

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS A RIESGO
OBSTÉTRICO EN MUJERES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y
DESARROLLO DE UN ASISTENTE CLÍNICO VIRTUAL.**

Por

L.B.G OLIVER JAIR GARCÍA GÓMEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS A RIESGO
OBSTÉTRICO EN MUJERES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y
DESARROLLO DE UN ASISTENTE CLÍNICO VIRTUAL.**

Aprobación de la tesis:



Dr. C. Noé Macías Segura

Director de la Tesis



Dr. C. María de los Ángeles Castro Corona

Co-director de Tesis



Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona

Comisión de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS A RIESGO OBSTÉTRICO EN MUJERES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y DESARROLLO DE UN ASISTENTE CLÍNICO VIRTUAL

Presentado por L.B.G. Oliver Jair García Gómez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología de sistemas del Servicio de Inmunología de la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. C. Noé Macías Segura.

Autorizado por el Comité de investigación y Ética de la facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" con el código de registro: "RE18-0008".



Dr. C. Noé Macías Segura

Director de la Tesis



Dr. C. María de los Ángeles Castro Corona

Co-director de Tesis



Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona

Comisión de Tesis

DEDICATORIA

A mis padres y hermano, su amor incondicional me ha acompañado toda la vida, y son mi fuerza para romper las barreras y límites que me pone la vida. Los amo y extraño todos los días.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Noé Macías Segura por permitirme ser su alumno, asesorarme, apoyarme y guiarme durante el corto, pero muy significativo periodo que estuve en su laboratorio, además por todas las oportunidades brindadas que me han ayudado en mi formación académica y humana.

A la Dra. María de los Ángeles Castro Corona por brindarme su apoyo, sus consejos, correcciones y retroalimentaciones que me permitieron aprender y desarrollarme durante el posgrado.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por sus consejos, apoyo y por brindarme la oportunidad de integrarme al Servicio de Inmunología.

A todos los profesores y personal del Servicio de Inmunología, que conforme mi estadía se alargaba me hicieron sentir como en casa.

A mis amigos Emilio Rojas y Ángel Mendoza, por su apoyo en todos los ámbitos, las experiencias y aventuras vividas y por siempre hacerme sentir una amistad real.

A mis amigos del departamento, Luisa, Oscar, Edgard, Luis, Tomas y Michelle por acompañarme durante esta etapa, los viajes, las risas, las comidas y las fiestas.

A mis padres, mi hermano, mis tías, mi abuela, por siempre estar dispuestos a apoyarme, por sus mensajes y por siempre creer en mí.

A todos los que me acompañaron a lo largo de esta etapa.

Tabla de contenido

Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	VIII
Lista de abreviaturas	X
Resumen	XVII
Capítulo I	1
Introducción	1
1. Lupus eritematoso sistémico	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Fisiopatología	5
1.4 Sistema inmune en LES	9
1.5 Lupus eritematoso sistémico durante el embarazo	16
Capítulo II	22
Antecedentes	22
Capítulo III	23
Justificación	23
Capítulo IV	24
Objetivos	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24
Capítulo V	25
Hipótesis	25
Capítulo VI	26
Materiales y métodos	26
6.1 Materiales	26
6.2 Métodos	28
Capítulo VII	36
Resultados	36
7.1 Selección de bases de datos transcriptómicas	36

7.2 Identificación de genes expresados diferencialmente en LES	39
7.3 Genes compartidos	40
7.4 Identificación de genes diferencialmente expresadas en LES con complicaciones obstétricas.....	46
7.5 Curvas ROC de genes asociados a complicaciones obstétricas.....	48
7.6 Dinámica de vías de señalización inmunológicas durante el embarazo	51
7.7 Dinámica de expresión de genes de citocinas durante el embarazo	53
7.8 Características de los sujetos de investigación	54
7.9 Dinámica de citocinas en suero durante el embarazo	56
7.10 Desarrollo del asistente clínico virtual	61
Capítulo VIII	64
Discusión	64
Capítulo IX	69
Conclusión.....	69
Capítulo X.....	70
Perspectivas	70
Referencias	71

Índice de figuras

Figura 1. Complicaciones asociadas a LES.	2
Figura 2. Incidencia mundial de LES.	4
Figura 3. Participación del sistema inmune en el desarrollo de LES.	9
Figura 4. Sistema inmune durante el embarazo.	18
Figura 5. Complicaciones obstétricas durante el embarazo con LES.	21
Figura 6. Estrategia experimental general.	28
Figura 7. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.	32
Figura 8. Análisis PCA de GSE235508.	38
Figura 9. Análisis PCA de GSE108497.	38
Figura 10. Gráfico de volcán de la base GSE108497.	40
Figura 11. Gráfico de volcán de la base GSE235508.	40
Figura 12. Diagrama de Venn de genes regulados al alza en LES.	41
Figura 13. Enriquecimiento funcional GO de Procesos Biológicos de genes regulados al alza.	42
Figura 14. Enriquecimiento funcional GO de Funciones Moleculares de genes regulados al alza en LES.	43
Figura 15. Enriquecimiento funcional KEGG de genes regulados al alza en LES.	44
Figura 16. Gráfico de volcán de los genes expresados diferencialmente entre pacientes con LES con y sin complicaciones.	47
Figura 17. Mapa de calor de genes expresados diferencialmente entre pacientes con LES con y sin complicaciones obstétricas.	48
Figura 18. Curvas ROC individuales de genes candidatos.	50
Figura 19. Curva ROC combinada de los genes candidatos.	51
Figura 20. Dinámica de señalización inmunológica durante el embarazo analizada mediante GSVA.	52
Figura 21. Dinámica longitudinal de citocinas y quimiocinas en controles sanos, LES sin complicaciones y LES con complicaciones obstétricas.	53
Figura 22. Dinámica longitudinal de citocinas y quimiocinas en controles sanos, LES sin complicaciones y LES con complicaciones obstétricas.	57
Figura 23. Niveles séricos de BAFF, CXCL13 y TGF-β1 en pacientes LES y AR en el trimestre 2.	58
Figura 24. Niveles séricos de BAFF y CXCL13 en pacientes LES y SAF en el trimestre 3.	59
Figura 25. Niveles séricos de citocinas en pacientes con LES y controles sanos en el 3er trimestre.	60
Figura 26. Niveles séricos de quimiocinas en pacientes con LES y controles en el 3er trimestre.	61
Figura 27. Diseño de calculadora de riesgo obstétrico.	62
Figura 28. Resultados generados por la calculadora de riesgo obstétrico.	63

Índice de tablas

Tabla 1. Proyectos GEO seleccionados.....	37
Tabla 2. Genes compartidos en bases GSE108497 y GSE235508 regulados a la baja	46
Tabla 3. Genes candidatos como biomarcadores para predicción de riesgo obstétrico.....	49
Tabla 4. Características principales de pacientes.....	54
Tabla 5. Características clínicas de los sujetos de investigación (LES).....	56

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ANA / ANAs	Antinuclear antibodies / Anticuerpos antinucleares
aNAV	Activated naïve cells / Células vírgenes activadas
aPL	Antiphospholipid antibodies / Anticuerpos antifosfolípidos
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Area under the curve / Área bajo la curva
BAFF	B-cell activating factor / Factor activador de células B
BCL6	B-cell lymphoma 6 / Factor de transcripción BCL6
BCR	B-cell receptor / Receptor de células B
BLK	B lymphocyte kinase / Cinasa de linfocitos B
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2 / Quimiocina 2 con motivo C-C; también MCP-1
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5 / Quimiocina 5 con motivo C-C; también RANTES
CCL8	C-C motif chemokine ligand 8 / Quimiocina 8 con motivo C-C
CD	Cluster of differentiation / Grupo de diferenciación
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase / Sintasa cíclica de GMP-AMP
cGMP-AMP	Cyclic GMP-AMP / GMP-AMP cíclico
CNTNAP2	Contactin-associated protein-like 2 / Proteína similar a contactina 2
COPCORD	Community Oriented Program for Control of Rheumatic Diseases / Programa comunitario orientado al control de enfermedades reumáticas
CpG	Cytosine-phosphate-guanine dinucleotide / Dinucleótido citosina-fosfato-guanina
CSS3	Cascading Style Sheets 3 / Hojas de estilo en cascada 3
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 / Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos
DEGs	Differentially expressed genes / Genes expresados diferencialmente

Abreviatura	Significado
DESeq2	Differential expression analysis for sequence count data 2 / Herramienta bioinformática para análisis diferencial de RNA-seq
DN	Double-negative T cells / Células T doble negativas
DNASE1	Deoxyribonuclease 1 / Desoxirribonucleasa 1
DNASE1L3	Deoxyribonuclease 1-like 3 / Desoxirribonucleasa 1 similar a 3
DNMT1	DNA methyltransferase 1 / ADN metiltransferasa 1
EBV	Epstein-Barr virus / Virus de Epstein-Barr
EF	Extrafollicular / Extrafollicular
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay / Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
ER α	Estrogen receptor alpha / Receptor de estrógeno alfa
ER β	Estrogen receptor beta / Receptor de estrógeno beta
ERK	Extracellular signal-regulated kinase / Cinasa regulada por señales extracelulares
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology / Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología
FASTQ	FASTQ format / Formato FASTQ para secuencias de alto rendimiento
FC	Fold change / Cambio de expresión relativo
FDR	False discovery rate / Tasa de falsos descubrimientos
GEO	Gene Expression Omnibus / Repositorio Gene Expression Omnibus
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GO	Gene Ontology / Ontología génica
GPR183	G protein-coupled receptor 183 / Receptor acoplado a proteína G 183
GSVA	Gene Set Variation Analysis / Análisis de variación de conjuntos de genes
GZMH	Granzyme H / Granzima H
HBZ	Hemoglobin subunit zeta / Subunidad zeta de hemoglobina
HC	Healthy controls / Controles sanos

Abreviatura	Significado
HCQ	Hidroxicloroquina / Hydroxychloroquine
HCl	Ácido clorhídrico / Hydrochloric acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer / Amortiguador ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HERC6	HECT and RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6 / Ligasa E3 de ubiquitina HERC6
HES4	HES family bHLH transcription factor 4 / Factor de transcripción bHLH de la familia HES 4
HISAT2	Hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts 2 / Herramienta de alineamiento para RNA-seq
HLA	Human leukocyte antigen / Antígeno leucocitario humano
HLA-B8	Human leukocyte antigen B8 / Alelo B8 del sistema HLA
HLA-DR3	Human leukocyte antigen DR3 / Alelo DR3 del sistema HLA
HOPX	HOP homeobox / Gen homeobox HOP
HTML5	HyperText Markup Language 5 / Lenguaje de marcado de hipertexto 5
IC95%	Intervalo de confianza al 95% / 95% confidence interval
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 / Molécula de adhesión intercelular 1
ICOS	Inducible T-cell costimulator / Coestimulador inducible de células T
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase / Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFI27	Interferon alpha-inducible protein 27 / Proteína 27 inducible por interferón alfa
IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1 / Proteína inducida por interferón con dominio helicasa C 1
IFN	Interferon / Interferón
IFN-I	Type I interferon / Interferón tipo I
IGLL3P	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 3, pseudogene / Pseudogén del polipéptido similar a inmunoglobulina lambda 3
IKK α	Inhibitor of κ B kinase alpha / Inhibidor de κ B quinasa alfa
IL	Interleukin / Interleucina
iPRs	Intracellular progesterone receptors / Receptores intracelulares de progesterona

Abreviatura	Significado
IRF	Interferon regulatory factor / Factor regulador de interferón
ISG	Interferon-stimulated genes / Genes estimulados por interferón
iTregs	Induced regulatory T cells / Células T reguladoras inducidas
JAK	Janus kinase / Cinasa Janus
JCHAIN	Immunoglobulin J chain / Cadena J de inmunoglobulina
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes / Enciclopedia de genes y genomas de Kioto
KLRB1	Killer cell lectin-like receptor B1 / Receptor tipo lectina de células killer B1; CD161
KLRF1	Killer cell lectin-like receptor F1 / Receptor tipo lectina de células killer F1; NKp80
KRT72	Keratin 72 / Queratina 72
LES	Lupus eritematoso sistémico / Systemic lupus erythematosus
LLPC	Long-lived plasma cells / Células plasmáticas de larga vida
logFC	Log ₂ fold change / Cambio de expresión log ₂
LPS	Lipopolysaccharide / Lipopolisacárido
LY6E	Lymphocyte antigen 6 family member E / Antígeno linfocitario 6, miembro E
MAIT	Mucosal-associated invariant T cells / Células T invariantes asociadas a mucosas
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 / Proteína quimioatrayente de monocitos 1; también CCL2
MFI	Median fluorescence intensity / Intensidad mediana de fluorescencia
MHC	Major histocompatibility complex / Complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs	Matrix metalloproteinases / Metaloproteinasas de matriz
MSigDB	Molecular Signatures Database / Base de datos de firmas moleculares
MZ	Marginal zone / Zona marginal
MZB1	Marginal zone B and B1 cell-specific protein / Proteína específica de células B de zona marginal y células B1
NaOH	Hidróxido de sodio / Sodium hydroxide

Abreviatura	Significado
NET	Neutrophil extracellular trap / Trampa extracelular de neutrófilos
NF- κ B	Nuclear factor kappa B / Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer cells / Células asesinas naturales
NKT	Natural killer T cells / Células T natural killer
NKp80	NK cell-activating receptor NKp80 / Receptor activador de células NK; también KLRF1
NLR	Neutrophil-to-lymphocyte ratio / Índice neutrófilo-linfocito
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain / Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
nTregs	Natural or thymic regulatory T cells / Células T reguladoras naturales o tímicas
OTOF	Otoferlin / Otoferlina
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells / Células mononucleares de sangre periférica
pDC / pDCs	Plasmacytoid dendritic cell(s) / Célula(s) dendrítica(s) plasmocitoide(s)
PGE2	Prostaglandin E2 / Prostaglandina E2
PI3	Peptidase inhibitor 3 / Inhibidor de peptidasa 3; elafina
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase / Fosfoinosítido 3-cinasa
PR	Progesterone receptor / Receptor de progesterona
PRR	Pattern recognition receptors / Receptores de reconocimiento de patrones
RCF	Restricción del crecimiento fetal / Fetal growth restriction
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I / Gen I inducible por ácido retinoico
RNA-seq	RNA sequencing / Secuenciación de ARN
RNASEH2	Ribonuclease H2 / Ribonucleasa H2
ROC	Receiver operating characteristic / Característica operativa del receptor
ROUT	Robust regression and outlier removal / Regresión robusta y eliminación de valores atípicos
RPL26	Ribosomal protein L26 / Proteína ribosomal L26
SAF	Síndrome antifosfolípido / Antiphospholipid syndrome

Abreviatura	Significado
SDR	Síndrome de dificultad respiratoria / Respiratory distress syndrome
SIGLEC14	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 14 / Lectina tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico 14
SLE	Systemic lupus erythematosus / Lupus eritematoso sistémico
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index / Índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico
SMIM1	Small integral membrane protein 1 / Proteína integral pequeña de membrana 1
SPATS2L	Spermatogenesis-associated serine-rich 2-like / Proteína similar a serina rica asociada a espermatogénesis 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription / Transductor de señal y activador de la transcripción
TCR	T-cell receptor / Receptor de células T
Tfh	Follicular helper T cells / Linfocitos T cooperadores foliculares
TGF- β	Transforming growth factor beta / Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Type 1 helper T cells / Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th2	Type 2 helper T cells / Linfocitos T cooperadores tipo 2
Th17	Type 17 helper T cells / Linfocitos T cooperadores tipo 17
TI-1	Antígeno T-independiente tipo 1 / T-independent type 1 antigen
TI-2	Antígeno T-independiente tipo 2 / T-independent type 2 antigen
TLR	Toll-like receptor / Receptor tipo Toll
TMEM119	Transmembrane protein 119 / Proteína transmembranal 119
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha / Factor de necrosis tumoral alfa
TNFSF13B	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B / Miembro 13B de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral; gen que codifica BAFF
TOM	Translocase of the outer mitochondrial membrane / Translocasa de la membrana mitocondrial externa
TOMM7	Translocase of outer mitochondrial membrane 7 / Translocasa de la membrana mitocondrial externa 7
Treg	Regulatory T cells / Linfocitos T reguladores

Abreviatura	Significado
TREX1	Three prime repair exonuclease 1 / Exonucleasa de reparación 3 prima 1
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin / Linfopoyetina estromal tímica
TYK2	Tyrosine kinase 2 / Tirosina cinasa 2
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León / Autonomous University of Nuevo León
U1-RNP / U1RNP	U1 small nuclear ribonucleoprotein / Ribonucleoproteína nuclear pequeña U1
USP18	Ubiquitin-specific peptidase 18 / Peptidasa específica de ubiquitina 18
UV	Ultravioleta / Ultraviolet
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A / Factor de crecimiento endotelial vascular A
ZM	Zona marginal / Marginal zone

Resumen

Introducción: El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva y durante el embarazo, se asocia con mayor riesgo de complicaciones obstétricas. La fisiopatología de la enfermedad se encuentra bien caracterizada, sin embargo, la estratificación individual del riesgo obstétrico es limitado. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo identificar biomarcadores moleculares e inmunológicos asociados a riesgo obstétrico en mujeres embarazadas con LES e integrarlos en el desarrollo de un asistente clínico virtual.

Metodología: Se realizó un estudio integrativo, combinando análisis bioinformático, evaluación de niveles de citocinas y desarrollo de una herramienta digital. Primero, se analizaron bases transcriptómicas públicas de Gene Expression Omnibus para identificar genes expresados diferencialmente en mujeres embarazadas con LES, controles sanos y pacientes con o sin complicaciones obstétricas. Se emplearon herramientas de RNA-seq, microarreglos, análisis diferencial, enriquecimiento funcional GO/KEGG/GSVA y curvas ROC. Posteriormente, se cuantificaron citocinas séricas en una cohorte de mujeres embarazadas con LES, artritis reumatoide, síndrome antifosfolípido y controles sanos mediante Luminex y ELISA. Finalmente, se diseñó una calculadora clínica virtual basada en variables clínicas, serológicas e inflamatorias para estimar riesgo obstétrico.

Resultados: El análisis transcriptómico identificó una firma común en LES caracterizada por activación de respuesta antiviral, interferón tipo I, inmunidad innata y señalización por quimiocinas. En pacientes con LES y complicaciones obstétricas se identificaron genes asociados con respuesta de interferón, activación humoral, plasmablastos, células mieloides y regulación tisular, destacando IFI27, USP18, JCHAIN, SIGLEC14 y PI3. Las curvas ROC individuales presentaron desempeños limitados, pero el modelo combinado alcanzó capacidad predictiva moderada con AUC de 0.746. El análisis de citocinas séricas mostró que las pacientes embarazadas con LES presentaron niveles elevados de BAFF y CXCL13 frente a pacientes con artritis reumatoide o síndrome antifosfolípido. En el tercer trimestre, se observó aumento de IFN- α , IL-17A, IFN- γ , IL-12p70, BAFF, IL-4, MCP-1/CCL2, CXCL8/IL-8 y RANTES/CCL5 comparado a controles sanos, lo que sugiere una activación inmunológica sistémica intensa en etapas tardías del embarazo.

Conclusión: Las mujeres embarazadas con LES se caracterizan por una activación de vías de interferón, respuesta humoral y quimiocinas. IFN- α y BAFF destacan como candidatos biomarcadores de preeclampsia, mientras que los genes IFI27, USP18, JCHAIN, SIGLEC14 y PI3 se proponen como biomarcadores moleculares de complicaciones obstétricas.

Capítulo I

Introducción

1. Lupus eritematoso sistémico

1.1 Aspectos generales

El Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares, generando depósito de inmunocomplejos responsables de desencadenar inflamación y daño tisular (1). El LES afecta aproximadamente 3.4 millones de personas en todo el mundo, presentando mayor incidencia en mujeres de edades reproductivas, específicamente entre la pubertad y menopausia (2). El LES es causada por una reacción autoinmune que involucra el sistema inmune innato y adaptativo. La producción de anticuerpos dirigidos contra elementos del núcleo celular, denominados como anticuerpos antinucleares (ANAs) corresponden a una característica del LES, sin embargo, proteínas nucleares (Smith, Ro y U1-RNP), proteínas del complemento (C1q), ácidos nucleicos (dsDNA) y componentes estructurales celulares (fosfolípidos) pueden ser reconocidos por los autoanticuerpos (3). Las manifestaciones clínicas del LES son altamente heterogéneas, difiriendo entre pacientes la sintomatología, por su parte, la enfermedad se categoriza entre leve, moderado y grave. En la práctica clínica, se emplean los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR), el índice de actividad de la enfermedad LES (SLEDAI) y la presencia de ANAs para su diagnóstico (2). Pacientes con LES presentan una variedad de manifestaciones clínicas, síntomas generales que incluyen fiebre, artralgias, mialgias, cefalea, fatiga, pérdida de apetito y de peso, estos últimos son comunes en casos nuevos o en episodios activos de la enfermedad. De manera sistémica numerosos órganos se encuentran afectados, por lo que se pueden presentar complicaciones cardíacas, neurológicas, pulmonares, cutáneas, renales, gastrointestinales, musculoesqueléticas y hematológicas (4). (Figura 1)

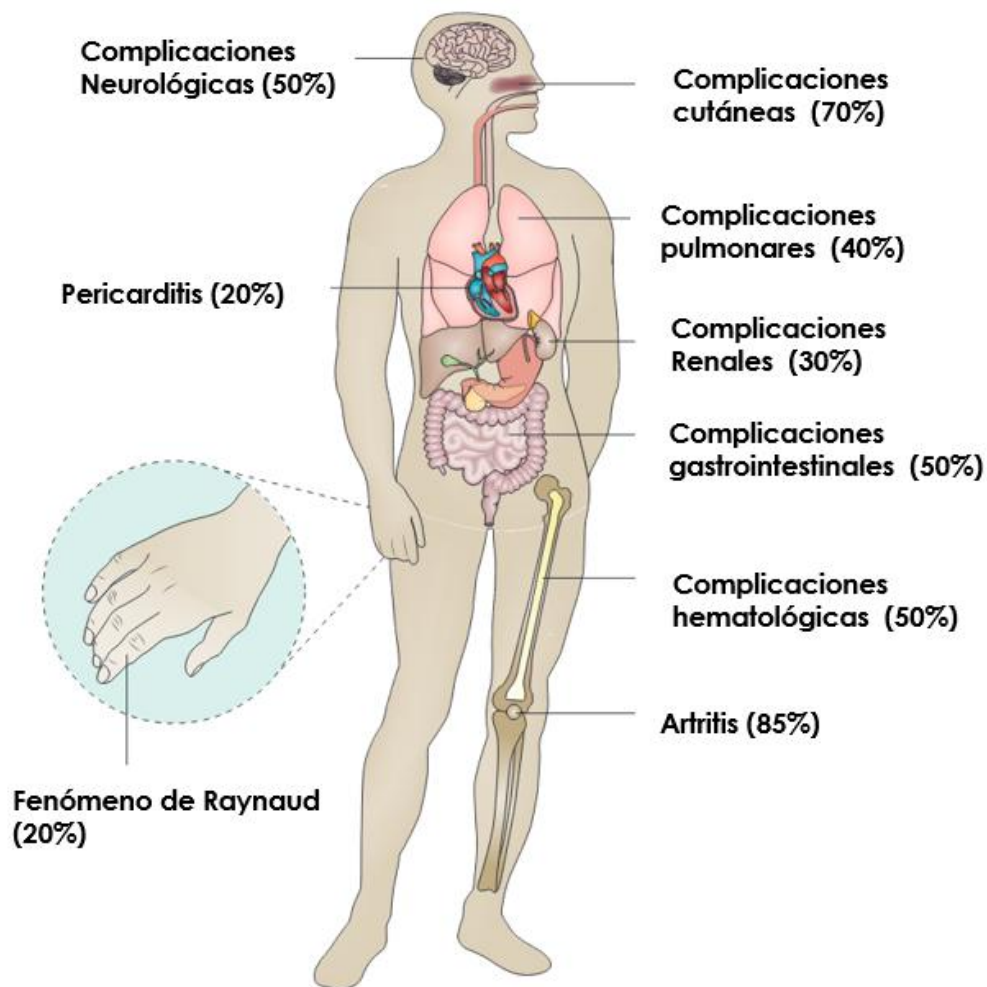


Figura 1. Complicaciones asociadas a LES. Imagen adaptada de Kaul. *et al.* (2016). Systemic lupus erythematosus, Nature Reviews Disease Primers (3)

1.2 Epidemiología

1.2.1 Nivel mundial

El LES es un problema de salud a nivel mundial, afecta aproximadamente 3.4 millones de personas con una incidencia estimada de 5.14 (1.4 a 15.13) por cada 100,000 personas al año (5). Es una enfermedad que se presenta principalmente en mujeres en edad reproductiva (15 a 44 años), en personas de etnia asiática, afroamericana, hispana e indígena. A nivel regional la incidencia de LES varía entre 3.7 a 49.0 por cada 100,000 personas al año en Norteamérica, 1.5 a 7.4 por cada 100,000 en Europa, 1.4 a 6.3 por cada 100,000 en América del Sur y 2.5 a 8.6 por cada 100,000 en Asia. La incidencia difiere ampliamente por país, los cuatro países con incidencias altas son Polonia (81.84 por cada

100,000 personas), Estados Unidos de América (12.13 por cada 100,000 personas), Barbados (10.37 por cada 100,000 personas) y China (8.57 por cada 100,000 personas), en contraste, Kazajistán fue el país con menor incidencia (0.57 por cada 100,000 personas) (4) (Figura 2).

La relación de mujeres y hombres que presentan LES se estima de 3:1 en niños y de 9:1 en adultos (2). La incidencia mundial de LES en mujeres es de 8.82 (2.4 a 25.99 por cada 100,000 personas) representando 0.34 millones de nuevos casos al año. En hombres, la incidencia mundial de LES es de 1.53 (0.41 a 4.46) por 100,000 personas, que representan 0.06 millones de nuevos casos al año (5).

En la estratificación por edad, se calcula que la incidencia de LES en adultos es 1.42 veces mayor que en el total de la población. La incidencia global en adultos es de 7.31 (1.98 a 21.54) por cada 100,000 personas al año, que corresponde a 0.68 millones de nuevos casos (5).

A nivel global, la prevalencia estimada de LES es de 43.7 (15.87 a 108.92) por cada 100,000 personas, afectando cerca de 3.41 millones de individuos. En el sur de Asia por cada 100,000 personas 15.9 (3.29 a 45.85) padecen LES, mientras que en Latinoamérica es 110.85 (26.79 a 314.1) por cada 100,000. Los cuatro países con mayor prevalencia son Emiratos Árabes Unidos (166.92 por cada 100,000 personas), Barbados (163.31 por cada 100,000 personas), Cuba (149.9 por cada 100,000 personas) y Brasil (147.37 por cada 100,000 personas). En contraste, Argentina es el país con la menor prevalencia (5.05 por cada 100,000 personas) (5).

