alergia. La composición final de la respuesta de los linfocitos cooperadores al antígeno, pueden por lo tanto determinar si el resultado de una respuesta a un proceso infeccioso, inflamatorio o autoinmune es favorable o no.

Evidencia reciente sugiere que la respuesta de citocinas Th1 con un exceso en su producción es esencial para el desarrollo de la nefritis en modelos murinos de lupus y también juega un papel importante en la NL humana.⁷¹

Aunque el LES es generalmente considerado como un prototipo de enfermedad con citocinas dominantes Th2, informes recientes tanto en humanos como en animales han estudiado el rol de citocinas Th1, especialmente de INF- γ en la patogénesis,^{72,73} sugiriendo que las citocinas Th1 ejercen un papel nefritogénico más importante.

b. Antecedentes Particulares

La producción de citocinas derivadas de las células T, juegan un papel determinante en el desarrollo de LES. Estudios previos han informado que un balance inapropiado en la producción de citocinas entre las respuestas inmunológicas de las células Th1 y Th2, con un predominio por las citocinas de Th2 en sangre periférica de pacientes con LES lo cuál está asociado con la patogénesis de la enfermedad.⁷⁴

Sin embargo, otros estudios se han enfocado al análisis de los niveles de expresión de INF- γ e IL-4 en células T intrarrenales así como también en células

sanguíneas periféricas de pacientes con LES con NL difusa proliferativa por inmunohistoquímica demostró el predominio de una respuesta Th1.⁷⁵

Por otro lado, otro estudio señala que el infiltrado de células T en el riñón puede producir citocinas de tipo Th2, tales como IL-4 e IL-10, determinado a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), y refiere que tal discrepancia puede deberse por la diferente sensibilidad entre los métodos empleados para la determinación de citocinas.⁷⁶

Otro estudio realizado describe la expresión elevada de los niveles de IL-13 en pacientes con LES,⁷⁷ interleucina que pertenece a la respuesta Th2, y además esta elevada también en enfermedades como artritis reumatoide, Síndrome de Sjögren y Esclerosis múltiple.

De acuerdo a los antecedentes el perfil de citocinas que será evaluado para respuesta inmunitaria Th1 fue INF- γ e IL-12, mientras que para Th2 IL-13 e IL-4.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NL es una de las complicaciones más graves de LES, y es el principal determinante del desenlace de la enfermedad a largo plazo. Estudios se han realizado para determinar el origen fisiopatológico que conlleva al daño renal en esta enfermedad señalando resultados controvertidos.

El compromiso renal en LES es variado, por un lado hay pacientes que no muestran ninguna evidencia de nefritis a lo largo de su enfermedad, mientras que otros desarrollan un cuadro fulminante con rápida pérdida de la función renal, la mayoría de pacientes se encuentran entre estos dos extremos.

- El predominio de alguna respuesta inmunológica Th1 o Th2 repercute en la génesis del daño renal, que traduce su relación con la clase histológica renal?

III. JUSTIFICACIÓN

Siendo LES el prototipo de las enfermedades autoinmunes y por la frecuencia y gravedad de este padecimiento, es trascendente el estudio de las complicaciones asociadas a esta enfermedad, uno de los trastornos asociados es la NL, que contribuye de manera importante como causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes que sufren de LES.

Además debido a la severidad de la nefropatía lúpica, la comprensión de los trastornos que conducen al daño renal podrá ayudar a descifrar los mecanismos de control y regulación de la respuesta inmunológica a este nivel, permitiendo evitar complicaciones cada vez más severas asociadas a este padecimiento.

Por otro lado, es de vital importancia recalcar que la nefropatía es la complicación más grave en estos pacientes y que además la mayoría de los enfermos con LES presentarán afectación renal en algún momento de su evolución.

El entender el tipo de respuesta inmune generada en esta enfermedad podrá ayudar a generar nuevas herramientas terapéuticas que repercutan en el pronóstico del paciente además de que al tratarse de un padecimiento crónico degenerativo genera grandes costos económicos en su tratamiento sobre el paciente que lo padece.

IV. HIPÓTESIS

- En la nefropatía lúpica: el daño renal manifestado por actividad, cronicidad y clase histopatológica depende del perfil de citocinas (Th1-Th2) secretado.

-

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General:

- Determinar el predominio del patrón de respuesta inmunológica Th1 y Th2 en biopsias de pacientes con nefropatía lúpica y la relación con el daño renal de acuerdo con la clasificación histológica de ISN/RPS.

B. Objetivos Específicos:

- Determinar la expresión de interleucinas (IL) involucradas en el perfil Th1: (INF- γ e IL-12) Y Th2: (IL-4 e IL-13).
- Clasificar histológica de las biopsias renales de los pacientes con nefropatía lúpica de acuerdo a la clasificación ISN/RPS
- Determinar la relación entre la expresión de citocinas y el daño histológico renal de cada biopsia.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Diseño de Estudio

Se trata de un estudio de tipo retrospectivo, observacional y transversal.

B. Universo de Estudio

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de LES, que reunieran criterios clínicos y de laboratorio de la ARA, tratados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), que contaran con biopsia renal con diagnóstico histopatológico de nefropatía lúpica del departamento de Anatomía Patológica del Instituto de Nutrición de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, del 1° de Febrero del 2009 al 31 de diciembre del 2010, sin distinción de sexo que cumplieran con los criterios de selección. Como controles se emplearon biopsias cero de riñones sanos de riñones transplantados.

C. Tamaño de Muestra:

Se incluyeron todas las biopsias del año en que se llevó a cabo el estudio, que en total incluyeron 91 casos.

Controles

Se emplearon 10 biopsias protocolizadas “cero” de riñones sanos, obtenidos de pacientes en el momento del trasplante renal.

D. Criterios de Selección

Criterios de inclusión

- Biopsias renales procedentes de pacientes con diagnóstico histopatológico de nefropatía lúpica sin importar edad, el género ni la clase histológica.

Criterios de No inclusión

- Biopsias de pacientes con LN, con alguna otra condición como: diabetes mellitus, embarazadas, neoplasia renal, linfoproliferativa, o de pacientes con alguna infección crónica.
- Biopsias de pacientes con otra nefropatía que no fuera NL.

Criterios de exclusión

- Biopsias de pacientes de quién no se contara con el bloque de parafina.
- Expedientes con información clínica incompleta o extraviada.

E. Abordaje Protocolario

El abordaje protocolario consistió en 3 etapas:

Etapa 1. Revisión del registro de Biopsias del Departamento de Anatomía Patológica del INCMNSZ, correspondiente al periodo del 1º de enero del 2009 al 31 de diciembre del 2010, se colectaron las biopsias renales procedentes de pacientes con diagnóstico de NL y búsqueda de tejido renal ya sea incluido en parafina o tejido fresco congelado correspondiente a cada paciente.

Etapa 2. Revisión de los expedientes clínicos correspondientes a cada paciente y captura de datos de las siguientes variables:

Aspectos demográficos:

- Género
- Edad

Parámetros clínicos:

- Química sanguínea (Glucosa)
- Pruebas de función renal (Creatinina, Urea, BUN)
- Pruebas inmunológicas (C3, C4, cuantificación de anticuerpos anti-DNAc)

Etapa 3. Re-evaluación de las biopsias renales y re-clasificación de la nefropatía lúpica. Así como deteterminación de la expresión de citocinas del perfil Th1 y Th2 en tejido renal por inmunohistoquímica y análisis estadístico de los resultados.

F. Clasificación de Nefropatía lúpica

Se revisaron los cortes histológicos de cada caso que correspondió a las siguientes tinciones: hematoxilina y eosina (HE), ácido periódico de Shciff (PAS), tinción de plata (plata metamina de Johns) y tinción tricómica de Masson. Para determinar la clase histológica de acuerdo a la clasificación ISN/RPS así como el grado de actividad y cronicidad de cada biopsia una nefropatóloga experta (UN) revisó el material.

G. Arreglo de Tejidos:

Se realizó un arreglo de tejidos que contenía todas las muestras reclutadas con una replicación para someter a todos los casos durante el proceso de inmunohistoquímica bajo las mismas condiciones.

H. Determinación de la Expresión de Citocinas Th1 y Th2

La expresión de citocinas se determinó la expresión de citocinas mediante la técnica inmunohistoquímica indirecta, para el perfil de Th1 se consideraron las citocinas I INF- γ e IL-12 y para el perfil Th2 se consideraron las citocinas IL-4 e IL-13

Con la finalidad de someter a todos los casos durante el proceso de inmunohistoquímica bajo las mismas condiciones se realizó un arreglo de tejidos que contenía todas las muestras reclutadas con una replicación.

I. Protocolo de Inmunohistoquímica Indirecta:

Se realizaron los cortes histológicos a 4 μ m y fueron sometidos al siguiente procedimiento:

Desparafinación: las laminillas se desparafinaron en el horno a 60°C durante 25-30 minutos, posteriormente se hidrataron en el tren del alcoholes (absoluto-30°) hasta agua destilada.

Recuperación antigénica: se realizó en una olla de presión, se colocaron las laminillas en cajas Petri con Trilogy (Cellmark 1X), se dejan bajo calor y presión durante 15min.

