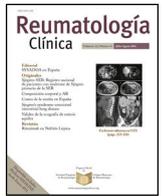




Sociedad Española
de Reumatología -
Colegio Mexicano
de Reumatología

Reumatología Clínica

www.reumatologiaclinica.org



Original breve

Relación de la expresión génica de IP-10 con la actividad del lupus eritematoso sistémico



Julián Torres-Vázquez^a, Martín Uriel Vázquez-Medina^{a,b,c,*}, David Alberto Comoto-Santacruz^d, Mariano Emilio Pradillo-Macias^{a,c}, Omar Eloy Muñoz-Monroy^a y Adriana Martínez-Cuazitl^{a,c,d}

^a Hospital Central Militar, SEDENA, Ciudad de México, México

^b Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

^c Departamento de Investigación, Hospital Central Militar, SEDENA, Ciudad de México, México

^d Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, SEDENA, Ciudad de México, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de agosto de 2020

Aceptado el 14 de enero de 2021

On-line el 25 de febrero de 2021

Palabras clave:

CXCL-10

IP-10

INF

LES

Lupus eritematoso sistémico

Actividad lúpica

R E S U M E N

Objetivo: Evaluar la expresión génica del gen IP-10 en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y su posible relación con la actividad de la enfermedad.

Pacientes y métodos: El estudio incluyó 120 pacientes diagnosticados con LES y 30 controles sanos. Se investigó la expresión génica relativa de IP-10 con el método *fold change*, la cual fue correlacionada con el nivel de actividad lúpica evaluado con el instrumento SLEDAI 2-K.

Resultados: Se encontraron diferentes niveles en la expresión génica de IP-10 relacionada con la actividad lúpica ($p < 0,001$). Estos fueron mayores en los pacientes con actividad grave respecto a aquellos sin actividad, baja y moderada. El incremento en la expresión génica del grupo con actividad grave fue significativo con un *fold change* de tres.

Conclusión: El incremento significativo en la expresión génica relativa IP-10 puede ser un marcador de actividad lúpica grave.

© 2021 Elsevier España, S.L.U. y

Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. Todos los derechos reservados.

Relationship of IP-10 gene expression to systemic lupus erythematosus activity

A B S T R A C T

Objectives: To evaluate IP-10 gene expression in patients with SLE, and its possible relationship with disease activity.

Patients and methods: This study included 120 patients diagnosed with SLE and 30 healthy controls. The relative gene expression of IP-10 was investigated with the Fold Change method, which was correlated with the level of lupus activity evaluated with the SLEDAI 2-K instrument.

Results: Different levels of gene expression were found according to the SLE activity ($p < 0,001$). IP-10 gene expression levels were higher in patients with severe activity than in those with no activity, low activity, and moderate activity. The increase in gene expression in the severe activity group was significant with a Fold Change of 3.

Conclusion: The significant increase in relative gene expression IP-10 may be a marker of severe lupus activity.

© 2021 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. All rights reserved.

Keywords:

CXCL-10

IP-10

INF

SLE

Systemic lupus erythematosus

Lupus activity

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marvazcan65@hotmail.com (M.U. Vázquez-Medina).

Introducción

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica, de presentación clínica heterogénea, actividad variable en el tiempo, multisistémica, caracterizada por la presencia de anticuerpos antinucleares^{1,2}.

A pesar de décadas de estudios, pocos biomarcadores de actividad de LES han sido validados³. Los marcadores convencionales (anti-C1q, anti-dsDNA, C3 y C4) son subóptimos, pues se les adjudica una sensibilidad del 50% y una especificidad del 75%⁴. Es por ello, que se requieren nuevos biomarcadores para conocer la respuesta al tratamiento, así como la necesidad de modificarlo.

Hay evidencia de que la señalización del interferón (IFN) es inductora cardinal en la fisiopatología del LES. Por ejemplo, el uso de INF para otras patologías induce anticuerpos asociados a LES. Por lo tanto, la sobreexpresión de genes estimulados por INF en la sangre de estos pacientes tiene potencial de ser biomarcadora de actividad⁵.