En mujeres la prevalencia mundial de LES es mayor que la de los hombres, estimaciones reportan 78.73 (28.61 a 196.33) por cada 100,000 de personas, afectando a 3.04 millones de mujeres. Los países con mayor prevalencia de LES en mujeres son Emiratos Árabes Unidos (410.3 por cada 100,000 personas), Barbados (285.62 por cada 100,000 personas), Cuba (266.6 por cada 100,000 personas) y Brasil (251.86 por cada 100,000 personas). La mayor población femenina con LES se registró en China (622, 526 personas), Brasil (281 763 personas), Estados Unidos de América (159, 914 personas) e Indonesia (131, 214 personas). En hombres, la prevalencia mundial es de 9.26 (3.36 a 22.97) por cada 100,000 personas con 0.36 millones de hombres.

La estratificación por edades reporta una prevalencia de LES en adultos de 61.08 (22.18 a 151.87) por cada 100,000 personas, que representa aproximadamente 3.17 millones de individuos. En la población adulta femenina es aproximadamente 1.38 veces mayor que la población femenina global, con una prevalencia de 108.75 (30.5 a 270.58) por cada 100,000 personas, con 2.84 millones de mujeres adultas afectadas en el mundo. La prevalencia en la población masculina adulta es de 13.04 (4.73 a 32.29) por cada 100,000 personas, lo que representa 0.34 millones de hombres adultos con LES (5).

La mortalidad por LES es de 18.6 decesos por cada 1000 personas al año, con un índice de mortalidad estandarizado global de 2.65 (2.13 a 3.26). Con respecto a la edad, el índice de mortalidad estandarizado fue de 5.59 (2.05 a 12.38) en el grupo de edad más joven (0-44 años) y disminuyendo progresivamente a 2.14 (1.59 a 2.83) en el grupo de edad más avanzada (≥ 75 años). La supervivencia a 1 año posterior al diagnóstico es de 96%, la supervivencia a los 5 años es de 91% y los 10 años del 85%. Las principales causas de muerte en pacientes con LES se deben a enfermedades cardiovasculares y cáncer (6).

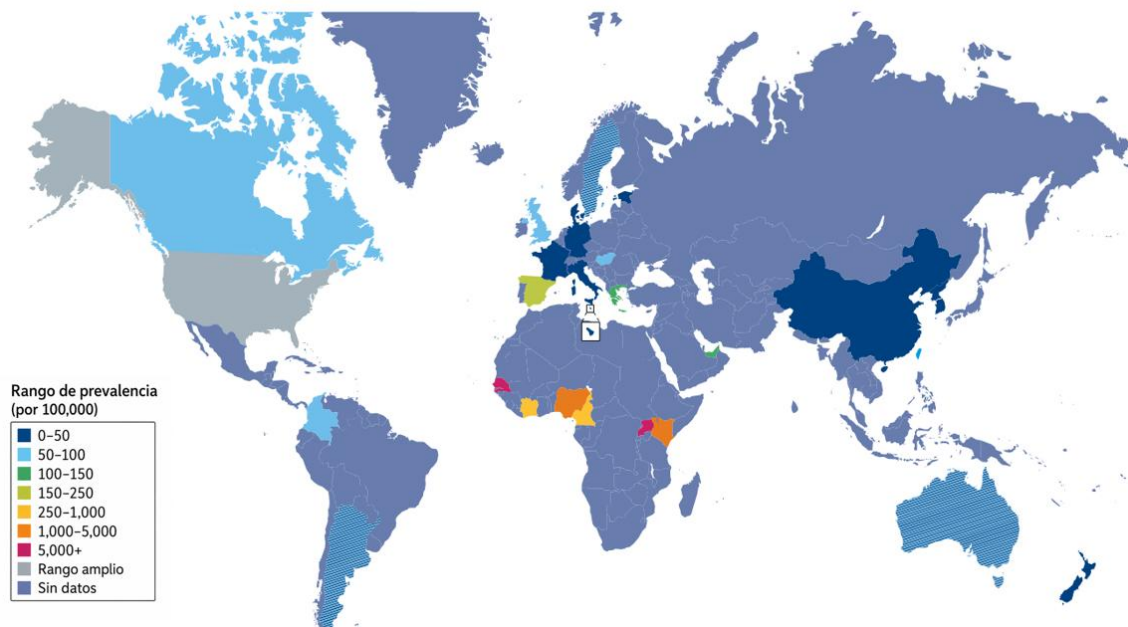


Figura 2. Incidencia mundial de LES. Imagen adaptada de Tian, J. *et al.* (2023). Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. *Annals of the Rheumatic Diseases* (5).

1.2.2 México

La prevalencia de LES en México se estima de 0.06% (0,03-0,10), con mayor frecuencia en mujeres (92.5%), respecto a hombres (7.5%) (7).

La tasa de mortalidad específica por edad es de 0.89 por cada 100,000 personas en 2017 (8). A nivel nacional, el LES se encuentra entre las 20 principales causas de muerte en mujeres de 10-54 años. En el periodo del año 1998 a 2017, se reportaron 11,449 defunciones, 75% ocurrieron en pacientes menores de 50 años (9).

1.2.3 Nuevo León

No existe un registro estatal actualizado y robusto de la epidemiología en LES. Sin embargo en el año 2010, el programa COPCORD reportó en Nuevo León una prevalencia estimada de 40 casos por cada 100, 000 habitantes, con un estimado de 2,300 personas con LES en el estado (10).

1.3 Fisiopatología

Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad causada por una respuesta inmune inapropiada hacia componentes del núcleo celular, se caracteriza por la producción de anticuerpos antinucleares (ANAs). Con base en los antígenos que son reconocidos, los autoanticuerpos se pueden dividir en aquellos con capacidad de dirigirse a componentes de los nucleosomas (anti-ADN y anti-histona) o proteínas de unión al ARN (anti-Sm, anti-U1RNP, anti-SSA, anti-Ro y anti-LA) (11). El LES es una enfermedad multisistémica donde se encuentran involucrados diversos factores genéticos (*IRF5*, *STAT4*, *BLK*, *HLA-DR3*, *TREX1*, *DNASE1*, entre otros), epigenéticos, ambientales (EBV, Radiación UV, tabaquismo) y hormonales (estrógeno y progesterona) que contribuyen a su desarrollo, progresión y establecimiento de la enfermedad.

1.3.1 Factores genéticos y epigenéticos

Existe una elevada predisposición genética para el desarrollo del LES. Se reportan aproximadamente 100 loci genéticos asociados con LES, muchas de las variantes corresponden a elementos regulatorios, sin embargo, algunas recaen en genes codificantes involucrados en vías de señalización importantes (3). Mutaciones que implican deficiencias en la vía de complemento (C2, C4 y C1q) pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad por alteraciones en la eliminación de detritos celulares, lo que provoca

acumulación de autoantígenos (12). El haplotipo 8.1 del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) asociado a LES incluye los alelos HLA-B8 y HLA-DR3 que favorecen la producción de autoanticuerpos dirigidos contra ADN o proteínas asociadas a ARN (13). Mutaciones en genes involucrados en vías de degradación de ácidos nucleicos, como nucleasas (*TREX1*, *DNASE1*, *DNASE1L3* y *RNASEH2*) promueven la acumulación de autoantígenos (14). La vía de interferón tipo I tiene un papel importante en la progresión de LES. Mutaciones en receptores tipo Toll activados por ácidos nucleicos (TLR7 y TLR9) (15), proteínas de señalización y factores de transcripción (*IRF5*, *IRF7*, *IRF8*, *IFIH1*, *STAT4*, *TYK2*) provoca la producción exacerbada de IFN tipo I (3).

Los mecanismos epigenéticos son eventos reversibles y heredables que modifican la expresión de los genes sin alterar la secuencia de ADN. La metilación del ADN en dinucleótidos de citosina-fosfato-guanosina (CpG) controla la accesibilidad de factores de transcripción, coactivadores transcripcionales y ARN polimerasas a regiones regulatorias (16). La hipometilación de elementos reguladores de genes *CD11a/CD18*, *CD70*, *CD40LG*, *IL-10*, *STAT3* promueve su expresión en pacientes con LES y se asocia con el inicio, desarrollo y complicaciones de la enfermedad (16). La modificación de histonas provoca una alteración en la interacción de los elementos del nucleosoma (histonas y DNA), estos incluyen acetilación, metilación, fosforilación y citrulinación. La acetilación de histonas y la metilación de la histona H3K9 disminuye en células T CD4⁺ provenientes de pacientes con LES (17). Modificaciones en histonas en genes de *IL17* e *IL2* contribuyen al fenotipo efector de las células T en LES. (16)

1.3.2 Factores ambientales

Diversos factores ambientales contribuyen a la aparición de LES en personas genéticamente predispuestas. Se estima que la contribución de los factores ambientales al desarrollo de LES es del 56% (18). El tabaquismo, la exposición a sílice y la ingesta de hormonas exógenas aumentan el riesgo relativo en un factor de 1.5, 2.1 – 4.6 y 1.5 – 1.9 respectivamente (18). La exposición a pesticidas, sustancias químicas e industriales incrementa el riesgo de LES en un factor de 1.5 a 7.4 (19). La luz UV puede inducir ruptura del ADN con formación de fragmentos de ácidos nucleicos lo que induce la apoptosis o necrosis de queratinocitos y desencadena la liberación de autoantígenos con formación de inmunocomplejos y daño tisular (3). Las modificaciones epigenéticas por exposición a

fármacos es el principal mecanismo propuesto en la inducción de LES. La hidralazina, un vasodilatador que inhibe la acumulación de Ca^{+2} empleado para tratar la hipertensión arterial, inhibe la vía de señalización ERK lo que provoca la disminución de la expresión de las ADN metiltransferasas DNMT1 y DNMT3A. Alteraciones en la expresión de genes del sistema inmune inducen autorreactividad y supervivencia de células T y B (20). El tabaquismo actúa como un estímulo inflamatorio en el epitelio y células mononucleares del pulmón, promueve daño celular por aumento de especies reactivas de oxígeno, alteración de funciones celulares y producción de autoanticuerpos (21). Compuestos minerales como sílice actúan como adyuvantes del sistema inmune, inducen inflamación crónica, estrés oxidativo y apoptosis, lo que favorece la ruptura de la tolerancia inmunológica y producción de autoanticuerpos (22). Otro de los factores ampliamente descritos son las infecciones virales, especialmente el virus de Epstein-Barr, la activación del sistema inmune innato mediante interacción de ARNs virales con receptores tipo Toll (TLR) induce la producción de interferón tipo I, que promueve la diferenciación de células B y producción de autoanticuerpos. Acompañado a esto, ocurre una reacción cruzada entre anticuerpos específicos dirigidos hacia la proteína del antígeno nuclear 1 de Epstein-Barr (EBNA1) con el ADN bicatenario (23).

1.3.3 Factores hormonales

Las hormonas sexuales incluyen estrógeno, progesterona, testosterona, dihidrotestosterona y dehidroepiandrosterona con participación en la modulación de la respuesta inmune. En mujeres, el estrógeno y progesterona son producidos por los ovarios, fluctúan durante el ciclo menstrual y a lo largo de la vida, etapas denominadas como premenopausia y menopausia, mientras que la testosterona permanece constante durante el ciclo menstrual y decrece en la menopausia (24). La progesterona y los andrógenos tienen efectos inmunosupresores y antiinflamatorios, mientras que los estrógenos se han asociado con un efecto estimulante para el desarrollo de enfermedades autoinmunes (25).

Las células del sistema inmune expresan dos subtipos de receptores de estrógenos, $\text{Er}\alpha$ y $\text{Er}\beta$, que regulan vías de señalización intracelular. En pacientes con LES existe un aumento en la expresión de $\text{Er}\alpha$ y un decremento en $\text{Er}\beta$ en PBMCs (26), asociado con el desarrollo y progresión de anticuerpos anti-DNA. Los estrógenos estimulan la maduración de células B y la secreción de anticuerpos. En enfermedades autoinmunes, el

estrógeno incrementa el número de progenitores de células B en la médula ósea y la supervivencia de células B esplénicas y favorece el desarrollo de células B autorreactivas (24). A su vez, el incremento de estrógeno se asocia con aumento en los niveles del factor de activación de células B (BAFF), esto favorece la supervivencia de células B autorreactivas y la producción de autoanticuerpos (27). Los estrógenos desempeñan una función importante en el tipo de respuesta inmune. Niveles bajos de estrógenos promueven la diferenciación de linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1) e inmunidad celular, mientras que niveles elevados promueven la diferenciación de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2) e inmunidad humoral (25). El aumento de niveles de estrógeno induce un fenotipo tipo LES, caracterizado por producción de citocinas Th2 y autoanticuerpos (28). Las células dendríticas plasmacitoides (pDC) son las principales productoras de interferón tipo I. En LES, las pDC se encuentran constantemente activadas por la interacción de ácidos nucleicos con receptores tipo Toll (TLR-7 y TLR-9) con la producción de interferón tipo I y desarrollo de autoinmunidad. El estrógeno promueve la diferenciación de pDC y eleva la expresión de MHC-II y CD86, a su vez, promueve la expresión de TLR8, TLR7 y TLR9 en PBMCs (29). A nivel celular, el estrógeno potencia la activación de células dendríticas y producción de interferón mediante las vías de señalización de TLR esto favorece el desarrollo y progresión de LES.

La progesterona es una hormona esteroide reproductiva con funciones inmunomoduladoras. La acción de la progesterona depende de sus receptores (PR), los cuales pueden estar presentes en la superficie celular o de manera intracelular (iPRs). A nivel celular, la progesterona regula funciones de quimiotaxis, supervivencia celular y liberación de superóxido en neutrófilos, inhibe funciones pro-inflamatorias (liberación de TNF- α) y promueve la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10) en macrófagos. En pDCs la progesterona aumenta la liberación de IFN- α inducida por TLR-7/8, además, suprime la proliferación de células CD4⁺, la diferenciación Th1/Th17 y funciones efectoras, en contraste potencia la diferenciación a Th2 y Treg. Durante el embarazo la progesterona suprime la actividad citotóxica de células CD3⁺CD8⁺ mediante moléculas inmunorreguladoras como 2,3- dioxigenasa (IDO) o el factor de bloqueo inducido por la progesterona (PIBF) (30). En pacientes con LES es característico la presencia de niveles

bajos de progesterona, por lo que disminuye su impacto y promueve la proliferación de células T CD4⁺ así como la producción de anticuerpos por las células B (31, 32).

1.4 Respuesta Inmune en LES

El LES es una enfermedad caracterizada por una desregulación inmune y pérdida de tolerancia, donde ocurre un error en el reconocimiento de autoantígenos e inicia una respuesta inmune inapropiada. La presencia de anticuerpos antinucleares indica la existencia de memoria inmunológica de largo plazo donde se incluyen células plasmáticas de larga vida, lo que indica la importancia de la inmunidad adaptativa, sin embargo, el estímulo inicial que desencadena la expansión clonal de linfocitos autorreactivos proviene de la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), liberación de citocinas y factores de supervivencia como IFN tipo I y BAFF. De manera general durante la inmunopatogénesis de LES la inmunidad innata contribuye al inicio y amplificación de la respuesta, mientras que la inmunidad adaptativa desempeña un papel central en la patogénesis de la enfermedad (31). (Figura 3)

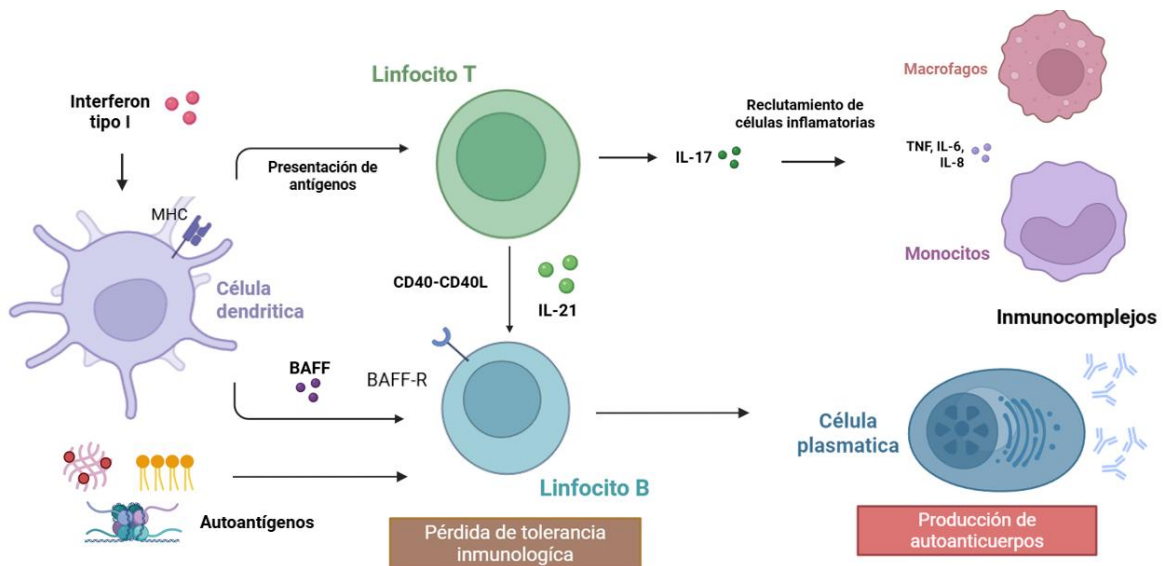


Figura 3. Participación del sistema inmune en el desarrollo de LES. Imagen creada en BioRender.com

1.4.1 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa rápida y no específica donde participan barreras físicas, químicas, células especializadas (monocitos, macrófagos,

neutrófilos, células NK, eosinófilos) y proteínas sanguíneas (complemento). En condiciones de inflamación, los neutrófilos forman trampas extracelulares (NET) en un proceso llamado NETosis, donde se liberan componentes celulares (mitocondrias, proteínas nucleares y ADN), los cuales son reconocidos por autoanticuerpos en LES (33). La formación de inmunocomplejos formados por autoanticuerpos y autoantígenos son reconocidos por el receptor FcγRII (CD32) en superficie celular de pDCs, son transportados a los receptores tipo Toll (TLR7/9) lo que activa la producción de IFN-α (34). La señalización río abajo de los TLRs endosomales induce la actividad de los factores de transcripción IRF3/7 y del inhibidor de la κB quinasa (IKKα) e inicia la producción de IFN tipo I (35). Los TLRs endosomales son los principales sensores de ácidos nucleicos. TLR7 reconoce ARN y TLR9 reconoce ADN rico en CpG no metilado, estos receptores son activados por los inmunocomplejos lo que favorece la producción de IFN tipo I y disfunción inmunitaria en LES (36). Mutaciones y alteraciones en los receptores, mediadores río abajo y reguladores negativos de la señalización de TLR se han implicado en la patogénesis de LES. El TLR7 influye en el desarrollo de la subpoblación de células B doble negativas (IgD⁻CD27⁻), las cuales están aumentadas en personas con LES y tienen la característica de presentar un fenotipo de células B virgen activadas con capacidad de detectar ácidos nucleicos, por lo que, se proponen como las principales responsables en la producción de los autoanticuerpos (37). Otra vía de activación del sistema inmune innato es el reconocimiento de ADN citosólico mediante la enzima sintasa cíclica de GMP-AMP (cGAS) que produce cGMP-AMP el cual se une al estimulador de la respuesta a interferón (STING). STING desencadena la fosforilación de IRF3, que posteriormente es desplazado al núcleo para promover la producción de citocinas proinflamatorias (IFNβ) (38). La vía de cGAS-STING se encuentra constantemente activa en pacientes con LES (39).

Los monocitos en LES potencian la inflamación e incrementa la señalización de interferón. Algunas poblaciones de monocitos presentes en sangre periférica de personas con LES son capaces de fagocitar glóbulos rojos y expresar genes estimulados por IFN (ISG) e IL-1β activando el inflamosoma, por otra parte, el aumento de la expresión de ISG en los monocitos se encuentra asociado con disminución del número de células T CD4⁺

vírgenes y aumento en el número de células T citotóxicas $CD8^+$ $GZMH^+$ (40). Los monocitos que ingresan a los tejidos contribuyen y potencian la inflamación.

Los principales mediadores humorales involucrados en la patogénesis de LES son el sistema de complemento. La activación del complemento por la formación de inmunocomplejos es un factor clave en el desarrollo del daño tisular, sin embargo, la activación de elementos del complemento como C1q y C3 de la vía clásica facilitan la eliminación de los inmunocomplejos y de material apoptótico en circulación (41). Alteraciones en los elementos del complemento provoca que los autoantígenos provenientes del material celular no eliminados se acumulen y depositen en tejidos, por ello mutaciones en C1q, C2 y C4 se describen como causas monogénicas de LES (42).

1.4.2 Sistema inmune adaptativo

Las células del sistema inmune reconocen antígenos de manera específica y generan memoria inmunológica, esto permite una respuesta más eficiente a estímulos posteriores. Este tipo de respuesta inicia con el reconocimiento preciso de antígenos mediante receptores específicos que se originan por recombinación somática. Sus principales células efectoras son los linfocitos B y T.

1.4.2.1 Linfocitos T

Los linfocitos T son importantes en la patogénesis de LES, secretan de manera excesiva citocinas proinflamatorias, proveen señales a células B mediante interacciones dependientes de contacto, promueven la producción de autoanticuerpos y potencian el daño tisular mediante el reclutamiento de otras poblaciones celulares (43). Los linfocitos T cooperadores son responsables de orquestar la respuesta inmune contra diversos patógenos, presentan una plasticidad que les permite diferenciarse en subtipos celulares con perfiles de expresión de citocinas y funciones específicas.

Los linfocitos Th1 están involucrados en la respuesta inflamatoria celular y la defensa contra patógenos intracelulares. Se caracterizan principalmente por la producción de IL-2 e IFN- γ , sin embargo, pueden producir otras citocinas como TNF, linfotoxinas y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Los linfocitos Th1 tienen un rol importante en la patogénesis de LES debido a su predominante contribución de IFN- γ , una citocina proinflamatoria con diversas funciones como; incrementar la

expresión de TLRs, promover el cambio de clase de la inmunoglobulina γ (IgG), potenciar la presentación de antígenos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y de clase II (MHC-II), inducir la secreción de citocinas, activar macrófagos e incrementar la fagocitosis (44).

Los linfocitos Th2 son reconocidos por su importancia en mecanismos de defensa contra parásitos multicelulares y su relación con enfermedades alérgicas. Se encuentran presentes en tejido epitelial, principalmente en tracto intestinal y pulmones. Citocinas de la respuesta inmune innata como IL-25, IL-33 y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de estas enfermedades. Los linfocitos Th2 se caracterizan principalmente por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. (45). IL-4 es una citocina pleiotrópica que promueve la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas e induce cambio clase de inmunoglobulinas a IgG1 e IgE, actúa promoviendo la diferenciación y maduración de células plasmáticas derivadas de médula ósea y contribuye a la reparación de tejidos potenciando la actividad de macrófagos M2 (44). IL-13 promueve proliferación y diferenciación de células B, induce expresión de MHC-II, CD23 e IgE, mientras que IL-5 estimula la producción de anticuerpos en linfocitos B activados (43). LES es característico de un eje Th1/Th2 elevado, sin embargo, citocinas provenientes de linfocitos Th2 pueden inducir la generación de autoanticuerpos y potenciar la patología.

Los linfocitos Th17 son la principal fuente de IL-17, una familia de citocinas con efectos inflamatorios y un papel fundamental en la defensa contra bacterias extracelulares y hongos. Existen 6 miembros conocidos de la familia de IL.17, IL-17A (conocida como IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, y IL-17F (46). Es una citocina con numerosas funciones patológicas como; reclutamiento de neutrófilos, activación de células inmunes innatas, incremento de funciones de linfocitos B, inducción de liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , GM-CSF e IL-1 β , expresión y liberación de ICAM-1, prostaglandinas E2 (PGE2), incremento de daño tisular por la inducción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y péptidos antimicrobianos (44). IL-17 se encuentra elevada en pacientes con LES, se asocia con gravedad y es un elemento importante en la patogénesis de la enfermedad. IL-17 promueve la formación espontánea de centros

germinales, la generación de autoanticuerpos de manera independiente del antígeno y promueve la respuesta de linfocitos B, potencia su proliferación, reduce su apoptosis y favorece su maduración en células plasmáticas (47).

Los linfocitos T reguladores (Treg) son células cruciales en el mantenimiento de la tolerancia y homeostasis inmunológica. Estos linfocitos se caracterizan por la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25) y el factor de transcripción FoxP3, además expresan CTLA-4 y sus funciones principales son la supresión de actividad celular, expansión de linfocitos y el mantenimiento de la tolerancia periférica de antígenos propios. Los linfocitos Treg se subdividen dependiendo de su origen de desarrollo en Tregs tímicas o naturales (nTregs) y Tregs inducidas en tejidos periféricos (iTregs) (48). Los mecanismos de supresión inmunitaria mediada por Treg son la secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β), expresión de receptores inhibidores y privación de citocinas. En LES como enfermedad autoinmune sistémica, la ausencia de Tregs o disminución de su función es considerado como favorable para la patogénesis de la enfermedad (49). En contraste a las funciones supresoras de IL-10 y TGF- β , bajo ciertas condiciones pueden potenciar y activar la patogénesis de LES. IL-10 activa y dirige la maduración de linfocitos B en células plasmáticas, estimula la proliferación de precursores y linfocitos B maduros (50). Por otra parte, TGF- β se encuentra asociado con efectos proinflamatorios, así como en el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos Th17, que favorece la inflamación y patogénesis de LES (51).

Los linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh) se localizan en centros germinales y en focos extra foliculares que proporcionan señales a las células B para su supervivencia, diferenciación y maduración. Se caracterizan por la expresión del factor de transcripción BCL6. En la respuesta inmune, la función principal de Tfh es ayudar a las células B durante la respuesta a antígenos dependientes de linfocitos T mediante la liberación de citocinas como IL-21 e IL-4. Los autoanticuerpos específicos en LES tienen una alta afinidad mediante hipermutación somática, lo que indica la participación de las Tfh en la generación de clones de células B autorreactivas (52). Las moléculas dependientes de contacto, como CD40L e ICOS de Tfh, también potencian la activación de las células B (53). Por lo tanto, las interacciones entre células T y B son fundamentales para el

desarrollo y mantenimiento de las células B autorreactivas y su diferenciación en células plasmáticas productoras de autoanticuerpos.

Los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) se caracterizan por su actividad citotóxica mediada por la expresión de perforinas y granzimas, además de citocinas como IFN- γ TNF- α . Tienen la capacidad de reconocer antígenos mediante su TCR y sus principales funciones son eliminar agentes virales y células tumorales. Las células T $CD8^+$ de pacientes con LES presentan defectos funcionales que incluyen disminución en la producción de perforina y granzima (54). La eliminación genética de la producción de perforina resulta en la aceleración de la progresión de la enfermedad. El rol principal de las células $CD8^+$ en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia periférica recae en la remoción de las células B autorreactivas.

Las células T doble negativos (DN) son células que expresan los receptores de linfocitos T $\alpha\beta$ pero carecen de los correceptores CD4 y CD8. Representan una población pequeña de linfocitos circulantes en individuos sanos, sin embargo, su población se encuentra elevada en pacientes con LES. Contribuyen a la patogénesis de la enfermedad por ser uno de los principales productores de IL-17 e IFN- γ (55).

1.4.2.2 Linfocitos B

La pérdida de la tolerancia inmunológica es la característica distintiva en la patogénesis de LES, provoca una respuesta inmune dirigida a componentes nucleares y citoplasmáticos. Las células plasmáticas y las clonas de células plasmáticas de larga vida son las principales productoras de autoanticuerpos, que contribuyen al daño tisular y mantenimiento de inflamación mediante la formación de complejos inmunes y la liberación de citocinas proinflamatorias (IFN-I) (56).

