



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

TESIS DE MAESTRÍA

Identificación de la Huella Metabólica Urinaria en Nefropatía Lúpica.

ALUMNO

Dr. David Alejandro Herrera van Oostdam

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Mauricio Pierdant Pérez

CO-DIRECTOR

M. en C. Marco Ulises Martínez Martínez

ASESORES

D. en C.A. Rogelio Flores Ramírez

Dr. Carlos Abud Mendoza

San Luis Potosí, S.L.P

Agosto 2018

TÍTULO DE TESIS
Identificación de la Huella Metabólica Urinaria en Nefropatía Lúpica.

PRESENTA
Dr. David Alejandro Herrera van Oostdam

Firmas

Director de Tesis M. en C. Mauricio Pierdant Pérez	
Co – Director M. en C. Marco Ulises Martínez Martínez	
Asesor D. en C.A. Rogelio Flores Ramírez	
Asesor Dr. Carlos Abud Mendoza	

Sinodales	
Sinodal Interno M. en C. Amado Nieto Caraveo	
Sinodal Interno D. en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno	
Sinodal Externo Dr. Enrique Cuevas Orta	
Sinodal Externo D. en C.A. Francisco Javier Pérez Vázquez	
M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefe de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	D. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso Coordinador de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

RESUMEN

Introducción. La nefropatía lúpica es el principal factor pronóstico en lupus eritematoso sistémico. Las clases de nefropatía lúpica que requieren tratamiento son las proliferativas (clases III y IV) y la membranosa (clase V).

Objetivo. Identificar la huella metabolómica urinaria en nefropatía lúpica clínicamente significativa.

Sujetos y Métodos. Estudio trasversal. Incluimos a pacientes con lupus eritematoso sistémico, con o sin nefropatía lúpica. Se analizaron muestras urinarias para la detección de metabolitos utilizando espectrometría por cromatografía de gases (acoplada a nariz electrónica) y se seleccionaron los metabolitos relevantes con análisis de componentes principales y Random Forest.

Resultados. Incluimos a 78 pacientes, de los cuáles 37 tuvieron nefritis lúpica. Los pacientes con nefritis lúpica eran más jóvenes ($p < 0.03$). El puntaje de SLEDAI fue más alto en los pacientes con nefritis lúpica (mediana, 16 vs 4, $p < 0.0001$). La nefropatía más frecuente fue la clase IV se presentó en el 64% de los casos, clases mixtas en el 21%, clase V en el 2%.

Encontramos más de 300 picos en la espectrometría, correspondientes a metabolitos o fragmentos de metabolitos. Mediante análisis de componentes principales logramos reducir los datos en 2 componentes, alcanzando una varianza mayor al 80% de los datos.

Mediante heatmap visualizamos agrupaciones de metabolitos que lograron diferenciar a los pacientes con y sin nefropatía lúpica. De estos metabolitos escogimos los más relevantes mediante Random Forest encontrando una huella metabolómica de 15 metabolitos en nefritis lúpica. Los metabolitos que mostraron diferencias significativas entre los grupos fueron citrulina, ácido 3 hidroxí-isoheptanoico y ácido 2 propil glutárico

Conclusión. Identificamos una huella metabolómica urinaria característica en pacientes con NL

DEDICATORIAS

A MI ESPOSA ALICIA,

A MIS PADRES Y HERMANAS,

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	<i>I</i>
<u>DEDICATORIAS</u>	<i>II</i>
<u>ANTECEDENTES.</u>	<i>1</i>
<u>JUSTIFICACIÓN.</u>	<i>10</i>
<u>HIPÓTESIS.</u>	<i>11</i>
<u>OBJETIVOS.</u>	<i>12</i>
<u>SUJETOS Y MÉTODOS.</u>	<i>13</i>
<u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</u>	<i>17</i>
<u>ÉTICA.</u>	<i>18</i>
<u>RESULTADOS.</u>	<i>20</i>
<u>DISCUSIÓN.</u>	<i>27</i>
<u>CONCLUSIONES.</u>	<i>32</i>
<u>BIBLIOGRAFÍA.</u>	<i>33</i>
<u>ANEXOS.</u>	<i>40</i>

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

LES: lupus eritematoso sistémico

NL: nefropatía lúpica

Anti-DNA: anticuerpos contra ácido desoxirribonucleicos

CH50: complejo hemolítico 50

ISN/RSP: Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad Renal de Patología

ACR: Colegio Americano de Reumatología (siglas en inglés, American College of Rheumatology)

SLICC: Grupo Colaborativo Internacional clínico de Lupus Sistémico

TNF: factor de necrosis tumoral

TWEAK: inductor débil de apoptosis relacionado con TNF

NGAL: lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos

VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

CXCL-16: ligando de quimiocina 16

LTB4: leucotrienos

GGT1: péptido 1 de gama glutamil

GSH: glutatión

MDA: malondialdehído

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico

MDA: 3,4 metilenedioxianfetamina

ROS: especies reactivas de oxígeno

NMR: espectroscopia por resonancia magnética

LC-MS: cromatografía de gases acoplada a espectroscopia

PCA: análisis de componente principales

Palabras clave:

Nefritis lúpica

Metabólica

Método diagnóstico

ANTECEDENTES.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, sistémica, cuya característica es la producción de autoanticuerpos. La presentación clínica es heterogénea, va desde manifestaciones cutáneas leves, hasta afección multiorgánica fatal [1].

La nefropatía es el principal predictor de morbilidad y mortalidad en pacientes con LES, y engloba afección glomerular, nefritis intersticial y vascular [2,3]. Se presenta como manifestación inicial en el 30-40% de los adultos con LES y 70% en niños. En el seguimiento a 10 años el 60% de los adultos con LES desarrollará nefropatía lúpica (NL) [4,5].

De acuerdo con la clase de nefropatía (Tabla 1), las proliferativas (clase III, IV) tienen mayor riesgo de mortalidad (HR 2.28, IC 95%, 1.29-3.8) comparado con la clase membranosa pura (V) (HR 1.09, IC 95% 0.38-3.14). Las formas combinadas (clases III+V o IV+V) tienen un índice de mortalidad estandarizado de 9.8 [2]. El pronóstico en pacientes con NL estima una supervivencia a 10 años del 90% con tratamiento [2,6].

La tasa de insuficiencia renal crónica en NL disminuyó en los últimos 10 años; ahora la incidencia es de 10%, y se asocia a mayor mortalidad (HR de 3, IC 95% 1.48–5.99) [7]. Los factores asociados a progresión de insuficiencia renal son: raza -pacientes afro-americanos e hispanos tienen peor pronóstico, clase de nefropatía, nivel basal de creatinina, entre otros [7–9].

Por lo anterior las clases proliferativas y membranosa, son el tipo de nefropatía con mayor trascendencia clínica, el diagnóstico temprano de este tipo de nefritis puede modificar el pronóstico.

Tabla 1. Clasificación de nefropatía lúpica de la Sociedad Renal de Patología y la Sociedad Internacional de Nefrología (ISN/RSP).

Clase de Glomerulonefritis	Descripción
I	Proliferación mesangial mínima, glomérulo normal, pero con depósito escaso de inmunocomplejos.
II	Proliferación mesangial, definido como hipercelularidad mesangial y depósitos de inmunocomplejos mesangiales.
III	Glomerulonefritis proliferativa focal, proliferación subendotelial A – Lesiones activas A/C – Lesiones activas y crónicas, presencia de proliferación celular y esclerosis C – Lesiones inactivas, con cicatrización glomerular
IV	Glomerulonefritis proliferativa difusa, afección segmentaria o global, endocapilar o extracapilar que afecta a >50% de todos los glomérulos IV-S (A) o IV-G (A) – Lesiones segmentarias o globales activas IV-S (A/C) o IV-G (A/C) – Lesiones activas y crónicas, segmentarias o globales IV-S (C) o IV-G (C) – Lesiones crónicas, con cicatriz glomerular
V	Glomerulonefritis membranosa, depósitos subepiteliales, sin alteración mesangial
VI	Glomerulonefritis esclerosante avanzada, >90% de esclerosis glomerular global, sin actividad residual

IV-S, clase IV segmentaria; IV-G, clase IV global; A, activo; C, crónico.

El diagnóstico de NL se establece por los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) del 2012, mediante:

- a) presencia de sedimento activo en el examen general de orina (eritrocitos dismórficos, y/o leucocituria),
- b) proteinuria (>0.5gr/día),
- c) biopsia renal compatible con NL [5].

El estándar de oro para la identificación de la clase de nefropatía lúpica es la biopsia renal percutánea. La indicación de biopsia es cuando el paciente presente uno de los siguientes criterios [5]: a) proteinuria mayor a 500mg/dL en 24 horas; sedimento activo (presencia de >5 eritrocitos dismórficos en campos de alto poder, en ausencia de infección); b) presencia de cilindros celulares eritrocitarios o leucocitarios; c) elevación de creatinina no atribuible a otra causa (hipovolemia, sepsis y/o fármacos).

Las nefropatías: proliferativa pura (clases III y IV) o combinada (III+V y IV+V), requieren tratamiento intenso (ej. pulsos de esteroide y ciclofosfamida) [10]. En las nefropatías no-proliferativas (I, II, V y VI), solo la clase V requiere tratamiento por el riesgo de progresión a insuficiencia renal [2,11].

La tasa de complicaciones por la biopsia renal percutánea es del 10-15%; 7% son graves y pueden requerir transfusión, o intervención quirúrgica [12,13]. Por lo que el diagnóstico no invasivo de la NL sería ideal en estos pacientes.

La expresión clínica de la NL es variable ocasionando que ciertos pacientes acudan al reumatólogo en fases irreversibles de la enfermedad. El 36% con NL desarrollan síndrome nefrótico, síndrome nefrítico en el 25% y proteinuria subnefrótica en 8% [14,15].

Métodos no invasivos de diagnóstico.

Los métodos no invasivos aceptados por el ACR para el diagnóstico de NL son: proteinuria de una micción, proteinuria en recolección de orina de 24 hrs o la determinación del índice albuminuria-creatinuria. Sin embargo, tienen baja sensibilidad y especificidad (50-80%) para identificar las clases de nefropatía lúpica [16].

Austin et al., reportó mayor proteinuria, presencia de sedimento activo, niveles de complemento y elevación de creatinina en NL proliferativa comparado con la membranosa [17], sin lograr reproducir estos resultados en otros estudios [18].

La identificación de sedimento activo entre las distintas clases de NL, tiene resultados variables en la sensibilidad y especificidad debido al procesamiento e interpretación de los resultados [19,20]. Martínez et al., identificó que los acantocitos en orina pudieran discriminar entre las clases proliferativas de las no proliferativas, además de que el conteo de acantocitos correlaciona con actividad de la nefritis lúpica [21].

Otros marcadores séricos para el diagnóstico de NL proliferativa, tienen baja sensibilidad: anticuerpos antinucleares 65-90%, anticuerpos anti DNA de doble cadena (anti-dsDNA) 75%; niveles bajos del complemento 60-80% [22–24], molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), ligandos de receptores de complemento (ej. CXCL 16), inductor de apoptosis relacionado a TNF (TWEAK), proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL): 50-70% y especificidad <60% [25–30].

El enfoque actual para el diagnóstico de lupus eritematoso se extiende más allá de lo inmunológico, y engloba áreas como la genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica [31].

Metaboloma y lupus eritematoso sistémico.

El metaboloma, es el conjunto completo de metabolitos de bajo peso molecular (<1000 daltones) en una célula, tejido o fluido [32,33]. Busca la “descripción analítica de una muestra biológica cuyo objetivo es caracterizar y cuantificar metabolitos endógenos (vías metabólicas: glicolisis, ácido tricarbóxico, pentosa, ácidos grasos, glutamina) o exógenos (alimentos, fármacos), es decir identificar la **huella metabolómica** (Imagen 1) [34]. El tiempo de procesamiento de las muestras es variable 4-12 hrs.

En los últimos años aumentaron las publicaciones relacionadas con el análisis del metabolismo celular en inmunología; el objetivo es identificar las distintas señales intrínsecas y extrínsecas del metabolismo celular, para tener mejor entendimiento de la proliferación y activación celular [35]. Cada célula inmune utiliza distintas vías para obtener energía y otros intermediarios para su proliferación y supervivencia. Estas vías metabólicas (vía glicolítica, pentosas, ácido tricarbóxico) varían en sus productos finales, y se relacionan entre sí a través de distintos productos intermedios.

En enfermedades autoinmunes se han identificado anomalías específicas de las vías metabólicas, que pueden participar en la patogenia [36] (Tabla 2). La mayoría de estos estudios metabólicos son de ciencia básica, con poco impacto clínico hasta el momento [37].