La quimiocina proteína 10 inducida por INF (IP-10 o CXCL10) es secretada por macrófagos, monocitos y células endoteliales en respuesta al INF⁶. Su receptor CXCR3 se expresa en linfocitos Th1, B, NK y células dendríticas. Entre sus funciones, se incluyen la actividad quimiotáctica, la inducción de apoptosis, la regulación de crecimiento, la proliferación celular y la angiogénesis. Su importancia radica en que sus niveles séricos han sido vinculados con actividad y nefritis lúpica en diversos estudios⁷.

Si bien se ha encontrado un aumento en la expresión relativa de IP-10 en los leucocitos obtenidos de sangre periférica de pacientes con LES⁸, la información que correlacione el grado de expresión génica con la actividad es escasa, es por ello que el objetivo de este trabajo es evaluar la expresión génica relativa del gen IP-10 en personas con LES, y su posible relación con la actividad de la enfermedad.

Pacientes y métodos

Pacientes

Durante el período comprendido entre enero del 2018 a octubre del 2019, se reclutaron 270 mujeres que acudieron al servicio de consulta externa de Reumatología, o bien fueron ingresadas en el Hospital Central Militar, clasificadas como casos de LES, según los criterios de *American College of Rheumatology* de 1997. Su actividad fue cuantificada mediante el instrumento SLEDAI-2K a ciegas de la obtención de la expresión génica de IP-10⁹, quedando excluidas aquellas con procesos infecciosos activos en los últimos tres meses.

También, se reclutaron 30 mujeres sanas para el grupo control que no tuvieran obesidad, enfermedades autoinmunes o

infecciones activas en los últimos tres meses. Todas las pacientes otorgaron su consentimiento informado y esta investigación fue aprobada por el comité de bioética e investigación en el Hospital Central Militar.

Se formaron cinco grupos con base en su puntaje SLEDAI-2K cada uno con n = 30: 1.- control, 2.- sin actividad (SA) cero a dos puntos, 3.- actividad leve (AL) tres a cuatro puntos, 4.- actividad moderada (AM) seis a ocho puntos y 5.- actividad grave (AG) > ocho puntos³.

Muestras

Fueron obtenidas muestras de sangre por punción venosa de todas las pacientes, que se procesaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la SEDENA, obteniéndose y cuantificándose el ácido ribonucleico (ARN) total de los leucocitos en cada una de las muestras.

Además, se diseñaron primers para amplificar una región específica en el exón 2 y 3 del gen IP-10 y se midió la expresión génica, usando *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR* (qRT-PCR) de ARN mensajero (ARNm) de IP-10. Posteriormente, se obtuvo la expresión de un gen endógeno (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [GAPDH]) de todas las muestras. El kit utilizado fue KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2X), de la empresa Kappa Biosystem.

Cuantificación de la expresión génica

La cuantificación de la expresión génica relativa de los grupos se obtuvo mediante el método «*fold change*» (FC), usando los valores de los ciclos en los cuales las muestras comienzan a presentar fluorescencia significativa (CT), obtenidos mediante qRT-PCR; los valores CT son inversamente proporcionales a la concentración inicial de ARNm.

Para este método, el primer paso es obtener el ΔCT que es la diferencia entre los promedios CT del gen estudiado y del endógeno en un grupo, dicho valor evalúa la expresión del gen en un grupo. Luego, se obtiene el $\Delta\Delta CT$ que es la diferencia de los ΔCT entre los grupos con la enfermedad y el de control, este evalúa el comportamiento del gen en una patología. Finalmente, se obtiene el FC mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ y significa las veces que un gen está sobre o sub-expresado en la escala logarítmica, en un grupo o grupos con LES respecto al grupo control que tiene un valor FC de 1.