Posteriormente se incubaron con peróxido de hidrógeno 0.3% en metanol durante 10min, seguido de incubar con albúmina al 5% durante 60min. Posteriormente se agregó el anticuerpo primario diluido en agua destilada y se dejó incubar toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos primarios empleados fueron los siguientes:

- IFN- γ : Anticuerpo monoclonal anti- interferón γ de ratón, clona 25723, (Sigma-Aldrich), no. De catálogo 19284, con una dilución de 1:100.
- IL-12: Anticuerpo monoclonal Anti-IL-12 de ratón, clona 24910,(R&D), no. De catálogo MAB219, con una dilución de 1:100
- IL-4: Anticuerpo monoclonal anti- IL-4 de ratón, clona 3007, (R&D) no. De catálogo MAB304, con una dilución de 1:50
- IL-13: Anticuerpo monoclonal anti- IL-13, (Abnova) No. De catálogo H00003596-M06, con una dilución 1:50

Controles empleados para los anticuerpos empleados:

- IFN- γ : Control positivo Bazo (Figura 8), control negativo (Figura 9): hiperplasia de ganglio
- IL-12: Control positivo Bazo, control negativo: Hiperplasia de ganglio
- IL-4: Control positivo apéndice , control negativo: piel
- IL-13: Control positivo testículo, control negativo: piel

Revelado: El sistema de revelado empleado fue diaminobenzidina, que produce un precipitado color café, el kit que se utilizó fue Mouse/Rabbit inmunodetector de la marca BIO-SB (catálogo: BSB 0005) basado en biotina-estreptavidina.

Después del anticuerpo primario se agrega el reactivo biotin-link, correspondiente al anticuerpo secundario acoplado a biotina durante 10min, posteriormente se agrega el reactivo HRP label, correspondiente a estreptavidina y peroxidasa por 10 min, en seguida observando al microscopio se agrega el cromógeno correspondiente a la diaminobenzidina para revelar el color y se detiene la reacción con agua destilada.

Finalmente se contrastó con hematoxilina de Harris durante 1minuto, y se vira el color con agua amoniacal 30 segundos y se procede a deshidratar en el tren de alcoholes (etanol 30°-absoluto) y xilol, para terminar se monta con resina y se cubre con un cubreobjetos.

J. Análisis de los Resultados

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS Versión 10, los resultados son expresados como media \pm DE. A los resultados obtenidos se les realizó una prueba de estadística descriptiva, un análisis univariado, para el caso de las variables dicotómicas: frecuencias (porcentajes).

La significancia estadística fue determinada mediante la prueba de Kruskal Wallis para comparación entre varios grupos para los datos no paramétricos.

También se aplicó un análisis bivariado que contempló una comparación entre las variables independiente y dependiente mediante la prueba de (χ^2), para comparar la expresión de las citocinas y su relación con la clase histológica de NL de acuerdo a la ISN/RPS, los valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

VII. RESULTADOS

En este estudio se consideraron 91 biopsias de pacientes con diagnóstico de NL registrados en departamento de Anatomía Patológica del INCMNSZ, durante el período del 1° de enero al 31 de diciembre del 2010, de los cuales 60 casos fueron excluidos por falta de bloque o laminilla y sólo se incluyeron 31 pacientes que reunían los criterios de inclusión.

A. Características epidemiológicas de la población de estudio

La distribución de género fue de 26 mujeres (83.9%) y 5 hombres(16.1%), con relación mujer:hombre de 5.2:1. La edad media fue de 29.8 años con un intervalo de 26.1 a 33.5 años. Se realizó un análisis estadístico para identificar una posible diferencia significativa con respecto a la distribución de género y edad entre las diferentes clases histológicas encontrando una distribución homogénea de los casos en todas las clases. En el cuadro 7 se muestra la distribución de género y edad promedio según el diagnóstico histológico.

Cuadro 7. Relación entre la edad y género de acuerdo a la clase histológica

Variable/Mediana (rango intercuartil 25, 75)	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V	Clase VI	Valor p*
Edad	23.5 (23- 24)	25.5 (22.5- 29.25)	27.5 (24- 55)	24.0 (20.0- 56.0)	27.0 (22.0- 32.0)	0.63
Género	2F	2F 2M	17F 3M	3F	2F	

*La comparación de las medianas se llevó a cabo mediante la prueba de Kruskal Wallis

B. Diagnóstico histopatológico de la población de estudio

Las biopsias con NL tuvieron la siguiente distribución de acuerdo con la clasificación de ISN/RPS¹⁷ (figura 4), 2 casos (6.45%) con NL proliferativa mesangial (clase II), 4 casos (12.9%) con NL proliferativa focal (clase III), 20 casos (64.52%) con NL proliferativa difusa (clase IV), 3 casos (9.68%) con NL membranosa (clase V) y 2 casos (6.45%) NL con esclerosis global (clase VI).

De acuerdo a la subclasificación de las características histopatológicas de la NL clase IV la frecuencia fue de: 9 casos (45%) con NL clase IV-S(A), (NL proliferativa difusa segmentaria con lesiones activas), 1 caso con NL clase IV-S(C), (NL proliferativa segmentaria con lesiones crónicas), 5 casos (25%) con NL clase IV-G(A), (NL proliferativa global con lesiones activas) y 5 casos (25%) con NL Clase IV-G(C), (NL proliferativa global con lesiones crónicas). El 54% de los pacientes con nefropatía lúpica clase III y IV presentaron además una asociación con la clase V, es decir que al evaluar la biopsia se presentaban estas dos clases juntas.

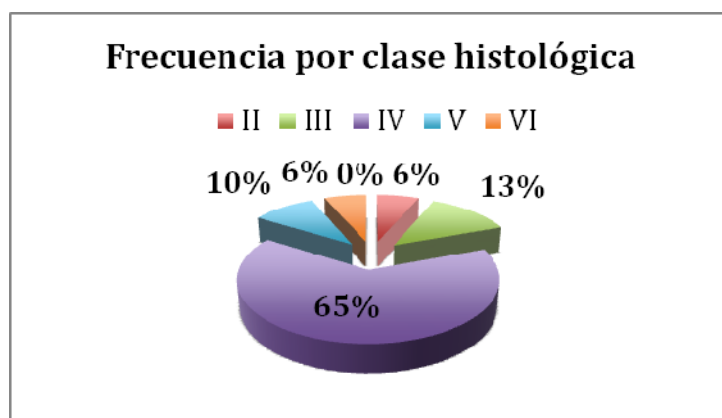


Figura 4. Frecuencia de casos según la clase histológica de las biopsias con NL

C. Parámetros inmunológicos según la clase histológica

Cómo marcadores de actividad de la enfermedad, se determinaron las fracciones C3 y C4 del complemento así como los anticuerpos anti-DNA de doble cadena en todos los casos. El cuadro 8 muestra la comparación entre las clases histológicas de la mediana de cada marcador y el intervalo intercuartil (25-75) según la clase histológica.

Cuadro 8. Asociación entre los marcadores de la actividad y la clase histológica

Variable/Mediana (rango intercuartil 25, 75)	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V	Clase VI	Valor p*
C3 (52.8-170.9mg/dl)	67.0 (48.1-85.9)	52.85 (41.2-67.72)	40.15 (32.72- 58.57)	40.30 (36.70-72.30)	73.950 (68.1-79.8)	0.116
C4 (12.1-31.5mg/dl)	6.660 (3.72-9.60)	11.30 (10.15-12.37)	6.52 (3.35- 13.85)	3.40 (2.76-10.20)	23.40 (22.8-24)	0.107
Ac anti-DNA_{dc} (Negativo)	32.70 (9.7-55.7)	94.6 (24.75- 1000.7)	69.30 (38.22- 206.6)	47.60 (21.4-1399.3)	11.05 (5.90-16.2)	0.378

*La comparación de las medianas se llevó a cabo mediante la prueba de Kruskal

Wallis

D. Parámetros bioquímicos según el diagnóstico histopatológico.

Como marcadores de la función renal se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos en sangre: creatinina, urea, nitrógeno ureico en sangre (BUN) y albúmina. En el Cuadro 9 se muestran los parámetros bioquímicos analizados según la clase histológica. Con respecto a los niveles de creatinina sérica en la clase histológica IV y VI se observó un aumento estadísticamente significativo en comparación con el resto de las clases histológicas (II, III y V). De igual forma existe una diferencia estadística significativa entre las distintas clases histológicas para la urea ($p=0.002$) y el BUN ($p=0.002$), mostrando los valores más elevados en la clase IV y VI. En el caso de la albúmina no existió diferencia significativa entre las clases histológicas.

Cuadro 9. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal según la clase histológica de la NL

Variable/Mediana (rango intercuartil 25, 75)	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V	Clase VI	Valor p*
Creatinina (0.6-1.0mg/dl)	0.66 (0.48-0.85)	0.61 (0.43-0.78)	1.29 (0.85-2.45)	0.630 (0.46-0.86)	2.99 (2.76-3.22)	0.003
Urea (7-20mg/dl)	29.51 (20.53- 38.5)	26.3 (17.42-37.42)	64.6 (37.47- 87.75)	18.4 (17.1-32.1)	184.0 (177.6- 190.5)	0.002
BUN	13.75	12.30	30.20	8.40	86.0	0.002

(7-18mg/dl)	(9.5-18)	(8.15-17.5)	(17.5-41.0)	(8.0-15.0)	(83.0-89.0)	
Albúmina	3.25	3.0	2.40	2.80	3.05	0.490
(>3.5g/dl)	(2.8-3.7)	(1.47-3.17)	(1.90-2.80)	(1.60-2.90)	(2.3-3.8)	

*La comparación de las medianas se llevó a cabo mediante la prueba de Kruskal Wallis

Con los resultados aquí analizados, queda demostrada la utilidad de la clasificación morfológica, ya que determina las clases de NL con comportamiento clínico y de laboratorio diferente.

E. Expresión de citocinas en biopsias renales

Cómo prototipos del perfil de citocinas Th1, se determinó la expresión de IFN- γ e IL-12 en biopsias renales incluidas en parafina por inmunohistoquímica. Como prototipos del perfil de citocinas Th2, se determinaron las citocinas IL-4 e IL-13.