A través de la huella metabólica se pueden obtener nuevos biomarcadores diagnósticos o pronósticos, y entender nuevas vías patogénicas en LES [38]. El análisis es de dos tipos: **específico**, en forma predeterminada analiza un grupo de metabolitos (ej. taurina, citrato) o **general**, que realiza un análisis completo para determinar diferencias de perfiles entre distintos individuos o condiciones [39,40].

En nuestro estudio utilizamos el tipo de análisis general (Anexo).

El metaboloma puede modificarse por condiciones intrínsecas (cambios metabólicos tisulares-celulares) y extrínsecos (fármacos, alimentos) [41–43], sin embargo, la magnitud de estos cambios en enfermedades, se desconoce.

Existe relación entre las enfermedades metabólicas, tal como la obesidad, y el desarrollo de inflamación sistémica, caracterizada por activación de macrófagos M1 e incremento en citocinas inflamatorias, a través de alteraciones en el metabolismo de la glucosa [44]. El papel de esta “metainflamación” en enfermedades autoinmunes aún es desconocido.

Identificación de la Huella Metabolómica Urinaria en Nefropatía Lúpica.

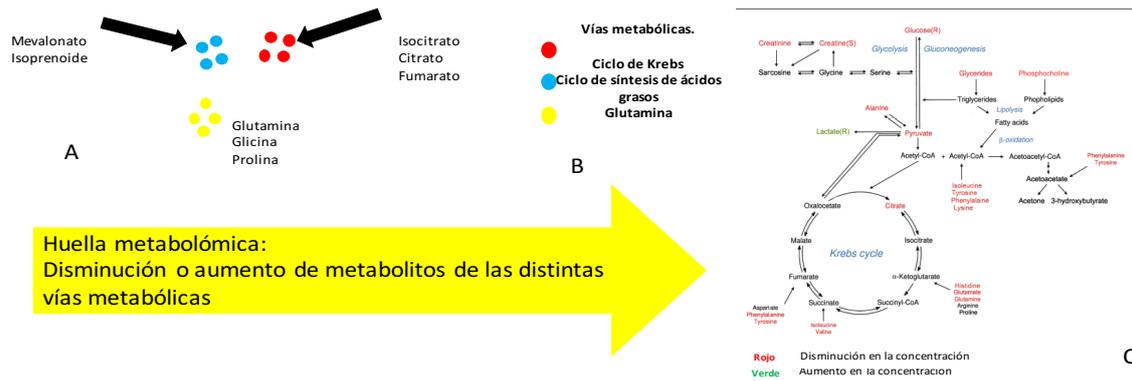


Imagen 1. Identificación de huella metabolómica. A) Determinación de metabolitos, B) Identificación de las vías metabólicas a las que pertenecen los metabolitos, círculo rojo, pertenecen al ciclo de Krebs; círculo azul, pertenecen al ciclo de ácidos grasos; círculo amarillo, pertenecen al ciclo de la glutamina, C) Comparación de los niveles de los metabolitos en pacientes y controles.

El análisis metabolómico es solo uno de los elementos que conforman el “dogma” central de la biología para el estudio de diversas enfermedades (genómica, transcryptómica, proteómica, metabolómica). Con este análisis pueden establecer: fenotipos más exactos de enfermedades, biomarcadores para diagnóstico temprano, biomarcadores para evaluar decisión o respuesta de tratamiento -medicina individualizada (Imagen 2) [45].

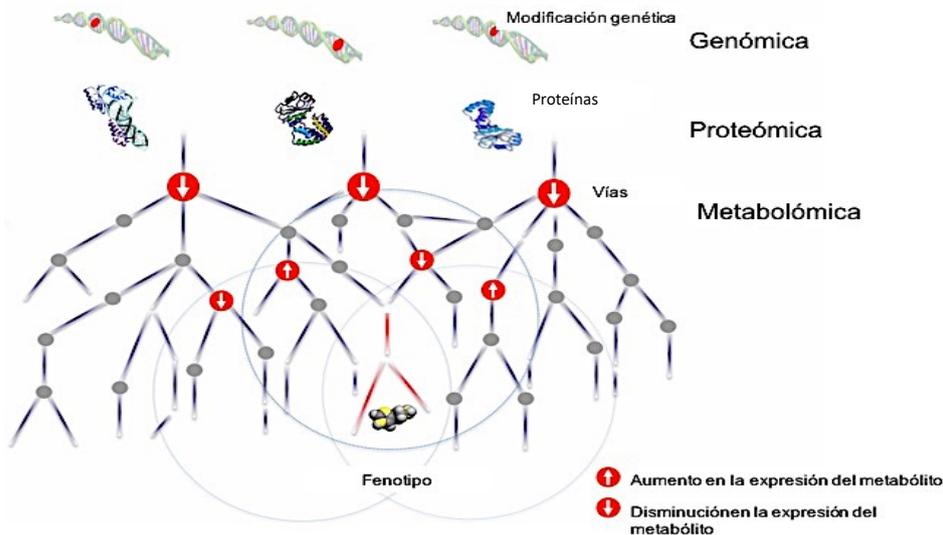


Imagen 2. Dogma central de la biología y la cascada “omica”. Alteraciones genéticas o proteicas ocasionan cambios en cascada de diversos metabolitos. *Modificada de Patti G et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2013; 13: 263–269*

La obtención de los metabolitos se realiza con la espectroscopia por resonancia magnética (NMR), cromatografía de gases acoplado a espectrometría (GC-MS), o líquida (LC-MS). Las ventajas de la NMR son: escasa cantidad de muestra, cuantificación rápida y absoluta de los metabolitos, reproducibilidad del 98%, la detección puede realizarse en muestras líquidas, semisólidas; y como desventaja que el costo del equipo es alto (\$500,000-\$2,000,000 dls) [46]. En la cromatografía de gases acoplado a espectrometría, el costo del equipo es menor (<\$100,000dls) y se pueden detectar de 200-1000 metabolitos en una sola muestra, como desventaja es que al prolongar el tiempo de procedimiento de la muestra pueden llegar a formarse varios productos a través de un metabolito [33,47,48]. En el presente estudio se realizó cromatografía de gases acoplado a espectrometría.

Existen varios métodos para el análisis de datos en metabolómica (Ver ANEXO II), en el presente estudio se utilizó el análisis de componentes principales (PCA). El PCA disminuye las dimensiones de los datos, tratando de explicar la mayor variación de los datos posibles. Cada componente principal es una combinación lineal de las variables originales. Estos componentes son graficados mediante la agrupación de los datos en un mapa de componentes principales, y cada agrupación de datos representará una **huella metabolómica** [34] (Imagen 3).

Una vez que se redujeron los datos mediante análisis de componentes principales, se debe de realizar análisis de agrupación como mapas de calor, posteriormente la selección de los metabolitos relevantes se realiza por métodos de regresión como Random Forest o Lasso; tomando como base cada componente principal obtenido.

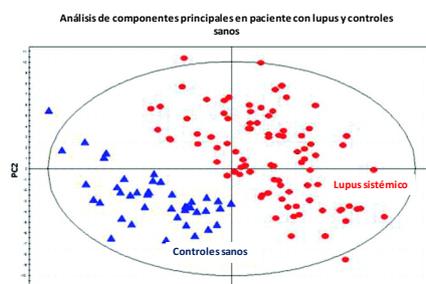


Imagen 3. Gráfica de resultados hipotéticos del análisis de componente principales entre pacientes con lupus eritematoso sistémico y personas sanas. Los círculos rojos representan la huella metabolómica

característica en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Cada uno de los círculos representa un metabolito.

Hay pocos estudios de metabolómica en LES. Uno de ellos demostró alteración en los sustratos de energía, con incremento en los metabolitos involucrados en el estrés oxidativo, y alteración en el perfil de lípidos [49]. De acuerdo a este estudio los metabolitos que tuvieron un mejor perfil de discriminación para lupus, fueron los productos de peroxidación de lípidos, elevación de péptidos gama glutamil 1, malondialdehído (MDA), 5-hidroxicicosatetraenoico (5-HETE), todo lo anterior como traducción de daño secundario a oxidación (Imagen 4).

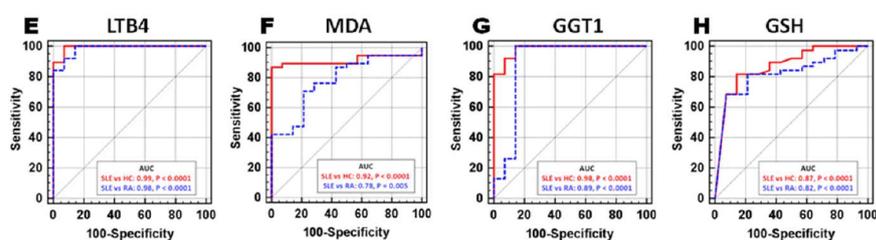


Imagen 4. Perfil de sensibilidad y especificidad de marcadores metabólicos. La línea roja corresponde al grupo de sujetos sanos vs LES; la línea azul a controles con artritis reumatoide vs LES

Ouyang X et al., logró distinguir a pacientes con lupus de pacientes con artritis reumatoide mediante NMR (especificidad 97.1% y sensibilidad 60.9%), destacando que los pacientes con lupus tuvieron disminución de aminoácidos como: valina, tirosina, fenilalanina, histamina, glutamina [50].

En pacientes con nefritis lúpica, estudios metabolómicos han encontrado niveles bajos de citrato (urinario y sérico), aminoácidos (valina, leucina, glutamato, prolina), y niveles elevados de creatinina y N-acetil glicoproteína [51,52]. La disminución de citrato pudiera identificar a la nefropatía membranosa, mientras que la elevación de taurina y citrato urinario, identifica las clases proliferativas [52]. Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferentes huellas en pacientes con nefropatía [53].

La nefropatía de cualquier tipo puede afectar el metaboloma sérico o urinario, sin embargo, esto no se ha comparado en ningún estudio relacionado con nefropatía lúpica [54].

Tabla 2. Anormalidades en vías metabólicas en enfermedades autoinmunes.

Vía metabólica	Artritis reumatoide	Lupus eritematoso sistémico
Estado oxidativo (Nivel de MDA)	Bajo	Alto
Consumo de oxígeno celular	¿?	Alto
Actividad del ciclo TCA	¿?	Alto
Niveles de ROS	Bajo	Alto
Actividad glicolítica de linfocitos T	Bajo	¿?
Metabolitos séricos	---	Glicolisis - disminuida Ciclo TCA - disminuido Oxidación de ácidos grasos - disminuido Metabolismo de aminoácidos – disminuido Nivel aumentado de ácidos grasos libres
Metabolitos en líquido sinovial	Glucosa baja Ácidos grasos bajos Glutamina elevada Aminoácidos elevados	---

MDA, 3,4 metilenedioxianfetamina; ROS, especies reactivas de oxígeno; TCA, ácido tricarbóxico.

Modificado de Yang Z et al. *Arthritis Res Ther.* 2015 Jan; 17:29

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe una huella metabolómica urinaria en nefropatía lúpica?

JUSTIFICACIÓN.

- La biopsia renal, aunque representa el estándar de oro para el diagnóstico de nefropatía lúpica proliferativa y/o membranosa, es un método invasivo, que puede provocar eventos adversos graves. El diagnóstico de nefropatía lúpica proliferativa o membranosa de manera no invasiva, sería el método diagnóstico ideal.
- La determinación de la clase de nefropatía lúpica es vital, ya que las clases proliferativas y membranosa son las únicas que **ameritan tratamiento**. El resultado definitivo de la biopsia renal puede tardar días, ocasionando retraso del tratamiento.
- El tiempo de procesamiento de metabolómica es más rápido (4-12 horas) comparado con la biopsia renal (4-5 días).
- Se identificó alteración en el perfil metabolómico de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Sin embargo, no se han realizado análisis metabolómicos entre los distintos fenotipos del LES.
- No hay estudios que evalúen la huella metabolómica como marcador diagnóstico en pacientes con nefropatía lúpica. Un marcador diagnóstico, sensible y específico, permitiría omitir la biopsia renal y evitar las complicaciones asociadas al procedimiento.
- Si se llega a confirmar la utilidad diagnóstica del metaboloma en nefropatía lúpica podremos diseñar estudios que nos permitan identificar en estadios subclínicos de la nefropatía lúpica y evitar progresión a falla renal crónica irreversible

HIPÓTESIS.

Los pacientes con nefropatía lúpica proliferativa y/o membranosa tienen una huella metabólica urinaria.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Identificar la huella metabólica urinaria en nefropatía lúpica clínicamente significativa.

Objetivos específicos

- Evaluar el metaboloma urinario en pacientes con nefropatía lúpica clínicamente significativa.
- Evaluar el metaboloma urinario en pacientes sin nefropatía lúpica clínicamente significativa.
- Evaluar si hay diferencia de la huella metabólica entre los pacientes con y sin nefropatía lúpica clínicamente significativa.

Objetivos secundarios.

