

La heterogeneidad del lupus eritematoso sistémico: buscando una respuesta molecular

Marta E. Alarcón Riquelme^{1,2}

¹Pfizer – Universidad de Granada – Gobierno de Andalucía, Centro para la Investigación Genómica y Oncológica (GENYO). Granada, España

²Unidad de Enfermedades Inflammatorias Crónicas, Instituto de Medicina Ambiental, Karolinska Institutet, Solna, Suecia.

Autor para correspondencia: Marta E. Alarcón-Riquelme

Correo electrónico: marta.alarcon@genyo.es

Resumen

La heterogeneidad del lupus es una limitante al momento de diseñar estudios clínicos, así como también para nuestra facultad de comprender de los mecanismos de la enfermedad. Los análisis previos a las nuevas tecnologías para la detección del transcriptoma de célula única trabajaron en la identificación de patrones moleculares, como la firma del interferón en sangre total, o a través del análisis de poblaciones celulares principales separadas, como son las células CD4+. Los análisis de patrones moleculares se han enfocado primordialmente en el transcriptoma y en los cambios de metilación del ADN. Ya se han publicado los primeros estudios de transcriptoma de célula única para células sanguíneas mononucleares y para tejidos, riñón total, túbulos y queratinocitos de piel. Estos últimos han definido patrones de no-respuesta al tratamiento. Aún falta mucho para que los métodos sean de utilidad en la práctica clínica.

Palabras claves: estratificación, lupus eritematosos sistémico, criterios de clasificación, transcriptoma, epigenética, metilación.

The heterogeneity of systemic lupus erythematosus: looking for a molecular answer

Abstract

The heterogeneity of SLE is a major limitation when designing clinical trials and understanding the mechanisms of the disease. The analyses conducted before the new technologies for the identification of the single cell transcriptome focused on the detection of molecular patterns such as interferon signature in total blood or through the analysis of major separate cell populations, such as CD4+ cells. The analyses of molecular patterns have mainly focused on the transcriptome and DNA methylation changes. The first studies on single cell transcriptomics have now been published for

mononuclear blood cells and tissues, total kidney, tubules and skin keratinocytes. The latter have defined patterns of nonresponse to treatment. However, much work still needs to be done to be able to use these methods in clinical practice.

Key words: stratification, systemic lupus erythematosus, classification criteria, transcriptome, epigenetics, methylation.

Introducción

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad altamente heterogénea y dicha heterogeneidad ha tenido un marcado impacto sobre cuán tempranamente se diagnostica la enfermedad, cómo se tratan los pacientes, e incluso sobre cómo se reportan los resultados de las investigaciones. El LES es una enfermedad con un inicio insidioso que puede presentarse de repente como una exacerbación seria y que amenaza la vida del paciente, con varias manifestaciones muy inespecíficas.

El uso de métodos moleculares, utilizando células sanguíneas o tejidos para la estratificación de la enfermedad en grupos moleculares significativos que representen los mecanismos de la enfermedad en el paciente, apenas está en sus comienzos. Dependemos de los parámetros clínicos disponibles que se basan en manifestaciones orgánicas específicas de la enfermedad; es decir, cuando ya los pacientes acusan diversos grados de daño orgánico. Los criterios de clasificación, los índices de la actividad de la enfermedad y los índices de daño – que suelen ser parámetros no medibles, subjetivos y semi-cuantitativos -, limitan nuestra capacidad para utilizar herramientas moleculares con mayor precisión. La gran heterogeneidad del LES se evidencia principalmente cuando se llevan a cabo estudios clínicos, al momento de definir los criterios de valoración o la respuesta.