Para cada una de las citocinas se utilizó un control negativo para validación de la técnica, para INF- γ (Figura 5d) e IL-12 (Figura 12d) se empleó un corte histológico de hiperplasia de ganglio, y para el caso de IL-4 (Figura 13b) e IL-13 (Figura 14b) se utilizó un corte histológico de piel sana. También se utilizó como control positivo para el caso de INF- γ (Figura 5c) e IL-12 (Figura 12c) se emplearon cortes histológicos de bazo, y para el caso de IL-4 fue un corte histológico de apéndice (Figura 13a) y para la IL-13 (Figura 14a) fue un corte histológico de testículo. Se analizó la ausencia de la expresión de cada citocina (control negativo) y la expresión de cada proteína (control positivo) para cada una de las muestras biológicas analizadas. Según las imágenes analizadas correlacionaron con lo

esperado para cada biopsia permitiendo validar la técnica empleada por la detección de la expresión de cada una de las citocinas en las biopsias renales.

1. Perfil de Citocinas Th1 en biopsias renales

1.1 Expresión de IFN- γ

En la figura 5a se puede observar la biopsia de un caso que corresponde a un corte histológico de una biopsia renal de NL clase IV positiva a la expresión de IFN- γ , en la figura 5b se observa el corte histológico de una biopsia renal de NL clase IV negativa correspondiente a otro paciente. En la figura 5c se muestra un corte histológico de bazo utilizado como control positivo y en la figura 5d se presenta un corte histológico de hiperplasia de ganglio utilizado como control negativo, los cuáles permitieron validar la técnica de inmunohistoquímica.

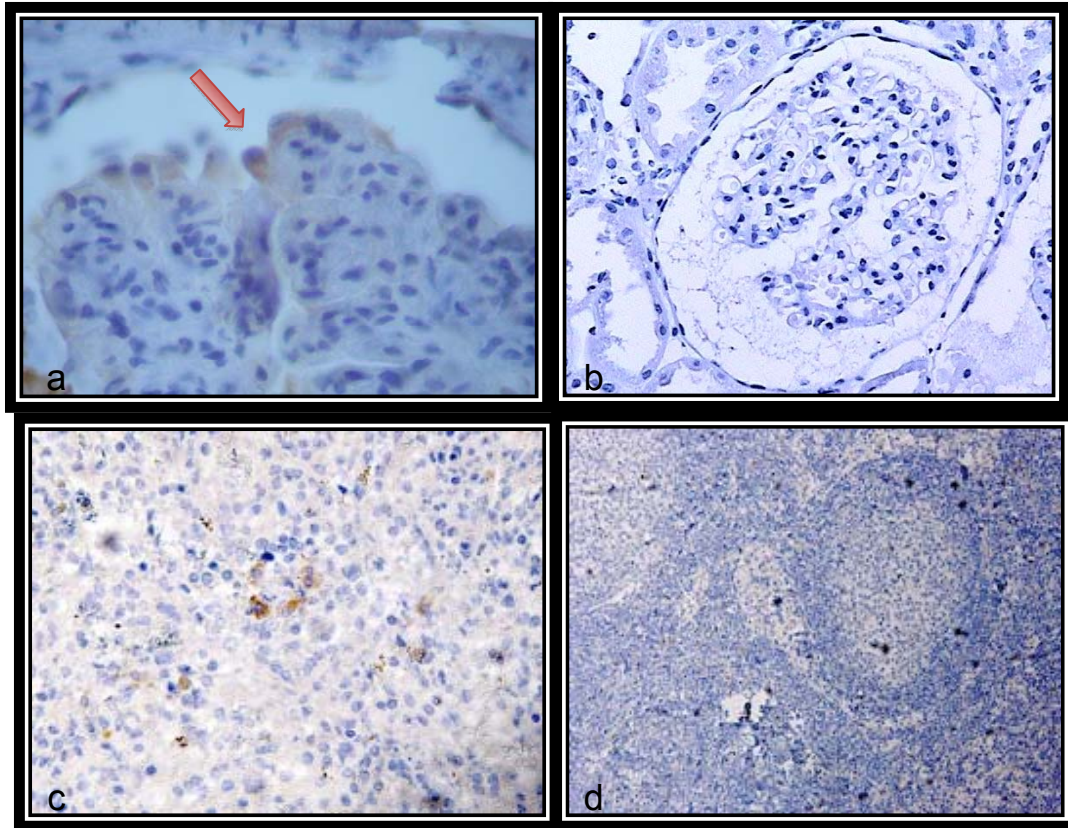


Figura 5. Expresión de IFN- γ en biopsias de casos y controles. a) Biopsia renal de un caso NL clase IV positivo; b) Biopsia renal de caso de NL clase IV negativo a IFN- γ ; c) Biopsia de bazo (control positivo) y d) Biopsia de ganglio con hiperplasia de ganglio (control negativo);

De acuerdo a los resultados de inmunohistoquímica 17/31 (54.8%) de las biopsias procesadas expresaron IFN- γ en los glomérulos (Figura 6).

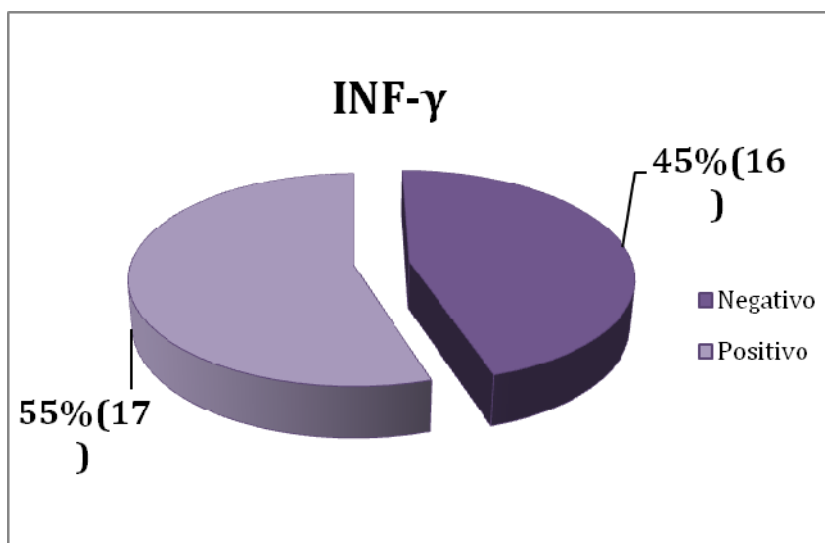


Figura 6. Porcentaje de casos que expresan INF- γ en biopsias renales

En la figura 7 se muestra la distribución de la frecuencia de casos positivos y negativos para INF- γ en biopsias renales de acuerdo a cada clase histológica, encontrando que la frecuencia de casos positivos en la clase II fue de 2 casos (100%), en la clase III 1 caso (25%); en la clase IV, de 9 casos (45%); en la clase V, de 2 casos (66.66%) y en la clase VI ningún caso positivo. La mayor frecuencia de la expresión de IFN- γ se observó en las clases II y V, aunque son pocos los casos encontrados en estas clases histológicas, mientras que la mayoría de los casos corresponden a la clase IV (50% de los casos) dónde se observó claramente la positividad de los podocitos, participando activamente en la producción de esta citocina (Figura 5a).

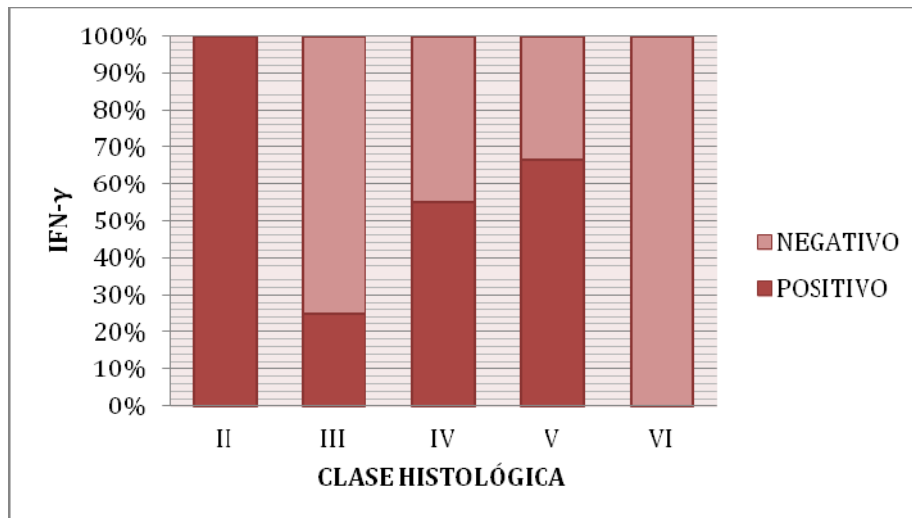


Figura 7. Porcentaje de expresión de INF- γ por clase histológica

Para conocer la relación que existe entre la expresión de INF- γ con el daño renal evaluado por la clase histológica observada, se realizó un análisis estadístico de asociación dónde se observó que la positividad de la expresión de INF- γ se correlacionó negativamente con la clase histológica ($p=0.036$); es decir, entre menor es la clase histológica mayor es el número de casos con expresión de INF- γ (Figura 8).