Los linfocitos B son precursores de células plasmáticas, su principal rol es la liberación de anticuerpos, además son importantes células presentadoras de antígenos. Se originan del progenitor linfoide común, que además da origen a los linfocitos T y NK. Su principal característica es la expresión de una única inmunoglobulina (57). La diversidad del receptor de células B (BCR) generado mediante recombinación V(D)J permite reconocer una gran variedad de antígenos, sin embargo, también se generan células B inmaduras que reconocen antígenos propios, denominados como linfocitos B autorreactivos (58). En el

repertorio de células B maduras, el porcentaje de linfocitos B autorreactivos disminuye como resultado de los mecanismos de la tolerancia inmunológica, tales como la modificación del BCR, apoptosis y anergia, sin embargo, todavía se presenta un porcentaje considerable de células B maduras autorreactivas (57). El LES se caracteriza por autoanticuerpos que reconocen de manera restrictiva antígenos nucleares, esto puede explicarse por la activación doble del BCR y TLRs. Durante una infección viral aguda, las células B específicas de antígeno transportan el ácido nucleico viral a compartimentos endosomales e inicia la señalización de TLR dependiente de MyD88 e inducción de producción de anticuerpos, sin embargo, los TLRs pueden reconocer partículas de ácidos nucleicos derivadas de células apoptóticas, integrarlos al BCR y aumentar el riesgo de autoinmunidad (59,60). Los receptores endosomales TLR9 se asocian con la producción de autoanticuerpos dirigidos al ADN y cromatina, mientras que TLR7 facilita la reactividad a autoantígenos asociados a ARN (61).

Los linfocitos B maduros se dividen en subpoblaciones funcionales y anatómicas, tales como las células B-1, células B de la zona marginal (ZM) y las células B foliculares. Las células B-1 se encuentran principalmente en el peritoneo y cavidades pleurales, mientras que son escasas en órganos linfoides y en sangre. Expresan anticuerpos poli-reactivos IgM e IgA y son activadas por antígenos independientes de linfocitos T como LPS (TI-1) o antígenos multivalentes (TI-2). Se proponen como la principal fuente de autoanticuerpos naturales de baja afinidad secretados de manera espontánea que permiten eliminar restos apoptóticos (62). En algunos modelos murinos de LES se observan niveles elevados de células B-1 en sangre, sin embargo, aún no existe asociación clara con el desarrollo de LES. Las células B de zona marginal (ZM) y foliculares derivan de células B inmaduras provenientes de la médula ósea, denominadas como células B transicionales, las cuales para su maduración dependen del factor de activación de las células B (BAFF (63). El incremento de niveles de BAFF permite a las células B autorreactivas madurar hasta ser inmunocompetentes. Pacientes con LES presentan un incremento de células B transicionales, lo que puede estar asociado con niveles elevados de BAFF (64). Las células B ZM se localizan en la zona marginal del bazo, donde actúan como primera línea de defensa frente a antígenos independientes de linfocitos T, como LPS bacteriano (65). Estas células B presentan una elevada respuesta a la activación de TLR, expresan niveles altos

de receptores de complemento y de moléculas coestimuladoras, además de una prominente capacidad de diferenciarse a células plasmáticas (66). Por otra parte, los linfocitos B foliculares, son células que migran entre ganglios linfáticos, folículos esplénicos y circulación, hasta que interactúan con un antígeno y son los principales contribuyentes en la respuesta dependiente de linfocitos T, además de la respuesta de centros germinales y generación de memoria (67).

Durante la fase inicial de la respuesta inmune humoral, plasmablastos de vida corta y baja afinidad son generados de manera extra folicular (EF), subsecuentemente interacciones constantes en los centros germinales de células B específicas de antígenos y linfocitos T CD4⁺ facilitan la producción de células plasmáticas de alta afinidad, que se desplazan a nichos de supervivencia en médula ósea para establecerse como plasmocitos de larga vida (LLPC) (68). En el desarrollo de LES ocurre una acumulación de clonas autorreactivas con presencia de hipermutación somática, lo que implica un origen de centro germinal. En pacientes y modelos murinos de LES se reportan la formación de centros germinales espontáneos que pueden estar asociados con la fisiopatología de la enfermedad (69). De manera paralela, en LES se pueden presentar células B con hipermutación somática generada de manera extra folicular (70). Dentro de las poblaciones específicas, en pacientes con LES ocurre una expansión de un subtipo celular denominadas células vírgenes activadas (aNAV) definidas como IgD⁺CD27⁻, las cuales muestran signos de activación temprana y alta capacidad de diferenciarse (71). Las células aNAV dan origen a la mayoría de las células productoras de autoanticuerpos en LES, en especial a las células doble negativas (DN2) (IgD⁻CD27⁻CXCR5⁻CD11c⁺) o también denominadas células asociadas a la edad (ABC). La subpoblación celular ABC tiene su origen tras la activación de sus precursores mediante TLR7, IL-21 e IFN γ (72), presentan una mayor autorreactividad y se sugiere que son las principales precursoras de las células plasmáticas que dan origen a la patogénesis en LES (73).

1.5 Lupus eritematoso sistémico durante el embarazo

La mayoría de las pacientes con lupus son mujeres con una edad media de 30 años, es decir, mujeres en edad reproductiva. Por lo tanto, es importante comprender la interacción de la enfermedad con el embarazo. Durante el embarazo se mantiene una tolerancia

inmunológica frente a los antígenos paternos presentes en el feto, lo que permite su desarrollo. Alteraciones en el sistema inmune provocadas por el LES resultan en la pérdida de la tolerancia inmunológica, lo que puede provocar complicaciones obstétricas como pérdida fetal, restricción de crecimiento fetal, preeclampsia y activación de LES.

1.5.1 Fisiología del embarazo

El embarazo constituye un estado fisiológico dinámico donde todos los sistemas maternos sufren modificaciones para permitir y sostener el crecimiento fetal, el desarrollo de la placenta, preparar el cuerpo materno para el parto y la lactancia. Estos cambios son progresivos, reversibles y necesarios para compensar el aumento de las demandas metabólicas materno-fetales.

Una de las adaptaciones significativas ocurre en el sistema cardiovascular. En etapas tempranas se produce una vasodilatación y relajación del músculo liso vascular para incrementar los niveles de progesterona, estrógeno y prostaglandinas en circulación (74). De manera paralela ocurre una expansión del volumen plasmático lo que se refleja como una disminución de masa eritrocitaria, esto se denomina anemia fisiológica del embarazo, se reduce la viscosidad sanguínea, mejora la perfusión y permite una mayor reserva con la pérdida sanguínea durante el parto (75).

El sistema respiratorio también sufre adaptaciones, la progesterona aumenta la sensibilidad al dióxido de carbono, aumentando la ventilación y disminuyendo la alcalosis, de esta manera se facilita la eliminación de CO₂ fetal en la circulación materna. Con respecto al metabolismo, la placenta actúa como un órgano endocrino donde favorece un estado anabólico inicial, seguido de una mayor resistencia a la insulina, lo que permite aumentar la disponibilidad de glucosa y nutrientes del feto (75).

1.5.2 Respuesta inmune en el embarazo

La respuesta inmune durante el embarazo permite la adaptación materna para regular la tolerancia del feto semiallogénico sin comprometer la defensa frente a patógenos e infecciones. La presencia de células del sistema inmune en la interfaz materno-fetal permiten la recepción, establecimiento y crecimiento del blastocisto durante la fase de implantación. Durante la implantación normal en la decidua se observan infiltrados de células del sistema inmune innato y adaptativo. Aproximadamente el 70% de los

leucocitos de la decidua son células NK, 20-25% macrófagos, 1.7% células dendríticas y 3-10% linfocitos T. Por otra parte, las células B se encuentran ausentes o en mínima cantidad en la decidua normal (76).

La respuesta inmune materna cambia a lo largo del embarazo. En el primer trimestre predomina un ambiente inflamatorio el cual es necesario para la implantación e invasión trofoblástica, además de una remodelación vascular. En esta fase predominan en el útero células NK, macrófagos y citocinas. Durante el segundo trimestre, el sistema inmune tiende hacia un perfil antiinflamatorio permitiendo el desarrollo de tolerancia inmunológica mediada por células T reguladoras y menor actividad de respuesta Th1 y Th17. Este periodo favorece el crecimiento fetal. Hacia el tercer trimestre, nuevamente se observa un aumento de mediadores proinflamatorios, el cual permite la maduración del cérvix uterino lo que provoca el trabajo de parto (77) (Figura 4).

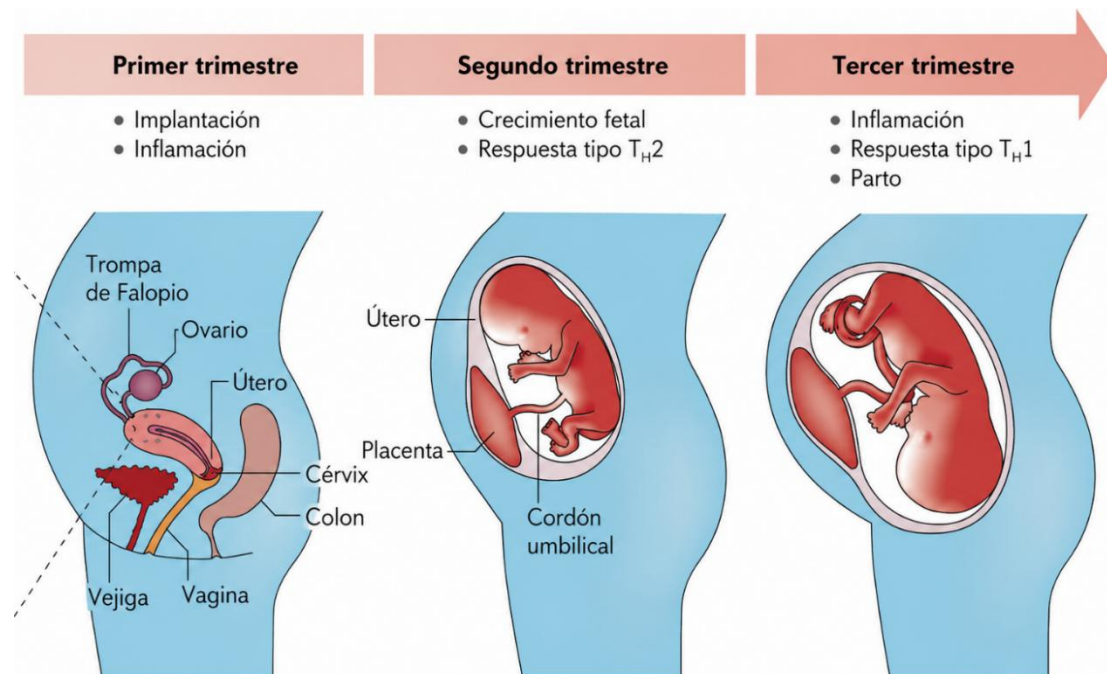


Figura 4. Sistema inmune durante el embarazo. Figura adaptada de Mor, *et. al* (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. In Nature Reviews Immunology (Vol. 17, Issue 8, pp. 469–482).

1.5.3 Alteraciones del sistema inmune durante el embarazo en LES

En condiciones normales, la gestación requiere de una regulación controlada del sistema inmune. Cada trimestre se caracteriza por un fenotipo inmunológico dependiendo los requerimientos materno-fetales, sin embargo, en pacientes con LES ocurre una disrupción del sistema inmune caracterizada por una pérdida de la tolerancia, activación de células B autorreactivas, producción de autoanticuerpos y activación sostenida de vías inflamatorias (78).

Una de las principales alteraciones del sistema inmune en LES es la señal exacerbada de interferón tipo I. Los complejos inmunes que contienen ADN y ARN activan células plasmáticas lo que induce la producción de IFN-I, esta señal incrementa la presentación de antígenos, activación de monocitos y promueve la activación y diferenciación de células B. Durante el embarazo esta activación constitutiva interfiere con la tolerancia materno-fetal contribuyendo a la inflamación placentaria y alteraciones del crecimiento fetal (79). Por otra parte, niveles elevados de BAFF en LES favorecen la supervivencia de los linfocitos B autorreactivos, contribuyendo a la producción de autoanticuerpos. En el embarazo la interacción de los autoanticuerpos con antígenos placentarios, aumentan el riesgo de daño a la placenta y desarrollo de complicaciones. Los anticuerpos anti-Ro/SSA, anti-La/SSB y antifosfolípidos se asocian con el riesgo de lupus neonatal, bloqueo auriculoventricular congénito, pérdida gestacional, trombosis e insuficiencia placentaria (78).

Respecto al perfil de citocinas en mujeres embarazadas con LES, existe una participación de mediadores Th1, Th2 y Th17, interferón y quimiocinas. La elevación de IL-12p70 e IFN- γ describe una activación del eje Th1, capaz de estimular macrófagos, aumentar la presentación de antígenos y potenciar la inflamación. Por su parte, IL-17A se asocia con la inducción de quimiocinas, daño tisular y reclutamiento de células efectoras (2). Las quimiocinas como MCP-1, CXCL8, CCL5, CXCL10 y CXCL13 favorecen el reclutamiento de monocitos, neutrófilos, linfocitos T y células B hacia tejidos inflamados o hacia la interfase materno-fetal, dando como resultado un microambiente con mayor tráfico celular, inflamación, activación endotelial y daño placentario (78).

1.5.4 Complicaciones obstétricas durante el embarazo con LES

El embarazo en pacientes con LES se considera una condición obstétrica de alto riesgo debido a la frecuencia elevada de desenlaces adversos. Las principales complicaciones descritas incluyen parto prematuro (39.4%), incremento de los síntomas de LES (35-85%), preeclampsia (28%), pérdida gestacional o aborto (16%) y restricción del crecimiento fetal (12%) (78). (Figura 5).

La pérdida gestacional incluye aborto espontáneo, muerte fetal o muerte intrauterina. El LES se asocia con la actividad sistémica de la enfermedad, presencia de anti-dsADN y principalmente anticuerpos antifosfolípidos (aPL). Los aPL pueden unirse a la β 2-glicoproteína I en la superficie del trofoblasto y endotelio, activan complemento e inducen inflamación local lo que compromete la perfusión placentaria y provoca falla en la implantación pérdida fetal o insuficiencia placentaria (80).

La preeclampsia se define clínicamente como el desarrollo de hipertensión después de la semana 20 de gestación, está asociada a proteinuria, trombocitopenia, insuficiencia renal, edema pulmonar y síntomas neurológicos (81). En LES los mecanismos inmunológicos incluyen la activación del complemento, disfunción endotelial, inflamación placentaria y activación de monocitos y neutrófilos (82).

El parto prematuro, se define como el nacimiento antes de las 37 semanas de gestación, es una de las complicaciones fetales más frecuentes en LES. Puede ser espontáneo, por trabajo de parto prematuro o ruptura temprana de membranas. Su impacto fetal es importante porque aumenta el riesgo de bajo peso al nacer, síndrome de dificultad respiratoria, sepsis neonatal, complicaciones neurológicas y finalmente ingreso a la unidad de cuidados intensivos neonatales (83).

La restricción de crecimiento fetal (RCF) se refiere a la incapacidad del feto para alcanzar su potencial de crecimiento, generalmente asociada a peso fetal por debajo del percentil 10 e insuficiencia placentaria (84). Los mecanismos inmunológicos más importantes incluyen daño vascular placentario, activación de complemento, depósito de complejos inmunes, aPL, inflamación del trofoblasto, alteración de la angiogénesis y disminución de la perfusión uteroplacentaria. (85).

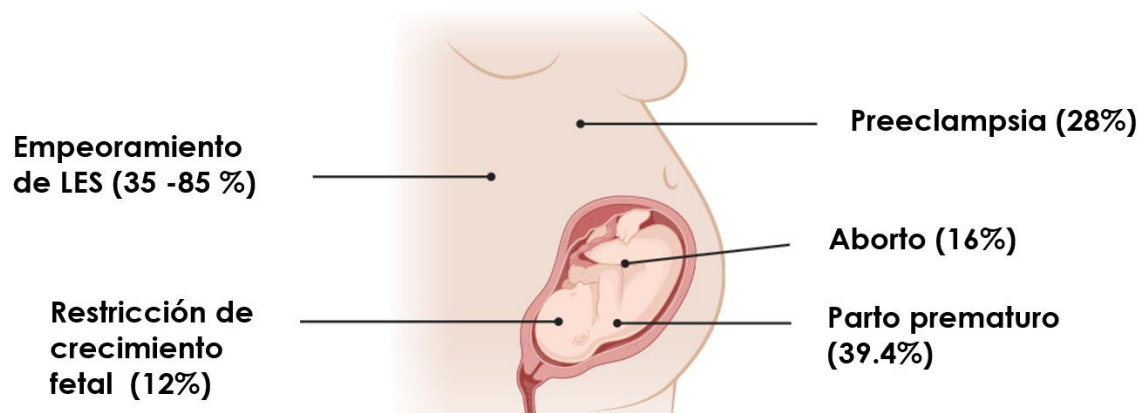


Figura 5. Complicaciones obstétricas durante el embarazo con LES. Imagen creada en BioRender.com

Capítulo II

Antecedentes

El lupus eritematoso sistémico se caracteriza por un conjunto de elementos y fenómenos inmunológicos en los que convergen la activación de IFN-I, hiperactividad de células B, producción de autoanticuerpos, formación de complejos inmunes, activación de células mieloides y liberación de citocinas y quimiocinas. En mujeres embarazadas, estos elementos se vuelven más relevantes debido a que la gestación requiere un equilibrio inmunológico dinámico, cuando este equilibrio se rompe, se pueden desarrollar complicaciones obstétricas como preeclampsia, restricción del crecimiento fetal, parto pretérmino o pérdida gestacional.

Estudios previos han reportado que existe un aumento significativo de citocinas y quimiocinas relacionadas con la respuesta Th1, Th2, interferón, quimiotaxis de monocitos, neutrófilos y linfocitos, mielopoyesis y remodelación tisular en pacientes con LES (86). A su vez, pacientes con LES presentan un perfil de citocinas característico que permite distinguirlo de otras enfermedades autoinmunes, donde destacan mediadores como MCP-1 e IL-10 (87). Los principales mediadores reportados en LES permiten correlacionar el impacto de las vías de IFN-I (IFN- α), activación de células B (BAFF) y quimiotaxis (CCL8, CXCL10 y CXCL11) como ejes principales en la patogénesis de la enfermedad (88).

En el contexto del embarazo, estudios sobre la dinámica de citocinas en pacientes con LES han reportado una regulación anómala de mediadores humorales e inflamatorios, caracterizado por el aumento de IL-10, sTNFR I en pacientes con enfermedad activa (89). Algunos autores reportan que mujeres embarazadas con LES presentan concentraciones séricas elevadas de CXCL8, CXCL9, CXCL10 e IL-10 en comparación con controles sanos, durante y después del embarazo, de manera general las pacientes con LES tienen cambios gestacionales similares que mujeres sin LES, pero con un nivel inflamatorio más elevado (90).

Capítulo III

Justificación

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune que en el embarazo se asocia a mayor riesgo de complicaciones como preeclampsia, parto prematuro, restricción del crecimiento y pérdida fetal. Aunque la fisiopatología de la enfermedad está bien caracterizada, la estratificación individual del riesgo obstétrico es limitada. Por ello, es necesario identificar e integrar biomarcadores clínicos y moleculares que sirvan para desarrollar un asistente virtual que permitirá predecir la posibilidad de complicaciones.

Capítulo IV

Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar biomarcadores asociados a riesgo obstétrico en mujeres con LES para el desarrollo de un asistente clínico virtual.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar biomarcadores asociados a complicaciones obstétricas en mujeres embarazadas con LES mediante un análisis *in silico* usando bioinformática integrativa.
2. Cuantificar los niveles de citocinas en muestras de suero en una cohorte de mujeres embarazadas con LES en el primer, segundo y tercer trimestre.
3. Desarrollar un asistente clínico virtual para la predicción de riesgo obstétrico.

Capítulo V

Hipótesis

La integración de biomarcadores moleculares e inmunológicos con variables clínicas permite predecir el riesgo de complicaciones obstétricas en mujeres con LES.

Capítulo VI

Materiales y métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico

- Sangre venosa periférica de pacientes embarazadas con diagnóstico de Lupus eritematoso sistémico atendidas en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina, UANL.
- Sangre venosa periférica de mujeres embarazadas sanas del Servicio de Neurología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina, UANL.

6.1.2 Material de laboratorio

- Aguja negra 22G x 25mm
- Tubo BD Vacutainer Plus rojo
- Torundas o gasas estériles
- Alcohol al 70%
- Tubos cónicos estériles de 15 ml
- Tubos cónicos estériles de 50 ml
- Crioviales de 1 ml
- Pipetas automáticas de 0.1 a 2 μ L
- Pipetas automáticas de 10 a 1000 μ L
- Pipetas automáticas de 20 a 200 μ L
- Pipetas automáticas de 2 a 20 μ L
- Micropipeta multicanal de 20 a 50 μ L
- Puntas estériles desechables de 100 a 1000 μ L
- Puntas estériles desechables de 1 a 10 μ L
- Puntas estériles desechables de 20 a 200 μ L
- Puntas estériles desechables de 2 a 20 μ L

6.1.3 Equipo de laboratorio

- Centrífuga refrigerada
- Cabina de bioseguridad clase II
- Refrigerador de 2 a 8 °C
- Congelador de -20 °C
- Ultracongelador de -80 °C
- Vortex
- Luminex 200TM
- Agitador orbital para placas
- Estación de lavado magnética para microplacas
- Lector de placa con capacidad de lectura a 450 nm
- Filtro

6.1.4 Reactivos y kits comerciales

- HCl 1N
- NaOH 1.2N /HEPES 0.5 M
- Agua desionizada
- Human Luminex® Discovery Assay, Número de Catálogo # LXSAHM (R&D Systems)
- QuantikineTM ELISA Human/Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-β1 Immunoassay (R&D Systems)

6.2 Métodos

6.2.1 Estrategia general

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de Inmunología de Sistemas del Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

La estrategia general del estudio se estructuró en cuatro etapas complementarias, integrando análisis bioinformáticos, reclutamiento clínico, medición experimental de citocinas y desarrollo de una herramienta virtual de apoyo clínico (Figura 6).

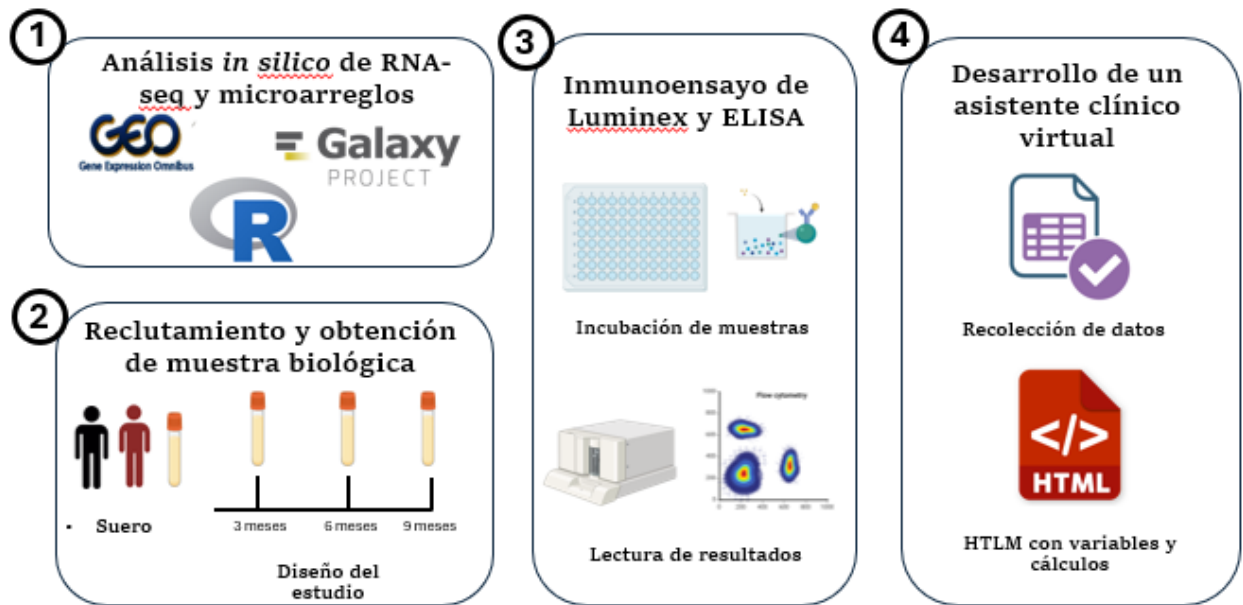


Figura 6. Estrategia experimental general. El estudio se desarrolló en cuatro etapas, (1) partiendo del análisis *in silico* de datos transcriptómicos de RNA-seq y microarreglos obtenidos de repositorios públicos de GEO, posteriormente (2) el reclutamiento clínico y obtención longitudinal de muestras de suero durante el embarazo, (3) cuantificación de citocinas séricas mediante inmunoensayo Luminex y ELISA y (4) desarrollo de un asistente clínico virtual

6.2.2 Búsqueda de bases de datos transcriptómicas

Para identificar biomarcadores asociados a complicaciones obstétricas en mujeres embarazadas con lupus eritematoso sistémico (LES) se realizó un análisis *in silico* a partir de bases de datos transcriptómicas públicas disponibles en Gene Expression Omnibus (GEO), un repositorio público que almacena datos de expresión génica.

6.2.2.3 Criterios de selección de bases

La búsqueda se enfocó en identificar estudios realizados en mujeres embarazadas con Lupus Eritematosos Sistémico (LES), teniendo especial interés en aquellos que incluyen pacientes con complicaciones obstétricas.

Se incluyeron bases de datos que provienen de RNA-seq y microarreglos que incluían información clínica sobre las diferentes complicaciones obstétricas. Se excluyeron estudios sin información clínica suficiente, estudios sin grupos comparativos y bases de datos no humanos.

Para las bases transcriptómicas se empleó la siguiente estrategia de búsqueda basada en las palabras clave:

- "Systemic Lupus Erythematosus"
- "SLE"
- "Pregnancy"
- "*Homo sapiens sapiens*"
- "Expression profiling by high throughput sequencing"
- "Expression profiling by array"

6.2.3 Procesamiento de datos transcriptómicos

Las bases de datos seleccionadas se organizaron según la tecnología de origen. Para los estudios de RNA-seq se descargaron los archivos de secuenciación en formato FASTQ, las lecturas fueron sometidas a control de calidad mediante la herramienta *Trimmomatic* donde se eliminaron secuencias de baja calidad (lecturas que presenten un promedio de calidad de base > Q20). Posteriormente mediante la herramienta *HISAT2* se llevó a cabo su alineamiento con el genoma humano de referencia hg38, finalmente empleando *featureCounts* se generó una matriz de conteo por gen y por muestra. Cada paso del procesamiento se realizó en la plataforma gratuita de libre acceso Galaxy (<https://galaxy-main.usegalaxy.org>).