- Realizar análisis de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud para la huella metabólica encontrada, para el diagnóstico de nefropatía lúpica
- Evaluar el perfil metabólico sérico para los diferentes grados de nefropatía lúpica.

SUJETOS Y MÉTODOS.

Diseño del estudio.

Universo.

Cualquier paciente de cualquier edad con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico con y sin nefropatía lúpica de acuerdo con criterios de ACR/SLICC 2012 e ISN/RPS 2004.

Lugar donde se llevó a cabo.

Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto

Tipo de muestreo.

Muestreo no probabilístico.

Grupos de estudio.

Grupo 1: pacientes con nefropatía lúpica

Grupo 2: pacientes con lupus eritematoso sistémico sin nefropatía

Tipo de estudio.

Transversal, analítico.

Tamaño de muestra.

De acuerdo a Osborne et al. para realizar análisis de componente principales se requieren por lo menos de 50 pacientes o una relación de 10:1 sujetos por componente principal incluido [55].

En el estudio encontramos que con dos componentes principales se agrupó más del 80% de los datos por lo que con 20 pacientes por grupo sería suficiente para el presente estudio.

Para el objetivo secundario:

Como prueba diagnóstica se calculó un tamaño de muestra para un alfa de 0.05 y una beta de 0.8, utilizando el nomograma propuesto por Flahault et al [56]. En donde de acuerdo con una sensibilidad esperada del 95% con un intervalo de confianza mínimo aceptable de 0.7, el número de sujetos necesarios será de 24.

Criterios de inclusión.

- Pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico de acuerdo con los criterios ACR/SLICC 2012,
- Cualquier edad
- Aceptación del paciente para participar en el estudio,
- Firma de consentimiento informado,
- Disponibilidad del expediente médico,
- Disponibilidad de muestra urinaria para el análisis metabolómico

Criterios de no-inclusión.

- Contraindicación de biopsia renal en pacientes con nefritis lúpica (Anexo)

Criterio de eliminación.

- Ausencia de datos clínicos, demográficos y de laboratorio en el expediente clínico.
- Que la biopsia renal tenga menos de 10 glomérulos en la evaluación histológica.

Variables del estudio.

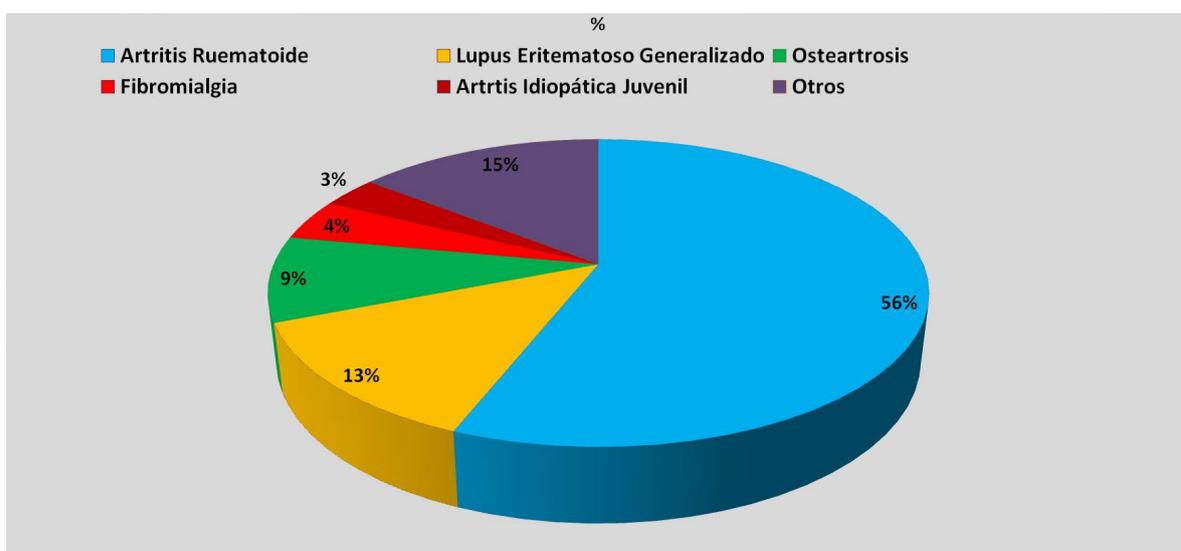
Variables	Código	Descripción	Escala de medición	Valor
Nefropatía lúpica	neflup	Clases de nefropatía lúpica	Dicotómica	Si No
Metaboloma	metabolom	Conjunto de metabolitos que determinen la presencia o ausencia de la nefropatía	Random forest	Presente Ausente

Viabilidad.

En la Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del Hospital Central “Dr. IMP” se atendieron 10 695 mil pacientes en el 2014, de los cuales el lupus eritematoso sistémico representó el 13%. Se atienden 120 pacientes con nefropatía lúpica.

Al año se realizan entre 40-50 biopsias renales en dichos pacientes ante la sospecha de nefropatía lúpica proliferativa, membranosa o combinación.

De acuerdo con el cálculo de muestra se requieren 24 pacientes por grupo. Por lo que en un período de dos años si se llegará a reclutar los pacientes necesarios.



Procesamiento de datos.

El plan de procesamiento se estableció de acuerdo a lo recomendado por de Souza et al [57].

Los datos crudos obtenidos del procesamiento de las muestras son tridimensionales, constituidos por el índice masa/carga (m/z) y las intensidades de los picos en el tiempo. Los datos obtenidos requirieron “detección, filtración e integración”.

Debido a la sobreposición de valores del índice de masa-carga (m/z) y los tiempos de retención de los picos, se debe de realizar alineación de los datos. Para la extracción y alineación de datos utilizamos dos programas con el objetivo de verificar la obtención de los mismos valores, los programas utilizados fueron XCMS® y Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS).

Una vez obtenidos y alineados los valores se realizó decodificación de los datos mediante el software XCMS® y Metlin®.

Realizamos normalización de los datos mediante transformación logarítmica, obteniendo una curva de distribución adecuada. (Ver Anexos)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Utilizamos análisis de componentes principales (PCA) para identificar el conjunto de metabolitos que determinarán la huella metabolómica en aquellos con y sin nefropatía lúpica significativa.

Realizamos análisis de agrupación jerárquica de tipo heatmap con el objetivo de identificar alguna posible huella metabolómica que diferenciará a pacientes con y sin nefropatía lúpica clínicamente significativa.

Con el heatmap tenemos una visión general de la huella, sin embargo, no podemos establecer cuál de los metabolitos incluidos pudiera ser más relevante, por lo que para seleccionar los metabolitos utilizamos análisis de regresión supervisados (Random Forest). Se consideró como significativo un metabolito cuando la disminución promedio de la exactitud era mayor a 0.006.

Utilizamos estadística descriptiva para las características basales. Las siguientes variables continuas tuvieron distribución normal: edad, peso, creatinina y tasa de filtración glomerular, por lo que se expresaron en medias y desviación estándar, el resto de las c variables continuas no tuvieron distribución normal por lo que se expresaron en mediana y rango intercuartil. La normalidad se evaluó mediante a prueba de Shapiro-Wilk y qqPlot. Las variables categóricas se expresaron en porcentajes. Para la comparación entre los grupos de las variables continuas utilizamos prueba T no pareada y para las variables categóricas X^2 o prueba exacta de Fisher según el número esperado de cada casilla.

Para el objetivo secundario (diagnóstico), se aplicó estadísticas para pruebas diagnósticas, en donde se obtuvieron sensibilidades, especificidades, y áreas bajo la curva.

ÉTICA.

Se aceptó por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

Las maniobras diagnósticas que se utilizaron se consideran de riesgo menor por lo que no transgreden las normas de la Conferencia de Helsinki de 1964 y su revisión de 2013.

Solicitamos consentimiento informado para adultos y menores de edad, en donde se especificó el objetivo, los métodos y las técnicas utilizadas en el estudio.

Así mismo los datos obtenidos fueron utilizados únicamente por los miembros del estudio. Se informó a los participantes del aviso de privacidad.

Se realizó el estudio en adultos y menores de edad; el estudio se apegó a lo que se considera y concierne a la Ley General de Salud de México en cuyo Título Quinto Capítulo único, investigación para la salud Artículo 100, referente a la investigación en seres humanos, en los apartados III y IV, se señala que: podrá efectuarse solo cuando exista una razonable seguridad de que no expone a riesgos ni daños innecesarios al sujeto en experimentación y que se deberá contar con el consentimiento por escrito en el caso de niños se deberá contar consentimiento informado por escrito de la madre o tutor del niño en quien se realizara la investigación, o de su representante legal en caso de incapacidad legal de aquel, una vez enterado de los objetivos de la experimentación y de las posibles consecuencias positivas o negativas para la salud.

Lo anterior coincide con lo dispuesto en la Ley de Salud del Estado de San Luis Potosí, en el artículo 84, fracciones III “Podrá efectuarse solo cuando exista una razonable seguridad de que no expone a riesgos, ni daños innecesarios al sujeto en experimentación”.

La carta de consentimiento informado fue diseñada conforme a los lineamientos

establecidos en la siguiente normatividad:

1. Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012. Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.
2. Código Civil Mexicano. Obligaciones en general sobre el consentimiento informado Artículos 1803 y 1812.

Padres y/o tutores de los pacientes menores firmaron y en los que no sabían escribir se utilizó huella dactilar del participante o de los padres/tutores del menor de edad.

El consentimiento informado en donde se informará de forma escrita y se comentará verbalmente, acerca del protocolo, el tratamiento indicado, los riesgos y beneficios que este implica.

Para las cuestiones éticas se tomaron en cuenta las consideraciones señaladas en el Código de Núremberg y lo mencionado en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en donde señala que “Para tomar parte en un proyecto de investigación, los individuos deben de ser participantes voluntarios e informados”; adicional se debe respetar el derecho de los participantes en la investigación a proteger su integridad. Tomar toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de los individuos, la confidencialidad de la información del ser humano y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física y mental.

Todos los sujetos incluidos recibieron la información necesaria relacionada con el estudio como: método, beneficios calculados, riesgos previsibles. Se resolverán dudas e inquietudes que pudieran tener.

RESULTADOS.

Incluimos a 78 pacientes, de los cuáles 37 pacientes tenían nefropatía lúpica.

En las características basales de los pacientes no existieron diferencias entre los grupos relacionados con edad y sexo (Ver tabla 1). Existió mayor actividad de la enfermedad -evaluado por SLEDAI- en los pacientes con nefropatía lúpica (14 vs 4, $p < 0.0001$).

Con respecto al tratamiento, mayor proporción de pacientes con nefropatía recibieron mofetil micofenolato (45.9% vs 26.8%, $p 0.1$). La ciclofosfamida intravenosa se administró en >60% de los pacientes con nefropatía lúpica.

Los pacientes con nefropatía tuvieron niveles más elevados de creatinina ($p 0.005$); y por lo tanto menor tasa de filtración glomerular (77 ml/min vs 123 ml/min, $p 0.01$).

Mediante análisis de componentes principales, logramos reducir la dimensión de los datos. Con los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) agrupamos el 84% de los datos; en la gráfica de puntaje se muestra la distribución de los metabolitos en pacientes con y sin nefropatía lúpica (Figura 1).

El primer componente logró explicar el 62% de los datos y segundo 22% (Figura 2). La suma de cada coeficiente de las variables determinó la dirección de cada componente principal, al incluir el tercer componente principal la explicación de la varianza aumento un 86% (Anexos).

Tabla 1. Características basales de pacientes con lupus eritematoso sistémico con y sin nefropatía.

Variables	Nefropatía lúpica N=37	Control N=41	Valor de p
Edad, media (SD)	28.5 (13.1)	35 (14.6)	0.03
Sexo: femenino, n (%)	32 (86.4)	35 (85.3)	0.5
Peso Kg, media (SD)	58 (10.2)	65 (14.6)	0.06
SLEDAI, mediana (IQR)	14 (9)	4 (2)	<0.0001
Tiempo de evolución meses, mediana (IQR)	24 (50)	54 (102)	<0.0001
Dosis de prednisona mg/día, mediana (IQR)	5 (10)	5 (0)	0.06
Medicamentos			
Metotrexato, n (%)	7 (18.9%)	19 (46.3)	0.008
Mofetil micofenolato, n (%)	17 (45.9)	11 (26.8)	0.1
Cloroquina, n (%)			
Ciclofosfamida, n (%)	19 (51.3)	24 (58.5)	0.02
	23 (61.1)	0 (0)	<0.0001
Linfocitos K/mL, media (IQR)	1.23 (1.08)	1.7 (0.97)	0.001
Creatinina mg/dL, media (SD)	2 (1.8)	0.7 (0.2)	0.0004
Tasa de filtración glomerular ml/kg/mt, media (SD)	77 (54.3)	123 (54)	0.001
Clase de nefropatía, n (%)			
III			
IV	4	0	NA
Mixta	24		
V	8		
	1		

IQR, rango intercuartil; SD, desviación estándar; SLEDAI, escala de actividad de lupus; n, número total de pacientes.