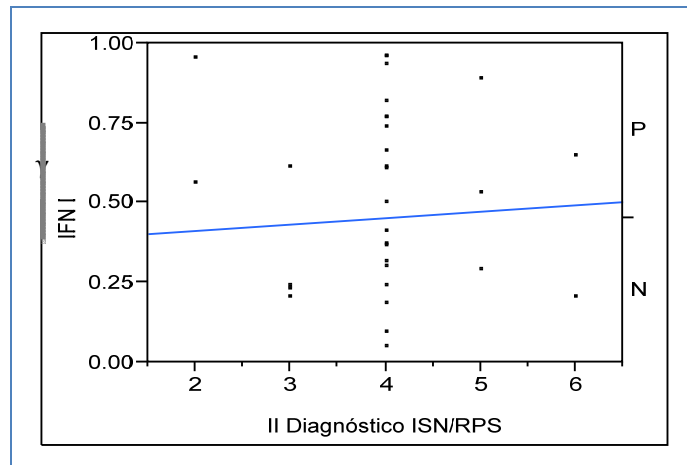


Figura 8. Asociación de la expresión de IFN- γ y con el daño renal (clase histológica). P) casos positivos y N) casos negativos. La línea azul representa la asociación entre las dos variables ($p=0.035$). Obsérvese que entre mayor es la clase histológica menor es el número de casos positivos.

Al evaluar la positividad en la expresión de INF- γ con el índice de actividad (Figura 9), se observó que entre mayor es el índice de actividad, mayor es el número de casos postivos para INF- γ , encontrando una asociación positiva, sin embargo este efecto no fue estadísticamente significativo ($p=0.391$).

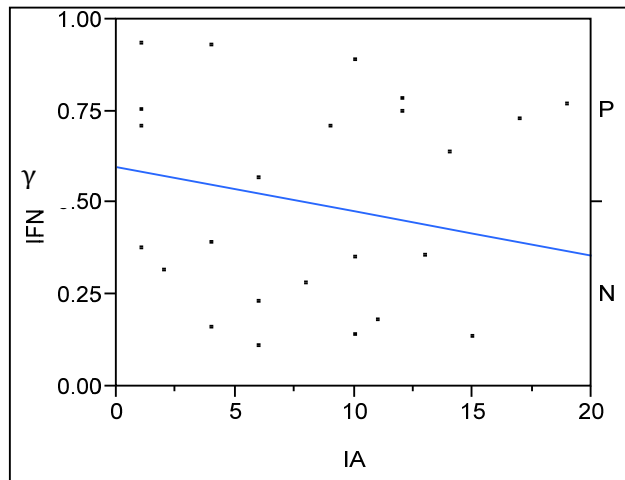


Figura 9. Asociación entre la expresión de IFN- γ y el índice de actividad de la nefropatía lúpica. P) casos positivos y N) casos negativos. La línea azul representa la asociación entre las dos variables (χ^2 $p=0.391$). Obsérvese que entre mayor es el índice de actividad mayor es el número de casos positivos.

Considerando el índice de cronicidad se realizó también un análisis estadístico de asociación entre esta variable y la positividad de la expresión de IFN- γ , (Figura 10). Los resultados mostraron una asociación positiva entre el número de casos que expresan IFN- γ y el índice de cronicidad aunque esta asociación se encuentra en los límites de la significancia estadística ($p=0.058$).

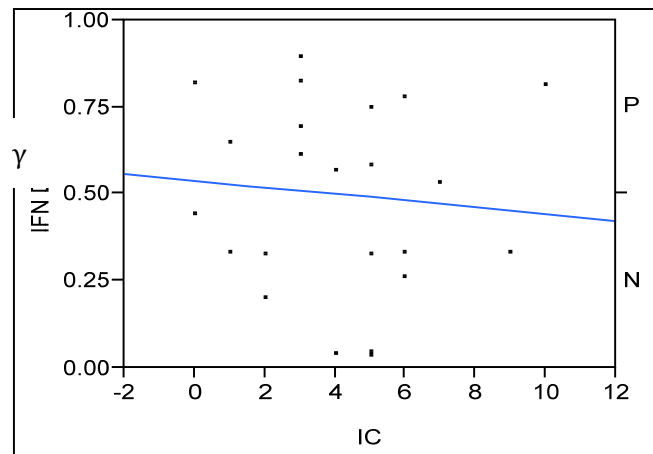


Figura 10. Asociación entre la positividad de la expresión IFN- γ y el índice de cronicidad. P) Casos positivos N) Casos negativos. La línea azul representa la asociación entre las dos variables (X^2 $p=0.058$). Obsérvese que entre mayor es el índice de cronicidad mayor es el número de casos positivos.

Posteriormente se hizo un análisis semi-cuantitativo de la expresión del IFN- γ , utilizando el programa informático Image-Pro Plus 5.1 dónde se midió la media de la expresión de IFN- γ por área glomerular y por la densidad de la tinción para comprobar si existía alguna diferencia significativa entre las clases histológicas, no encontrando diferencias significativas ($p=0.4253$).

Al analizar la media del área de IFN- γ en el mismo programa de análisis (Image-Pro Plus 5.1) sólo se analizaron clases III y IV ya que la mayoría de los casos corresponden a estas dos clases histológicas. El análisis estadístico no mostró ninguna diferencia estadística entre ambos diagnósticos histopatológicos ($p=0.42$; Figura 11).

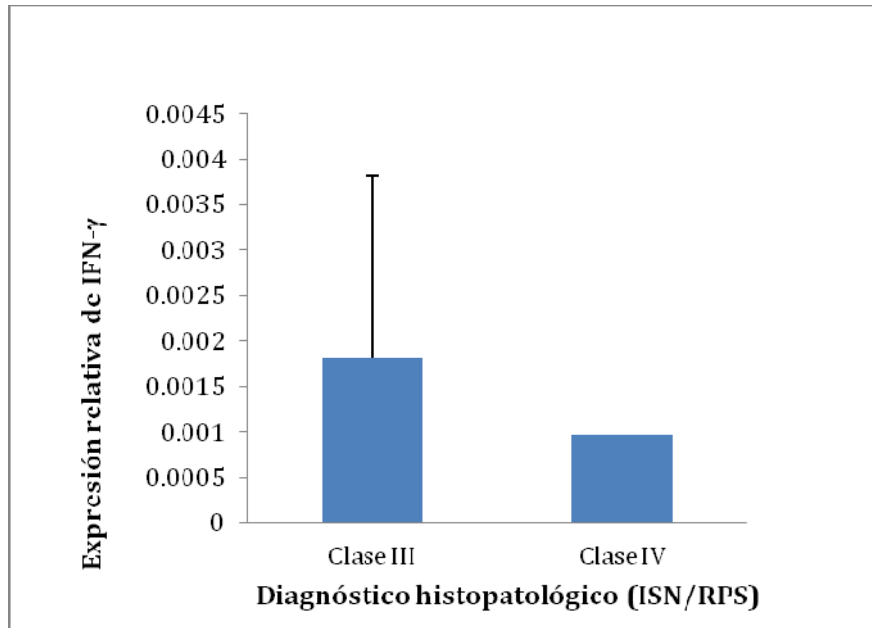


Figura 11. Media del área glomerular positiva para INF- γ según la clase histológica. Los datos de media \pm DE de la media del área glomerular positiva para INF- γ de todos los casos positivos ($p=0.42$)

1.2 Expresión de IL-12

De acuerdo a los resultados de inmunohistoquímica únicamente el 9.67%(3/31) de las biopsias analizadas expresaron IL-12 en los glomérulos (Figura 12a). La Figura 12d que corresponde a un corte histológico de una hiperplasia de ganglio y la Figura 12c que corresponde a un corte histológico de un bazo, se muestran los controles positivo y negativo respectivamente empleados para la validación del ensayo.