En el caso de estudios realizados con microarreglos, se descargaron los datos previamente normalizados por los autores del estudio, se procesaron en RStudio empleando diferentes

paqueterías (“*lumi*”, “*lima*”, “*biomaRT*”). Se empleó un filtro de señales de fluorescencia ($p < 0.05$) para cada uno de los genes y se llevó a cabo su anotación en formato Symbol empleando la paquetería “*AnnotationDbi*” e “*illuminaHumanv4.db*”

6.2.4 Identificación de genes expresados diferencialmente

La identificación de los genes expresados diferencialmente se realizó en RStudio empleando paqueterías bioinformáticas adecuadas según la plataforma. Para los datos derivados de RNA-seq se utilizaron métodos con base en conteos con paqueterías correspondientes como “*DESeq2*”, mientras que para microarreglos se empleó “*limma*”.

Se definieron los contrastes entre los grupos de interés según la finalidad del estudio

- LES vs HC
- LES con complicaciones vs LES sin complicaciones

Para todos los análisis los parámetros de significancia fueron Fold change > 0.5 y p ajustada < 0.05 con corrección por comparaciones múltiples mediante ajuste FDR de Benjamini-Hochberg. La tasa de falsos descubrimientos (FDR) permite limitar la proporción esperada de falsos positivos entre los resultados considerados significativos. Los genes que cumplieron los criterios fueron considerados como genes expresados diferencialmente (DEGs) y se emplearon para generar la lista de posibles biomarcadores. Los resultados se representan mediante gráficos de volcán (paquetería “*EnhancedVolcano*”) y mapas de calor (“*heatmap*”).

6.2.5 Enriquecimiento de vías KEGG, GO y GSVA

A partir de la lista de genes expresados diferencialmente se dividieron en genes regulados al alza ($FC > 0$) y a la baja ($FC < 0$), y se sometieron a un análisis de enriquecimiento funcional para identificar vías de señalización alteradas utilizando bases de datos de Ontología Génica (GO) y firmas moleculares humanas (MSigDB), además de repositorios como la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG).

El análisis de ontología génica (GO) permitió clasificar los genes en procesos biológicos, funcionales y componentes celulares. La enciclopedia (KEGG) se utilizó para identificar rutas metabólicas y de señalización. Para estos análisis se emplearon herramientas bioinformáticas en R (paqueterías “*clusterProfiler*”). Las firmas moleculares (MSigDB)

alteradas se identificaron mediante un Análisis de Varianza de Conjuntos de Genes (GSVA) utilizando el conjunto de genes “*hallmark*” (H).

6.2.6 Curvas ROC

Para evaluar la capacidad de discriminación de los genes candidatos se utilizaron curvas ROC individuales y una curva ROC combinada. Para las curvas individuales, cada gen se analizó de forma independiente, utilizando su nivel de expresión como predictor continuo y la presencia de complicaciones obstétricas como desenlace binario. Se calculó el AUC y su intervalo de confianza al 95% mediante la paquetería “*pROC*” en R. Posteriormente, los genes fueron ordenados de acuerdo con su AUC para identificar aquellos con mayor desempeño individual. Para evaluar el desempeño conjunto, se construyó un modelo multivariable mediante regresión logística binaria, incluyendo genes seleccionados como predictores. A su vez, se realizó una selección de genes con mejor aplicabilidad en la clínica, es decir, aquellos que pueden medirse en el suero de pacientes a nivel proteína. De manera paralela se evaluó su desempeño conjunto. Las probabilidades del modelo se utilizaron como puntaje combinado para generar una curva ROC. El AUC y su IC 95% se calcularon mediante el método de DeLong.

6.2.7 Población de estudio

Se incluyeron 9 mujeres embarazadas con diagnóstico de LES, se verificó que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión, se obtuvo su consentimiento informado por escrito (Figura 7). Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con número de registro RE18-0008.

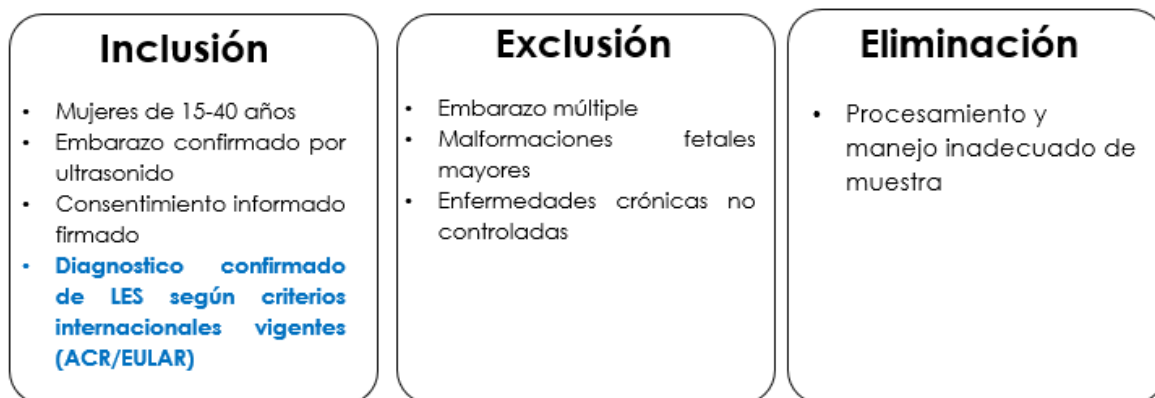


Figura 7. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

6.2.8 Obtención de muestra biológica

Se recolectó sangre total en 2 tubos de tapa roja sin anticoagulante, se permitió la formación del coágulo durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente la muestra se centrifugó a 1,000 x g durante 15 min. El suero se separó y se almacenó en viales para criocongelación a -80 °C hasta su uso.

6.2.9 Cuantificación de citocinas en suero mediante ensayo Luminex

La cuantificación de citocinas en suero se realizó mediante el ensayo Luminex Discovery Assay (R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero se descongelaron de manera gradual. Un día antes del ensayo, las muestras se pasaron de -80°C a -20°C. Dos horas antes de iniciar el ensayo, las muestras se colocaron a 4°C para permitir la descongelación controlada. Debido a la posible pérdida de citocinas el suero no se diluyó. Los reactivos se prepararon y reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agregó 50 µL de cada estándar y muestra en los pocillos correspondientes, posteriormente se agregó 50 µL del cóctel de micropartículas y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital para microplacas a 800 ± 50 rpm. Los lavados se realizaron en una estación de lavado magnética para microplacas con el buffer de lavado proporcionado por el fabricante. Posteriormente se agregaron 50 µL del coctel de anticuerpos biotinilados, las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador orbital para microplacas a 800 ± 50 rpm, de manera similar se realizaron tres lavados. A cada pocillo se agregaron 50 µL del reactivo Estreptavidina-PE previamente reconstituido, la placa se incubó durante 30 min a

temperatura ambiente en un agitador orbital para microplacas a 800 ± 50 rpm para posteriormente realizar tres lavados correspondientes. Finalmente, las micropartículas se resuspendieron en 100 μ L de amortiguador de lavado listas para su lectura en un equipo Luminex™ 200™ (ThermoFisher Scientific)

6.2.10 Cuantificación de TGF- β 1 en suero mediante ELISA

La cuantificación de TGF- β 1 en suero se realizó mediante el kit Quantikine™ ELISA Human/Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- β 1 Immunoassay (R&D Systems/Bio-Techne), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero fueron descongeladas de manera gradual, pasando de -80 °C a -20 °C un día antes del ensayo y posteriormente a 4 °C 2 horas antes del procesamiento. Debido a que TGF- β 1 puede encontrarse en su forma latente, previamente las muestras fueron sometidas a activación ácida con 10 μ L de HCl 1N, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se neutralizaron antes de iniciar el ensayo con 10 μ L de NaOH 1.2 N / HEPES 0.5 M. Se prepararon los estándares, controles y reactivos correspondientes. Se agregaron 50 μ L de estas muestras a una microplaca previamente tratada con anticuerpos de captura. Posteriormente, la placa se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados mediante el amortiguador de lavado. Se agregó 100 μ L del anticuerpo conjugado seguido de una incubación de 2 horas. Posteriormente se agregó 100 μ L de la solución sustrato y se incubó durante 30 minutos. La reacción se detuvo agregando 100 μ L de solución de paro. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas Multiskan™ FC (ThermoFisher Scientific).

6.2.11 Desarrollo del asistente clínico virtual

6.2.11.1 Búsqueda de biomarcadores

Para el desarrollo del modelo digital de estratificación de riesgo obstétrico se realizó una revisión estructurada de literatura científica enfocándose en variables clínicas, serológicas, inflamatorias y obstétricas asociadas a complicaciones obstétricas con enfermedades reumáticas autoinmunes. La búsqueda se diseñó bajo una estrategia tipo PICO, considerando como población de interés a las mujeres embarazadas con enfermedades reumáticas autoinmunes, como factores de riesgo la presencia de biomarcadores clínicos, inmunológicos, serológicos o inflamatorios, en comparación con sin factores de riesgo y como desenlaces, la presencia de complicaciones obstétricas. Se

integraron revisiones sistemáticas, metaanálisis, cohortes prospectivas, estudios observacionales y guías clínicas internacionales. De manera particular se consideraron las recomendaciones del American College of Rheumatology (ACR) así como las recomendaciones de EULAR.

6.2.11.2 Diseño de modelo matemático

El modelo matemático fue diseñado como un sistema de puntuación ponderada. El diseño del modelo se inspiró en principios generales de los modelos de predicción clínica donde se utilizan múltiples predictores o factores de riesgo para estimar la probabilidad individual de presentar un desenlace clínico, en este caso la presencia de complicaciones obstétricas. La asignación de ponderación a cada biomarcador se realizó partiendo de la magnitud de asociación reportada en la literatura consultada y se tomó en cuenta medidas como odds ratio, hazard ratio o riesgo relativo.

El modelo matemático se construyó mediante una función sumatoria ponderada

$$Puntaje\ total = \sum_{k=1}^n (Xi \times Wi)$$

Donde

Xi: Magnitud de cada variable

Wi: Peso asignado a cada variable

Posteriormente el puntaje total se normalizó respecto a una puntuación máxima:

$$Riesgo\ global\ (\%) = \frac{Puntaje\ obtenido}{Puntaje\ maximo\ teorico} \times 100$$

Partiendo del porcentaje global se establecieron categorías de riesgo bajo, moderado o alto. Su principal propósito es facilitar la lectura rápida del perfil de riesgo.

De manera paralela se desarrollaron submodelos para clasificar el porcentaje en distintos fenotipos de riesgo, agrupando variables específicas y calculando su contribución al puntaje total. Los dominios son los siguientes:

- Fenotipo placentario: caracterizado por variables relacionadas con preeclampsia, insuficiencia placentaria, restricción del crecimiento intrauterino, daño endotelial, nefritis, hipertensión, actividad inflamatoria y alteración angiogénica.
- Fenotipo trombótico: asociado principalmente con síndrome antifosfolípido, anticoagulante lúpico, antecedentes de trombosis y pérdida gestacional.
- Fenotipo autoinmune-fetal: definido por la presencia de autoanticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB
- Fenotipo inflamatorio sistémico: relacionado con actividad persistente de la enfermedad, elevación de biomarcadores inflamatorios, SLEDAI elevado, IL-6 aumentada, índice neutrófilo-linfocito elevado, parto pretérmino y exacerbación de la enfermedad.

6.2.11.3 Desarrollo de interfaz

La interfaz digital del modelo se desarrolló utilizando HTML5, CSS3 y JavaScript para capturar la estructura de las variables clínicas, obstétricas, serológicas e inflamatorias asociadas a complicaciones obstétricas. La estructura en HTML permitió organizar los campos del formulario, CSS3 se utilizó para mejorar la vista y legibilidad de la herramienta, y JavaScript ayudó a ejecutar el cálculo del puntaje de riesgo, la normalización porcentual, la clasificación en categorías de riesgo.

6.2.12 Pruebas estadísticas

Se evaluó la normalidad de los datos mediante prueba Shapiro-Wilk. Para comparaciones múltiples, según la normalidad de los grupos se realizaron análisis de ANOVA con prueba post-hoc de Sidak cuando los datos eran paramétricos, o una prueba de Kruskal-Wallis con ajuste de Dunn para datos no paramétricos. Para análisis de dos grupos independientes, según la normalidad se realizaron pruebas T con corrección de Welch cuando los datos eran paramétricos, o U de Mann-Whitney cuando los datos no eran paramétricos.

Capítulo VII

Resultados

7.1 Selección de bases de datos transcriptómicas

Para el análisis de expresión transcriptómica se seleccionaron dos bases de datos en el repositorio público Gene Expression Omnibus (GEO). GSE235508 y GSE108497 donde evalúan perfiles de expresión en sangre periférica total de mujeres embarazadas con enfermedades autoinmunes (Tabla 1).

La base GSE235508 corresponde a un estudio de expresión génica mediante la secuenciación de alto rendimiento del ARN (RNA-seq) empleando la plataforma Illumina HiSeq 4000. En ese proyecto se incluyeron 335 muestras de sangre total obtenidas de 84 participantes con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y controles sanos, a las cuales se les realizó la recolección antes del embarazo, durante el embarazo en cada trimestre y posparto.

La base GSE108497 corresponde a un proyecto de expresión génica de sangre total mediante la tecnología de microarreglos, utilizando la plataforma Illumina HumanHT-12 V4.0. En ese estudio se incluyeron 512 muestras en total, de las cuales 325 corresponden a pacientes con LES y 187 a mujeres sin LES. Las muestras fueron obtenidas en distintos momentos del embarazo (<16 semanas de gestación, 16–23 semanas, 24–31 semanas, 32–40 semanas) y posparto.

Base GEO	Tecnología	Tipo de muestra	Población incluida	Tamaño muestral	Tiempos de medición
GSE235508	RNA-seq	Sangre total	Mujeres con LES, artritis reumatoide y controles sanas	335 muestras de 84 participantes	Antes del embarazo, cada trimestre, 6 semanas, 6 meses y 12 meses posparto
GSE108497	Microarreglos Illumina HumanHT-12 V4.0	Sangre total	LES embarazadas, controles embarazadas, LES no embarazadas y controles no embarazadas	512 muestras; 325 LES y 187 sin LES	No embarazada, <16, 16–23, 24–31, 32–40 semanas y posparto

Tabla 1. Proyectos GEO seleccionados. Se identificaron dos proyectos en el repositorio GEO de datos transcriptómicos de sangre total proveniente de mujeres embarazadas con LES.

Como parte del control de las bases seleccionadas se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para visualizar la distribución global de las muestras e identificar posibles valores atípicos. Para ambas bases (Figura 8 y 9) se mostró una distribución parcialmente superpuesta entre las muestras de pacientes con LES y controles sanos. Aunque no se observa una separación completa, las muestras de LES presentaron una mayor dispersión a lo largo de los dos primeros componentes principales, algunos localizados más alejados.

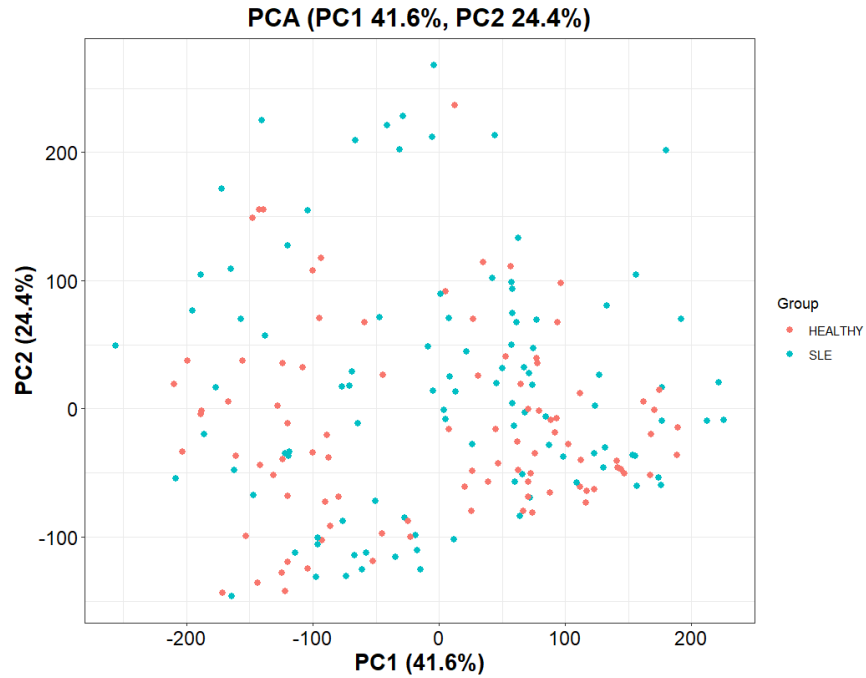


Figura 8. Análisis PCA de GSE235508. El gráfico muestra la distribución global de las muestras de acuerdo con dos componentes principales (PC1, PC2). Cada punto representa una muestra, coloreada según el grupo de estudio: rojo para controles sanos y azul para pacientes con LES

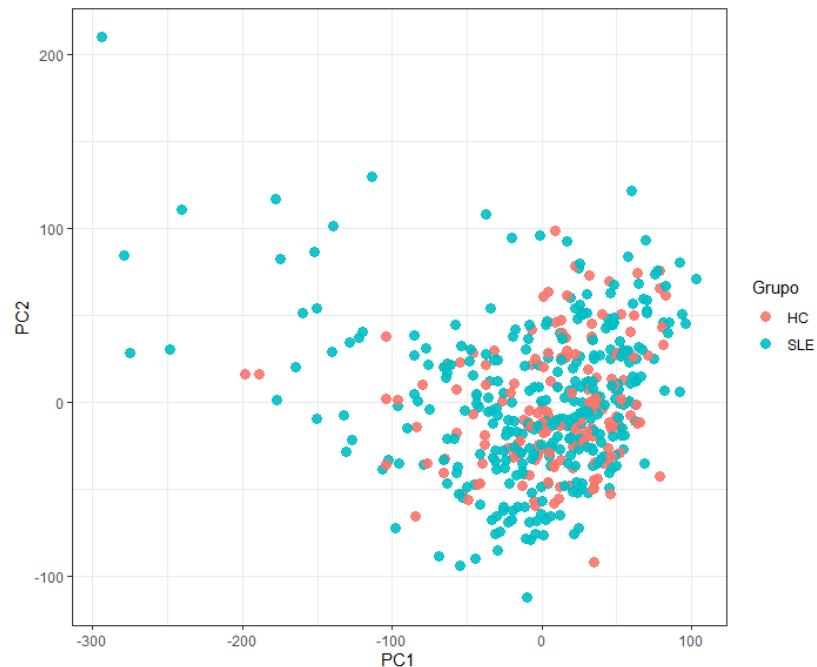


Figura 9. Análisis PCA de GSE108497. El gráfico muestra la distribución global de las muestras de acuerdo con los dos primeros componentes principales. Cada punto representa una muestra individual, coloreada según el grupo de estudio: rojo para controles sanos y azul para pacientes con LES

7.2 Identificación de genes expresados diferencialmente en LES

Para la identificación de genes expresados diferencialmente se analizaron las muestras correspondientes a pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y controles sanos (HC) incluidas en las bases transcriptómicas GSE108497 y GSE235508. En ambos casos, el análisis se realizó empleando la comparación LES vs HC. Los genes con valores positivos de logFC se consideraron como genes expresados al alza en LES, mientras que los genes con valores negativos de logFC se interpretaron como genes regulados a la baja en LES respecto a los controles sanos. Para definir los genes expresados diferencialmente se utilizaron como criterios $\text{adj.P.Val} < 0.05$ y $\text{abs}(\log\text{FC}) \geq 0.5$. El criterio de $\text{adj.P.Val} < 0.05$ indica que la diferencia de expresión presenta significancia estadística después del ajuste por múltiples comparaciones. Por otro lado, $\text{abs}(\log\text{FC}) \geq 0.5$ establece un umbral de magnitud del cambio de expresión en escala log₂.

En la base GSE108497, se identificaron 182 genes expresados diferencialmente entre pacientes con LES y controles sanos. De estos, 167 genes se encontraron al alza en LES y 15 genes se encontraron a la baja (Figura 10). Para la base GSE235508, se identificaron 978 genes expresados diferencialmente entre pacientes con LES y controles sanos. De estos, 300 genes se encontraron al alza y 678 genes se encontraron a la baja en LES (Figura 11).

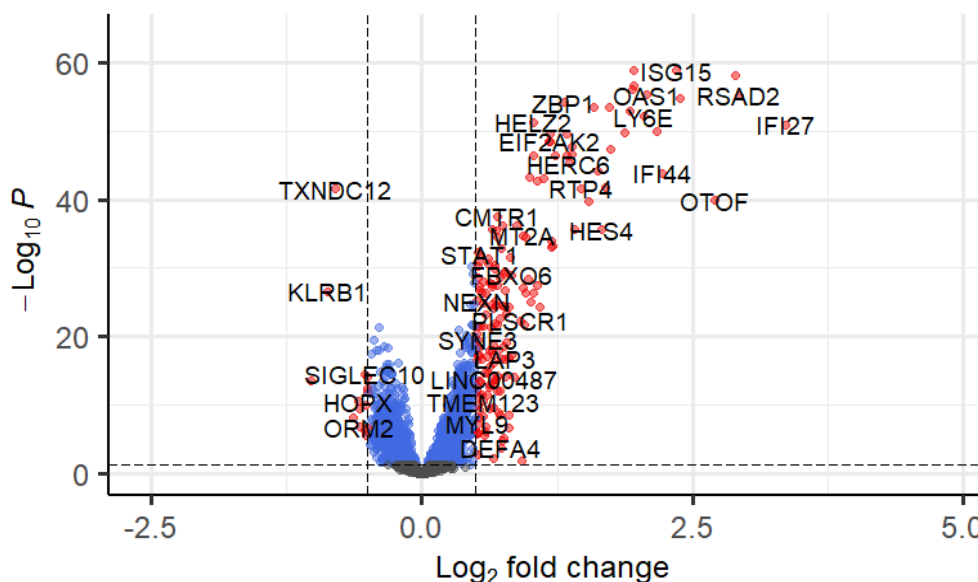


Figura 10. Gráfico de volcán de la base GSE108497. El eje X representa el $\log_2$ fold change y el eje Y representa la significancia estadística expresada como $-\log_{10}$ del valor de p. Los valores de corte son $\text{adj.P.Val} < 0.05$ y $\text{abs}(\log\text{FC}) \geq 0.5$. Los puntos rojos corresponden a genes que cumplen simultáneamente los criterios de significancia y magnitud de cambio; los puntos azules corresponden a genes significativos, pero con menor magnitud de cambio; y los puntos grises representan genes no significativos.

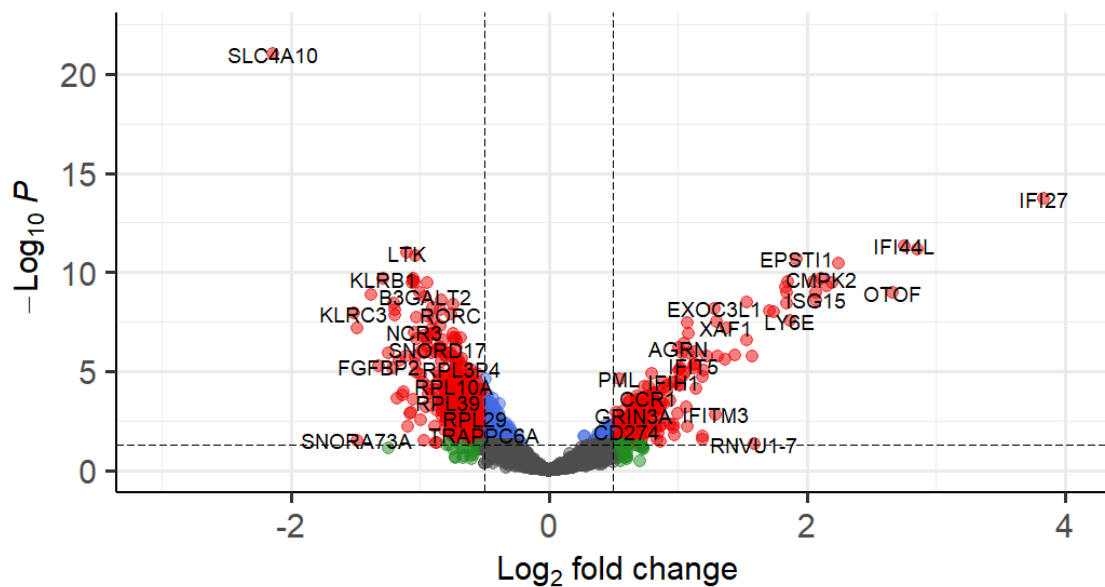


Figura 11 Gráfico de volcán de la base GSE235508. El eje X representa el $\log_2$ fold change y el eje Y representa la significancia estadística expresada como $-\log_{10}$ del valor de p. Los valores de corte son $\text{adj.P.Val} < 0.05$ y $\text{abs}(\log\text{FC}) \geq 0.5$. Los puntos rojos corresponden a genes que cumplen simultáneamente los criterios de significancia y magnitud de cambio; los puntos azules corresponden a genes significativos, pero con menor magnitud de cambio; y los puntos grises representan genes no significativos.

7.3 Genes compartidos

Posterior a la identificación de DEGs en cada base, se realizó una intersección de los genes para identificar los genes regulados al alza y a la baja en LES que fueron compartidos entre GSE108497 y GSE235508 con el objetivo de reconocer una firma transcriptómica común entre ambas cohortes.

7.3.1 Genes regulados al alza

De los genes regulados al alza se identificaron 69 genes exclusivos de GSE108497, mientras que 202 genes fueron exclusivos de GSE235508 y 98 genes fueron compartidos

por ambas bases. Estos 98 genes comunes representan aproximadamente el 27% del conjunto total de genes (Figura 12).

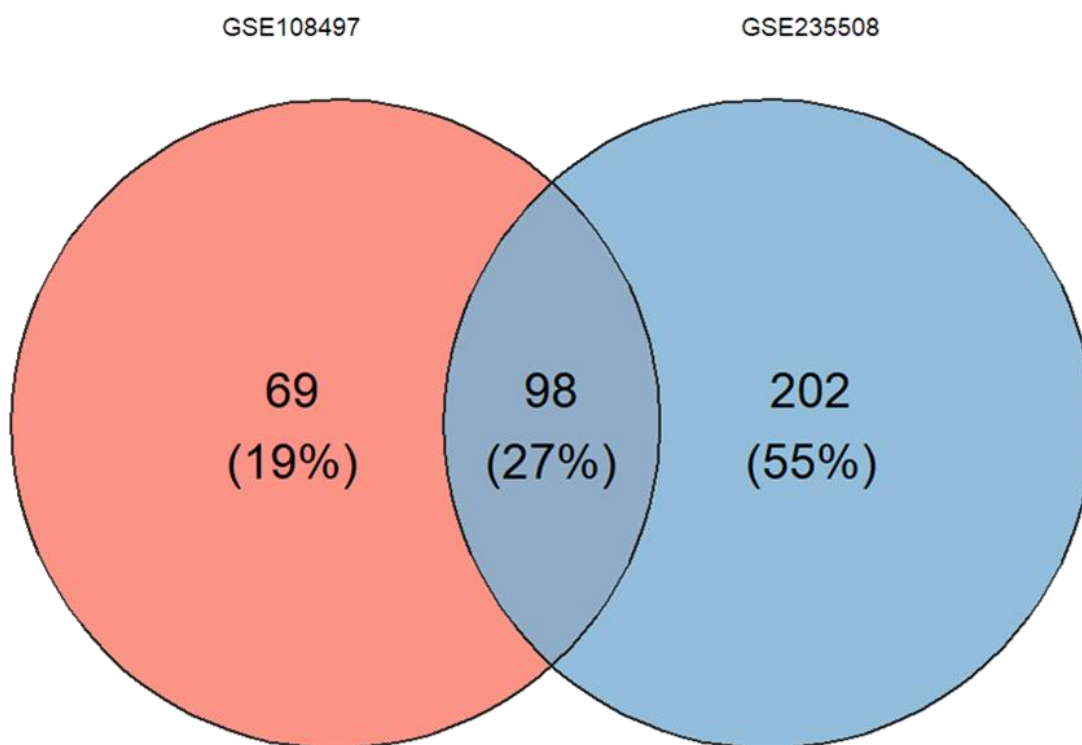


Figura 12.Diagrama de Venn de genes regulados al alza en LES

7.3.2 Enriquecimiento funcional (GO y KEGG) de DEGs regulados al alza

El enriquecimiento GO se evaluó en dos ontologías principales que son Procesos Biológicos (BP) y Funciones Moleculares (MF). Se empleó el método de corrección por comparaciones múltiples Benjamini-Hochberg con parámetros de significancia de $qvalueCutoff < 0.05$.