Por su escala continua, tendencia a la normalidad y no representar una proporción, la significancia estadística global entre grupos se obtiene con los valores ΔCT mediante el test de análisis de varianza (ANOVA). Se considera que la expresión del gen en estudio

Tabla 1
Características de los grupos y expresión génica relativa (*fold change*) de IP-10

	No. = 150	Control No. = 30	SA No. = 30	AL No. = 30	AM No. = 30	AG No. = 30	
<i>Características por grupo</i>							
Edad	Mediana (IQR)	24(23,28)	34 (27, 54)	37 (31,49)	47 (34, 69)	43 (34,54)	p
Edad LES			34 (27, 54)	37 (31,49)	47 (34, 69)	43 (34,54)	< 0,001*
SLEDAI-2K			0 (0, 0)	4 (4, 4)	7 (6, 8)	25 (20, 34)	0,3*
<i>Análisis fold change de IP-10</i>							
GADPH	Media	17,1	17,6	17,7	17,6	17,7	p
IP-10		24,2	24,31	24,39	25,6	23,3	
ΔCT		7,1	6,7	6,6	8	5,5	< 0,001**
$\Delta\Delta CT$		0	-0,46	-0,49	0,8	-1,59	
<i>Fold change</i>	Media IC 95%	1 (0,6 - 1,4)	1,38 (0,8 - 2,1)	1,41 (1,1 - 1,8)	0,56 (0,3 - 1)	3 (1,4 - 6,1)	

AG: Actividad grave; AL: Actividad leve; AM: Actividad moderada; Edad LES: Edad de pacientes con lupus eritematoso sistémico; GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IC: Intervalo de confianza; IQR: Rango intercuartílico; IP-10: Proteína 10 inducida por interferón; SA: Sin actividad.

* Determinado con el test de Kruskal Wallis

** Determinado con la prueba ANOVA Brown-Forsythe

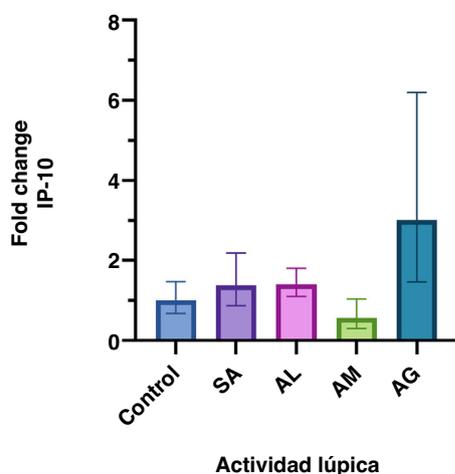


Figura 1. Expresión génica relativa de IP-10 de acuerdo con la actividad de LES. Se presenta la media geométrica y el IC 95% del *fold change* de IP-10 en cada grupo. Solo el grupo con actividad grave presenta un incremento significativo en la expresión génica relativa.

AG: Actividad grave; AL: Actividad leve; AM: Actividad moderada; LES: lupus eritematoso sistémico; SA: Sin actividad.

(IP-10) está significativamente involucrada en la actividad de la enfermedad cuando el FC del grupo es mayor a dos.

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism 8.4.0.

Resultados

Los datos que no tienen distribución normal se presentan como mediana (IQR). De todas las pacientes incluidas, la mediana de edad fue de 38 años (29, 53). Las mujeres con LES tuvieron una mediana SLEDAI-2K de ocho puntos (cuatro, 27) y una edad de 42 años (34, 54). Las características por grupo y el análisis FC se muestran en la [tabla 1](#) y en la [figura 1](#) se grafica el FC de los grupos. La diferencia en la expresión relativa de IP-10 entre grupos fue estadísticamente significativa ($F = 5,3$ [4.104,8], $p < 0,001$) determinada por la prueba ANOVA de una vía (Brown-Forsythe).

Discusión

Este estudio demostró un incremento significativo ($FC > 2$) en la expresión génica de IP-10 en los pacientes con LES y AG, que presentaron un mayor aumento en la expresión de IP-10 respecto a los otros sujetos. Con excepción del grupo AM, los valores de FC fueron más altos en las personas diagnosticadas con LES.