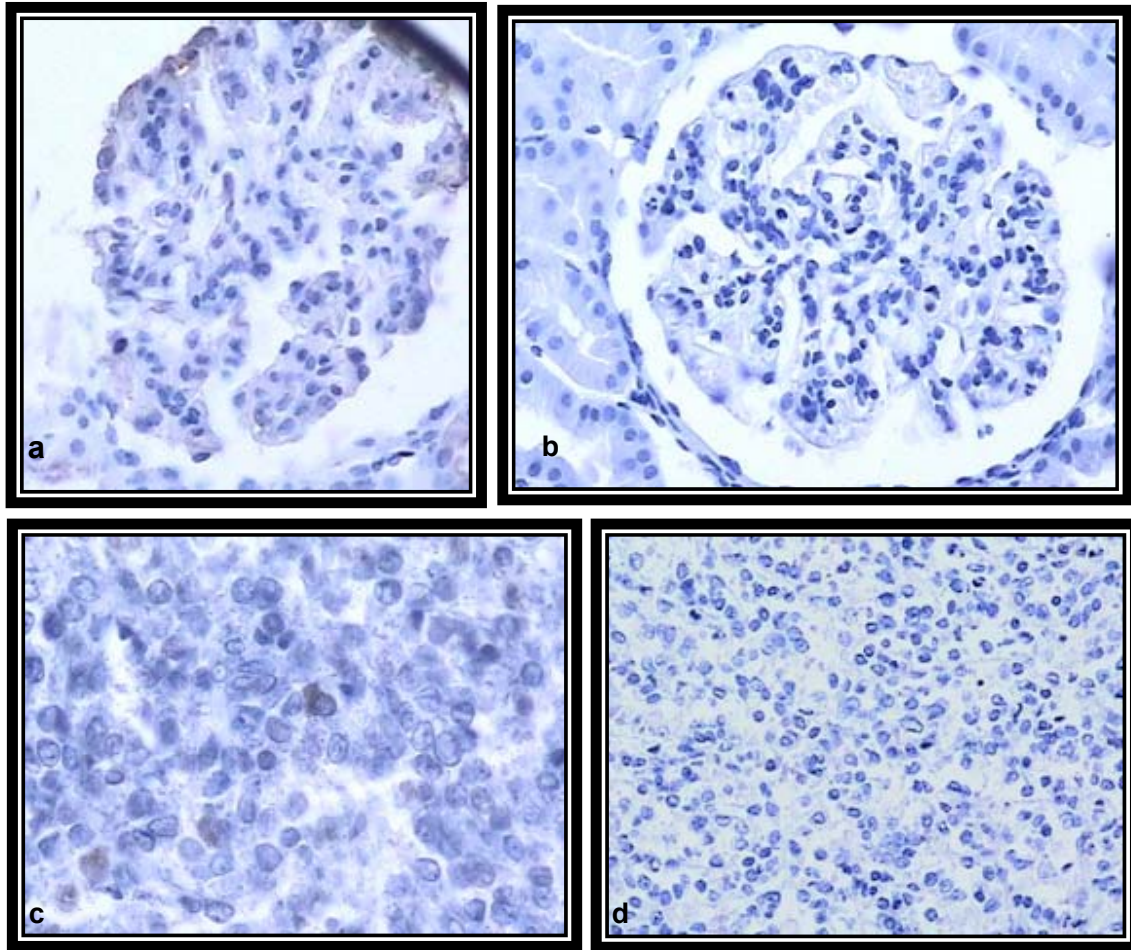


Figura 12. Expresión de IL-12 en biopsias de casos y controles. a) Biopsia renal de un caso NL clase III positivo; b) Biopsia renal de un caso de NL clase IV negativo; c) Biopsia de bazo (control positivo); d) Biopsia de ganglio con hiperplasia de ganglio (control negativo).

En el cuadro 10 se muestra la distribución de la frecuencia de casos positivos y negativos para IL-12 de acuerdo a cada clase histológica, donde se puede observar que los casos positivos se encuentran en las biopsias con clase histológica II, III y IV. En las clases V y VI no hubo casos positivos. Dada la

ausencia casos en algunas clases histológicas y al bajo número de casos en otras no se pudo llevar a cabo ningún análisis estadístico.

Cuadro 10. Frecuencia de expresión de IL-12 según la clase histológica de las biopsias renales

Clase	Casos totales	Casos positivos	Casos negativos
II	2	1(50 %)	1(50%)
III	4	1 (25%)	3 (75%)
IV	20	1(5%)	19 (95%)
V	3		3(100%)
VI	2		2 (100%)

2. Citocinas Th2: IL-4 e IL-13

2.1 Expresión de IL-4

De acuerdo a los resultados de inmunohistoquímica para esta citocina, no se encontraron casos positivos, es decir que ningún caso expresó IL-4 correspondiente al perfil de citocinas Th2 (Figura 13).

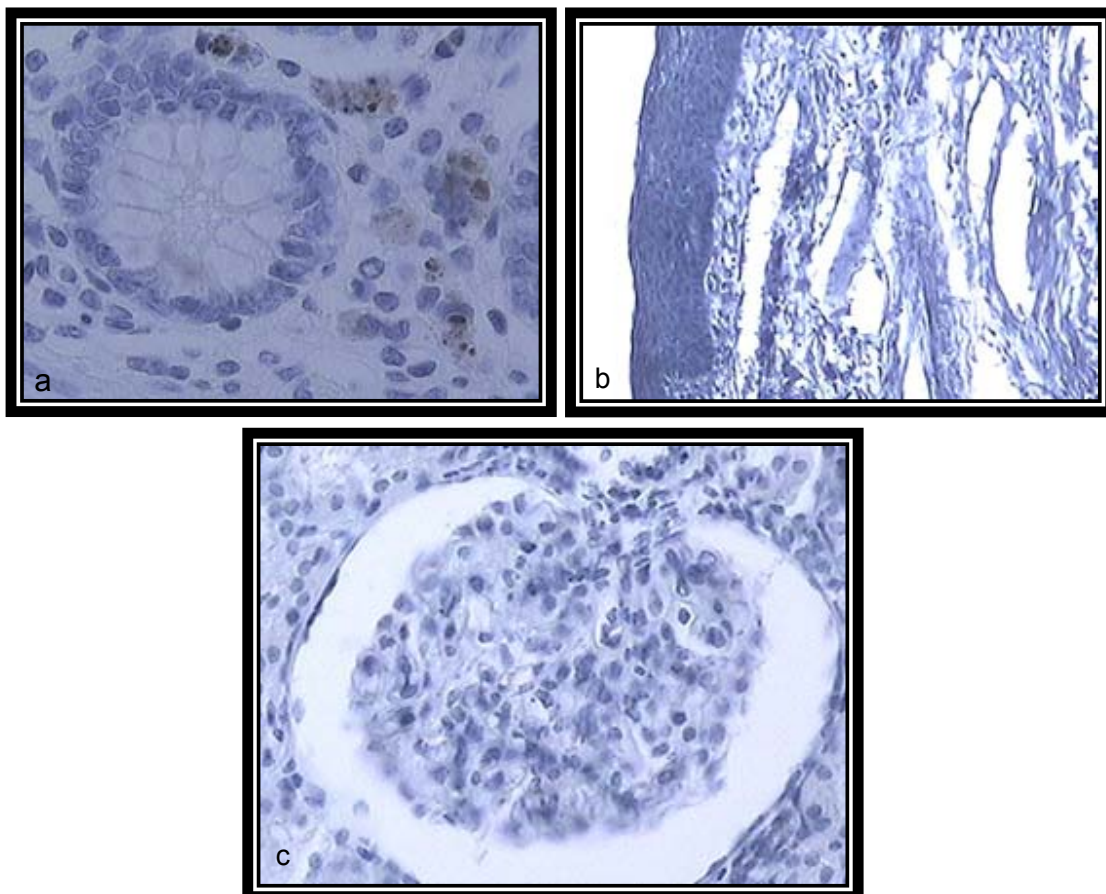


Figura 13. Expresión de IL-4 en biopsias de casos y controles. a) Corte histológico de apéndice, control positivo; b) corte histológico de piel, control negativo; c) NL Clase III. La figura 14c muestra la imagen representativa de los casos con nefropatía lúpica dónde se puede observar la falta de expresión de IL-4 determinado por inmunohistoquímica.

2.2 Expresión de IL-13

Todas las biopsias de los casos de nefropatía lúpica fueron analizadas para determinar la expresión de IL-13 por inmunohistoquímica. Sin embargo en ninguna clase histológica de NL se observaron casos positivos para la expresión de esta citocina la cuál corresponde al perfil de citocinas Th2 (Figura 14)

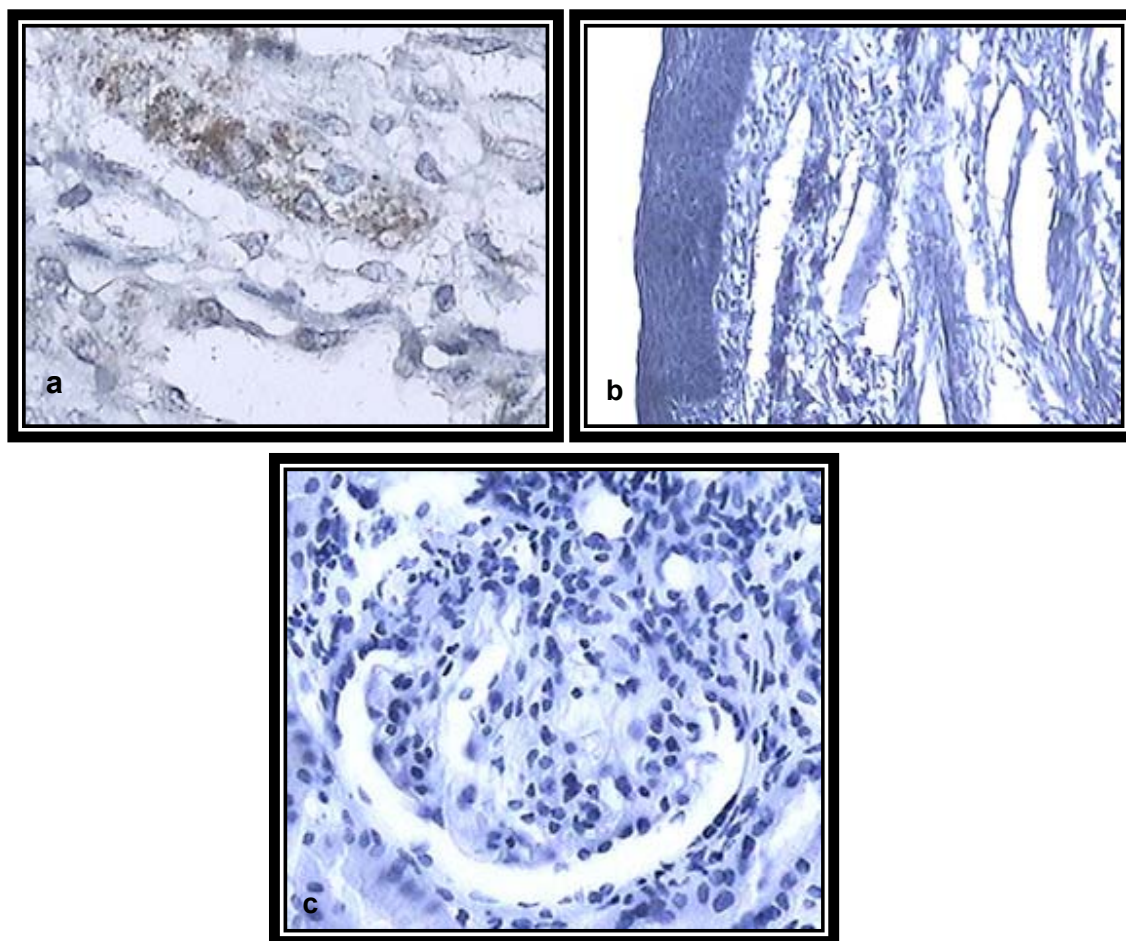


Figura 14. Expresión de IL-13 en biopsias de casos y controles. a) Corte histológico de testículo, control positivo; b) corte histológico de piel, control negativo; c) NL Clase IV. La figura 14c muestra la imagen representativa de los casos con nefropatía lúpica

dónde se puede observar la falta de expresión de IL-13 determinado por inmunohistoquímica.