El análisis GO de Procesos Biológicos (Figura 13) los genes al alza mostraron enriquecimiento de procesos relacionados con respuesta antiviral, defensa frente a virus, regulación de inmunidad innata y respuesta de interferón tipo I.

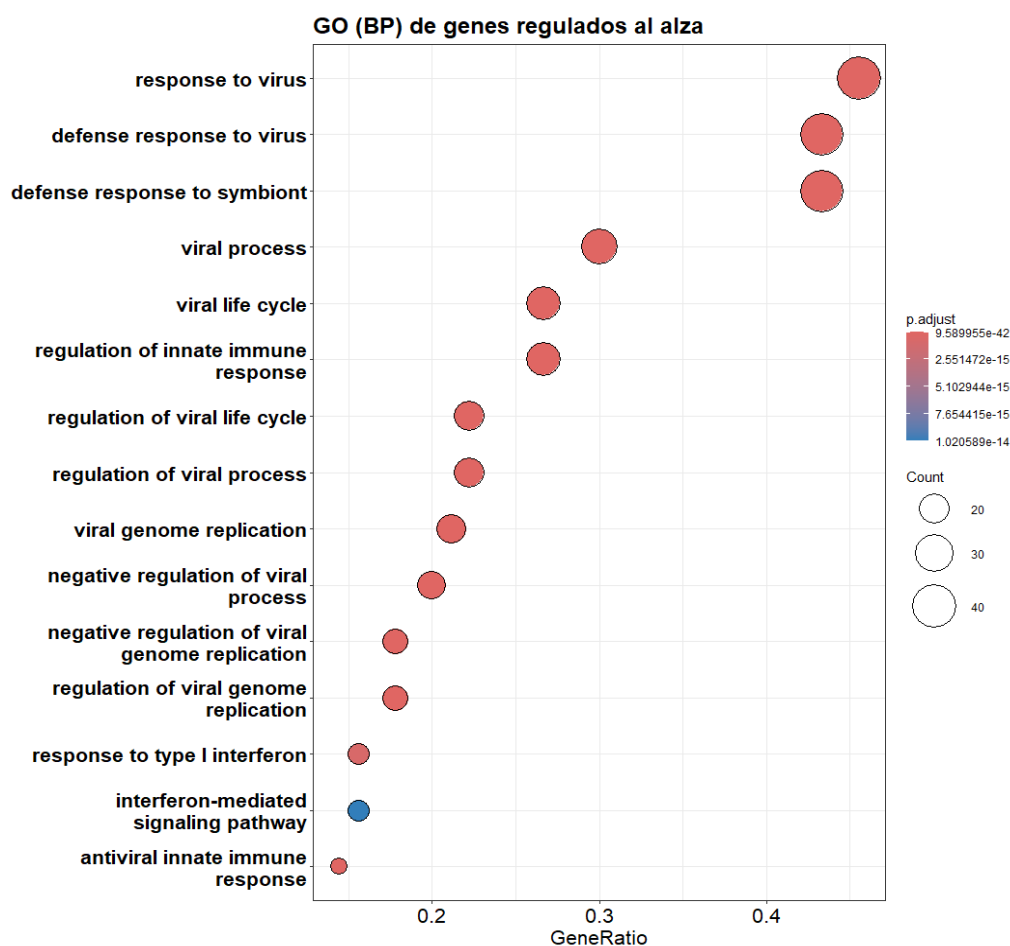


Figura 13. Enriquecimiento funcional GO de Procesos Biológicos de genes regulados al alza. El eje X representa el GeneRatio, la proporción de genes de entrada asociados con cada término funcional, mientras que el eje Y muestra los procesos biológicos enriquecidos. El tamaño de cada punto indica el número de genes incluidos en cada categoría y el color representa el valor de p ajustado

En el análisis GO de Funciones Moleculares (Figura 14) los términos enriquecidos se relacionan con funciones de unión a ARN de una y doble hebra, actividad de helicasa, vías de señalización asociadas al sistema inmune como actividad de quimiocinas y receptores de quimiocinas, receptores de reconocimiento de patrones y unión a las proteínas de la familia STAT.

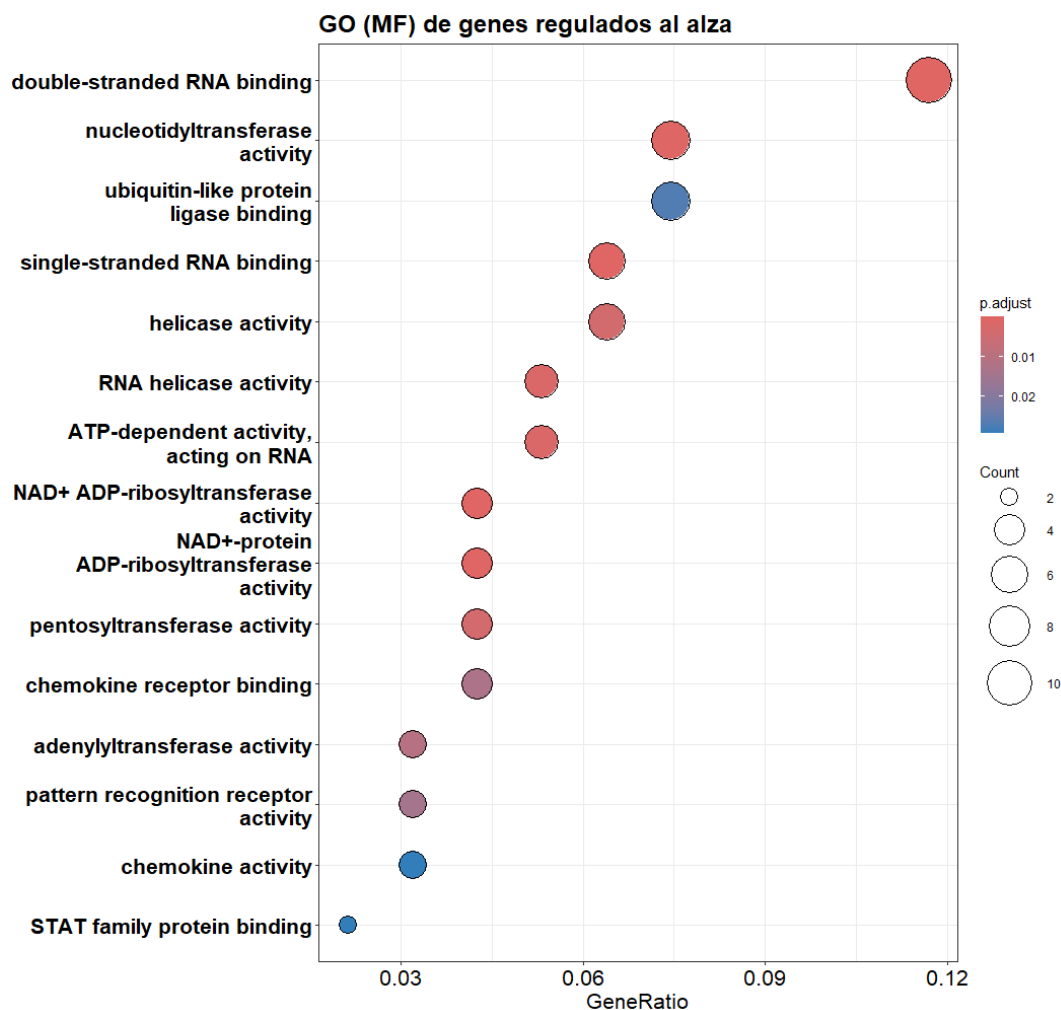


Figura 14. Enriquecimiento funcional GO de Funciones Moleculares de genes regulados al alza en LES. El eje X representa el GeneRatio, la proporción de genes de entrada asociados con cada término funcional, mientras que el eje Y muestra las funciones moleculares enriquecidas. El tamaño de cada punto indica el número de genes incluidos en cada categoría y el color representa el valor de p ajustado

El análisis de KEGG (Figura 15) mostró enriquecimiento de vías asociadas con infecciones virales y señalización del sistema inmune innato. Las rutas más relevantes observadas son Hepatitis C, Influenza A, enfermedad por coronavirus (COVID-19), sarampión, infección por el virus del herpes simple tipo 1, infección por el virus de Epstein-Barr, infección por el virus del papiloma humano, hepatitis B, infección por el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, así como vías inmunológicas como la vía de señalización del receptor tipo RIG-I, la vía de detección de ADN citosólico, la vía de señalización del receptor tipo NOD, la vía de señalización de quimiocinas y la interacción de proteínas virales con citocinas y receptores de citocinas.

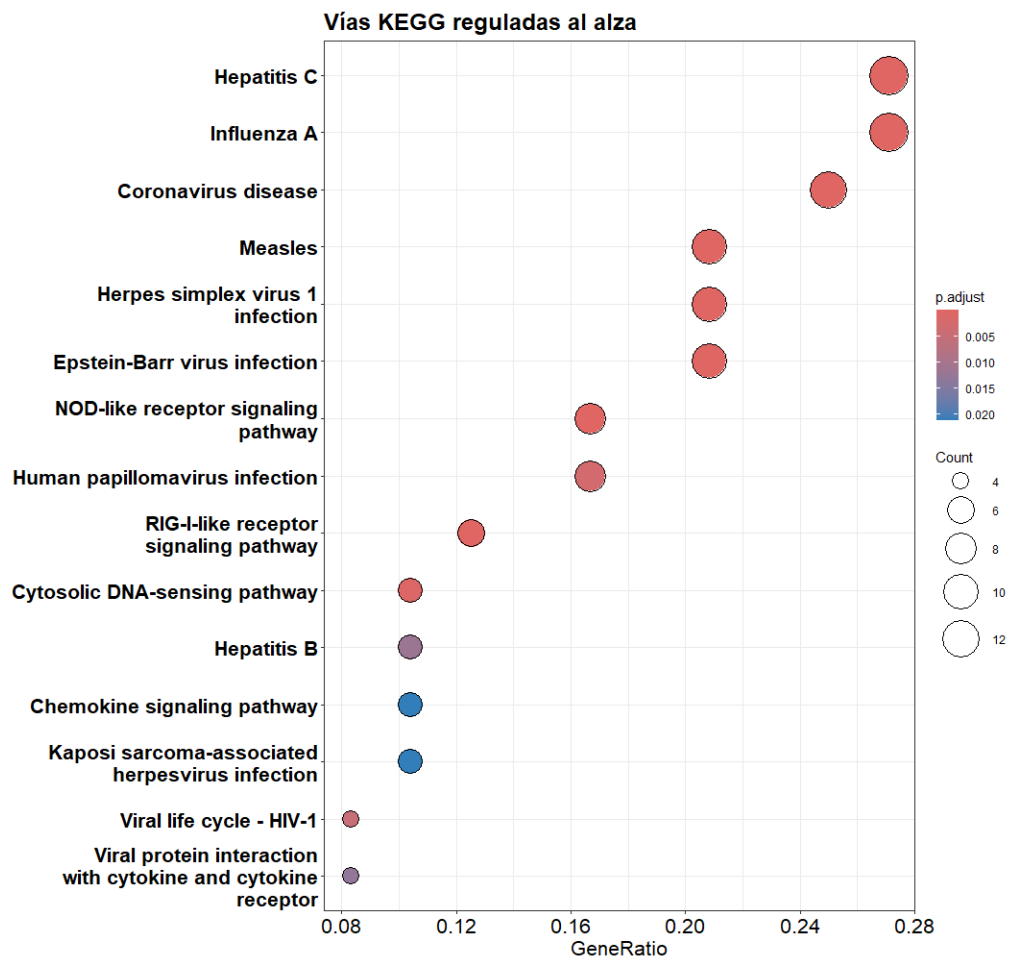


Figura 15. Enriquecimiento funcional KEGG de genes regulados al alza en LES. El eje X representa el GeneRatio, la proporción de genes de entrada asociados con cada vía enriquecida, mientras que el eje Y muestra las vías enriquecidas. El tamaño de cada punto indica el número de genes incluidos en cada categoría y el color representa el valor de p ajustado

En conjunto, el enriquecimiento funcional de los genes regulados al alza compartidos entre ambas bases evidencia una firma transcriptómica dominada por respuesta antiviral, mecanismos de censado de ácidos nucleicos, activación de inmunidad innata, señalización por quimiocinas y respuesta a interferón tipo I.

7.3.3 Genes regulados a la baja

De los genes regulados a la baja se identificaron genes que son exclusivos de GSE108497, 671 genes son exclusivos de GSE235508 y únicamente 7 genes se compartieron entre ambas bases, correspondientes a KLRB1, HOPX, KLRF1, GPR183, TOMM7, EEF1B2 y RPL26. Estos genes compartidos regulados a la baja incluyen marcadores asociados con células NK, linfocitos T, migración de células inmunes, función mitocondrial y maquinaria traduccional (Tabla 2)

Gen	Proteína	Función biológica resumida
KLRB1 / CD161	Receptor tipo lectina de células NK, subfamilia B, miembro 1	Receptor tipo lectina expresado en células NK y subpoblaciones T, participa en la modulación de la citotoxicidad y activación inmunitaria.
HOPX	Proteína con homeodominio único X	Proteína homeodominio que participa en regulación transcripcional, diferenciación celular y control del crecimiento celular.
KLRF1 / NKp80	Receptor tipo lectina de células NK, subfamilia F, miembro 1	Receptor tipo lectina asociado principalmente a células NK relacionado con reconocimiento celular y actividad efectora.
GPR183 / EBI2	Receptor acoplado a proteína G183	Receptor acoplado a proteína G que regula quimiotaxis de linfocitos, células dendríticas y monocitos/macrófagos mediado por oxisteroles.

TOMM7	Translocasa de la membrana mitocondrial externa 7	Subunidad del complejo TOM de la membrana externa mitocondrial que participa en el transporte de proteínas hacia la mitocondria.
EEF1B2	Factor de elongación de la traducción eucariota 1 beta 2	Factor de elongación de la traducción que actúa como factor de intercambio de nucleótidos de guanina durante la síntesis proteica.
RPL26	Proteína ribosomal L26	Proteína estructural de la subunidad ribosomal

Tabla 2. Genes compartidos en bases GSE108497 y GSE235508 regulados a la baja

7.4 Identificación de genes diferencialmente expresadas en LES con complicaciones obstétricas

Para identificar la firma transcriptómica asociada a complicaciones obstétricas en pacientes con lupus eritematoso sistémico se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando las muestras de la base GSE108497. Las muestras se clasificaron en dos grupos, pacientes con LES y con complicaciones obstétricas y pacientes con LES sin complicaciones obstétricas. Para definir los genes expresados diferencialmente se utilizaron los criterios $\text{adj.P.Val} < 0.05$ y $\text{abs}(\log\text{FC}) \geq 0.5$. El valor adj.P.Val corresponde al valor de p ajustado por múltiples comparaciones, mientras que $\text{abs}(\log\text{FC}) \geq 0.5$ establece el umbral de cambio de expresión en escala $\log_2$. Se identificaron 19 genes expresados diferencialmente entre pacientes con LES con y sin complicaciones obstétricas donde 3 genes se encontraron regulados al alza y 16 genes regulados a la baja en el grupo con complicaciones obstétricas (Figura 16).

7.4.1 Dinámica de genes diferencialmente expresados en LES con complicaciones obstétricas

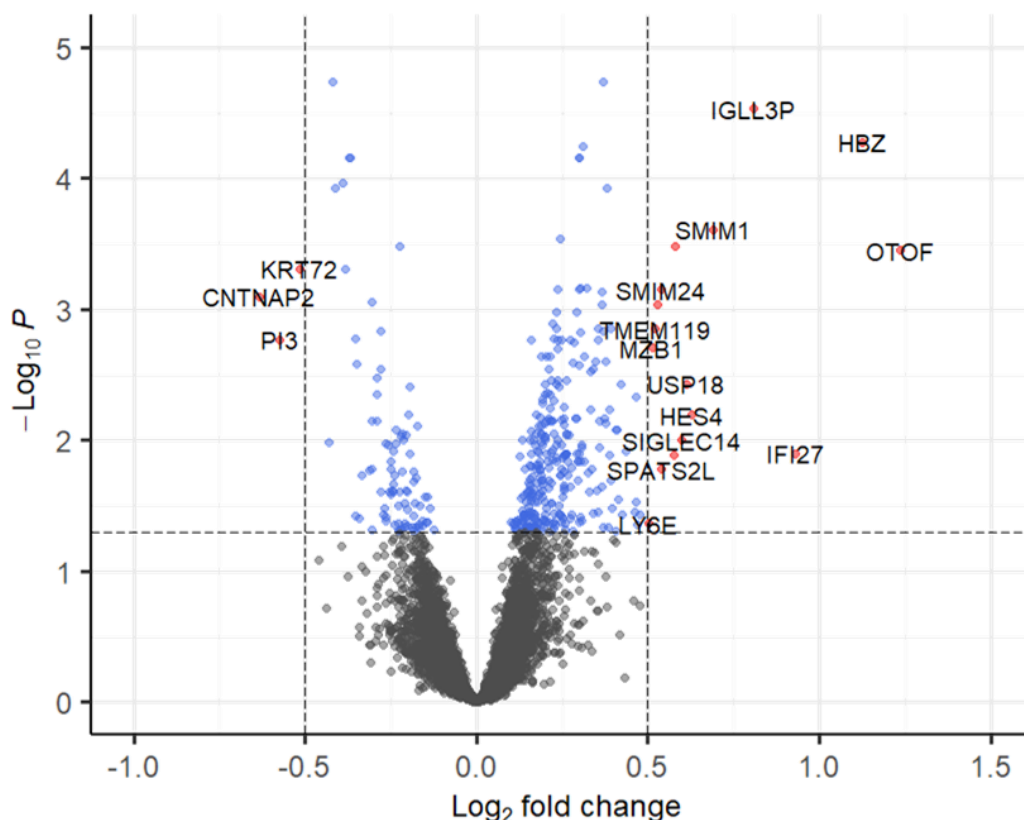


Figura 16. Gráfico de volcán de los genes expresados diferencialmente entre pacientes con LES con y sin complicaciones. El eje X representa el $\log_2$ fold change y el eje Y representa la significancia estadística expresada como $-\log_{10}$ del valor de p. Los valores de corte son $\text{adj.P.Val} < 0.05$ y $\text{abs}(\log\text{FC}) \geq 0.5$. Los puntos rojos corresponden a genes que cumplen simultáneamente los criterios de significancia y magnitud de cambio; los puntos azules corresponden a genes significativos, pero con menor magnitud de cambio; y los puntos grises representan genes no significativos.

Para evaluar la dinámica de expresión de los 19 genes expresados diferencialmente se realizó un mapa de calor usando los niveles de expresión de la base de datos GSE108497 (Figura 17). Se identificaron 16 genes expresados al alza en el grupo LES con complicaciones, principalmente asociadas con respuesta humoral y plasmablastos (JCHAIN, IGLL1, IGLL3P y MZB1), genes vinculados con respuesta de interferón y antiviral (IFI27, USP18, HERC6 y LY6E), respuesta inmune innata o mielóide (SIGLEC14, PI3 y TMEM119) además de genes estructurales, regulatorios o de función

celular general (KRT72, CNTNAP2, HBZ, SMIM1, SMIM24, SPATS2L, HES4 y OTOF). Esto en conjunto puede indicar que las complicaciones obstétricas en LES no se asocian únicamente con cambios inflamatorios inespecíficos, sino con una firma transcriptómica que integra activación de inmunidad humoral, respuesta interferón y cambios en genes relacionados con regulación celular y componentes tisulares.

7.5 Curvas ROC de genes asociados a complicaciones obstétricas

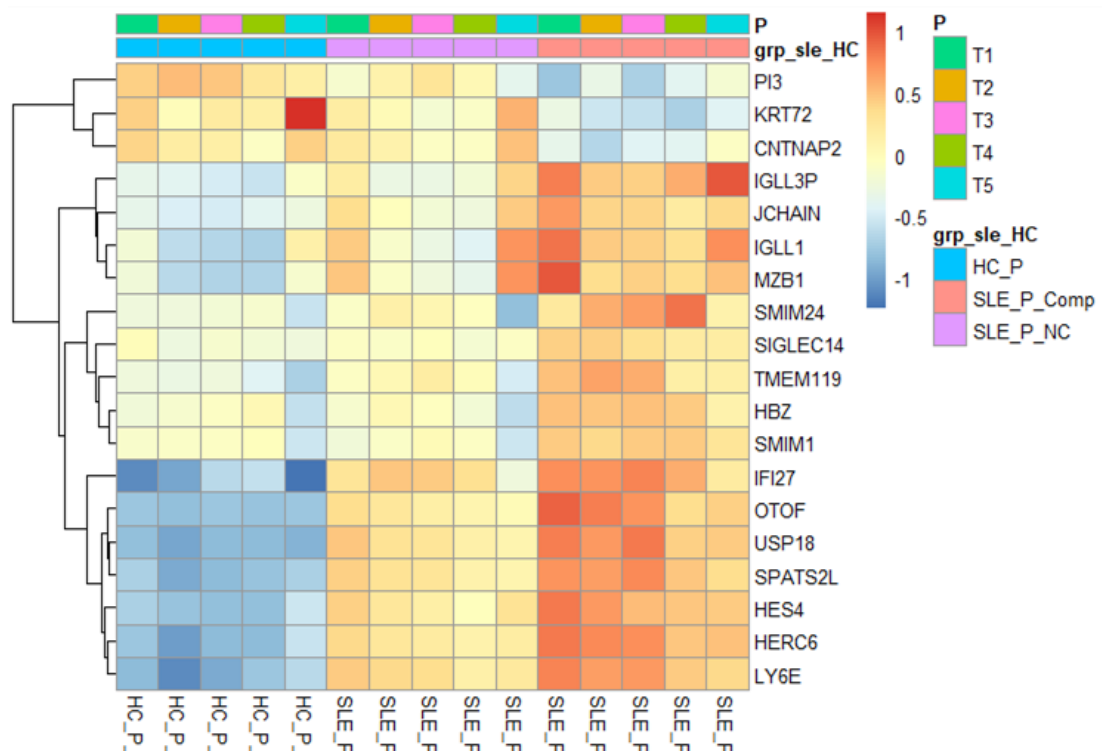


Figura 17. Mapa de calor de genes expresados diferencialmente entre pacientes con LES con y sin complicaciones obstétricas. Las columnas representan muestras individuales agrupadas según condición clínica: controles sanos embarazadas (HC_P), pacientes con LES sin complicaciones obstétricas (SLE_P_NC) y pacientes con LES con complicaciones obstétricas (SLE_P_Comp). La barra superior indica el tiempo de muestreo durante el embarazo (T1–T5) y la segunda barra clasifica el grupo clínico correspondiente.

A partir de los DEGs identificados en pacientes con LES con complicaciones obstétricas se seleccionó un conjunto de 6 genes que pueden ser medidos a nivel proteico en suero mediante ELISA, con la finalidad de determinarlos como biomarcadores candidatos (Tabla 3). Esta selección tiene como objetivo identificar los biomarcadores y evaluar su capacidad discriminativa mediante curvas ROC.

Gen	Proteína codificada	Función biológica resumida
IFI27	Proteína inducible por interferón alfa 27	Proteína inducida por interferón tipo I que participa en respuestas antivirales, señalización inflamatoria y procesos asociados a apoptosis celular.
SIGLEC14	Lectina tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico 14	Receptor de superficie asociado a células mieloides que reconoce glicanos y participa en adhesión celular y activación inmune innata.
USP18	Hidrolasa carboxilo-terminal de ubiquitina tipo 18	Proteasa específica de ISG15 que regula la deubiquitinación de proteínas y actúa como modulador negativo de la señalización por interferón tipo I.
JCHAIN	Cadena J de inmunoglobulina	Proteína necesaria para la formación de inmunoglobulinas poliméricas, principalmente IgA e IgM.
CNTNAP2	Proteína tipo 2 asociada a contactina	Proteína de adhesión celular de la familia de las neurexinas, participa en organización celular, interacción membranal y comunicación intercelular.
PI3	Inhibidor de peptidasas 3 o elafina	Inhibidor de proteasas, especialmente elastasa, participa en defensa antimicrobiana, protección epitelial y control de daño tisular mediado por proteasas.

Tabla 3. Genes candidatos como biomarcadores para predicción de riesgo obstétrico.

7.5.1 Curva ROC de genes individuales

Se construyeron curvas ROC individuales (Figura 18) para evaluar la capacidad discriminativa de los genes FI27, CNTNAP2, PI3, USP18, JCHAIN y SIGLEC14. En el análisis el área bajo la curva (AUC) resume el desempeño global del biomarcador donde valores cercanos a 0.5 indican capacidad discriminativa similar al azar, mientras que valores más cercanos a 1.0 indican mejor capacidad de clasificación. Entre los genes evaluados FI27 presentó el mejor desempeño individual, con un AUC de 0.663 (IC95% 0.6006 - 0.7256), CNTNAP2 mostró un AUC de 0.6414 (IC95% 0.5776 - 0.7052), PI3 presentó un AUC de 0.6367 (IC95% 0.5745 - 0.6989), USP18 obtuvo un AUC de 0.6360 (IC95% 0.5720 - 0.7000), JCHAIN mostró un AUC de 0.6243 (IC95% 0.5628 - 0.6859) y SIGLEC14 un AUC de 0.6199 (IC95% 0.5590 - 0.6808).