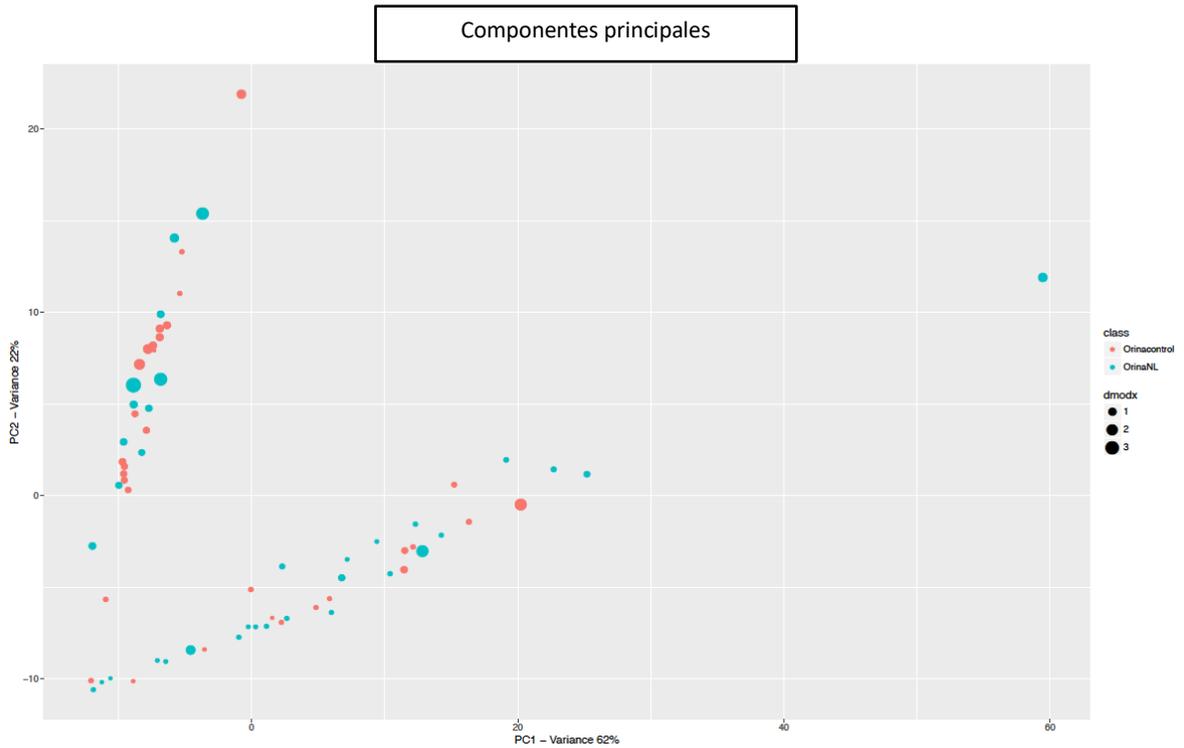


Figura 1. Gráfica de puntaje, componente principal 2 (PC2) vs componente principal 1 (PC1). Punto azul, lupus con nefropatía; Punto rojo, pacientes sin nefropatía.

Identificamos >300 picos correspondientes a metabolitos o fragmento de metabolitos, una vez alineados de acuerdo al índice masa/carga obtuvimos 230 posibles metabolitos (Ver anexos).

En el heatmap observamos como existe agrupación de metabolitos que logran diferenciar entre los pacientes con nefropatía de los pacientes sin nefropatía, sin poder determinar cuál de todos los metabolitos fueron los más relevantes para diferencia los grupos (Figura 4).

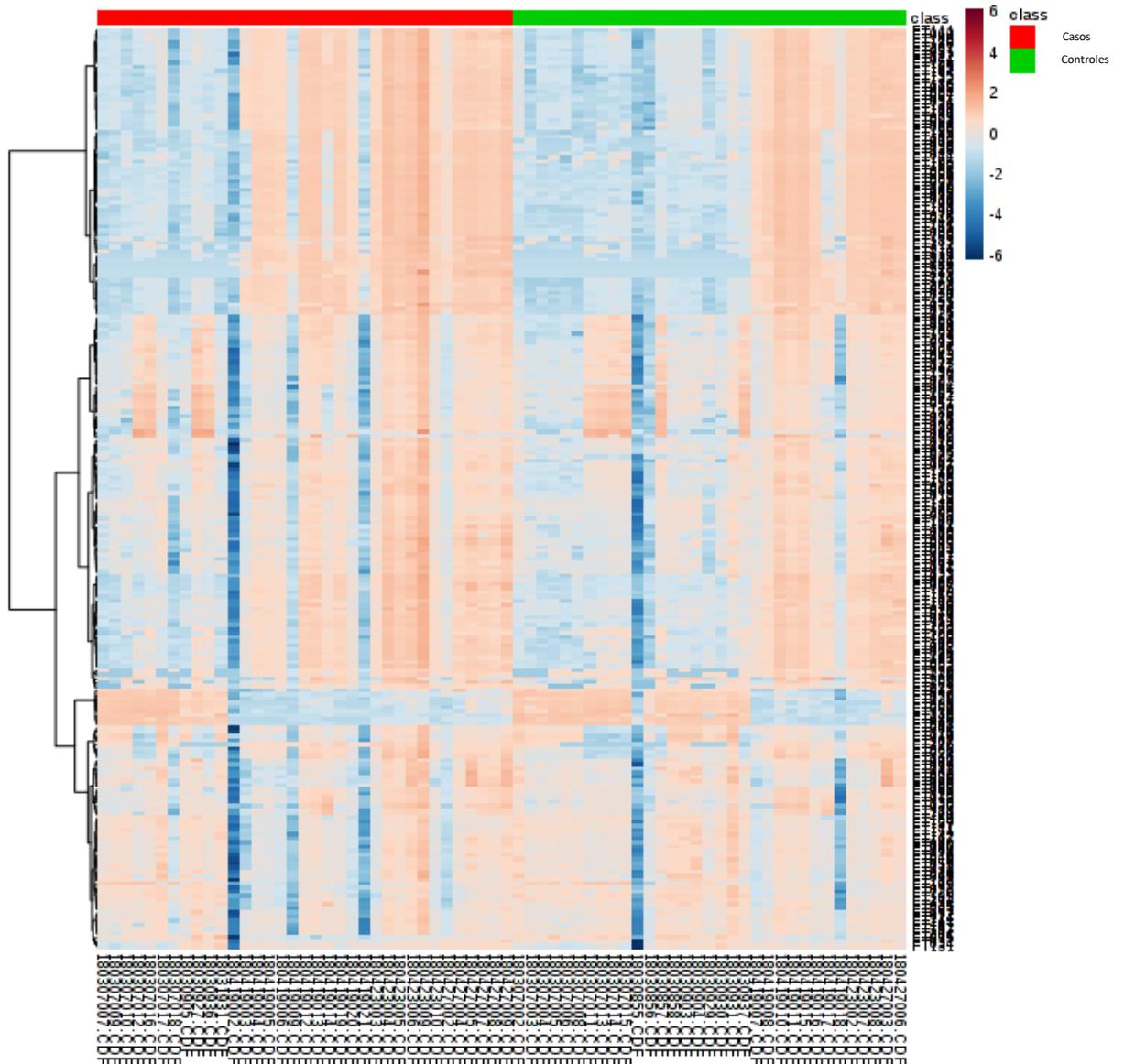


Figura 4. Heatmap, se muestran los metabolitos más relevantes en pacientes con nefropatía lúpica (barra horizontal rojo) vs pacientes sin nefropatía lúpica (barra horizontal verde). Los números de la columna de la derecha representan metabolitos, y los valores en el eje de las x son los pacientes.

A diferencia del heatmap, con el Random Forest observamos cuáles fueron los metabolitos con mayor relevancia para poder diferenciar entre los pacientes con y sin nefropatía (Figura 5). De los 230 picos, con el Random Forest obtuvimos 15 metabolitos que logran identificar a pacientes con nefropatía lúpica ($p < 0.006$). Once de estos metabolitos se encontraron con aumento de expresión en

pacientes con nefropatía lúpica y 4 se encontraron con baja expresión, determinando así la huella metabólica.

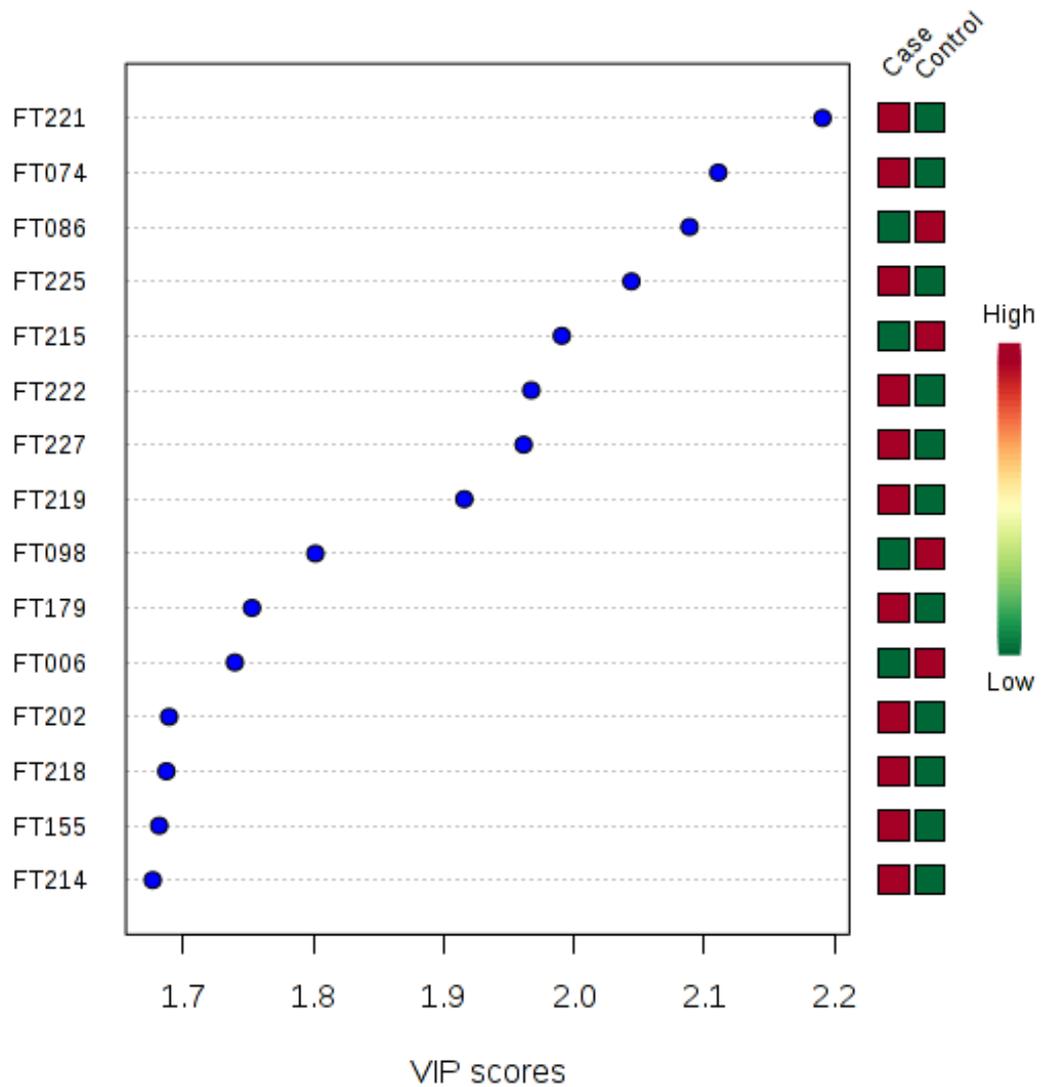


Figura 5. Random Forest. Los metabolitos se grafican en orden de importancia, siendo el superior el más relevante. La barra de color lateral izquierda traduce la mayor expresión del metabolito en rojo y la menor expresión en verde.

Biomarcadores diagnósticos

Como potenciales biomarcadores diagnósticos, seleccionamos a los metabolitos obtenidos en el Random Forest.

Todos los metabolitos mostraron un área bajo la curva entre el 60-66%. Los metabolitos que mostraron diferencias significativas entre los grupos fueron citrulina, ácido 3 hidroxioisheptanoico y ácido 2 propil glutámico (Figura 6). El resto se muestran en anexos.

Al juntar los tres metabolitos antes mencionados, el área bajo la curva no mejoró con respecto al análisis individual (Figura 7).