3. Inmunohistoquímica de Controles Sanos

Para poder correlacionar la expresión de cada una de las citocinas estudiadas con el daño renal, se analizaron 10 biopsias procedentes de pacientes transplantados (sin nefropatía lúpica) denominadas biopsias “cero”. La expresión de IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-13 fueron negativas en todos los casos. (Figura15)

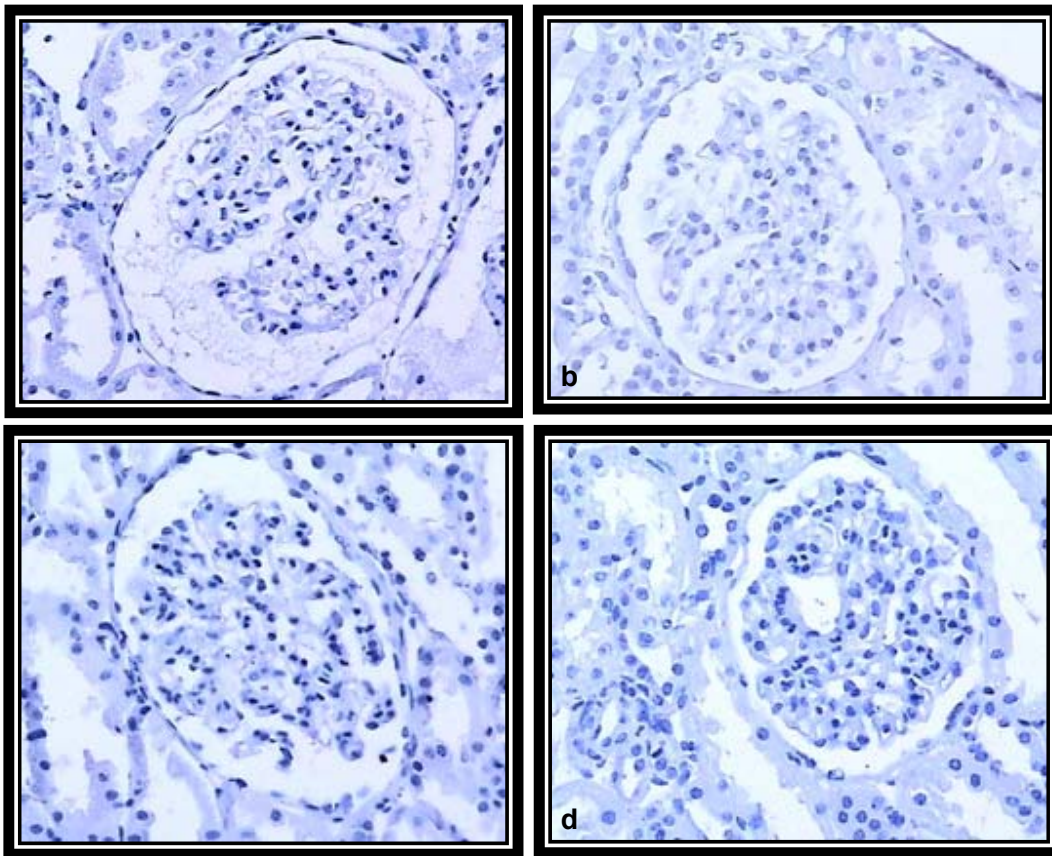


Figura 15. Expresión de citocinas en biopsias “cero” procedentes de pacientes transplantados (sin nefropatía lúpica). a) Expresión de IFN- γ ; b) Expresión de IL-12; c) Expresión de IL-13; y d) Expresión de IL-4. En las imágenes se puede

observar la falta de expresión de cada una de las citocinas en las biopsias renales analizadas por inmunohistoquímica.

VIII. DISCUSIÓN

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune multisistémica caracterizada por manifestaciones clínicas variadas. Las citocinas producidas por células inflamatorias como linfocitos T tienen un papel determinante en el desarrollo y evolución de la enfermedad. Estudios previos señalan que existe un desbalance en la producción de citocinas entre linfocitos Th1 y Th2 con un predominio de las citocinas Th2) en sangre periférica de pacientes con LES y esta respuesta se asocia con la patogénesis de la enfermedad.⁷⁸ Por otro lado, Akahoshi *et al.* Demostró que existe un predominio de la respuesta Th1 en muestras de sangre periférica de pacientes con NL clase IV de la Organización Mundial de la Salud.⁷⁹ Matsutani *et al.* Analizó los niveles de expresión de IFN- γ e IL-4 en linfocitos T intrarrenales así como también en muestras de sangre periférica con NL proliferativa por inmunohistoquímica demostrando el predominio de la respuesta de linfocitos Th1.⁷⁵ Sin embargo Murata *et al.*, señalan que el infiltrado de linfocitos T en riñón produce citocinas de tipo Th2 tales como IL-4 e IL-10 mediante la técnica de RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa-Transcripción reversa) y señalan que tal diferencia en los resultados puede deberse a la diferencia de sensibilidad entre los métodos empleados en la detección de la expresión de las citocinas.⁷⁶

Dada la frecuencia de la nefropatía en los pacientes con lupus eritematoso sistémico y su impacto en la morbi-mortalidad de estos pacientes muchos estudios se han centrado en esta patología. Sin embargo hasta el momento no se ha reportado la expresión de citocinas en tejido renal de pacientes con LES y su correlación con el daño renal a nivel histológico.

El objetivo del presente estudio fue determinar el perfil de citocinas (Th1/Th2) que predomina en el tejido renal procedentes de pacientes con diagnóstico de nefropatía lúpica y por otra parte se realizó un estudio de asociación entre la expresión de cada citocina con el daño renal y con el índice de actividad y de cronicidad de la enfermedad. El daño renal fue evaluado por la clasificación de la Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad de Patología Renal (ISN/RPS) la cual considera el daño renal y la fase en la que se encuentre la lesión (activa o crónica).¹⁷

Las características epidemiológicas de los casos incluidos en este estudio muestran que la nefropatía lúpica presentó mayor frecuencia en el género femenino (cuadro 7) afectando principalmente la población en edad adulta joven (media de edad 29.7 años), siguiendo el mismo comportamiento que otras poblaciones raciales.³⁴

Dentro de este estudio se evaluaron diferentes marcadores bioquímicos relacionados con el daño renal y marcadores inmunológicos relacionados con la actividad de la enfermedad (LES).

Los niveles de creatinina, urea, nitrógeno uréico y albúmina en sangre fueron considerados como marcadores bioquímicos de daño renal. Los resultados mostraron que la albúmina no se correlacionó con el daño renal según la clase histológica. Sin embargo la creatinina se elevó de manera significativa en los casos de NL clase IV ($1.29 \pm 0.85 \text{ mg/dl}$; $p=0.003$), lo que correlaciona bien con las manifestaciones clínicas, ya que es la clase histológica que tiene manifestaciones más floridas y con mayor repercusión en la función renal,¹² mientras que para el caso de la clase VI, donde también los niveles de creatinina aumentaron significativamente ($2.99 \pm 3.22 \text{ mg/dl}$; $p=0.003$), la respuesta se debe primordialmente al daño crónico e irreversible de la morfología renal que estos pacientes manifiestan con el deterioro de la función renal. Este mismo efecto se observó en los niveles de urea y de nitrógeno uréico en sangre (BUN), en las mismas clases histológicas.¹²

El perfil de citocinas Th1 se determinó por la expresión de IFN- γ e IL-12 y el perfil de Th2 por la IL-4 y la IL-13. Todas las citocinas fueron evaluadas por la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales específicos para tejidos incluidos en parafina.

De todas estas citocinas evaluadas sólo se detectaron IFN- γ y la IL-12 en biopsias renales de pacientes con nefropatía lúpica. Sin embargo ninguna citocina del perfil Th2 (IL-4 e IL-13) fueron detectadas por inmunohistoquímica. Consideramos que estos resultados no son por una mala técnica ya que los controles negativos y positivos incluidos en el ensayo fueron correctos (Figuras 5, 12, 13 y 14)

La expresión de INF- γ y su correlación positiva con la clase histológica IV, sugiere la participación de la respuesta Th1 en la génesis del daño renal clase IV, así como su manifestación clínica y su repercusión en la función renal.

Cabe resaltar que la expresión de las citocinas INF- γ e IL-12 sólo fue detectadas en los casos con NL, no así en los controles de riñones sanos que se emplearon, lo que resalta la participación activa de estas citocinas en la morfología de estas lesiones.