El presente artículo es una actualización de las herramientas moleculares disponibles para clasificar a los pacientes con lupus en grupos clínicamente pertinentes. Se trata de una información valiosa para el uso de nuevos medicamentos biológicos y eventualmente mostrar los patrones moleculares de los pacientes que más se beneficiarían de un determinado fármaco, a la vez que ayudaría a descubrir nuevos medicamentos. Uno de los avances más importantes ha sido el descubrimiento y posterior confirmación de la impronta genómica del interferón tipo 1 (IGS). La impronta genómica del interferón tipo 1 se define por la expresión de un grupo importante de genes que caracterizan los eventos de señalización aguas abajo del IFN tipo 1 (IFN-I, principalmente IFN α e IFN β), descritos originalmente en LES^{1, 2} y posteriormente en otras enfermedades³. De hecho, si bien es cierto que los pacientes pediátricos con LES muestran una alta prevalencia de ambos (70% de los pacientes tienen una impronta de interferón), no es así en los pacientes adultos y, en muchos casos, la etnia y los aspectos económicos también son importantes al definir el tipo de enfermedad que presentan^{4, 5}.

Por lo tanto, predecir el tipo de vía molecular que desarrollará un paciente con LES es cada vez más importante. De hecho, yo diría que los diagnósticos clínicos limitan las posibilidades de definir el patrón molecular de un individuo, dado que muchos de dichos patrones están relacionados con procesos inflamatorios que pueden ser compartidos con muchas otras enfermedades y no se limitan a las patologías autoinmunes. En realidad, tal vez tengamos que reconsiderar el término autoinmunidad.

De la misma manera, tal vez incluso cambiemos la definición de normalidad, puesto que un individuo con un determinado patrón molecular de expresión génica o cambios epigenéticos, puede o no estar en riesgo de desarrollar una condición inflamatoria en el futuro. Por lo tanto, me gustaría ofrecer el término diagnóstico molecular, término que irá evolucionando a medida que avancen los estudios y se perfeccionen las tecnologías, especialmente al estudiar a pacientes y a individuos de manera prospectiva. Para los fines de esta reseña limitaré mis comentarios a LES, incluyendo una discusión acerca de los últimos intentos para estratificar la enfermedad desde el punto de vista molecular.

Los patrones moleculares sanguíneos en LES

Los análisis de la transcriptómica y del epigenoma han sido una importante fuente de datos que han servido de base para estudios sobre la estratificación de la enfermedad. Numerosos estudios han utilizado la sangre y otras células sanguíneas, principalmente las células T. Al utilizar sangre, el principal problema es la dilución de la señal, si hay una diferencia en un transcriptoma específico que ese esté buscando. Por lo tanto, los análisis transcriptómicos dan una idea general. Bradley S.J. y colaboradores, utilizando datos de transcriptómica de células T purificadas, identificaron subgrupos de pacientes con LES, de acuerdo con la severidad de la enfermedad ⁶. Sin embargo, el número de pacientes era muy reducido, lo cual sugiere sobreajuste (overfitting).

Flint⁷ investigó la impronta del interferón en más detalle, buscando principalmente diferencias en el tipo de impronta expresada por diversos tipos de células (neutrófilos, células CD4⁺T, células CD8⁺T y monocitos) a través de cuatro condiciones distintas de mediación inmunológica, incluyendo LES y un grupo control de sujetos sanos. Estos autores utilizaron el análisis de la red de expresión génica ponderada (WGCNA), que identifica los módulos de genes en los datos basados en la co-expresión (un método ampliamente utilizado luego de la publicación de Chaussabel y colaboradores en el 2008) ⁸. Para cada población celular se elegía un módulo como el más representativo de la impronta del interferón, de acuerdo con la composición génica, su correlación con el diagnóstico de LES y la correlación con el perfil de expresión de la impronta del interferón de 21 genes núcleo.