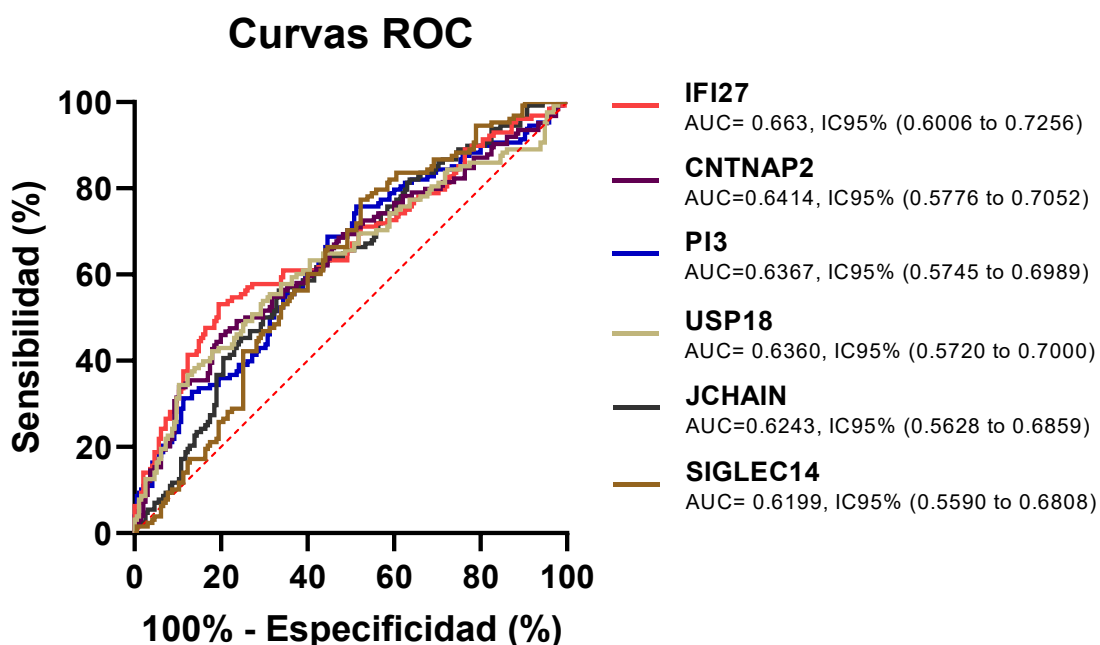


Figura 18. Curvas ROC individuales de genes candidatos. El eje Y representa la sensibilidad (%), mientras que el eje X representa 100% – especificidad (%). La línea diagonal punteada indica el desempeño esperado por azar

7.5.2 Curva ROC de modelo combinado

Dado que los valores individuales de las curvas ROC presentan poder predictivo limitado, se construyó una curva ROC combinada con el objetivo de evaluar el desempeño conjunto

de los genes seleccionados. Para este análisis se empleó un modelo de regresión logística binaria, en el cual los genes candidatos se emplean como variables predictoras y el desenlace obstétrico como la variable dependiente.

La curva ROC combinada mostró un AUC de 0.7460, con un intervalo de confianza del 95% de 0.6915 a 0.8006 (Figura 19) sugiriendo un desempeño moderado.

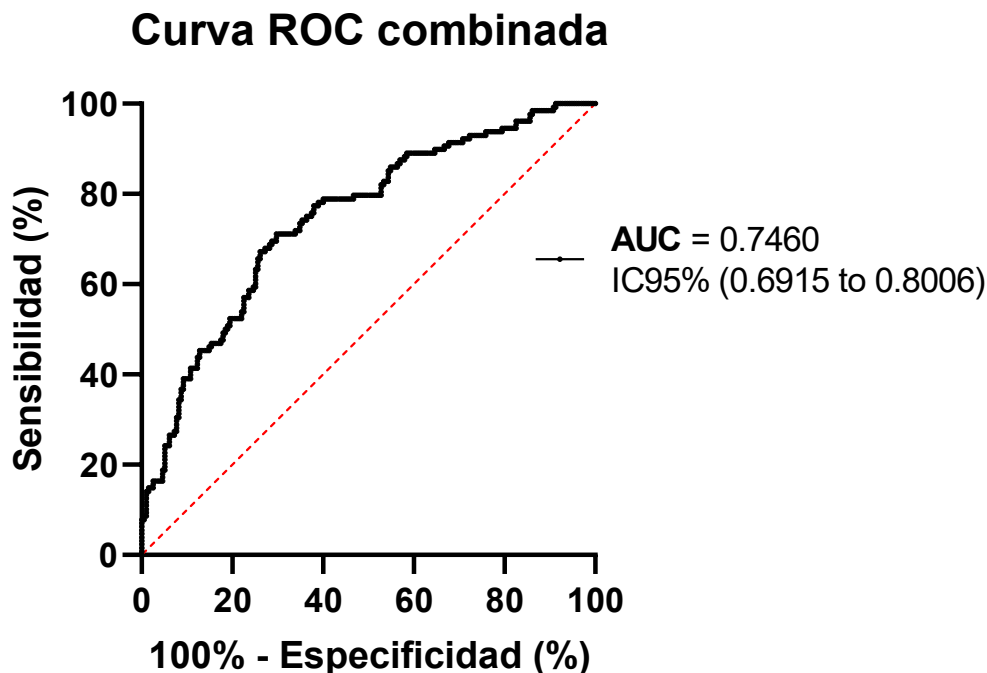


Figura 19. Curva ROC combinada de los genes candidatos. El eje Y representa la sensibilidad (%), mientras que el eje X representa 100% – especificidad (%). La línea diagonal punteada indica el desempeño esperado por azar

7.6 Dinámica de vías de señalización inmunológicas durante el embarazo

Para evaluar la dinámica funcional de vías inmunológicas durante el embarazo se realizó un Análisis de Variación de Conjuntos de Genes (GSVA) en la matriz de expresión, este tipo de análisis permite convertir una matriz de genes por muestra en una matriz representada por vías por muestra, asignando a cada una de las muestras un puntaje de enriquecimiento por cada conjunto génico interés. Para este análisis se seleccionó los conjuntos génicos llamados “Hallmark” de MSigDB, donde se conjuntan las 50 vías más

representativas, a partir de estos se eligió aquellas relacionadas con inflamación, interferón, complemento, señalización de citocinas y metabolismo inmunológico.

El mapa de calor (Figura 20) representa el promedio de los puntajes de GSVA por grupo, donde se observó una expresión mayor de vías inmunológicas en pacientes con LES en comparación con controles sanos. Especialmente vías de respuesta a interferón alfa, interferón gamma, complemento, respuesta inflamatoria, IL-6-JAK-STAT, TNF- α vía NF- κ B, IL2-STAT5 y PI3K-AKT-mTOR se encontraron elevados en pacientes con LES. De manera paralela para las muestras de LES con complicaciones presentaron puntajes elevados en las vías de respuesta a interferón alfa y gamma comparando con aquellas sin complicaciones.

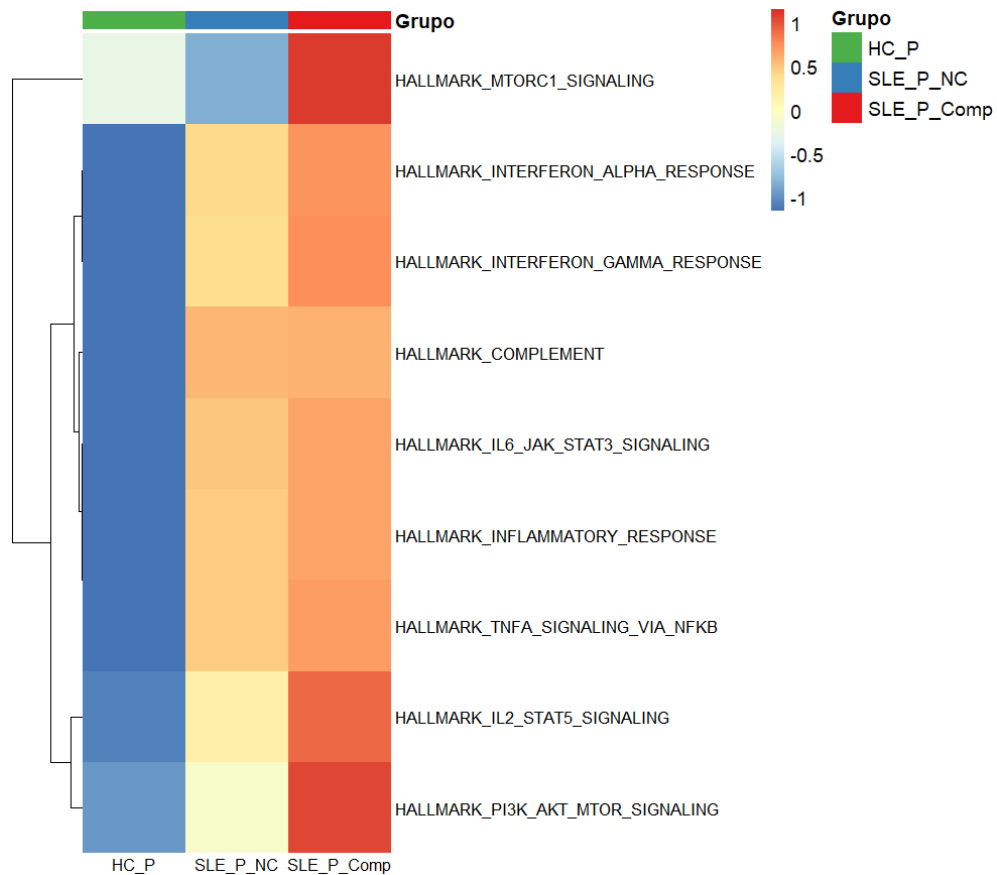


Figura 20. Dinámica de señalización inmunológica durante el embarazo analizada mediante GSVA. El mapa de calor muestra el enriquecimiento relativo de vías Hallmark entre controles sanos embarazadas (HC_P), pacientes con LES embarazadas sin complicaciones obstétricas (SLE_P_NC) y pacientes con LES embarazadas con complicaciones obstétricas (SLE_P_Comp)

7.7 Dinámica de expresión de genes de citocinas durante el embarazo

A partir de las vías de señalización inmunológicas alteradas se procedió a evaluar la dinámica de la expresión de citocinas en los diferentes grupos de controles sanas, pacientes con LES sin complicaciones y pacientes con LES con complicaciones. Se eligieron de especial interés citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IFN- γ , TNF e IL-17A), antiinflamatorias (IL10 y TGF- β 1), quimiocinas (CCL5, CXCL8, CCL2 y CXCL10) y factores de supervivencia y diferenciación (BAFF o TNFSF13B y VEGFA).

El mapa de calor (Figura 21) de puntajes estandarizados (Z-score) demuestra que existe un aumento en la expresión de citocinas IL-10, IL-17A, IL-12p70/IL-23, TNFSF13B (BAFF), CXCL10, CCL2/MCP-1, VEGFA, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, IFN- γ y TNF en pacientes con LES comparado con controles sanos. Por su parte en la comparación de pacientes con complicaciones y sin complicaciones se observa un aumento en la expresión de mediadores inflamatorios como IFN- γ e IL-17A, además de quimiocinas mieloides (CCL2), neutrofílicas (CXCL8) y linfocíticas (CXCL10), por su parte se presentan niveles de expresión elevados de TNFSF13B (BAFF) y TGF- β 1.

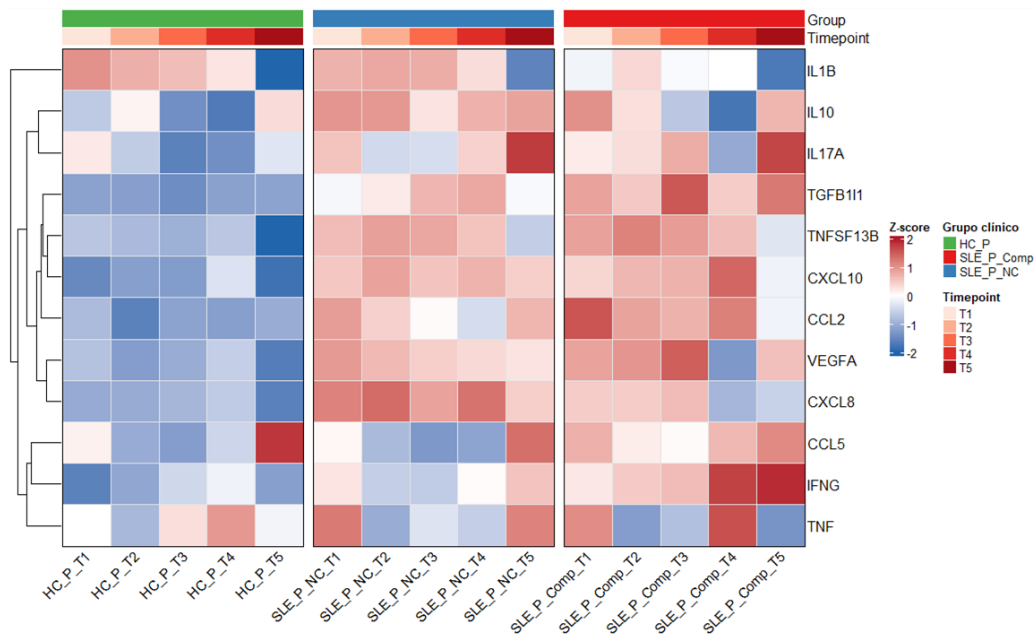


Figura 21. Dinámica longitudinal de citocinas y quimiocinas en controles sanos, LES sin complicaciones y LES con complicaciones obstétricas. El mapa de calor muestra la intensidad relativa de citocinas y quimiocinas de controles sanos embarazadas (HC_P), pacientes con LES embarazadas sin complicaciones obstétricas (SLE_P_NC) y pacientes con LES embarazadas con complicaciones obstétricas (SLE_P_Comp) a lo largo del embarazo.

7.8 Características de los sujetos de investigación

Variable	LES (n=9)	AR (n=5)	SAF (n=3)	Control	Total
Edad (años)	25.71 ±4.3	31.4 ± 1.8	29.6 ± 5.6	21.40±3.4	*p=0.1004
T1	4	5	1	0	10
T2	6	5	2	0	13
T3	5	2	3	5	16

Tabla 4. Características principales de pacientes.

Categoría	Característica clínica	N (9)
COMORBILIDADES		
Inmunológicas	Nefritis lúpica	1 / 9
	Lupus cutáneo	1 / 9
Endocrinas	Hipotiroidismo	2 / 9
	Hipertensión arterial sistémica	1 / 9
Autoinmunes asociadas	Síndrome antifosfolípido (aPL/APS)	2 / 9
	Artritis reumatoide	2 / 9
	Síndrome de Sjögren	1 / 9

Hematológicas	Síndrome de Evans	1 / 9
	Anemia	1 / 9
Autoanticuerpos	ANAs	9 / 9
	Anti-dsDNA	3 / 9
	Anti-Ro (SS-A)	3 / 9
	aPL / anti-PS-PT o β 2GPI	2 / 9
	Anti-CCP	3 / 9
Fármacos utilizados	Hidroxicloroquina (HCQ)	8 / 9
	Prednisona	5 / 9
	Aspirina	3 / 9
	Azatioprina	2 / 9
	Enoxaparina	1 / 9
DESENLACE OBSTÉTRICO		
Tipo de desenlace	Cesárea	4 / 9
	Parto natural	3 / 9
Complicaciones obstétricas	Preeclampsia	2 / 9
	Sin complicaciones	7 / 9

Complicaciones posparto o fetales	Síndrome de dificultad respiratoria (SDR)	2 / 9
	Asfixia perinatal	1 / 9
	Sin complicaciones	6 / 9

Tabla 5. Características clínicas de los sujetos de investigación (LES).

7.9 Dinámica de citocinas en suero durante el embarazo

Las muestras provenientes de pacientes con LES (n=9), AR (n=5) y SAF (n=3) se analizaron para su medición de citocinas séricas mediante ensayo Luminex donde se incluyeron 17 citocinas de interés. El mapa de calor (Figura 22) representa la intensidad relativa de la señal de MFI de cada una de las citocinas entre grupos y tiempos.

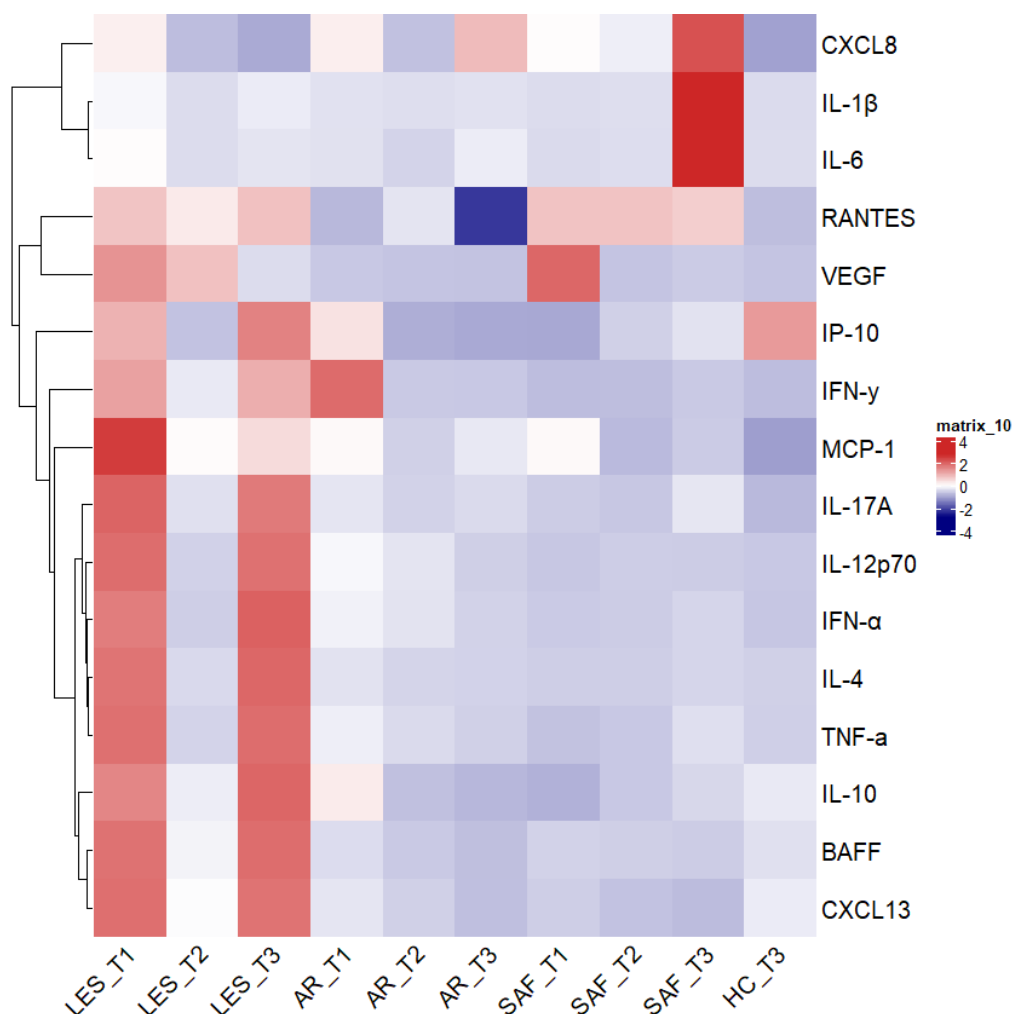


Figura 22. Dinámica longitudinal de citocinas y quimiocinas en controles sanos, LES sin complicaciones y LES con complicaciones obstétricas. El mapa de calor muestra la dinámica relativa de citocinas, quimiocinas y factores solubles en suero durante el embarazo, evaluadas mediante un ensayo multiplex basado en Luminex. La gráfica fue construida a partir de los valores de MFI. La escala de color indica la intensidad relativa de la señal, donde las tonalidades rojas representan mayor MFI y las tonalidades azules menor MFI.

7.9.1 Comparación de niveles de citocinas entre LES, AR y SAF en el trimestre 2

De los valores de citocinas séricas obtenidas en el ensayo se realizó la comparación entre los grupos de LES y AR en el segundo trimestre. Se identificaron diferencias significativas en los niveles séricos de citocinas donde se reporta un incremento de BAFF ($p = 0.0117$), CXCL13 ($p = 0.0378$) y TGF- β 1 ($p = 0.0425$) entre pacientes embarazadas con LES comparado con pacientes embarazadas con AR (Figura 23).

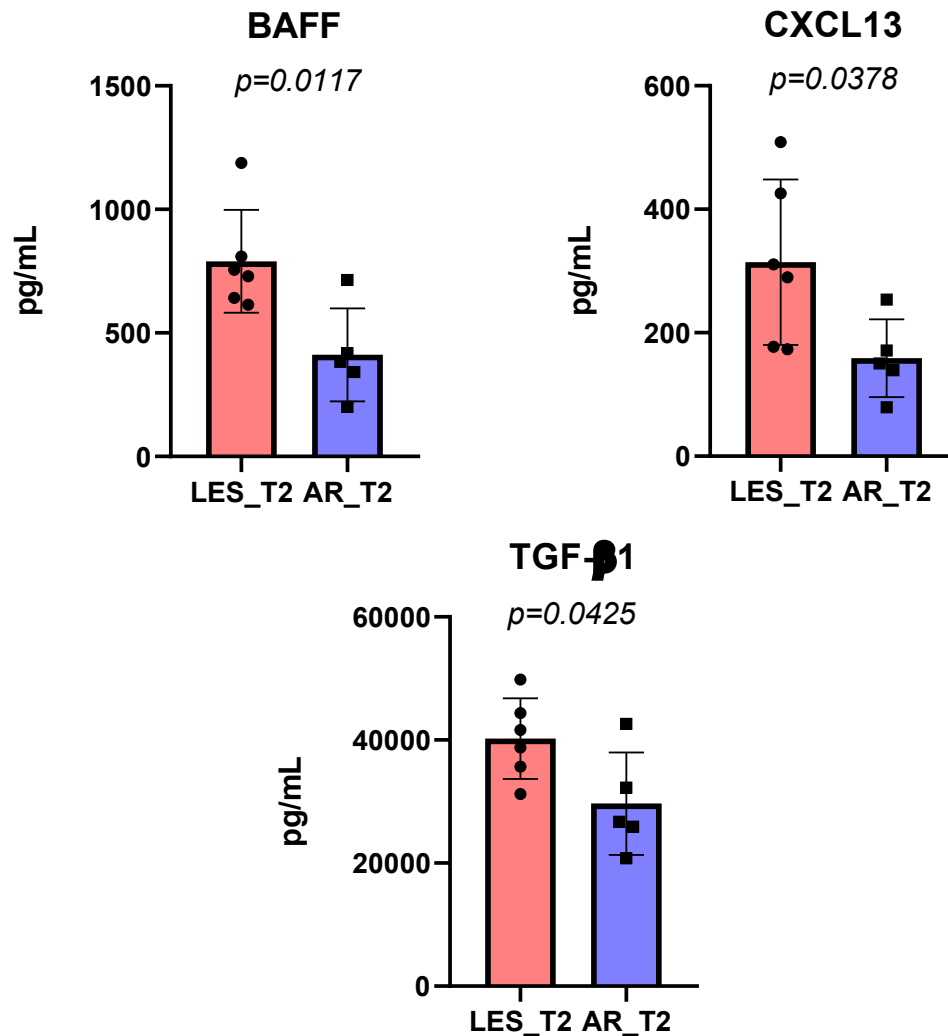


Figura 23. Niveles séricos de BAFF, CXCL13 y TGF-β1 en pacientes LES y AR en el trimestre 2. Las gráficas muestran las concentraciones séricas de BAFF, CXCL13 y TGF-β1 expresadas en pg/mL. Cada punto representa una muestra individual; las barras indican la tendencia central del grupo y las líneas de error representan la dispersión de los datos. Valores de p corresponden a prueba T independiente con corrección de Welch. La normalidad se evaluó mediante Shapiro-Wilk y se eliminaron valores atípicos con método ROUT.

7.9.2 Comparación de niveles de citocinas entre LES, AR y SAF en el tercer trimestre

Partiendo de los niveles de citocinas en suero se realizó la comparación entre los grupos LES y SAF en el tercer trimestre. Se identificaron diferencias con un incremento de niveles de BAFF ($p = 0.0541$), no alcanza significancia, pero se reporta como tendencia,

y CXCL13 ($p = 0.0185$) en pacientes embarazadas con LES comparado con pacientes embarazadas con SAF. (Figura 24)

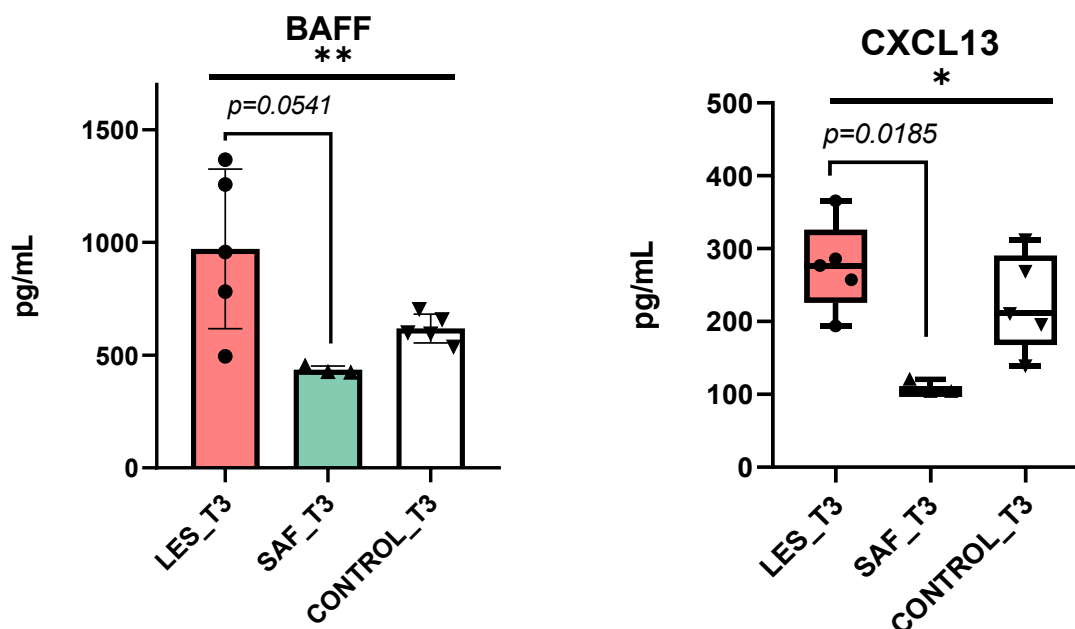


Figura 24. Niveles séricos de BAFF y CXCL13 en pacientes LES y SAF en el trimestre 3. Las gráficas muestran las concentraciones séricas de BAFF y CXCL13 expresadas en pg/mL. Cada punto representa un paciente. Valores de p corresponden a ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis según corresponda. Las comparaciones múltiples se ajustaron con Sidak y Dunn respectivamente. La normalidad se evaluó mediante Shapiro-Wilk

7.9.3 Comparación de niveles de citocinas entre LES y controles sanos en el tercer trimestre

Posteriormente se compararon los niveles séricos de las citocinas en muestras provenientes de pacientes embarazadas con LES y controles sanas en el 3er trimestre. Las citocinas identificadas se pueden categorizar dependiendo su función biológica. En la figura 25 se reportan las citocinas relacionadas con IFN-I e inflamación como IFN- α ($p = 0.0684$) e IL-17A ($p = 0.0143$), citocinas relacionadas con respuesta Th1 como IFN- γ ($p = 0.0239$) e IL-12p70 ($p = 0.0467$), además citocinas involucradas en la activación de células B y respuesta humoral como BAFF ($p = 0.0893$) e IL-4 ($p = 0.0393$). Por otra parte, en la figura 26 se reportan niveles de quimiocinas de monocitos, neutrófilos y linfocitos como MCP-1 ($p = 0.0173$), CXCL8 ($p = 0.0173$) y CCL5 o RANTES ($p = 0.0450$) se encontraron elevados en pacientes embarazadas con LES en comparación con controles sanos.