En general, LES es una enfermedad autoinmune mediada por el depósito de complejos inmunes, respuesta ligada a un exceso en la producción de linfocitos Th2. Sin embargo los resultados reflejados a nivel histológico muestran la participación de INF- γ , citocina representativa de la respuesta Th1, podría participar en la respuesta inflamatoria teniendo un impacto deletéreo en la patogénesis de la NL, de manera predominante en la NL proliferativa difusa. En un modelo murino de NL, esta citocina muestra un papel crítico causando un daño renal al promover la generación de anticuerpos fijadores de complemento.⁸⁰ De igual forma esta citocina promueve la expresión de moléculas del MHC clase II por células renales, como los podocitos viscerales. Este proceso podría permitir a las células renales actuar como APC's, y de este modo amplificar la respuesta inmunológica local. Ya que el INF- γ , es la citocina prototipo de la respuesta Th1, o una molécula clave para influir en la generación de este tipo de respuesta inmune, la sobreproducción de esta citocina podría inducir el cambio del balance hacia una respuesta predominante Th1 con el desarrollo subsecuente de los cambios histopatológicos correspondientes a la NL proliferativa difusa.

Aunque en otros ensayos⁸¹ se ha destacado que la expresión de la IL-12 se asocia cercanamente con la enfermedad renal en pacientes con LES en paralelo a la polarización de la respuesta Th1 y al incremento de INF- γ , pudiendo así ser un mediador en la patogénesis de la falla renal en LES, el rol de IL-12 es aún incierto, en el presente estudio la expresión de esta citocina no mostró ninguna relación con la morfología de la NL, a pesar de que se encuentra expresado, en comparación con los controles sanos, esto sugiere que juega algún papel en la fisiopatogenia de la NL.

En contraste a esta respuesta las citocinas IL-4 e IL-13, correspondientes a la respuesta Th2, han sido asociadas a la glomerulonefritis de cambios mínimos dónde se observan cambios estructurales de los podocitos viscerales asociado clínicamente a proteinuria.⁸² El presente estudio esperaba encontrar una relación entre la expresión de estas de éstas citocinas con la clase histológica II y V sin encontrar alguna relación como se esperaba, ya que cabe destacar que el número de casos analizados en este estudio es pequeño.

Las perspectivas del presente trabajo son ampliar el número de muestras de cada clase para hacer más apropiada la comparación entre los distintos grupos, para lograr un mayor soporte estadístico.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados analizados se identificó el papel ponderante del INF- γ en los casos de NL de este trabajo favoreciendo la respuesta Th1, lo que sugiere que esta citocina podría tener un papel importante en la génesis de la NL clase IV correspondiente a una glomerulonefritis proliferativa difusa.

No se encontró una relación entre las citocinas IL-4 e IL-13, correspondientes al perfil de citocinas Th2 y la clasificación histológica de la NL.

X Referencias

- ¹ Kumar Vinay, Abbas Abul K., *Robbins and Cotran Patologic Basis of Disease*, Saunders, El Sevier, China 8° Edición 2010, Pp.208-221
- ² Kokuina Elena. De la autoinmunidad a las enfermedades autoinmunes. 2001, *Rev Cubana de Med*; 40(1); 36:44.
- ³ D'Cruz D. Systemic lupus erythematosus, *BMJ* 2006;332:890–4
- ⁴ Sergio H. Sánchez-Rodríguez, Gerardo E. Barajas-Vásquez, Elena D. Ramírez-Alvarado, Alejandra Moreno-García, Olga Y. Barbosa-Cisneros. Lupus eritematoso: enfermedad autoinmune sistémica y órgano específica. 2004; *Rev Biomed*; 15:173-180.
- ⁵ Dubois EL: The clinical picture of systemic lupus erythematosus. In Dubois: EL Ed. *Lupus Erythematosus* 2nd Ed. Los Angeles University of Southern California Press 1974; 232-42
- ⁶ Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England: relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 1995;38: 551-8.
- ⁷ Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM: Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84(3):223-43.
- ⁸ Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Ann Rheum Dis* 1994;53(10):675-80.
- ⁹ Alarcon GS, MacGwin G, Jr., Bartolucci AA, Roseman J, Lisse J, Fessler BJ, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. IX. Differences in damage accrual. *Arthritis Rheum* 2001;44(12):2797-806.
- ¹⁰ Alarcon GS, McGwin G, Jr., Petri M, Reveille JD, Ramsy-Goldman R, Kimberly RP. Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE. *Lupus* 2002;11(2):95-101.
- ¹¹ D'Cruz David P, Systemic lupus erythematosus, *BMJ* 2006;332:890–4.

-
- ¹² Sullivan KE. Genetics of systemic lupus erythematosus: clinical implications. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:229- 56.
- ¹³ Walport MJ, Black CM, Batchelor JR. The immunogenetics of SLE. *Clin Rheum Dis* 1982;8:3-21.
- ¹⁴ Walport MJ. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res* 2002; 4:Suppl 3:S279-S293.
- ¹⁵ Buyon JP, Petri MA, Kim MY, et al. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2005;142:953-62.
- ¹⁶ Rubin R. Drug induced lupus. In: Wallace DJ, Hahn BH, eds. *Dubois' lupus erythematosus*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:885-916.
- ¹⁷ Clynes R, Dumitru C, Ravetch Jv. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 1998;279:1052-1054
- ¹⁸ Rahman Anisur, Isenberg David A., *Mechanisms of Disease Systemic Lupus Erythematosus N Engl J Med* 2008;358:929-39.
- ¹⁹ Ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus: a long-term, prospective study. *Arthritis Rheum* 1990;33:634-43.
- ²⁰ Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43:76-84.
- ²¹ Buyon JP, Clancy RM. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:140-54.
- ²² McCarty GA, Harley JB, Reichlin M. A distinctive autoantibody profile in black female patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1560-5.
- ²³ Buyon JP, Clancy RM. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Semin Arthritis Rheum*

2003;33:140-54.

- ²⁴ Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: a prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:353-65.
- ²⁵ Mason LJ, Ravirajan CT, Rahman A, Putterman C, Isenberg DA. Is alpha-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? *Arthritis Rheum* 2004;50:866-70.
- ²⁶ Siegert CE, Daha MR, Swaak AJ, vander Voort EA, Breedveld FC. The relationship between serum titers of autoantibodies to C1q and age in the general population and in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;67:204-9.
- ²⁷ Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA. Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2000;59(4):243-51
- ²⁸ Jara LJ, Irigoyen L, Ortiz MJ, Zazueta B, Bravo G, Espinoza LR. Prolactin and interleukin-6 in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 1998;17(2):110-4.
- ²⁹ Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T Cell Clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57
- ³⁰ Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y, Kohsaka T, Nagano S, Ohgami E, et al. Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42(8):1644-8.
- ³¹ Gamarra AI, Matteson EL, Rodríguez AI, Rodríguez MI, Restrepo Suárez JF. An historical review of systemic lupus erythematosus in Latin America. *Med Sci Monit* 2004; 10(7):RA171-85
- ³² Hochberg MC. Update in the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1725
- ³³ González Naranjo LA, Vásquez Duque GA, Uribe Uribe O, Ramírez Gómez LA. Nefropatía lúpica. Presentación clínica, clasificación y tratamiento. 2006; *Revista Colombiana de Reumatología*: 13(4); 307:333

-
- ³⁴ Cervera Ricard, Khamashta M., Font J., Sebastiani GD., Gil A., Lavilla P., Mejía JC., Aydintug AO., Chwalinska-Sadowska H., De Ramón E., Fernández-Nebro A., Galeazzi M, Valen M., Mathieu A., Houssiau F., Caro N., Alba P., Ramos-Casals M., Ingelmo M., Huges GRV., and the European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus, Morbidity and Mortality in Systemic Lupus Erythematosus During a 10-year Period, A Comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients, *Medicine* 2003; 82(5);299-308.
- ³⁵ Wallace DJ, Hahn BH, Klippel JH. Clinical and laboratory features of lupus nephritis. In: Dubois' *Lupus Erythematosus*, 4th Ed, edited by Wallace DJ, Hahn BH, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 1077-1091.
- ³⁶ Cameron JS. Lupus nephritis. 1999, *J Am Soc Nephrol*; 10: 413:424.
- ³⁷ Hill GS, Hinglais N, Tronf G, Bach JR. Systemic lupus erythematosus. Morphologic correlations with immunologic and clinical data at the time of biopsy. 1978 *Am J Med*: 61-4.
- ³⁸ Ahmadzadeh Ali, Derakhshan Alí, Ahmadzadeh Azar, A Clinicopathological Study of Lupus Nephritis in Children. 2008, *Saudi J KidneyDis Transplant*; 19(5); 756:760.
- ³⁹ González-Crespo MR, López-Fernández JI, Usera G, Poveda MJ, Gómez-Reino JJ. Outcome of silent lupus nephritis. 1996 *Semin Arthritis Rheum*; 26: 468-476.
- ⁴⁰ Zabaleta- Lanz M, Vargas-Arenas RE, Tápanes F, Daboin I, Atahualpa Pinto J, Bianco NE. Silent nephritis in systemic lupus erythematosus. 2003 *Lupus*; 12: 26-30.
- ⁴¹ Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. 1993 *Medicine*; 72: 113-124.
- ⁴² Austin HA, Balow JE. Natural History and treatment of lupus nephritis. 1999, *Semin Nephrol*; 19: 2-11.
- ⁴³ Stephen M. Korbet, Melvin M. Schwartz, Sever Lupus Nephritis : Racial Differences in Presentation and Outcome. 2007; *J Am Soc Nephrol* 18:244-254.