Si bien, hubo diferencia estadísticamente significativa entre la edad de todos los grupos, cuando se consideró únicamente a los pacientes diagnosticados con LES, el valor p fue de 0,3. Por lo que no se puede considerar que la variación en la expresión génica observada en el presente trabajo esté asociada con la edad.

Los hallazgos en el grupo con AM podrían explicarse por diferencias en la respuesta al tratamiento, ya que se ha encontrado que la expresión IP-10 está disminuida en pacientes con buena respuesta al tratamiento inmunomodulador. Es posible que el grupo con AM represente a la población con una buena respuesta, los pacientes con AL o SA, los que inician terapia o son de reciente diagnóstico y aquellos con AG resistente al tratamiento¹⁰.

También hay evidencia de que la predominancia del fenotipo Th1 en linfocitos CD4+ de pacientes con LES se relaciona con una mayor actividad lúpica. El INF secretado por linfocitos Th1 promueve la síntesis y liberación de los productos de respuesta a INF; como IP-10. En cambio, las interleucinas secretadas por los linfocitos Th2 antagonizan la secreción y acción de mediadores liberados por linfocitos Th1; entre ellos INF¹¹. Por consiguiente, la menor expresión génica de IP-10 del grupo con AM puede deberse a un predominio de linfocitos Th2, teniendo el grupo con AG una mayor expresión génica de IP-10 por predominancia de linfocitos Th1.

En conclusión, se puede sugerir que el incremento significativo en la expresión génica IP-10 puede ser un biomarcador de actividad lúpica grave, lo cual implica que podría ser utilizada para identificar aquellos pacientes que requieran un ajuste de tratamiento y una vigilancia más estricta. Al tratarse de un estudio preliminar, no se recogieron los tratamientos de los pacientes ni el fenotipo de los linfocitos CD4+, por lo que nuevos estudios prospectivos con mayor número de casos que consideren estas variables son necesarios para corroborar nuestras observaciones.

Financiación

Este trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Walling HW, Sontheimer RD. Cutaneous lupus erythematosus: Issues in diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2009;10:365–81. <http://dx.doi.org/10.2165/11310780-000000000-00000>.
- Ospina-Caicedo AI, Ballesteros DA, Romero-Sánchez MC, Munevar-Niño JC. Dickkopf-1 protein and systemic lupus erythematosus: New fields in research. *Rev Colomb Reumatol.* 2016;23:259–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.07.001>.
- Miniño M. Índice de actividad lúpica y tratamiento del lupus eritematoso en dermatología. *Dermatología Rev Mex.* 2008;52:20–8.
- Julkunen H, Ekblom-Kullberg S, Miettinen A. Nonrenal and renal activity of systemic lupus erythematosus: A comparison of two anti-C1q and five anti-dsDNA assays and complement C3 and C4. *Rheumatol Int.* 2012;32:2445–51. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-011-1962-3>.
- Puapatanakul P, Chansritrakul S, Susantitaphong P, Ueaphongsukkit T, Eiam-Ong S, Praditpornsilpa K, et al. Interferon-inducible protein 10 and disease activity in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4952. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20194954>.
- Gota C, Calabrese L. Induction of clinical autoimmune disease by therapeutic interferon- α . *Autoimmunity.* 2003;36:511–8. <http://dx.doi.org/10.1080/08916930310001605873>.
- Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22:121–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>.
- Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C, et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: A validation study. *Arthritis Rheum.* 2009;60:3098–107. <http://dx.doi.org/10.1002/art.24803>.
- Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002;29:288–91.
- Dominguez-Gutierrez PR, Ceribelli A, Satoh M, Sobel ES, Reeves WH, Chan EKL. Reduced levels of CCL2 and CXCL10 in systemic lupus erythematosus patients under treatment with prednisone, mycophenolate mofetil, or hydroxychloroquine, except in a high STAT1 subset. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R23. <http://dx.doi.org/10.1186/ar4451>.
- Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y, Kohsaka T, Nagano S, Ohgami E, et al. Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1644–8.