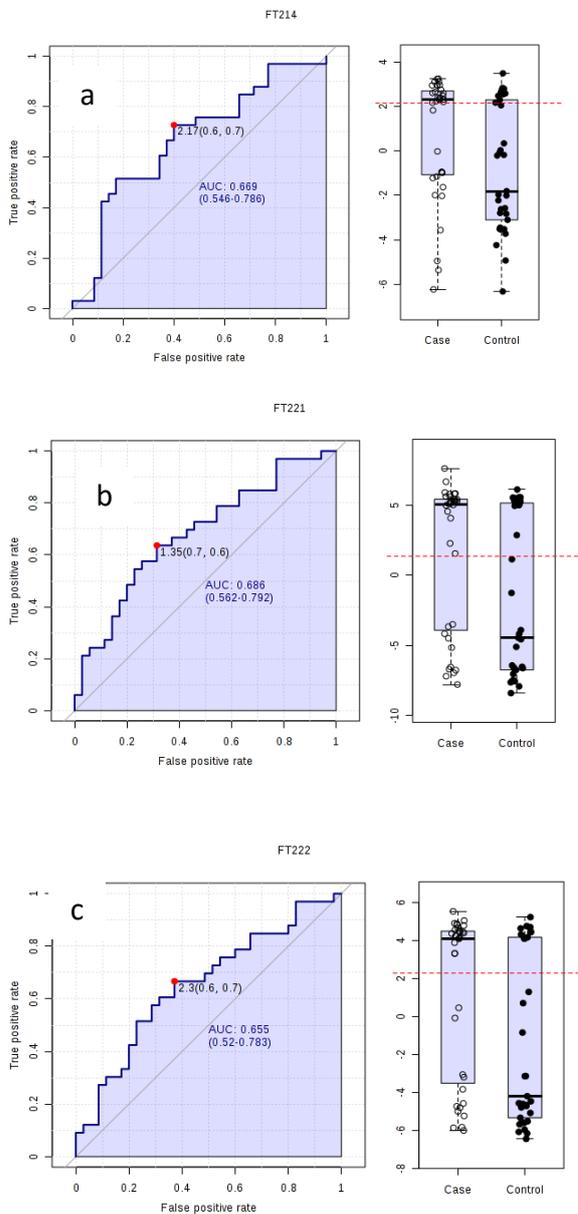


Figura 6. Área bajo la curva y boxplot de los tres metabolitos significativos.

a) Metabolito F214 (ácido 3 hidroxioisheptanoico) se encuentra elevado comparado con controles, teniendo un AUC de 66%; b) FT 221 (ácido 2 propil glutámico), con AUC de 68% y c) FT222 (citrulina) con AUC de 65%.

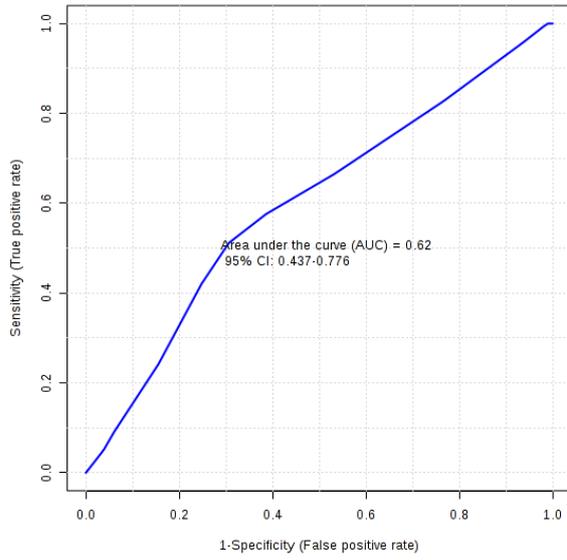


Figura 7. Área bajo la curva de la combinación de los tres metabolitos significativos (FT214, FT 221 y FT 222).

AUC 62%.

DISCUSIÓN.

En nuestro estudio encontramos una huella metabolómica en pacientes con nefropatía lúpica.

Como posibles metabolitos encontrados obtuvimos 4 derivados de vías endógenas, 4 derivados de medicamentos, 12 derivados de tóxicos y 3 metabolitos no identificados. Tres de los derivados de drogas comparten vías con el metabolismo endógeno y solamente uno es producto del metabolismo del ácido valproico. Sin embargo, no se realizó registro del uso de ácido valproico en nuestros pacientes.

Al tomar en cuenta los metabolitos derivados de vías endógenas y los asociados a drogas -excluyendo el derivado del ácido valproico-, encontramos asociación con las siguientes vías metabólicas: taurina e hipotaurina, seleno aminoácido, alanina-aspartato y glutamato, biosíntesis de lisina, cisteína (Ver anexos).

Una de las vías metabólicas con mayor impacto en nuestros resultados fue la relacionado con el metabolismo de la lisina y alanina [58]. Estos aminoácidos son parte fundamental para la formación de proteínas. La glucosilación de la lisina ocasiona cambios estructurales de diversas proteínas como las histonas, ocasionando respuesta autoinmune en algunos modelos [59,60]. Desafortunadamente, el diseño de nuestro estudio no nos permite establecer el papel exacto de estos compuestos metabólicos en la patogenia de la enfermedad.

La huella metabolómica característica en pacientes con nefropatía lúpica consiste en **picos elevados** de: citrulina, alanina, treonina, N-isopropiltereptalaldehidamida, 3,4,4-Trimethyl-1,3,2-oxazaborolidin-2-yl, Borolane, 1-methoxy-, (3Z)-N,2,4-Trimethyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-imine, N-Acetylhistamina; y **picos disminuidos** de: 2-Methylbutane, ácido 3-Hydroxyisoheptanoico.

De los metabolitos que integraron la huella en los pacientes con nefropatía lúpica, seleccionamos tres como potenciales biomarcadores (citrulina, ácido 3 hidroxí-isoheptanoico y ácido 2 propil glutárico) dada la significancia estadística en el análisis de pruebas diagnóstica. El área bajo la curva, la sensibilidad y especificidad de los tres metabolitos fue similar, y al conjuntarlos no mejoró el rendimiento diagnóstico (AUC 65-68%, sensibilidad 60-70% y especificidad 60-70%). Este análisis correspondió a objetivos secundarios, por lo requiere un cálculo de tamaño de muestra de acuerdo a lo obtenido para pruebas diagnósticas.

Debido a la escasa publicación de estudios metabolómicos en lupus eritematoso sistémico con o sin nefropatía, los resultados son heterogéneos [53,61]. Ningún estudio ha logrado reproducir una misma huella metabolómica en lupus; en unos se muestra alteración en la expresión de aminoácidos, en otros se muestran alteración en la expresión de lípidos. Nuestro estudio no es diferente en este aspecto; ninguno de los metabolitos de la huella metabolómica ha sido reportado en estudios previos.

Una de las diferencias de nuestros resultados con el resto publicado, primero radica en la técnica. Wang L y cols. utilizaron espectroscopia por resonancia magnética (NMR), teniendo como beneficio mayor exactitud en la obtención de los metabolitos y la cuantificación de estos. En este estudio existió disminución de algunos aminoácidos como valina, tirosina e incremento en las concentraciones de N-acetyl glicoproteína [32,50]. Logrando distinguir con esta huella entre pacientes con lupus eritematoso de pacientes con artritis reumatoide; con una sensibilidad del 60% y especificidad del 97.1%. Otro estudio que emplea NMR fue el realizado por Guleria y cols. cuyo principal hallazgo fue el incremento en lípidos de cadena corta y acetato, considerándolos potenciales biomarcadores [51].

El resto de los estudios utilizaron la cromatografía de gases o líquidos. Mediante la cromatografía de gases (técnica empleada en nuestro estudio), tenemos menor exactitud en la determinación de los metabolitos, por el uso de métodos

de correlación de información iónica NMR [62]. En el presente estudio utilizamos cromatografía de gases.

Otra diferencia que tomar en cuenta es el tipo de pacientes con lupus incluidos en el resto de los estudios. Solamente dos incluyeron a pacientes con nefropatía lúpica. Uno se enfocó a establecer diferencias con pocos pacientes (<10) entre nefropatía lúpicas (proliferativas y membranosas), con otro tipo de nefropatía primaria, como focal y segmentaria; a pesar del pequeño número de pacientes encontraron que citrato, taurina e hipurato, pudieran ser biomarcadores diagnósticos. En los resultados solo se enfocaron a potenciales biomarcadores, más no al conjunto de metabolitos que determinaron alguna huella [52]. Otro estudio, mencionado en párrafos previos reportado por Guleria y cols., en el que utilizó NMR como técnica de extracción de metabolitos incluyeron: controles, y pacientes lúpicos con y sin nefropatía.

Yan y cols. realizaron un estudio técnicamente similar al nuestro, reportando 23 metabolitos elevados en pacientes con lupus eritematoso sistémico, agrupándose principalmente en las vías metabólicas derivados del metabolismo energético, estrés oxidativo, y metabolismo de nucleótidos [61]. Ninguno de ellos relacionado a nuestros hallazgos. En la metodología no se especificó el manejo de los datos crudos, ni los pasos para la selección de los metabolitos, por lo que la validez de los resultados no es confiable.

Para la identificación de los metabolitos en nuestro estudio utilizamos los valores del índice masa/carga y el tiempo de retención, teniendo como principal limitante la baja exactitud de identificación. Esto es debido a: 1) ruido registrado en los resultados; 2) la desviación de los picos fuera de los valores teóricos, obteniendo falsos-positivos; 3) podemos obtener más de 1 metabolito, con diferente contexto biológico (vías metabólicas endógenas, medicamentos, tóxicos, etc.) y 4) hasta 20% de los picos obtenidos pueden corresponder a fragmentos de metabolitos o metabolitos desconocidos [63,64]. La identificación requiere una tolerancia de 30 partículas por millón (ppm).

En la actualidad no hay un algoritmo que sea 100% confiable para la identificación y selección de metabolitos. Las bases de datos más usadas para la identificación son: NIST (National Institute of Standards and Technology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), HMDB (Human Metabolome Database), Mass Bank y para metabolitos no contenidos en las previas, ChemSpider [62]. La mayoría de estas bases de datos son publicas, requiriendo para la identificación de los metabolitos el índice masa/carga y/o el área de retención. De no encontrar compatibilidad, el compuesto se determina como “no identificado”.

La huella encontrada en el estudio nos permitió diferenciar a pacientes con nefropatía lúpica, de momento asumimos que la diferencia esta asociada al fenotipo de la enfermedad. Sin embargo, debemos de considerar que algunas diferencias basales entre los pacientes pudieron influir en la expresión de dicha huella. Una de estas variables incluidas es la diferencia en el tratamiento recibido entre los grupos.

Con respecto al tratamiento, todos los pacientes con lupus recibieron medicamentos inmunosupresores, que por el mecanismo de acción farmacológico se pudo modificar potencialmente el metaboloma. Mayor proporción de pacientes sin nefropatía lúpica tomaron metotrexato al inicio del estudio, mientras que los pacientes con nefropatía recibieron con mayor frecuencia ciclofosfamida. El metotrexato modifica el metabolismo global celular con implicaciones antiinflamatorias, específicamente en linfocitos CD4+ [65], sin embargo, no se tiene alguna huella metabolómica farmacológica.

La ciclofosfamida, tiene como evento adverso, la cistitis hemorrágica (incidencia 14-42%) [66], siendo este evento un potencial modificador del metaboloma en nuestros pacientes debido a la muestra usada urinaria utilizada. La acroleína es el principal metabolito de la ciclofosfamida asociado a este evento adverso [67,68]. Sin embargo, ninguno de nuestros pacientes desarrolló hematuria macroscópica que orientará al diagnóstico, aunque no descartamos la posibilidad de cistitis subclínica que pudiera haber modificado la huella.

Otros factores no medibles que pudieron modificar la huella metabolómica fueron los hábitos dietéticos que no se contralaron en los pacientes. Y dada las características de la población incluida (situación geográfica, económica, cultural), en pacientes hospitalizados, fue imposible el control de este factor. Debido a la poca información relacionada al metaboloma y los hábitos alimenticio se propone la creación de bases de datos para la identificación del metaboloma en alimentos; hasta el momento con pocos reportes en la literatura [69,70].

De momento la huella se obtuvo mediante los picos espectrales de los metabolitos, por lo que el siguiente paso será la medición de los metabolitos significativos con el estándar y de esta manera obtener un nivel urinario cuantitativo. Debido a la importancia biológica nosotros escogimos de manera arbitraria los metabolitos y sus potenciales vías metabólicas.

Para verificar la reproducibilidad de los metabolitos encontrados, las muestras pueden ser sometidas a otra técnica con una mayor especificidad para la obtención de estructuras químicas tal como NMR, sin embargo, este método es más costoso.

CONCLUSIONES.

Existe una huella metabólica urinaria en pacientes con nefropatía lúpica clínicamente significativa al compararlos con los pacientes con lupus eritematoso sistémico sin nefropatía lúpica.

BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Dooley MA. Clinical and Epidemiologic Features of Lupus Nephritis. In: Wallace JD, Bevara HH, editors. DUBOIS' Lupus Erythematosus Relat. Syndr. 8th ed., Philadelphia, PA: Saunders; 2013, p. 438–54.
- [2] Mok CC, Kwok RCL, Yip PSF. Effect of renal disease on the standardized mortality ratio and life expectancy of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013;65:2154–60. doi:10.1002/art.38006.
- [3] Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:143–53. doi:10.1038/nrrheum.2015.159.
- [4] Alarcón GS, McGwin G, Petri M, Reveille JD, Ramsey-Goldman R, Kimberly RP. Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE. *Lupus* 2002;11:95–101.
- [5] Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:797–808. doi:10.1002/acr.21664.
- [6] Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:241–50.
- [7] Hanly JG, O'Keefe AG, Su L, Urowitz MB, Romero-Diaz J, Gordon C, et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 2015;55:252–62. doi:10.1093/rheumatology/kev311.
- [8] Pons-Estel GJ, Alarcón GS. Lupus in Hispanics: a matter of serious concern. *Cleve Clin J Med* 2012;79:824–34. doi:10.3949/ccjm.79a.12048.
- [9] Pons-Estel B a, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among “Hispanics”. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:1–17. doi:10.1097/01.md.0000104742.42401.e2.
- [10] Kallenberg CGM, Mok CC. Pro; Cyclophosphamide in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2016. doi:10.1093/ndt/gfw069.
- [11] Huong DL, Papo T, Beauvils H, Wechsler B, Blétry O, Baumelou A, et al.

- Renal involvement in systemic lupus erythematosus. A study of 180 patients from a single center. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:148–66.
- [12] Lefaucheur C, Nochy D, Bariety J. [Renal biopsy: procedures, contraindications, complications]. *Néphrologie & Thérapeutique* 2009;5:331–9. doi:10.1016/j.nephro.2009.02.005.
- [13] Uppot RN, Harisinghani MG, Gervais DA. Imaging-guided percutaneous renal biopsy: rationale and approach. *AJR Am J Roentgenol* 2010;194:1443–9. doi:10.2214/AJR.10.4427.
- [14] Ismail MI, Lakouz K, Abdelbary E. Clinicopathological correlations of renal pathology: A single center experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 27:557–62. doi:10.4103/1319-2442.182399.
- [15] Cooper GS, Parks CG, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, Cohen PL, et al. Differences by race, sex and age in the clinical and immunologic features of recently diagnosed systemic lupus erythematosus patients in the southeastern United States. *Lupus* 2002;11:161–7.
- [16] Christopher-Stine L, Petri M, Astor BC, Fine D. Urine protein-to-creatinine ratio is a reliable measure of proteinuria in lupus nephritis. *J Rheumatol* 2004;31:1557–9.
- [17] Austin HA, Illei GG. Membranous lupus nephritis. *Lupus* 2005;14:65–71.
- [18] Zhang W, Yuan M, Hong L, Zhou Q, Chen W, Yang S, et al. Clinical outcomes of lupus nephritis patients with different proportions of crescents. *Lupus* 2016. doi:10.1177/0961203316642312.
- [19] Bargman JM. Why are rheumatologists treating lupus nephritis? *Nat Clin Pract Nephrol* 2007;3:296–7. doi:http://dx.doi.org/10.1038/ncpneph0489.
- [20] Huussen J, Koene RAP, Hilbrands LB. The (fixed) urinary sediment, a simple and useful diagnostic tool in patients with haematuria. *Neth J Med* 2004;62:4–9.
- [21] Martínez-Martínez MU, Abud-Mendoza C, Martínez-Galla D, Antonio B-G, Valadez-CastilloFrancisco. Correlación de la acantocituria con el índice de actividad de la nefritis lúpica estimado en la biopsia renal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2016.
- [22] Dooley L. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- [23] Li Q-Z, Zhen QL, Xie C, Wu T, Mackay M, Aranow C, et al. Identification of

- autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. *J Clin Invest* 2005;115:3428–39. doi:10.1172/JCI23587.
- [24] Lewis MJ, Botto M. Complement deficiencies in humans and animals: links to autoimmunity. *Autoimmunity* 2006;39:367–78. doi:10.1080/08916930600739233.
- [25] Oates JC, Varghese S, Bland AM, Taylor TP, Self SE, Stanislaus R, et al. Prediction of urinary protein markers in lupus nephritis. *Kidney Int* 2005;68:2588–92. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00730.x.
- [26] Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int* 2008;74:799–807. doi:10.1038/ki.2008.316.
- [27] Rovin BH, Zhang X. Biomarkers for lupus nephritis: the quest continues. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1858–65. doi:10.2215/CJN.03530509.
- [28] Wu T, Fu Y, Brekken D, Yan M, Zhou XJ, Vanarsa K, et al. Urine proteome scans uncover total urinary protease, prostaglandin D synthase, serum amyloid P, and superoxide dismutase as potential markers of lupus nephritis. *J Immunol* 2010;184:2183–93. doi:10.4049/jimmunol.0900292.
- [29] Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Suzuki M, Petri M, Kiani AN, et al. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2687–97. doi:10.1002/art.34426.
- [30] Consolaro A, Varnier GC, Martini A, Ravelli A. Advances in biomarkers for paediatric rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:265–75. doi:10.1038/nrrheum.2014.208.
- [31] Arriens C, Mohan C. Systemic lupus erythematosus diagnostics in the “omics” era. *Int J Clin Rheumatol* 2013;8:671–87. doi:10.2217/ijr.13.59.
- [32] Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48:155–71.
- [33] Guma M, Tiziani S, Firestein GS. Metabolomics in rheumatic diseases: desperately seeking biomarkers. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:269–81. doi:10.1038/nrrheum.2016.1.
- [34] Kosmidis AK, Kamisoglu K, Calvano SE, Corbett SA, Androulakis IP. Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities. *Crit Rev Biomed*

- Eng 2013;41:205–21.
- [35] O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 2016;16:553–65. doi:10.1038/nri.2016.70.
- [36] Yang Z, Matteson EL, Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther* 2015;17:29. doi:10.1186/s13075-015-0542-4.
- [37] German JB, Hammock BD, Watkins SM. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics* 2005;1:3–9. doi:10.1007/s11306-005-1102-8.
- [38] Ding H, Mohan C. Connective tissue diseases: Promises and challenges of metabolomics in SLE. *Nat Publ Gr* 2016. doi:10.1038/nrrheum.2016.163.
- [39] Buzatto AZ, de Sousa AC, Guedes SF, Cieslarová Z, Simionato AVC. Metabolomic investigation of human diseases biomarkers by CE and LC coupled to MS. *Electrophoresis* 2014;35:1285–307. doi:10.1002/elps.201300470.
- [40] Menni C, Zierer J, Valdes AM, Spector TD. Mixing omics: combining genetics and metabolomics to study rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:174–81. doi:10.1038/nrrheum.2017.5.
- [41] Armitage EG, Southam AD. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. *Metabolomics* 2016;12:146. doi:10.1007/s11306-016-1093-7.
- [42] Guertin KA, Moore SC, Sampson JN, Huang W-Y, Xiao Q, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Metabolomics in nutritional epidemiology: identifying metabolites associated with diet and quantifying their potential to uncover diet-disease relations in populations. *Am J Clin Nutr* 2014;100:208–17. doi:10.3945/ajcn.113.078758.
- [43] Menni C, Zhai G, MacGregor A, Prehn C, Römisch-Margl W, Suhre K, et al. Targeted metabolomics profiles are strongly correlated with nutritional patterns in women. *Metabolomics* 2013;9:506–14. doi:10.1007/s11306-012-0469-6.
- [44] Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 2017;542:177–85. doi:10.1038/nature21363.

- [45] Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:263–9. doi:10.1038/nrm3314.
- [46] Wishart D. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal Chem* 2008.
- [47] Holčápek M, Jirásko R, Lísa M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A* 2012;1259:3–15. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.072.
- [48] Jutley GS, Young SP. Metabolomics to identify biomarkers and as a predictive tool in inflammatory diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2015;29:770–82. doi:10.1016/j.berh.2016.02.010.
- [49] Wu T, Xie C, Han J, Ye Y, Weiel J, Li Q, et al. Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2012;7:e37210. doi:10.1371/journal.pone.0037210.
- [50] Ouyang X, Dai Y, Wen JL, Wang LX. ¹H NMR-based metabolomic study of metabolic profiling for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011;20:1411–20. doi:10.1177/0961203311418707.
- [51] Guleria A, Pratap A, Dubey D, Rawat A, Chaurasia S, Sukesh E, et al. NMR based serum metabolomics reveals a distinctive signature in patients with Lupus Nephritis. *Sci Rep* 2016;6:35309. doi:10.1038/srep35309.
- [52] Romick-Rosendale LE, Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Nelson S, Petri M, et al. Identification of urinary metabolites that distinguish membranous lupus nephritis from proliferative lupus nephritis and focal segmental glomerulosclerosis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R199. doi:10.1186/ar3530.
- [53] Bengtsson AA, Trygg J, Wuttge DM, Sturfelt G, Theander E, Donten M, et al. Metabolic Profiling of Systemic Lupus Erythematosus and Comparison with Primary Sjögren's Syndrome and Systemic Sclerosis. *PLoS One* 2016;11:e0159384. doi:10.1371/journal.pone.0159384.
- [54] Rhee EP. Metabolomics and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2015;24:371–9. doi:10.1097/MNH.000000000000136.
- [55] Osborne JW, Costello AB. Sample size and subject to item ratio in principal components analysis. - *Practical Assessment, Research & Evaluation* 2004;9.
- [56] Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be

- performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol* 2005;58:859–62. doi:10.1016/j.jclinepi.2004.12.009.
- [57] de Souza LP, Naake T, Tohge T, Fernie AR. From chromatogram to analyte to metabolite. How to pick horses for courses from the massive web resources for mass spectral plant metabolomics. *Gigascience* 2017;6:1–20. doi:10.1093/gigascience/gix037.
- [58] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J* 1984;219:345–73.
- [59] Araki Y, Mimura T. The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm* 2017;2017:1–12. doi:10.1155/2017/2608605.
- [60] Mir AR, Moinuddin. Glycooxidation of histone proteins in autoimmune disorders. *Clin Chim Acta* 2015;450:25–30. doi:10.1016/j.cca.2015.07.029.
- [61] Yan B, Huang J, Dong F, Yang L, Huang C, Gao M, et al. Urinary metabolomic study of systemic lupus erythematosus based on gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2016;30:1877–81. doi:10.1002/bmc.3734.
- [62] Lynn KS, Cheng ML, Chen YR, Hsu C, Chen A, Lih TM, et al. Metabolite identification for mass spectrometry-based metabolomics using multiple types of correlated ion information. *Anal Chem* 2015;87:2143–51. doi:10.1021/ac503325c.
- [63] Scheltema R, Decuyper S, Dujardin J, Watson D, Jansen R, Breitling R. Simple data-reduction method for high-resolution LC-MS data in metabolomics. *Bioanalysis* 2009;1:1551–7. doi:10.4155/bio.09.146.
- [64] Brown M, Dunn WB, Dobson P, Patel Y, Winder CL, Francis-McIntyre S, et al. Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst* 2009;134:1322–32. doi:10.1039/b901179j.
- [65] Sole Chimenti M, Tucci P, Candi E, Perricone R, Melino G, Willis A. Metabolic profiling of human CD4+ cells following treatment with methotrexate and anti-TNF- α infliximab. *Cell Cycle* 2013;12:3025–36. doi:10.4161/cc.26067.
- [66] Monach PA, Arnold LM, Merkel PA. Incidence and prevention of bladder

- toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: A data-driven review. *Arthritis Rheum* 2010;62:9–21. doi:10.1002/art.25061.
- [67] Korkmaz A, Topal T, Oter S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol* 2007;23:303–12. doi:10.1007/s10565-006-0078-0.
- [68] Saito Y, Kumamoto T, Shiraiwa M, Sonoda T, Arakawa A, Hashimoto H, et al. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in young patients with solid tumors: A single institution study. *Asia Pac J Clin Oncol* 2018. doi:10.1111/ajco.13048.
- [69] Edmands WM, Ferrari P, Rothwell JA, Rinaldi S, Slimani N, Barupal DK, et al. Polyphenol metabolome in human urine and its association with intake of polyphenol-rich foods across European countries. *Am J Clin Nutr* 2015;102:905–13. doi:10.3945/ajcn.114.101881.
- [70] Scalbert A, Brennan L, Manach C, Andres-Lacueva C, Dragsted LO, Draper J, et al. The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am J Clin Nutr* 2014;99:1286–308. doi:10.3945/ajcn.113.076133.
- [71] Clinical competence in percutaneous renal biopsy. Health and Public Policy Committee. American College of Physicians. *Ann Intern Med* 1988;108:301–3.