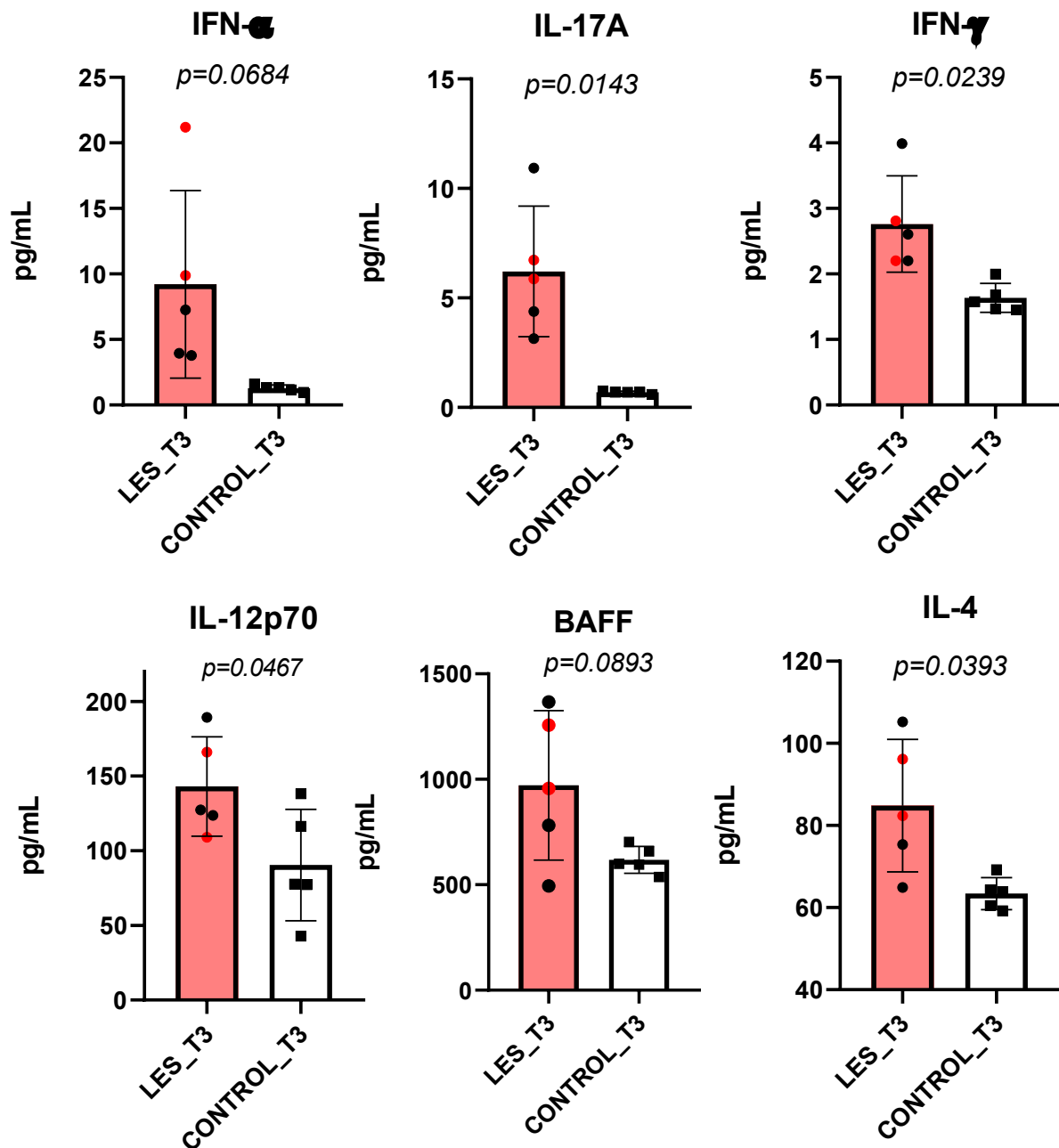


Figura 25. Niveles séricos de citocinas en pacientes con LES y controles sanos en el 3er trimestre. Las gráficas de barra corresponden a las concentraciones de cada analito. Cada punto representa un paciente, los puntos rojos corresponden a pacientes con complicaciones obstétricas, y los puntos negros sin complicaciones. Valores de p corresponden a prueba T independiente con corrección de Welch. La normalidad se evaluó mediante Shapiro-Wilk.

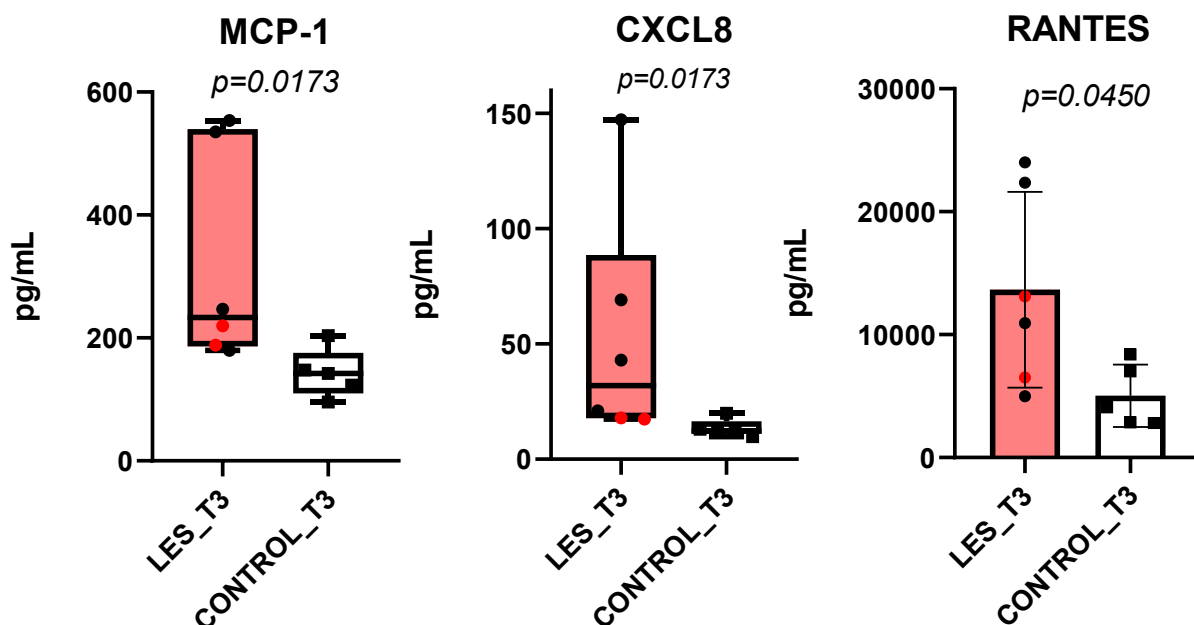


Figura 26. Niveles séricos de quimiocinas en pacientes con LES y controles en el 3er trimestre. Las gráficas de barra corresponden a las concentraciones de cada analito. Cada punto representa un paciente, los puntos rojos corresponden a pacientes con complicaciones obstétricas, y los puntos negros sin complicaciones. Valores de p corresponden a prueba T independiente con corrección de Welch o U de Mann-Whitney según corresponda. La normalidad se evaluó mediante Shapiro-Wilk.

7.10 Desarrollo del asistente clínico virtual

7.10.1 Interfaz de calculadora de riesgo obstétrico

Para el desarrollo traslacional del proyecto se generó un asistente clínico virtual de estratificación de riesgo obstétrico en pacientes con LES. Fue diseñada para integrar variables clínicas, serológicas e inflamatorias. Se definieron tres dominios de la fisiopatología que son inflamación sistémica, autoinmunidad y disfunción placentaria. Se integraron variables tales como antecedentes obstétricos adversos, nefritis o daño renal, anticoagulante lúpico, autoanticuerpos anti-Ro/SSA y anti-dsDNA, niveles de IL-6, índice neutrófilo/linfocito y actividad de enfermedad como SLEDAI (Figura 27).

Herramienta auxiliar para Reumatología · Alto Riesgo Obstétrico

Calculadora de Riesgo Obstétrico en Enfermedades Reumáticas

LES · SAF · AR · Sjögren · Artritis psoriásica · Fibromialgia. Estimación clínica orientativa basada en biomarcadores y antecedentes.

Datos clínicos

Diagnóstico principal Lupus Eritematoso Si

Antecedente de preeclampsia No

Nefritis lúpica o daño renal No

Biomarcadores

Los puntos de corte están basados en metaanálisis y guías clínicas. Los porcentajes por desenlace son estimaciones auxiliares, no un modelo predictivo validado.

LAC (Lupus anticoagulant) Negativo

Anti-dsDNA (UI/mL) 30 Positivo clínicamente si > 30 UI/mL

Anti-Ro/SSA Negativo

IL-6 (pg/mL) 8 Elevado si > 5 pg/mL

NLR (Relación Neutrófilo/Linfocito) 4 Riesgo inflamatorio si > 3.

Actividad de enfermedad (SLEDAI) 7 Riesgo incrementado si SLEDAI > 4

Calcular Riesgo

Figura 27. Diseño de calculadora de riesgo obstétrico. La imagen muestra la interfaz de una herramienta auxiliar para estimar el riesgo obstétrico en pacientes con enfermedades reumáticas. La calculadora integra variables clínicas y biomarcadores seleccionados, como diagnóstico principal, antecedente de preeclampsia, nefritis lúpica o daño renal, anticoagulante lúpico, anti-dsDNA, anti-Ro/SSA, IL-6, relación neutrófilo/linfocito y actividad de enfermedad medida por SLEDAI

7.10.2 Validación de asistente clínico virtual

El modelo fue diseñado como una herramienta basada en puntuación ponderada de variables. En la figura 28 se muestra una estimación del riesgo global moderado donde según la ponderación se estima por porcentaje (33% en este caso). Dependiendo los puntos de corte establecidos se interpreta que valores < 30% se clasifican como riesgo bajo, entre 30-50% como riesgo moderado y >50% como riesgo elevado. En este caso se ubica dentro de la categoría de riesgo obstétrico moderado. El modelo también identifica como riesgo

predominante sugerido el parto prematuro, con estimación del 38% en donde los factores que contribuyeron a este fenotipo fue el diagnóstico de LES, presencia de IL-6 elevado, índice neutrófilo-linfocito > 3 y una actividad de enfermedad o SLEDAI > 4 . Por su parte, también se identificaron posible riesgo de desarrollar preeclampsia o insuficiencia placentaria del 35%, restricción de crecimiento intrauterino del 16% y pérdida gestacional del 12% entre los que predominan. Finalmente, la herramienta genera sugerencias de integración clínica donde se describen

- Confirmar la edad gestacional, actividad de la enfermedad y tratamiento compatibles con embarazo
- Considerar seguimiento estrecho de actividad lúpica mediante C3, C4, anti-dsDNA
- Examen general de orina/proteinuria, creatinina y presión arterial
- Interpretar IL-6 y NLR como marcadores inflamatorios inespecíficos que deben correlacionarse con infección, actividad autoinmune y contexto clínico.

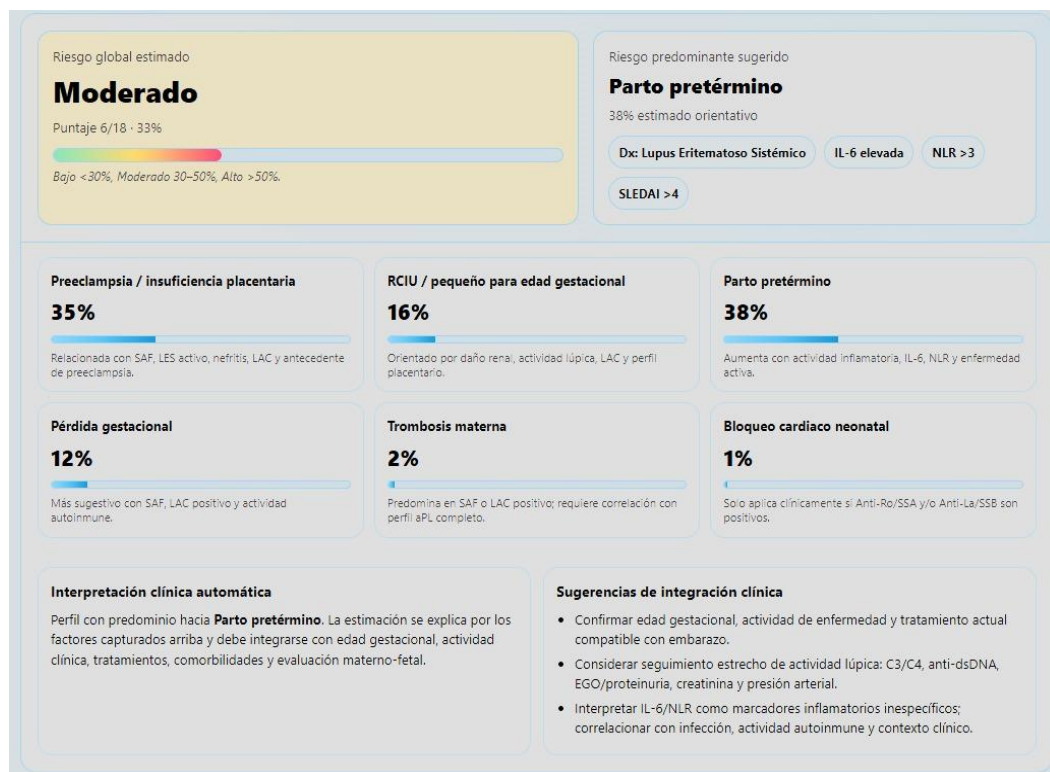


Figura 28. Resultados generados por la calculadora de riesgo obstétrico. La imagen muestra el panel de resultados de una calculadora auxiliar de riesgo obstétrico aplicada a una paciente con enfermedad reumática.

Capítulo XIII

Discusión

El objetivo del presente trabajo fue identificar biomarcadores asociados a riesgo obstétrico en mujeres con LES con la finalidad de desarrollar un asistente clínico virtual para apoyar el manejo de estas pacientes. Para cumplir este objetivo se diseñó una estrategia metodológica en dos niveles complementarios; un abordaje transcriptómico y un abordaje clínico–analítico aplicado. En la primera fase, se realizó la selección sistemática de bases de datos transcriptómicas del repositorio público Gene Expression Omnibus que incluyeran mujeres embarazadas con LES y controles sanos, lo que permitió analizar un total de 867 muestras. A partir del análisis de expresión diferencial y enriquecimiento funcional se identificaron conjuntos de genes regulados al alza y a la baja asociados principalmente a vías de interferón tipo I, respuesta antiviral, activación de células B y alteraciones en células NK, lo que proporcionó un marco inmunológico robusto para la selección de posibles biomarcadores séricos. El aumento de vías de señalización de interferón tipo I, además del incremento de la expresión de genes inducidos por interferón se ha reportado previamente como unas de las principales firmas genéticas en LES (91, 92). El aumento de interferón puede funcionar como un estímulo inicial que permite amplificar la respuesta autoinmune, IFN-I activa células dendríticas y monocitos, incrementa BAFF, favorece la diferenciación de células B hacia plasmablastos y aumenta la expresión de quimiocinas como CXCL10, CCL2 y CXCL8 (89), configurando un entorno proinflamatorio que podría contribuir al riesgo obstétrico en estas pacientes. Esta persistencia de mediadores proinflamatorios se debe de interpretar como un elemento patogénico con implicaciones directas en la falla de la tolerancia materno-fetal.

En contraste, la reducción de KLRB1 (CD161) y KLRF1 (NKp80) sugiere una alteración en la señalización y función de células NK. CD161 se expresa en células NK, NKT, MAIT y subpoblaciones T, mientras que NKp80 es un receptor activador asociado a células NK. Estudios previos han demostrado que la frecuencia de células CD161+ y los niveles de expresión de CD161 se encuentran reducidos en subpoblaciones NK y T de pacientes con LES (93), y que estos pacientes presentan disminución numérica y funcional de células NK, con alteraciones en citotoxicidad, diferenciación y respuesta a estímulos inmunológicos (94, 95). Por otra parte, GPR183 regula la migración y localización de

linfocitos B, T y células mieloides mediante gradientes de oxiesteroides, y su disminución se ha reportado en subpoblaciones T y B de pacientes con LES, asociándose con mayor actividad de la enfermedad (96). En conjunto, estas alteraciones de la firma de interferón y regulación de moléculas como CD161, NKp80 y GPR183 sugieren un tráfico inmunológico y posicionamiento de células linfoides disfuncional, lo cual podría vincularse con un microambiente placentario menos tolerogénico y aumento del riesgo de complicaciones obstétricas.

En análisis de expresión diferencial de pacientes con LES con complicaciones y sin complicaciones obstétricas identificó una firma diferencial de 19 genes, de los cuales 16 genes se encontraban expresados al alza y 3 genes expresados a la baja. Los genes con expresión diferencial se pueden agrupar según su función biológica. El primer grupo funcional corresponde a genes inducidos por interferón o asociados con respuesta antiviral (IFI27, SPATS2L, USP18, HERC6 y LY6E). Estos genes corresponden con la firma de interferón reportada ampliamente en LES (97-100), sin embargo, no existen estudios que presenten una asociación directa con complicaciones obstétricas. El segundo grupo funcional corresponde a genes asociados con respuesta humoral, células B y diferenciación hacia plasmablastos, donde destacan JCHAIN, IGLL1, IGLL3P y MZB1. Estudios previos han descrito aumento de la expresión de dichos genes en pacientes con LES (101, 102), lo que sugiere activación de células B, plasmablastos y células plasmáticas, coherente con la producción elevada de autoanticuerpos presente en LES. El tercer grupo incluye genes relacionados con inmunidad innata, células mieloides y respuesta tisular (SIGLEC14, PI3 y TMEM119) lo que puede reflejar un microambiente inflamatorio sistémico que, a nivel placentario, se traduzca en una remodelación vascular subóptima y un estado menos tolerogénico, condiciones vinculadas con complicaciones obstétricas en LES (103, 104).

El cuarto bloque se constituye por proteínas celulares estructurales, eritroides y de diferenciación celular (KRT72, CNTNAP2, HBZ, SMIM1, SMIM24, SPATS2L, HES4 y OTOF). Hasta la fecha no existen artículos que relacionen estos genes con LES o complicaciones obstétricas, pero su conjunto puede sugerir cambios en composición de células sanguíneas, variación eritroide y activación tisular indirecta. La sobreexpresión de

estos genes plantea la posibilidad de cambios en la composición celular circulante y en la dinámica eritroide durante el embarazo en LES, lo cual podría relacionarse con las alteraciones hematológicas descritas en estas pacientes. La presencia de *HBZ* (Hemoglobina zeta), una globina de desarrollo embrionario, en sangre adulta sugiere una respuesta eritropoyética de emergencia ante la anemia severa documentada en nuestra cohorte (Tabla 5). A su vez, *KRT72* (Queratina 72) y *CNTNAP2* (proteína 2 similar a la proteína asociada a la contactina) han sido descritos en procesos de reparación epitelial y migración. Su aparición en nuestra huella transcriptómica sugiere una respuesta compensatoria fallida ante el estrés vascular placentario. En modelos de insuficiencia placentaria, el tejido intenta restaurar su integridad mediante la activación de vías estructurales, pero en un entorno inflamatorio crónico por LES, esta reparación se vuelve disfuncional, contribuyendo a la fragilidad capilar (85). La inflamación mediada por citocinas afecta la homeostasis de los eritrocitos de manera detectable a nivel transcripcional, sugiriendo entonces que el sistema hematopoyético está operando bajo condiciones de urgencia adaptativa, lo cual no se observa en embarazos de controles sanos.

Partiendo de los 19 genes previamente identificados, se seleccionaron aquellos codificantes para una proteína detectable en suero, con la finalidad de proponerlos como biomarcadores de complicaciones obstétricas. Se eligieron PI3, CNTNAP2, JCHAIN, USP18, SIGLEC14 y IFI27 (105–110), a los cuales los análisis de curva ROC presentó niveles bajos en su desempeño individual, al integrarlos mediante regresión logística binaria, la curva ROC combinada alcanzó niveles moderado en su capacidad discriminatoria ($AUC = 0.7460$) coherente con la naturaleza multifactorial del riesgo obstétrico en LES y con la necesidad de paneles con múltiples marcadores más que de indicadores aislados. Estudios previos han reportado biomarcadores para la predicción de riesgo obstétrico en LES (111), sin embargo, los genes presentan limitaciones en su escalamiento a nivel analítico, por lo que nuestra propuesta presenta una ventaja significativa.

La dinámica de citocinas durante el embarazo permitió evaluar los cambios que ocurren en las concentraciones séricas a lo largo del tiempo y entre diferentes condiciones reumáticas. Los resultados muestran que las pacientes embarazadas con LES presentan

niveles séricos elevados de mediadores relacionados con el eje de células B, particularmente BAFF y CXCL13, en comparación con pacientes embarazadas con artritis reumatoide (AR) y síndrome antifosfolípido (SAF). BAFF es una citocina de la familia TNF fundamental para la supervivencia, maduración y diferenciación de linfocitos B. En LES, la sobreexpresión de BAFF puede permitir la persistencia de clones B autorreactivos que normalmente serían eliminados durante los puntos de control de tolerancia. Algunos estudios han reportado que las concentraciones plasmáticas de CXCL13, BAFF e IL-21 fueron significativamente más altas en pacientes con LES que en controles normales, y que el incremento de CXCL13 y BAFF se relacionó con actividad de enfermedad y alteraciones de células B (112). Por su parte, CXCL13 es una quimiocina clave para la migración de linfocitos B hacia zonas foliculares mediante su interacción con CXCR5. Niveles elevados en LES puede reflejar activación de células T foliculares cooperadoras o células B activadas. Artículos previos reportan un aumento significativo de BAFF y CXCL13 en LES, contrastando con AR y SAF (113, 114). La combinación de una firma transcriptómica que indica activación de células B y plasmablastos, junto con niveles séricos elevados de BAFF y CXCL13 en embarazadas con LES, sugiere que el eje B constituye un nodo central en la fisiopatología del riesgo obstétrico, diferenciando de manera clara el perfil inmunológico respecto a otros trastornos reumáticos como AR y SAF.

Esta convergencia entre los niveles transcriptómicos (expresión de JCHAIN y MZB1) y la proteómica sérica resalta la relevancia del eje humoral en el LES en mujeres embarazadas. La huella transcripcional detectada en sangre periférica indica una expansión de células B plasmablasticas con capacidad secretora activa, una característica que precede a los episodios de complicaciones obstétricas. En LES gestacional se observa una polarización hacia linfocitos B efectores (34). BAFF promueve la supervivencia de clones B autorreactivos y favorece la hipermutación somática dentro de centros germinales ectópicos. La elevación de CXCL13 actúa como un quimioatrayente que dirige a las células B hacia nichos donde la producción de autoanticuerpos alcanza concentraciones locales elevadas, suficientes para activar el complemento en la membrana basal placentaria. Por tanto, los resultados sugieren que la hiperactivación del eje B,

mediada por las citocinas BAFF y CXCL13, es el promotor patogénico del daño tisular mediado por inmunocomplejos en el sitio de implantación (114).

En el tercer trimestre se observó un aumento significativo de IFN- α , IL-17A, IFN- γ , IL-12p70, BAFF, IL-4, MCP-1/CCL2, CXCL8/IL-8 y RANTES/CCL5 en pacientes embarazadas con LES en comparación con controles sanos. Este hallazgo sugiere que, hacia etapas tardías, las pacientes con LES presentan una activación inmunológica sistémica intensa comparada con la gestación fisiológica. Por su parte IFN- α mostró una tendencia a aumentar en pacientes con complicaciones obstétricas, lo que puede representar que el eje de interferón tipo I podría estar relacionado con mayor riesgo de disfunción placentaria. Estudios previos han reportado un aumento significativo de IFN- α en pacientes con LES que presentaron restricción de crecimiento fetal (115), por su parte BAFF, IL-17, IFN- γ , IL-4, MCP-1 (CCL2), CXCL8 (IL-8) y RANTES (CCL5) reportan aumento de niveles séricos en mujeres embarazadas con LES en contraste con controles sanos, pero sin relación con el desarrollo de complicaciones obstétricas (116–118) IFN- α denota activación del eje de interferón tipo I impulsado por complejos inmunes, que contienen ácidos nucleicos, y activación de células dendríticas plasmacitoides. Esta señal puede inducir genes estimulados por interferón, aumentar presentación antigénica y favorecer la producción de BAFF. Por otra parte, el aumento conjunto de IL-12p70 e IFN- γ indica activación del eje Th1. IL-12p70, producida por células dendríticas, monocitos y macrófagos activados, promueve la diferenciación Th1 y estimula la producción de IFN- γ . A su vez, IFN- γ activa macrófagos, aumenta moléculas de presentación de antígenos y refuerza la inflamación. La elevación de IL-17A actúa sobre células endoteliales, epiteliales, fibroblastos y células mieloides, induciendo mediadores como CXCL8 y CCL2, favoreciendo un microambiente quimiotáctico y proinflamatorio. El aumento de BAFF e IL-4 sugiere activación del componente humoral. BAFF promueve supervivencia de células B autorreactivas, mientras que IL-4 favorece diferenciación, cambio de isotipo y activación de células B. Finalmente, el aumento de MCP-1, CXCL8 y RANTES indica que se favorece el reclutamiento de células inmunes hacia los tejidos, contribuyendo a la inflamación sistémica.

Capítulo IX

Conclusión

La integración de biomarcadores moleculares e inmunológicos con variables clínicas permite predecir el riesgo de complicaciones obstétricas en mujeres con LES.