-
- ⁴⁴ Bastian HM, Roseman JM, McGwin G *et al.* Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. *Lupus* 2002;11:152-160
- ⁴⁵ Goulet JR, MacKenzie T, Levinton C, Hayslett JP, Ciampi A, Esdaile JM. The longterm prognosis of lupus nephritis: the impact of disease activity. *J Rheumatol* 1993; 20:59-65.
- ⁴⁶ Michael M. Ward, Changes in the incidence of end-stage renal disease due to lupus nephritis in the united states, 1996 – 2004. 2009, *J Rheumatol*. January ; 36(1): 63–67.
- ⁴⁷ Korbert SM, Schwartz MM, Evans J *et al.* Severe lupus nephritis: racial differences in presentation and outcome. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:244-254
- ⁴⁸ Gamba G, Quintanilla L, Del Bosque MD *et al.* Evolución y factores pronósticos de la nefropatía lúpica. *Rev Invest Clin* 2000 52;397-405.
- ⁴⁹ Fries JW, Mendrick DL, Rennke HG, Determinants of immune complex-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int* 1988;34:33-345
- ⁵⁰ Weening JJ, D'Agati V.,† Schwartz M.M. *et al.* The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited 2004, *J Am Soc Nephrol* 15: 241–250.
- ⁵¹ Schwartz Melvin M., The Pathology of Lupus Nephritis, 2007 *Seminars in Nephrology*,27;(1):22-34.
- ⁵² Inmaculada Sánchez-Vegazo Sánchez, Carlos Teruel, Josefina Menéndez. 2002 Nefritis lúpica, 2002 *Rev Esp Patol*; 35(3): 269-278
- ⁵³ Clynes R, Dumitru C, Ravethc JV: Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 1998;279:1052-1054. 1998
- ⁵⁴ Berden JHM. Lupus nephritis. *Nephrology Forum. Kidney Int* 1997;52:538-58.
- ⁵⁵ Kelley VR, Wuthrich RP. Cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Semin Nephrol* 1999; **19**:57–66.
- ⁵⁶ Koffler D, Agnello V, Thoburn R, Kunkel HG. Systemic lupus erythematosus: prototype of immune complex nephritis in man. *J Exp Med*. 1971; 134:169s-79s.

-
- ⁵⁷ Hill GS, Hinglais N, Tron F, Bach JF. Systemic lupus erythematosus. Morphologic correlation with immunologic and clinical data at the time of biopsy. *Am J Med.* 1978;64:61-79.
- ⁵⁸ Kerjaschki D. Pathogenetic concepts of membranous glomerulopathy (MGN). *J Nephrol* 2000;13 Suppl3:S96-100.
- ⁵⁹ Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher., Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383, 787-793.
- ⁶⁰ Mosmann, TR, Cherwinski H, Bond MW., Giedlin, M.A. & Coffman RL., Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986; 136, 2348-2357.
- ⁶¹ Seder, RA., Paul WE., Davis MM., & Fazedas de StG., The presence of interleukin-4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T-cell-receptor-transgenic mice. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1091-1098
- ⁶² Afkarian, M. *et al.* T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nature Immunol.* 2002; 3: 549-557.
- ⁶³ O'Garra Anne., Cytokines Induce the Development of functionally heterogeneous T Helper Cell Subsets., *Immunity* 1998; 8:275-283.
- ⁶⁴ Adorini L., Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, 1999; 55:1610-1625
- ⁶⁵ Yang, J., Murphy, TL., Ouyang, W, Murphy KM., Induction of Interferon- γ in Th1 CD4⁺ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29:548-555.
- ⁶⁶ Schoroder K., Hertzog P., Ravasi T., Hume D., Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004; 75: 163-189.

-
- ⁶⁷ K.D. Brown, S.M. Zurawski, T.R. Mosmann & G., Zurawski: A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol*;1989; 142, 679-87.
- ⁶⁸ A. Minty, P. Chalon, J.M. Derocq, X. Dumont, J.C. Guillemot, M. Kaghad, C. Labit, P. Leplatois, P. Liauzun, B. Miloux, C. Minty, P. Casellas, G. Loison, J. Lupker, D. Shire, P. Ferrara & D. Caput: Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993; 362: 248-50.
- ⁶⁹ M.P. Beckmann, D. Cosman, W. Fanslow, C.R. Maliszewski & S.D. Lyman: The interleukin-4 receptor: structure, function, and signal transduction. *Chem Immunol*; 1992; 51: 107-34.
- ⁷⁰ Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138–46.
- ⁷¹ Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlondorff D. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**:1369–82.
- ⁷² Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. Interferongamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest* 1998;101:364–71.
- ⁷³ Schwarting A, Wada T, Kinoshita K, Tesch G, Kelley VR. IFN-gamma receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease inMRL-Fas(lpr)mice. *J Immunol* 1998;161:494–503.
- ⁷⁴ Funauchi M, Ikoma S, Enomoto H, Horiuchi A. Decreased Th-1 like and increased Th-2 like cells in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1998; **27**:219–24.
- ⁷⁵ Masutani K, Mitsuteru Akahoshi, Kazuhiko Tsuruya, Masanori Tokumoto, Toshiharu Ninomiya, Tsutomu Kohsaka, Kyoichi Fukuda, Hidetoshi Kanai, Hitoshi Nakashima, Takeshi Otsuka, and Hideki Hirakata, Predominance of Th1

Immune Response in Diffuse Proliferative Lupus Nephritis. 2001, *Arthritis & Rheumatism* Vol. 44, No. 9, pp 2097–2106

⁷⁶ Murata H, Matsumura R, Koyama A *et al.* T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2141–7.

⁷⁷ Morimoto S, Tokano Y, Kaneko H, Nozawa K, Amano H, Hashimoto H. The increased interleukin-13 in patients with systemic lupus erythematosus: relations to other Th1-, Th2-related cytokines and clinical findings. *Autoimmunity* 2001; 34:19–25.

⁷⁸ Viillard JF, Pellegrin JL, Rnachin V. Th1 (IL-1, interferón-gamma (IFN- γ) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1999; 115:189-95.

⁷⁹ Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y. Th1/th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1644-8.

⁸⁰ Peng SL, Moslehi J, Craft J. Roles of interferon-g and interleukin-4 in murine lupus. *J Clin Invest* 1997; 99:1936–46.

⁸¹ Tucci M, Lombardi L, Richards HB, Dammacco F, and Silvestris F., Overexpression of interleukin-12 and T helper 1 predominance in lupus nephritis; *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 2008 154: 247–254

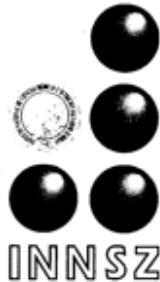
⁸² Van den Berg JG., Aten J, Chand M.A., Claessen N, Dijkink L, Wijdenes J, Lakkis FG., Weening JJ., Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular visceral epithelial Cells, *J Am Soc Nephrol* 2000;11: 413–422.

ANEXOS

FORMATO UNICO DE REGISTRO

<u>Nefropatía Lúpica: patrón de la respuesta inmunológica (Th1-Th2) y el daño renal, manifestado por actividad, cronicidad y estadio histopatológico.</u>					
No. De Registro:		Nombre del paciente:			
No. Qx:	Fecha Bx:	Existencia de bx: ___ Sí ___ No	Fecha Nac:	Edad:	Género:
Fecha dx LEG:	Evolución padecimiento (meses):	Tratamiento:			
		Fármaco ___ PND ___ AZA ___ MMF ___ Otros Especificar _____		Dosis: ___ PND ___ AZA ___ MMF ___ Otros Especificar _____	
Datos Histopatológicos					
Lesión Mediada por Complejos inmunes: ___ Sí ___ No					
Clasificación ISN/RPS:			IA:		IC:
IA		IC		S: a c G: a c SL: TG:	
<ul style="list-style-type: none"> • ½ Lunas celulares: • Cariorrexis /necrosis: • Nefritis Intersticial: • Proliferación Intracap: • Leucostasis: • Asas de alambre: 		<ul style="list-style-type: none"> • ½ Lunas fibrosas: • Esclerosis Global: • % Fibrosis Inters: • % Atrofia tubular: 		Total:	
Lesiones No mediadas por Complejos inmunes:					
Vasculitis: Sí ___ No ___	Microangiopatía trombótica: Sí ___ No ___	Podocitopatía: Sí: ___ No ___	Arterias: _____	GN Necrosante Segmentaria: Sí ___ No ___	
Exámenes de laboratorio					
	BRP	3 meses	6 meses		
Fecha:					
Creatinina (mg/dl):					
Glucosa (mg/dl):					
UREA (mg/dl):					
BUN (mg/dl):					
Albúmina (g/dl):					
Ac Anti DNA dc (U/ml):					
C3 (mg/dl):					
C4 (mg/dl):					
Prot. Totales en orina 24h (g/dl)					
Vol. Orina 24 h(ml)					
Creat orina 24h (g/vol)					

REGISTRO DEL PROTOCOLO EN EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

MÉXICO, D.F., A 04 DE MAYO DE 2011.

DRA. NORMA OFELIA URIBE URIBE
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
PRESENTE


Por este medio, me permito informarle que la Comisión de Ética en Investigación, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha **revisado y aprobado** el Protocolo de Investigación, titulado:

"NEFROPATÍA LÚPICA: PERFIL DE CITOCINAS (TH1 Y TH2) Y SU ASOCIACIÓN CON EL DAÑO RENAL A NIVEL HISTOLÓGICO"
REF. 329

Así mismo se solicita que al terminar el estudio se deberá de enviar los resultados con resumen de todos los datos sobresalientes y conclusiones, un informe anual (si la duración del estudio es mayor de un año), donde comunique los avances y resultados parciales de su Investigación.

Sin más por el momento quedo de usted.

ATENTAMENTE,


DR. PATRICIO SANTILLÁN DOHERTY
COORDINADOR
COMISIÓN DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Investigación
Tradición Servicio
Asistencia c.c.p. Dr. Rubén Lisker Y. Director de Investigación.
C.P. Martha Arredondo Urzúa. Jefe del Depto. C.F.E.I.
PSD/mrg
20007700

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00