ANEXOS.

Anexo. IA. Consentimiento Informado.

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Tesis: Identificación de la huella metabólica urinaria como diagnóstico de nefropatía lúpica clínicamente significativa.

San Luis Potosí, S.L.P.

Fecha: _____

Con el presente, se le invita a participar en un estudio de investigación con el objetivo de buscar una sustancia que nos permita diagnosticar de manera más sencilla el problema renal secundario al lupus eritematoso sistémico. Se obtendrán pequeña cantidad de sangre, orina y biopsia renal (solo a los pacientes con problema renal).

Si los resultados surgen de acuerdo con lo esperado, en un futuro no será necesario realizar biopsia renal para decidir que tratamiento es el que debemos utilizar en pacientes como usted.

Todos los procedimientos que se realizarán son parte de los estudios habituales que se aplican a todos los pacientes con la misma condición que usted. El riesgo de realizar extracción de sangre es: equimosis (moretón) en el sitio donde se puncionó; y más raro que suceda infección en ese sitio. Las complicaciones al realizar biopsia renal (explicado y consentido por el nefrólogo) en los pacientes que la vayan a necesitar son: hemorragia, infección y muerte.

Los resultados obtenidos serán analizados e informados al concluir el estudio, sin embargo, independiente de los mismos usted continuará recibiendo el tratamiento indicado por el reumatólogo y nefrólogo correspondiente.

Toda la información para el estudio será manejada de forma confidencial por los integrantes del estudio. Ninguna persona ajena al mismo tendrá acceso a esta información.

Accedo a participar de manera voluntaria en el estudio. Se respondieron todas mis dudas. En caso de existir algún comentario posterior a esta entrevista o alguna duda, se podrá dirigir con el investigador principal:

Dr. David Alejandro Herrera van Oostdam

Reumatólogo

Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis, Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Teléfono. 444-834-2781

Dr. Josué Sidonio Rodríguez Cuevas

Presidente del Comité de Ética en Investigación Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Av. Venustiano Carranza 2395, Col. Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78290,
Tel (444) 834 27 01, Ext.1710

Nombre y firma del participante

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Dirección y relación con el paciente.

Anexo. IB. Carta de asentimiento informado. Pacientes menores de edad.

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Tesis: Identificación de la huella metabólica urinaria como diagnóstico de nefropatía lúpica clínicamente significativa.

San Luis Potosí, S.L.P.

Fecha: _____

Con el presente, se le invita a participar a su hijo a un estudio de investigación con el objetivo de buscar una sustancia que nos permita diagnosticar de manera más sencilla el problema renal secundario al lupus eritematoso sistémico. Se obtendrán muestras de sangre, orina del paciente.

Si los resultados surgen de acuerdo con lo esperado, en un futuro no será necesario realizar biopsia renal a pacientes con problemas renales debida al lupus eritematoso sistémico.

Si los resultados surgen de acuerdo con lo esperado, en un futuro no será necesario realizar biopsia renal para decidir que tratamiento es el que debemos utilizar en pacientes como usted.

Todos los procedimientos que se realizarán son parte de los estudios habituales que se aplican a todos los pacientes con la misma condición que usted. El riesgo de realizar extracción de sangre es: equimosis (moretón) en el sitio donde se puncionó; y más raro que suceda infección en ese sitio. Las complicaciones al realizar biopsia renal (explicado y consentido por el nefrólogo) en los pacientes que la vayan a necesitar son: hemorragia, infección y muerte.

Los resultados obtenidos serán analizados e informados al concluir el estudio, sin embargo, independiente de los mismos usted continuará recibiendo el tratamiento indicado por el reumatólogo y nefrólogo correspondiente.

Siendo los padres o tutores de _____ accedemos que participe de manera voluntaria en el estudio. Se respondieron todas mis dudas.

En caso de existir algún comentario posterior a esta entrevista o alguna duda, se podrá dirigir con el investigador principal:

Dr. David Alejandro Herrera van Oostdam

Reumatólogo

Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis, Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Teléfono. 444-834-2781

Nombre y firma del participante
(Padre)

*Nombre y firma

Nombre y firma del que obtiene el consentimiento
(Madre)

*Nombre y firma

Nombre y firma del testigo

Anexo II. Aviso de privacidad.

Mediante el aviso de privacidad usted como paciente podrá conocer la información que se solicitada y recabada en el estudio actual, lo cuál incluye información de la institución y personal participante.

Los datos que obtendremos de usted son:

- 1.- Nombre, fecha de nacimiento
- 2.- Antecedentes de enfermedades previas, cirugías previas, y medicamentos que esta tomando actualmente
- 3.- Obtendremos los resultados de laboratorio y biopsias obtenidos durante su hospitalización o durante su estancia en la consulta.

Uso de datos.

Adicional a confirmación de su identidad, lo utilizaremos para el estudio de investigación titulado “Identificación de la huella metabólica urinaria en nefropatía lúpica”.

Personal autorizado para uso de tu información.

Únicamente los médicos y personal directamente involucrado con el estudio.

Fragmento extraído del aviso de privacidad del Hospital Central (sitio donde se realizar el estudio)

“¿Cómo puede usted limitar el uso o divulgación de su información personal?”

Para limitar la divulgación de su información personal puede emplear cualquiera de estos instrumentos:

- Presentar personalmente por escrito su solicitud en nuestro domicilio Av. Venustiano Carranza # 2395 Zona Universitaria, cp.78290, En la Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis
- Llamando gratuitamente al teléfono 014448 342709 Ext. 1783

¿Cómo acceder, rectificar, cancelar u oponerse al tratamiento de datos personales?

Al ejercicio de los derechos acceso, rectificación, cancelación u oposición al tratamiento de su información se le denomina Derechos ARCO por sus iniciales: Acceder, Rectificar, Cancelar u Oponerse a dicho tratamiento. Usted puede ejercer esos derechos y también puede revocar el consentimiento, si presenta su solicitud en los mismos términos señalados.

Con la solicitud ARCO, usted debe de ser informado si en la institución (en este caso el Hospital) existe alguna información en la base de datos con la que ahí se cuenta (Acceder). También puede solicitar que se corrijan los datos cuando son incorrectos, imprecisos, incompletos o estén desactualizados (Rectificar), o bien bloquear los datos o en su caso suprimirlos (Cancelar) y de igual modo oponerse a que el hospital se abstenga de proporcionar sus datos en determinadas situaciones (Oponerse).

Para hacer valer cualquiera de los Derechos ARCO, deberá usted de solicitarlo por escrito o por correo electrónico, proporcionando lo siguiente:

- Nombre y domicilio o medio para recibir notificaciones.
- Anexar identificación o documento que acredite su personalidad.
- Explicación clara y precisa de los datos a los que desea se aplique el ARCO, acompañado de una JUSTIFICACION documentada.
- Cualquier otro elemento que facilite la localización de sus datos.

Cuando realice usted la revocación de algún dato, es importante conservar la constancia de su solicitud, ya que, de no obtener respuesta o no quedar satisfecho con ella, pueda usted acudir al Instituto Federal de Acceso a la Información Pública y de Protección de Datos (IFAI). “

Anexo III. Carta de aceptación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.



San Luis Potosí, S.L.P., a 02 de marzo de 2017

Dr. David Alejandro Herrera van Oostdam
Investigador Principal:

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado “Identificación de la huella metabolómica urinaria como diagnóstico de nefropatía lúpica clínicamente significativa”, fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 14 CI 24 028 083, así como por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427, y fue dictaminado como:

APROBADO

El número de registro es 13-17, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a ambos comités.

De igual forma pido sea tan amable de comunicar a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación: la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe final pertinente.

*Se le recuerda que todos los pacientes que participen en el estudio deben firmar la versión sellada del formato de consentimiento informado.

Atentamente


Dra. Ma. Del Pilar Fonseca Leal
Sub-Directora de Educación e Investigación en Salud
Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”



C.C.P. Archivo

Av. Venustiano Carranza No. 2395
Zona Universitaria
San Luis Potosí, S.L.P. C.P. 78290
Tel. 01 (444) 198-10-00
www.hospitalcentral.gob.mx
www.slp.gob.mx

Anexo IV. Análisis metabolómico.

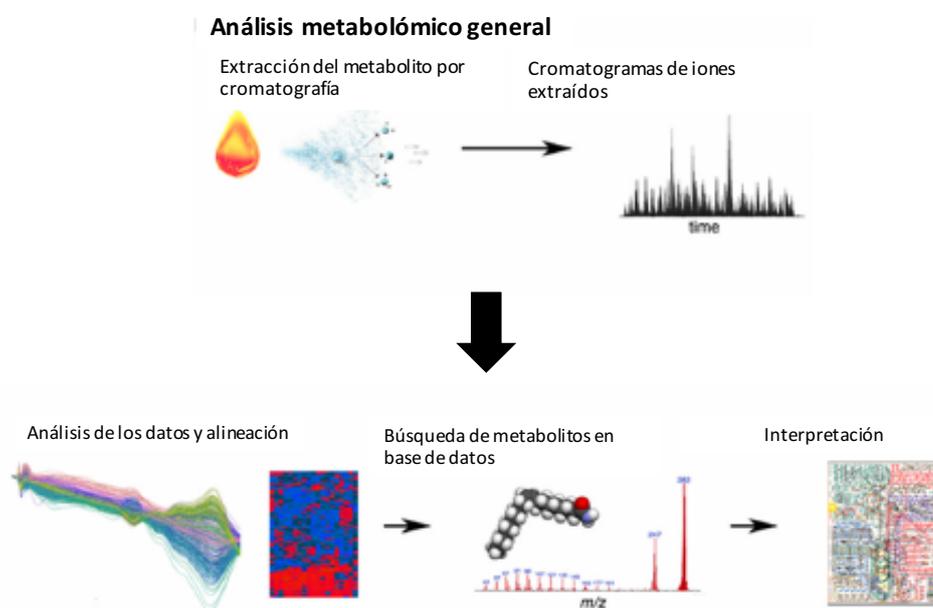
Se almacenaron las muestras a -70°C después de la recolección. Posteriormente se realizó Microextracción en Fase Sólida (SPME), la cual fue utilizada como método de extracción y la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas con Impacto Electrónico (GC-MS-EI), como sistema de separación y detección. Las fibras que se evaluaron de SPME fueron las de Carboxen-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) de 85 y 75 μm , Carbowax-Divinilbenceno (CW-DVB) de 65 μm y PDMS de 100 μm .

El análisis se realizó utilizando un Cromatógrafo de Gases (Hewlett Packard HP 6890) acoplado a un detector de Espectrometría de Masas con Impacto Electrónico (HP 5973) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con una columna HP 5MS (60m x 0.25 mm x 0.25 μm). Se utilizó la Espectrometría de Masas en modo SCAN (30-300 m/z) para identificar con una exactitud de 99% los compuestos analizados. El equipo realiza este procedimiento mediante la comparación del espectro del analito con respecto a la biblioteca de espectrómetros de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST) (cuenta con más de 130000 espectros de masas). Para la cuantificación de los compuestos seleccionaremos el modo Monitoreo Selectivo de Iones (SIM) a través de los fragmentos de masa específicos de los compuestos.

El análisis puede realizarse de tres maneras, 1) **identificación del metabolito**, esto se realiza mediante NMR, en donde cada uno de los picos obtenidos corresponde a un metabolito específico; 2) **métodos no supervisados: análisis de componentes principales (PCA)**, se trata de un algoritmo que se encarga de reducir dimensiones de una gran base de datos, con el fin de explicar lo más que se puede la variación de los datos. Los componentes principales son ortogonales (no relacionados), y los primeros componentes considerados son los que tienen mayor variación. Una vez encontrados los componentes principales se graficarán en un mapa de PCA. Debido a que los componentes contienen la mayor variabilidad, estos aparecerán como puntos agrupados en el mapa. Cada conjunto representará una huella metabolómica distinta. Estas huellas pueden

ser utilizadas como marcadores diagnósticos o pronósticos; **3) métodos supervisados**, este tipo de análisis incluye análisis discriminativo de cuadrados parciales y ortogonales, en este caso se realizan descripción de matriz y de resultados para definir una superficie en un espacio dimensional n que separa a los datos en clases; **4) análisis de trayectoria geométrica**; **5) modelaje basado en entropía**; **6) algoritmos genéticos, tipo contracción de regresión o Lasso**.

Además, se utilizó Flash Gas Chromatography Electronic Nose (Heracle, ALPHA M.O.S.) que incluye una base de datos que contiene 295,000 índices de kovats obtenidos de 44,000 compuestos químicos. Con dos columnas con diferente polaridad en paralelo la DB-5 (5% Phenyl-95% dymethylpolisiloxano) y la DB-1701 (14% Cyanopropylephenyl-86% dimethyl polisiloxano). Además de 2 detectores de ionización de flama para aumentar la sensibilidad.