Capítulo X

Perspectivas

- Ampliar tamaño muestral de la cohorte clínica, incorporando un mayor número de pacientes embarazadas con lupus eritematoso sistémico, además controles sanos y grupos comparativos con otras enfermedades autoinmunes. De esta forma se podrá incrementar la potencia estadística del estudio, reducir la variabilidad asociada a muestras pequeñas y realizar análisis estratificados según el tipo de complicación obstétrica, trimestre del embarazo, actividad de la enfermedad, perfil de autoanticuerpos y tratamiento recibido
- Validar biomarcadores identificados de manera *in silico*, Los genes IFI27, USP18, JCHAIN, SIGLEC14 y PI3, requieren ser confirmados a nivel proteico para permitir establecer si los cambios observados en bases de datos públicas se reflejan también en muestras biológicas.
- Integrar y validar biomarcadores en la calculadora clínica. La herramienta virtual desarrollada es una aproximación inicial que combina variables clínicas, serológicas e inflamatorias en una estimación del riesgo. Sin embargo, es necesario incorporar los biomarcadores validados al modelo predictivo, ajustar sus ponderaciones y evaluar su desempeño mediante métricas de sensibilidad, especificidad, AUC y capacidad de clasificación de riesgo

Referencias

1. Hoi A, Igel T, Mok CC, Arnaud L. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2024. p. 2326–38. doi:10.1016/S0140-6736(24)00398-2 PubMed PMID: 38642569.
2. Dai X, Fan Y, Zhao X. Systemic lupus erythematosus: updated insights on the pathogenesis, diagnosis, prevention and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2025. doi:10.1038/s41392-025-02168-0 PubMed PMID: 40097390.
3. Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, Van Vollenhoven R, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Jun 16;2. doi:10.1038/nrdp.2016.39 PubMed PMID: 27306639.
4. Cojocaru M, Inimioara ;, Cojocaru M, Silosi I, Doina Vrabie C. Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Medicine EDITORIAL DITORIAL* 330 *Maedica A Journal of Clinical Medicine*. 2011.
5. Tian J, Zhang D, Yao X, Huang Y, Lu Q. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. *Ann Rheum Dis*. 2023 Mar 1;82(3):351–6. doi:10.1136/ard-2022-223035 PubMed PMID: 36241363.
6. Zen M, Salmaso L, Barbiellini Amidei C, Fedeli U, Bellio S, Iaccarino L, et al. Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus over the last decade: Data from a large population-based study. *Eur J Intern Med*. 2023 Jun 1;112:45–51. doi:10.1016/j.ejim.2023.02.004 PubMed PMID: 36774306.
7. López-Villanueva RF, Valencia-Pacheco G, Zapata-Vázquez R, López-Suárez R, Castro-Sansores C. Follow-up of clinical activity and accumulated organic damage in a cohort of patients with Systemic Lupus Erythematosus from the Yucatán peninsula, México (1995-2016). *Reumatol Clin*. 2023 Feb 1;19(2):106–13. doi:10.1016/j.reuma.2021.12.005
8. Elsisí GH, Andrade-Ortega L, Portela M, Ramírez GM. The economic burden of systemic lupus erythematosus in Mexico. *J Med Econ*. 2024;27(sup1):12–22. doi:10.1080/13696998.2024.2322263 PubMed PMID: 38468477.
9. Etchegaray-Morales I, Mendoza-Pinto C, Arellano-Avendaño FJ, Ibañez-Ovando S, Munguía-Realpozo P, Orbe-Sosa JG, et al. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in Latin America. *Reumatología Clínica (English Edition)*. 2024 Dec;20(10):560–6. doi:10.1016/j.reumae.2024.11.003 PubMed PMID: 39523135.
10. Rodríguez-Amado J, Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Esquivel-Valerio AJ, Burgos-Vargas R, Pérez-Barbosa L, et al. Epidemiology of rheumatic diseases. A community-based study in urban and rural populations in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Journal of*

- Rheumatology. 2011 Jan;38(SUPPL. 86):9–14. doi:10.3899/jrheum.100952 PubMed PMID: 21196593.
11. Pisetsky DS, Lipsky PE. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Research; 2020. p. 565–79. doi:10.1038/s41584-020-0480-7 PubMed PMID: 32884126.
 12. TRUEDSSON LENNART, BENGTSSON ANDERS A., STURFELT GUNNAR. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. 2007.
 13. Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunological Reviews*. Blackwell Munksgaard; 1999. p. 257–74. doi:10.1111/j.1600-065X.1999.tb01398.x PubMed PMID: 10319267.
 14. Mustelin T, Lood C, Giltiay N V. Sources of pathogenic nucleic acids in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.01028 PubMed PMID: 31139185.
 15. Fillatreau S, Manfroi B, Dörner T. Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Research; 2021. p. 98–108. doi:10.1038/s41584-020-00544-4 PubMed PMID: 33339987.
 16. Hedrich CM. Epigenetics in SLE. *Current Rheumatology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2017. doi:10.1007/s11926-017-0685-1 PubMed PMID: 28752494.
 17. Hu N, Qiu X, Luo Y, Yuan J, Li Y, Lei W, et al. Abnormal Histone Modification Patterns in Lupus CD4+ T Cells. *The Journal of Rheumatology* [Internet]. 2008. Available from: www.jrheum.org
 18. Leffers HCB, Lange T, Collins C, Ulff-Møller CJ, Jacobsen S. The study of interactions between genome and exposome in the development of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2019. p. 382–92. doi:10.1016/j.autrev.2018.11.005 PubMed PMID: 30772495.
 19. Parks CG, De Roos AJ. Pesticides, chemical and industrial exposures in relation to systemic lupus erythematosus. *Lupus*. SAGE Publications Ltd; 2014. p. 527–36. doi:10.1177/0961203313511680 PubMed PMID: 24763537.
 20. He Y, Sawalha AH. Drug-induced lupus erythematosus: An update on drugs and mechanisms. *Current Opinion in Rheumatology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018. p. 490–7. doi:10.1097/BOR.0000000000000522 PubMed PMID: 29870500.
 21. Speyer CB, Costenbader KH. Cigarette smoking and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Expert Review of Clinical Immunology*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 481–7. doi:10.1080/1744666X.2018.1473035 PubMed PMID: 29724134.

22. Fireman EM, Fireman Klein E. Association between silicosis and autoimmune disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2024. p. 45–50. doi:10.1097/ACI.0000000000000966 PubMed PMID: 38277164.
23. Draborg AH, Duus K, Houen G. Epstein-barr virus and systemic lupus erythematosus. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012. doi:10.1155/2012/370516 PubMed PMID: 22983998.
24. Kim JW, Kim HA, Suh CH, Jung JY. Sex hormones affect the pathogenesis and clinical characteristics of systemic lupus erythematosus. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Aug 11;9. doi:10.3389/fmed.2022.906475
25. Cutolo M, Straub RH. Sex steroids and autoimmune rheumatic diseases: state of the art. *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Research; 2020. p. 628–44. doi:10.1038/s41584-020-0503-4 PubMed PMID: 33009519.
26. Inui A, Ogasawara H, Naito T, Sekigawa I, Takasaki Y, Hayashida Y, et al. Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2007 Oct;26(10):1675–8. doi:10.1007/s10067-007-0568-3 PubMed PMID: 17874259.
27. Panchanathan R, Choubey D. Murine BAFF expression is up-regulated by estrogen and interferons: Implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Mol Immunol*. 2013 Jan;53(1–2):15–23. doi:10.1016/j.molimm.2012.06.013 PubMed PMID: 22784990.
28. Feng F, Nyland J, Banyai M, Tatum A, Silverstone AE, Gavalchin J. The induction of the lupus phenotype by estrogen is via an estrogen receptor- α -dependent pathway. *Clinical Immunology*. 2010 Feb;134(2):226–36. doi:10.1016/j.clim.2009.10.004 PubMed PMID: 19926524.
29. Young NA, Wu LC, Burd CJ, Friedman AK, Kaffenberger BH, Rajaram MVS, et al. Estrogen modulation of endosome-associated toll-like receptor 8: An IFN α -independent mechanism of sex-bias in systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*. 2014 Mar;151(1):66–77. doi:10.1016/j.clim.2014.01.006 PubMed PMID: 24525049.
30. Hughes GC. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. 2012. doi:10.1016/j.autrev.2011.12.003 PubMed PMID: 22193289.
31. Wu D, Ye L, Zhang X, Yin M, Guo Y, Zhou J. Characteristics of steroid hormones in systemic lupus erythematosus revealed by GC/MS-based metabolic profiling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14. doi:10.3389/fendo.2023.1164679

32. Lahita RG. Sex and gender influence on immunity and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023. doi:10.3389/fimmu.2023.1142723 PubMed PMID: 37304263.
33. Wang H, Li T, Chen S, Gu Y, Ye S. Neutrophil extracellular trap mitochondrial DNA and its autoantibody in systemic lupus erythematosus and a proof-of-concept trial of metformin. *Arthritis and Rheumatology*. 2015 Dec 1;67(12):3190–200. doi:10.1002/art.39296 PubMed PMID: 26245802.
34. Weidenbusch M, Kulkarni OP, Anders HJ. The innate immune system in human systemic lupus erythematosus. *Clinical Science*. Portland Press Ltd; 2017. p. 625–34. doi:10.1042/CS20160415 PubMed PMID: 28351959.
35. Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, et al. I κ B kinase- α is critical for interferon- α production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature*. 2006 Apr 13;440(7086):949–53. doi:10.1038/nature04641 PubMed PMID: 16612387.
36. Crow MK, Olferiev M, Kirou KA. Targeting of type I interferon in systemic autoimmune diseases. *Translational Research*. Mosby Inc.; 2015. p. 296–305. doi:10.1016/j.trsl.2014.10.005 PubMed PMID: 25468480.
37. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel A V., Wang X, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2018 Oct 16;49(4):725–739.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.08.015 PubMed PMID: 30314758.
38. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* (1979). 2013 Feb 15;339(6121):786–91. doi:10.1126/science.1232458 PubMed PMID: 23258413.
39. Kato Y, Park JH, Takamatsu H, Konaka H, Aoki W, Aburaya S, et al. Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS–STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(10):1507–15. doi:10.1136/annrheumdis-2018-212988 PubMed PMID: 29945921.
40. Tsokos GC. The immunology of systemic lupus erythematosus. *Nature Immunology*. Nature Research; 2024. p. 1332–43. doi:10.1038/s41590-024-01898-7 PubMed PMID: 39009839.
41. Pickering MC, Botto M. Canonical and noncanonical functions of complement in systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2024. doi:10.1002/eji.202350918 PubMed PMID: 38629181.

42. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: An update. *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group; 2014. p. 1601–6. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205287 PubMed PMID: 24845390.
43. Paredes JL, Fernandez-Ruiz R, Niewold TB. T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2021. p. 379–93. doi:10.1016/j.rdc.2021.04.005 PubMed PMID: 34215369.
44. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. Academic Press; 2015. p. 5–17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011 PubMed PMID: 25458968.
45. Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*. 2013. p. 536–42. doi:10.1038/ni.2617 PubMed PMID: 23685824.
46. Richter P, Macovei LA, Mihai IR, Cardoneanu A, Burlui MA, Rezus E. Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus—Focus on TNF- α and IL-17. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. doi:10.3390/ijms241914413 PubMed PMID: 37833861.
47. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature Immunology*. Nature Publishing Group; 2009. p. 778–85. doi:10.1038/ni.1741 PubMed PMID: 19483719.
48. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced Tregs-role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol*. 2013;4(AUG). doi:10.3389/fimmu.2013.00232
49. Li W, Deng C, Yang H, Wang G. The regulatory T cell in active systemic lupus erythematosus patients: A systemic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2019;10(FEB). doi:10.3389/fimmu.2019.00159 PubMed PMID: 30833946.
50. Morali K, Steuten J, Russo F, Santoni De Sio FR, Menage C, Consoli V, et al. Antigen-specific B cell response regulation by IL-10-producing tolerogenic dendritic cells. *Sci. Adv* [Internet]. 2025. Available from: <https://www.science.org>
51. Wang J, Zhao X, Wan YY. Intricacies of TGF- β signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature; 2023. p. 1002–22. doi:10.1038/s41423-023-01036-7 PubMed PMID: 37217798.
52. Craft JE. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012. p. 337–47. doi:10.1038/nrrheum.2012.58 PubMed PMID: 22549246.

53. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, et al. Cell distance mapping identifies functional T follicular helper cells in inflamed human renal tissue. *Sci Transl Med*. 2014 Apr 2;6(230). doi:10.1126/scitranslmed.3008146 PubMed PMID: 24695686.
54. Comte D, Karampetsou MP, Yoshida N, Kis-Toth K, Kyttaris VC, Tsokos GC. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 Engagement Restores Defective Effector CD8⁺ T Cell Function in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatology*. 2017 May 1;69(5):1035–44. doi:10.1002/art.40038 PubMed PMID: 28076903.
55. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, et al. Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys 1. 2008.
56. Canny SP, Jackson SW. B Cells in Systemic Lupus Erythematosus: From Disease Mechanisms to Targeted Therapies. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2021. p. 395–413. doi:10.1016/j.rdc.2021.04.006 PubMed PMID: 34215370.
57. Atisha-Fregoso Y, Toz B, Diamond B. Meant to B: B cells as a therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2021. doi:10.1172/JCI149095 PubMed PMID: 34128474.
58. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* (1979). 2003 Sep 5;301(5638):1374–7. doi:10.1126/science.1086907 PubMed PMID: 12920303.
59. Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nature Reviews Immunology*. 2012. p. 282–94. doi:10.1038/nri3190 PubMed PMID: 22421786.
60. Green NM, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. *Seminars in Immunology*. 2011. p. 106–12. doi:10.1016/j.smim.2011.01.016 PubMed PMID: 21306913.
61. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RAA, Shlomchik MJ. Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):417–28. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.013 PubMed PMID: 16973389.
62. Malkiel S, Barlev AN, Atisha-Fregoso Y, Suurmond J, Diamond B. Plasma cell differentiation pathways in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.00427

63. Li L, Shen S, Shao S, Dang E, Wang G, Fang H, et al. The role of B cell-activating factor system in autoimmune diseases: mechanisms, disease implications, and therapeutic advances. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2025. doi:10.3389/fimmu.2025.1538555 PubMed PMID: 40547016.
64. Landolt-Marticorena C, Wither R, Reich H, Herzenberg A, Scholey J, Gladman DD, et al. Increased expression of B cell activation factor supports the abnormal expansion of transitional B Cells in systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology*. 2011 Apr;38(4):642–51. doi:10.3899/jrheum.100214 PubMed PMID: 21239754.
65. Martin F, M. Oliver A, F. Kearney J. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. 2001 May.
66. Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C, Defrance T. TLR Agonists Selectively Promote Terminal Plasma Cell Differentiation of B Cell Subsets Specialized in Thymus-Independent Responses 1. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2007. Available from: www.jimmunol.org
67. Nashi E, Wang YH, Diamond B. The role of B cells in lupus pathogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2010. p. 543–50. doi:10.1016/j.biocel.2009.10.011 PubMed PMID: 19850148.
68. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar 27;15(3):160–71. doi:10.1038/nri3795 PubMed PMID: 25698678.
69. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*. 2009. p. 845–57. doi:10.1038/nri2637 PubMed PMID: 19935804.
70. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of Autoantibody Responses via Somatic Hypermutation Outside of Germinal Centers. *Science* (1979). 2002 Sep 20;297(5589):2066–70. doi:10.1126/science.1073924
71. Tipton CM, Fucile CF, Darce J, Chida A, Ichikawa T, Gregoretti I, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 2015 Jul 20;16(7):755–65. doi:10.1038/ni.3175 PubMed PMID: 26006014.
72. Naradikian MS, Hao Y, Cancro MP. Age-associated B cells: Key mediators of both protective and autoreactive humoral responses. *Immunol Rev*. 2016 Jan 1;269(1):118–29. doi:10.1111/imr.12380 PubMed PMID: 26683149.
73. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel A V., Wang X, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to

- Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2018 Oct 16;49(4):725-739.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.08.015 PubMed PMID: 30314758.
74. Mockridge A, Maclellan K. Physiology of pregnancy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. Elsevier Ltd; 2019. p. 397–401. doi:10.1016/j.mpaic.2019.05.001
 75. Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr*. 2016 Mar 1;27(2):89–94. doi:10.5830/CVJA-2016-021 PubMed PMID: 27213856.
 76. Abenius MS, Janefjord C, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L, Duchén K, et al. The placental immune milieu is characterized by a Th2- and anti-inflammatory transcription profile, regardless of maternal allergy, and associates with neonatal immunity. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015 May 1;73(5):445–59. doi:10.1111/aji.12350 PubMed PMID: 25491384.
 77. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 469–82. doi:10.1038/nri.2017.64 PubMed PMID: 28627518.
 78. Gluhovschi C, Gluhovschi G, Petrica L, Velciov S, Gluhovschi A. Pregnancy Associated with Systemic Lupus Erythematosus: Immune Tolerance in Pregnancy and Its Deficiency in Systemic Lupus Erythematosus - An Immunological Dilemma. *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited; 2015. doi:10.1155/2015/241547 PubMed PMID: 26090485.
 79. Ma G, Han J, Gao R, Qin L. Immune-mediated mechanisms and maternal-fetal interface dysfunction in obstetric antiphospholipid syndrome. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2025. doi:10.3389/fimmu.2025.1722080 PubMed PMID: 41383627.
 80. Murvai VR, Galiş R, Panaitescu A, Radu CM, Ghitea TC, Trif P, et al. Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a comprehensive literature review. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2025 Dec 1;25(1). doi:10.1186/s12884-025-07471-w PubMed PMID: 40128683.
 81. Martini C, Saeed Z, Simeone P, Palma S, Ricci M, Arata A, et al. Preeclampsia: Insights into pathophysiological mechanisms and preventive strategies. *American Journal of Preventive Cardiology*. Elsevier B.V.; 2025. doi:10.1016/j.ajpc.2025.101054
 82. Kim MY, Buyon JP, Guerra MM, Rana S, Zhang D, Laskin CA, et al. Angiogenic factor imbalance early in pregnancy predicts adverse outcomes in patients with lupus and antiphospholipid antibodies: Results of the PROMISSE study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Jan 1;214(1):108.e1-108.e14. doi:10.1016/j.ajog.2015.09.066 PubMed PMID: 26432463.

83. Abheiden CNH, Blomjous BS, Slaager C, Landman AJEMC, Ket JCF, Salmon JE, et al. Systemic lupus erythematosus is associated with an increased frequency of spontaneous preterm births: systematic review and meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc.; 2024. p. 408-416.e21. doi:10.1016/j.ajog.2024.03.010 PubMed PMID: 38492714.
84. Poh YJ, Yii IYL, Goh LH, Li HH, Yang L, Tan HK, et al. Maternal and Fetal Outcomes in Systemic Lupus Erythematosus Pregnancies. *Ann Acad Med Singap*. 2020 Dec 1;49(12):963–70. doi:10.47102/annals-acadmedsg.2020373 PubMed PMID: 33463654.
85. Castellanos Gutierrez AS, Figueras F, Morales-Prieto DM, Schleußner E, Espinosa G, Baños N. Placental damage in pregnancies with systemic lupus erythematosus: A narrative review. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022. doi:10.3389/fimmu.2022.941586 PubMed PMID: 36059466.
86. Damiati LA, Denetiu I, Bahlas S, Damiati S, Pushparaj PN. Immunoprofiling of cytokines, chemokines, and growth factors in female patients with systemic lupus erythematosus— a pilot study. *BMC Immunol*. 2023 Dec 1;24(1). doi:10.1186/s12865-023-00551-6 PubMed PMID: 37370001.
87. Duarte-Delgado NP, Segura K, Gómez O, Pulido S, Tovar-Sánchez C, Bello-Gualtero JM, et al. Cytokine profiles and their correlation with clinical and blood parameters in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2024 Dec 1;14(1). doi:10.1038/s41598-024-72564-z PubMed PMID: 39379404.
88. Lindblom J, Beretta L, Borghi MO, Alarcón-Riquelme ME, Parodis I. Serum profiling identifies CCL8, CXCL13, and IL-1RA as markers of active disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1257085 PubMed PMID: 38098483.
89. Doria A, Ghirardello A, Iaccarino L, Zampieri S, Punzi L, Tarricone E, et al. Pregnancy, cytokines, and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2004 Dec 15;51(6):989–95. doi:10.1002/art.20837 PubMed PMID: 15593367.
90. Björkander S, Bremme K, Persson JO, van Vollenhoven RF, Sverremark-Ekström E, Holmlund U. Pregnancy-associated inflammatory markers are elevated in pregnant women with systemic lupus erythematosus. *Cytokine*. 2012 Aug;59(2):392–9. doi:10.1016/j.cyto.2012.04.046 PubMed PMID: 22633082.
91. Catalina MD, Bachali P, Geraci NS, Grammer AC, Lipsky PE. Gene expression analysis delineates the potential roles of multiple interferons in systemic lupus erythematosus. *Commun Biol*. 2019 Dec 1;2(1). doi:10.1038/s42003-019-0382-x PubMed PMID: 31044165.

92. Shen M, Duan C, Xie C, Wang H, Li Z, Li B, et al. Identification of key interferon-stimulated genes for indicating the condition of patients with systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2022 Jul 28;13. doi:10.3389/fimmu.2022.962393 PubMed PMID: 35967341.
93. Lin YL, Lin SC. Analysis of the CD161-expressing cell quantities and CD161 expression levels in peripheral blood natural killer and T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Med.* 2017 Feb 1;17(1):101–9. doi:10.1007/s10238-015-0402-1 PubMed PMID: 26590595.
94. Sun HW, Zhang X, Shen CC. The shared circulating diagnostic biomarkers and molecular mechanisms of systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel disease. *Front Immunol.* 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1354348 PubMed PMID: 38774864.
95. Green MRJ, Kennell ASM, Larche MJ, Seifert MH, Isenberg DA, Salaman MR. Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: Demonstration of a killing defect in patients. *Clin Exp Immunol.* 2005 Jul;141(1):165–73. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02822.x PubMed PMID: 15958083.
96. Matei DE, de Gruijter NM, Jenkins P, Radziszewska A, Peckham H, Jebson B, et al. Sexual dimorphism of early GPR183-dependent B cell responses in systemic lupus erythematosus. *iScience.* 2026 Mar 20;29(3). doi:10.1016/j.isci.2026.114980
97. Freimann K, Brümmer A, Warmerdam R, Rupall TS, Hernández-Ledesma AL, Chiou J, et al. Trans-eQTL mapping prioritises USP18 as a negative regulator of interferon response at a lupus risk locus. *Nat Commun.* 2025 Oct 2;16(1):8795. doi:10.1038/s41467-025-63856-7 PubMed PMID: 41038828.
98. Zhao X, Zhang L, Wang J, Zhang M, Song Z, Ni B, et al. Identification of key biomarkers and immune infiltration in systemic lupus erythematosus by integrated bioinformatics analysis. *J Transl Med.* 2021 Dec 1;19(1). doi:10.1186/s12967-020-02698-x PubMed PMID: 33468161.
99. Chen M, Zhang Y, Shi W, Song X, Yang Y, Hou G, et al. SPATS2L is a positive feedback regulator of the type I interferon signaling pathway and plays a vital role in lupus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2024;56(11):1659–72. doi:10.3724/abbs.2024132 PubMed PMID: 39099414.
100. Lai JH, Wu DW, Huang CY, Hung LF, Wu CH, Ka SM, et al. Induction of LY6E regulates interleukin-1 β production, potentially contributing to the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cell Communication and Signaling .* 2025 Dec 1;23(1). doi:10.1186/s12964-025-02140-z PubMed PMID: 40114200.

101. Cheng L li, Tang Z fu, Li M, Chen J jie, Shang S shuang, Huang C bing. Single-cell sequencing-based analysis of CD4 + T-cell and B-cell heterogeneity in patients with lupus nephritis. *BMC Med Genomics*. 2026 Jan 15. doi:10.1186/s12920-025-02277-3 PubMed PMID: 41540405.
102. Miyagawa-Hayashino A, Yoshifuji H, Kitagori K, Ito S, Oku T, Hirayama Y, et al. Increase of MZB1 in B cells in systemic lupus erythematosus: Proteomic analysis of biopsied lymph nodes. *Arthritis Res Ther*. 2018 Jan 30;20(1). doi:10.1186/s13075-018-1511-5 PubMed PMID: 29382365.
103. Thornhill SI, Mak A, Lee B, Lee HY, Poidinger M, Connolly JE, et al. Monocyte Siglec-14 expression is upregulated in patients with systemic lupus erythematosus and correlates with lupus disease activity. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2017 Jun 1;56(6):1025–30. doi:10.1093/rheumatology/kew498 PubMed PMID: 28137763.
104. Makinde HM, Winter DR, Procissi D, Mike E V., Stock AD, Kando MJ, et al. A Novel Microglia-Specific Transcriptional Signature Correlates With Behavioral Deficits in Neuropsychiatric Lupus. *Front Immunol*. 2020 Feb 26;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00230 PubMed PMID: 32174913.
105. Shojaei M, Shamshirian A, Monkman J, Grice L, Tran M, Tan CW, et al. IFI27 transcription is an early predictor for COVID-19 outcomes, a multi-cohort observational study. *Front Immunol*. 2023 Jan 5;13. doi:10.3389/fimmu.2022.1060438 PubMed PMID: 36685600.
106. Jimmy Huang PC, Low PY, Wang I, Danny Hsu S Te, Angata T. Soluble Siglec-14 glycan-recognition protein is generated by alternative splicing and suppresses myeloid inflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Dec 21;293(51):19645–58. doi:10.1074/jbc.RA118.005676 PubMed PMID: 30377253.
107. Działałek-Macioszczyk P, Winiarska A, Pawłowska A, Macioszczyk J, Wojtacha P, Stompór T. Ubiquitin-Specific Protease 18 in Chronic Kidney Disease—Another Emerging Biomarker to Consider? *Biomedicines*. 2024 May 1;12(5). doi:10.3390/biomedicines12051073
108. Li G, Wang X, Yang Z, Zhao Q, Wen Y, Li X, et al. Serum levels of joining chain-containing IgA1 are not elevated in patients with IgA nephropathy. *Dis Markers*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/9802839 PubMed PMID: 31354895.
109. Alayadhi LY, Halepoto DM, Alhowikan AM, Elamin NE, Halepota AT. Low Plasma Levels of Contactin-Associated Protein-Like 2 in Children with Autism Spectrum Disorder: Links to Neural Development. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2024;20:2423–31. doi:10.2147/NDT.S490582

110. Paczesny S, Braun TM, Levine JE, Hogan J, Crawford J, Coffing B, et al. Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci Transl Med*. 2010;2(13). doi:10.1126/scitranslmed.3000406 PubMed PMID: 20371463.
111. Deng Y, Zhou Y, Shi J, Yang J, Huang H, Zhang M, et al. Potential genetic biomarkers predict adverse pregnancy outcome during early and mid-pregnancy in women with systemic lupus erythematosus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Nov 16;13. doi:10.3389/fendo.2022.957010
112. Wong CK, Wong PTY, Tam LS, Li EK, Chen DP, Lam CWK. Elevated production of B Cell Chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J Clin Immunol*. 2010 Jan;30(1):45–52. doi:10.1007/s10875-009-9325-5 PubMed PMID: 19774453.
113. Eldin AB, Sayed S, Hegazy G, Shaker O. B-cell activating factor (BAFF) in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and Behçet's disease. *Turkish Journal of Rheumatology*. 2012;27(3):185–94. doi:10.5606/tjr.2012.031
114. Lindblom J, Beretta L, Borghi MO, Alarcón-Riquelme ME, Parodis I. Serum profiling identifies CCL8, CXCL13, and IL-1RA as markers of active disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1257085 PubMed PMID: 38098483.
115. Stockfelt M, Torell A, Gunnarsson I, Svenungsson E, Zickert A, Sennstrom MM, et al. Plasma interferon-alpha protein levels during pregnancy are associated with lower birth weight in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2025 Mar 1;64(3):1469–75. doi:10.1093/rheumatology/keae332 PubMed PMID: 38876981.
116. Elewa EA, Zakaria O, Mohamed EI, Boghdadi G. The role of interleukins 4, 17 and interferon gamma as biomarkers in patients with Systemic Lupus Erythematosus and their correlation with disease activity. *Egyptian Rheumatologist*. 2014 Jan;36(1):21–7. doi:10.1016/j.ejr.2013.10.003
117. Hoffmann JA, Gründler K, Richter DU, Stubert J. Prediction of spontaneous preterm birth using CCL2 and CXCL10 in maternal serum of symptomatic high-risk pregnant women: a prospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2023 Dec 1;23(1). doi:10.1186/s12884-023-06016-3 PubMed PMID: 37770883.
118. Iaccarino L, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, Punzi L, et al. Polarization of TH2 response is decreased during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Reumatismo*. 2012.