Anexo. V. Biopsia renal percutánea.

En los pacientes que cumplan criterios para nefropatía y lúpica y para toma de biopsia se obtendrá consentimiento informado para el procedimiento.

Se colocó al paciente en posición prona.

El procedimiento se realizó mediante ultrasonido, colocando el transductor en el sitio contralateral de donde se pretende puncionar. Una vez localizado el polo inferior se lavó el sitio de punción, y se administró lidocaína al 1%. Una vez anestesiado el sitio se introdujo la aguja de biopsia extrayendo 2 biopsias. Los especímenes se enviaron al nefro-patólogo para su evaluación.

La vigilancia post-biopsia consistió en la toma de presión arterial cada 15 minutos las primeras dos horas y posteriormente cada hora en las siguientes 4 horas. Adicional se cuantificó la diuresis para verificar vaya disminuyendo la hematuria macroscópica.

Contraindicaciones.

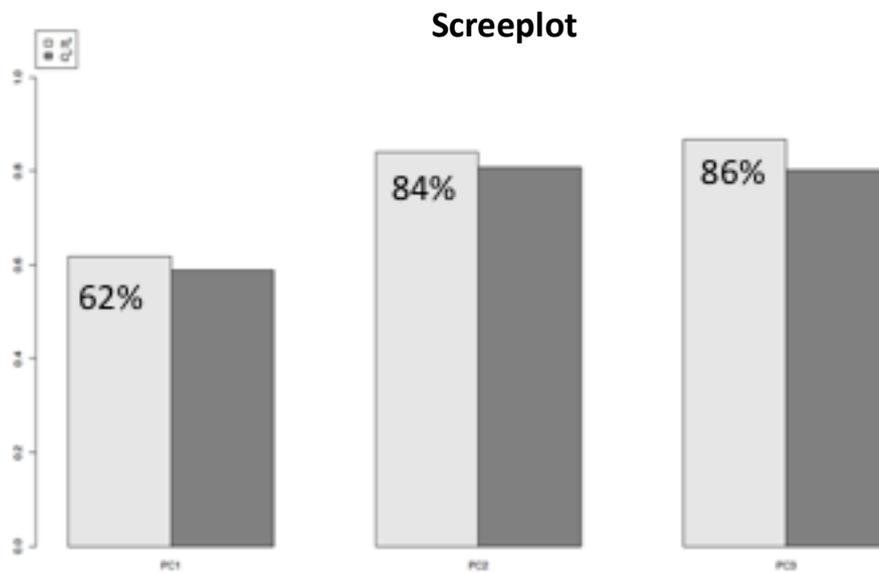
Absolutas: hipertensión grave – no controlada, diátesis hemorrágica, infección renal o peri--renal activa e infección cutánea en el sitio donde se pretende realizar la biopsia.

Relativas: poca cooperación del paciente, anormalidades anatómicas, riñones pequeños o riñón único [71].

Complicaciones. Las complicaciones leves se observan en el 13% siendo lo más frecuente dolor moderado en el sitio de punción; del total de complicaciones 6-7 % se consideran graves y 0.1% ponen en peligro la vida.

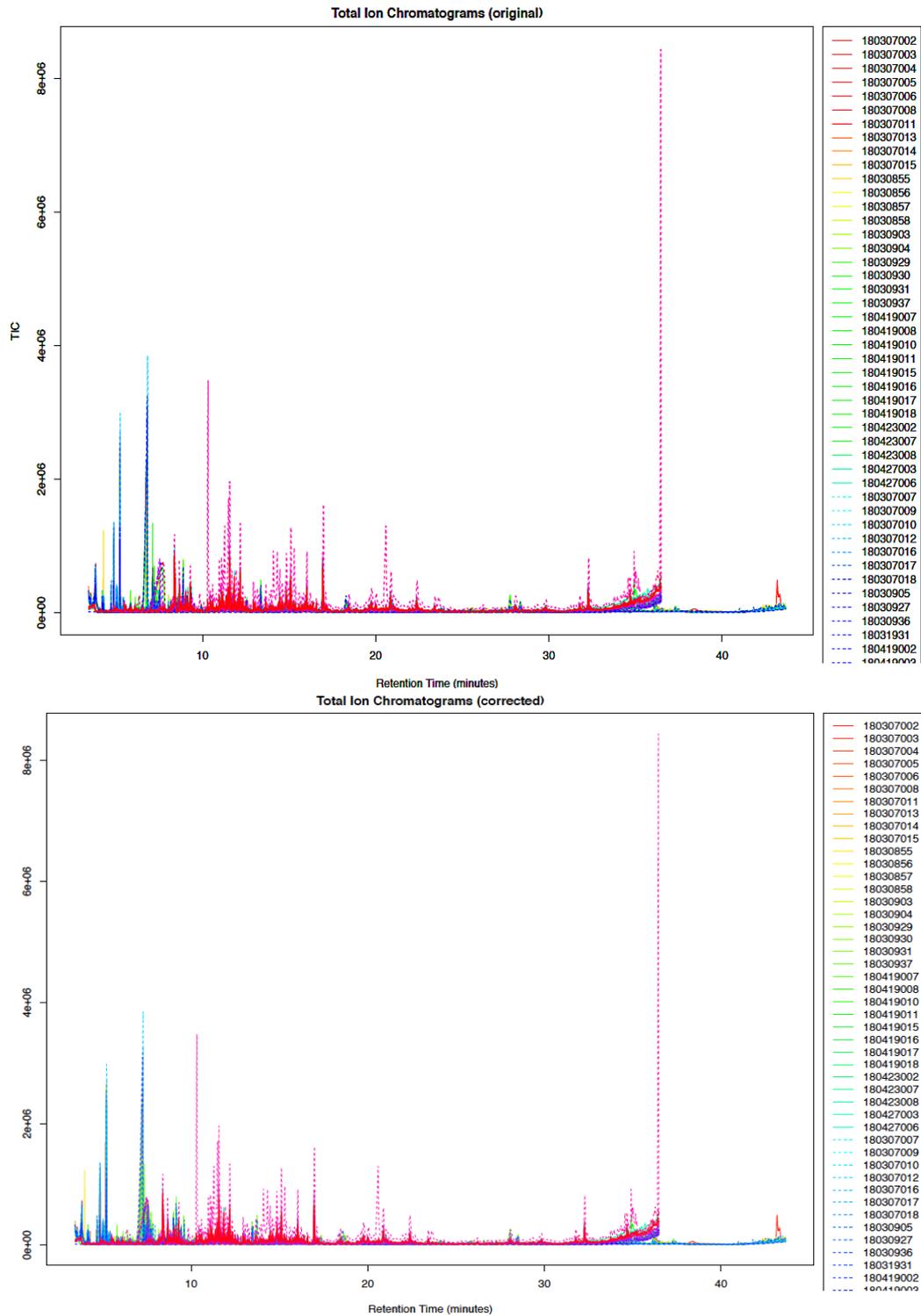
El 90% de las complicaciones suceden en las primeras 24hrs de la biopsia [12].

Anexo VI. Resultados complementarios.

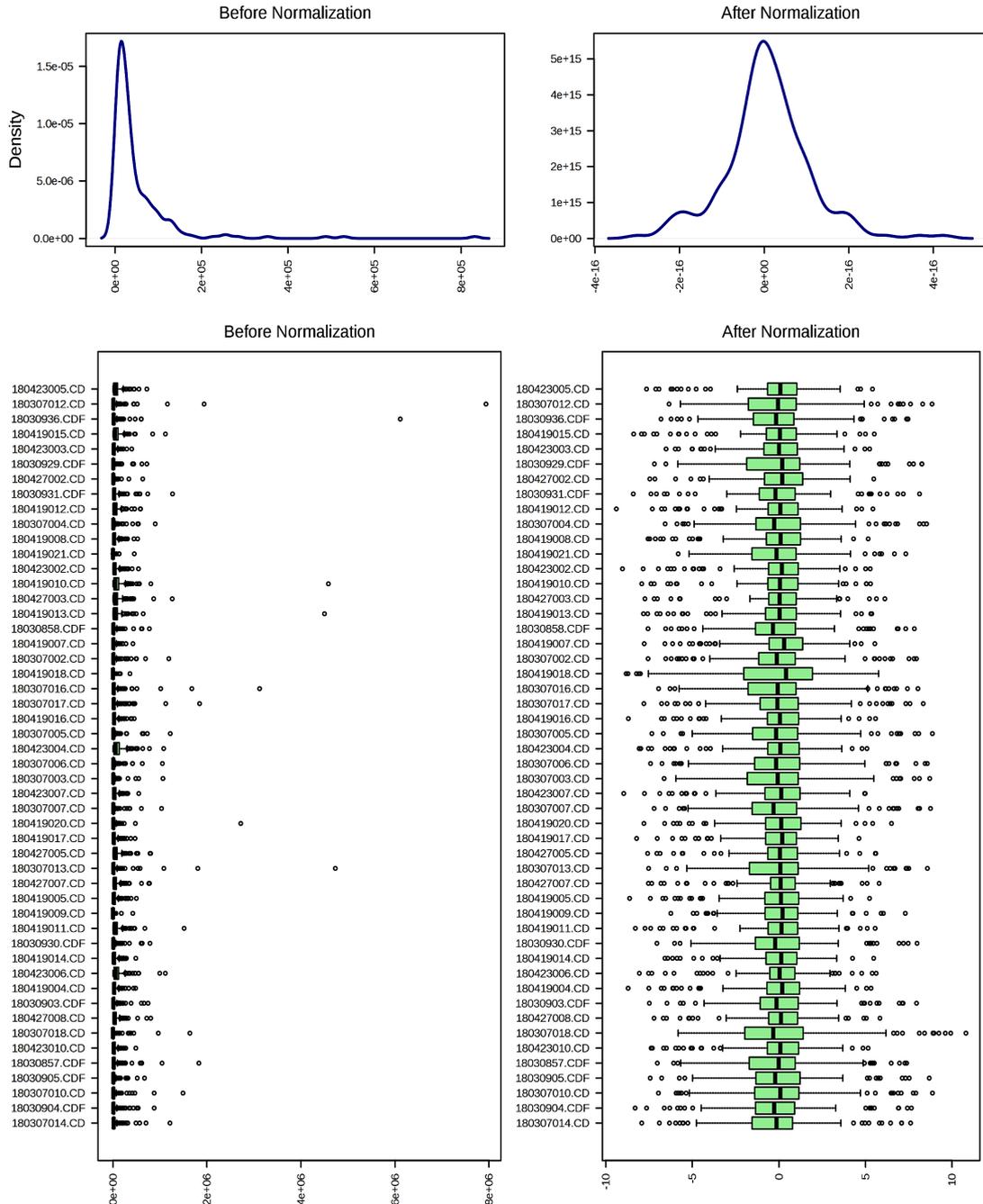


Gráfica de screepplot. Muestra el porcentaje acumulado de los tres primeros componentes principales. Varianzas PC1: 62%, PC2: 22%, PC3: 2%. Varianza acumulada de los tres componentes 86%.

Cromatograma de metabolitos. Datos originales y alineados.



Distribución de datos pre y post normalizados.



Pruebas diagnósticas de metabolitos significativos.

Tabla de pruebas diagnósticas. Metabolitos significativos obtenidos por Random Forest.

Codigo	Nombre del metabolito	Valor logarítmico	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo	
					positivo	Valor de p
FT214	Ácido 3-Hydroxi-isoheptanoico	2.73	0.9	0.28	1.27	0.02
FT222	Citrulina	4.45	0.84	0.37	1.34	0.01
FT221	Ácido propil gutárico	5.5	0.9	0.25	1.22	0.008
FT086	2-metilbutano	-6.8	0.93	0.02	0.99	0.037
FT225	Alanina	5.05	0.9	0.31	1.32	0.01
FT227	N-Isopropiltetraphthalaldehydamida	3.79	0.81	0.28	1.14	0.01
FT218	Nw-Acetilhistamina	2.37	0.96	0.14	1.13	0.02
FT006	NA	-5.9	0.9	0.1	1.06	0.06
FT074	NA	0.27	0.69	0.57	1.62	0.01
FT098	NA	-8.6	0.9	0.08	0.99	0.059
FT155	Bolonano 1 metoxi	2.26	0.87	0.22	1.13	0.01
FT179	3,4,4-Trimetil-1,3,2-oxazaborolidina-2-yl	2.7	0.78	0.31	1.19	0.01
FT202	(3Z)-N,2,4-Trimetil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-imina	2.65	0.75	0.37	1.15	0.02
FT219	Octahidropirrol[1,2-a]pirazina-hidrogeno cloruro (1/1)	3.08	0.93	0.34	1.42	0.016

Tres de los metabolitos, FT006, FT074, FT098, no se lograron identificar en ninguna base de datos. Por lo que se desconoce su origen.

Vías metabólicas de los metabolitos encontrados.