Los autores ⁷ llevaron a cabo un extenso análisis de 1.288 genes dentro de los módulos seleccionados para comparar entre varias enfermedades autoinmunes y poblaciones de células. Se consideraron cuatro módulos de interferón con 67 genes como los genes

núcleo del interferón, y se encontró que la mayoría se expresaban marcadamente en las células mieloides y en los neutrófilos, en tanto que solo unos pocos, 11 genes estaban más expresados en las células T. Interesantemente, la mayor expresión de módulos específicos de las células T parecían ser exclusivos de LES. Por otra parte, los monocitos y los neutrófilos presentaban niveles de expresión similares en las otras enfermedades y en los controles, respaldando así la idea de que los niveles basales de la impronta de interferón son importantes para mantener a las poblaciones mieloides, en tanto que no ocurre lo mismo con las células T.

Al separar diferentes poblaciones de células de pacientes con LES, McKinney ⁹ encontró que las células CD8⁺ T presentan dos grupos clínicamente importantes de pacientes con LES, con pronósticos diferentes. Un grupo de mal pronóstico que presentaba mayor cantidad de genes de la vía del receptor de interleucina 7 (IL-7R) y señalización del receptor de células T (TCR), y genes expresados por las células T de memoria. Más aún, el grupo de mal pronóstico se asociaba con una mayor población de células de memoria T CD8⁺.

La metilación del ADN se considera la marca epigenética más característica ¹⁰. Su presencia o ausencia en diferentes regiones regulatorias del genoma se ha asociado con cambios en la transcripción génica, estabilidad de los cromosomas, o la regulación de empalme alternativo ¹¹. Los patrones aberrantes de metilación de ADN han estado involucrados en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes y los cambios pudieran relacionarse con loci genéticos a través de meQTLs (ref Elena) ¹². La expresión específica de los módulos de células T en pacientes con LES es consistente con los hallazgos sobre hipometilación de los genes regulados por interferón tipo I en células CD4⁺ T naive ¹³, lo cual sugiere que antes de la estimulación estas células están listas para expresar los genes IFN tipo 1 inducibles. ¹⁴

La práctica clínica de rutina se podría beneficiar de una comparación entre diferentes enfermedades autoinmunes para identificar los perfiles discriminatorios. Con este objetivo, un estudio analizó LES y artritis reumatoide (AR), clasificando a ambas patologías en 3 grupos con perfiles específicos que se superponían entre las dos condiciones ¹⁵. Interesantemente, estudios posteriores replicaron la asociación entre AR y LES ¹⁶, pero no fue posible replicar los grupos, probablemente por el tamaño limitado de la muestra. El estudio mostró que los pacientes con AR precoz se agrupaban mejor con los pacientes con LES, que los pacientes con AR de larga data ¹⁷. La impronta genética compartida afectó la función de las células B ¹⁸, sugiriendo que estos individuos eventualmente podían tratarse con terapia dirigida a las células B; sin embargo, el estudio también sugiere que entre más temprana sea la enfermedad, más marcadas serán las similitudes y posiblemente sea más fácil su tratamiento con agentes tales como Rituximab.

Otro estudio que analizó los transcriptomas de LES y de esclerosis sistémica (EsS), encontró que el 62% de los genes con diferente expresión en EsS versus individuos sanos, también se expresaban de manera diferente al analizar LES ¹⁹. El IFN tipo 1 inducible y las vías de señalización JAK/STAT estaban enriquecidas, al igual que las

funciones de reconocimiento del patrón molecular de patógenos. Algunos pacientes con EsS se agrupaban junto con LES. Estos pacientes “tipo lupus”, presentaban aumento del IFN Tipo 1 inducible y expresión génica de células plasmáticas, siendo por ende muy similares a LES. En ambas patologías, el aumento de la expresión de genes de IFN inducible se relacionaba con la actividad de la enfermedad y con la presencia de anticuerpos antinucleares ^{19,20}. La impronta del IFN tipo 1 también se asoció a subgrupos de AR ²¹. Un estudio que buscaba improntas compartidas entre enfermedades autoinmunes ^{22,23} mostró que la expresión diferencial de los genes entre enfermedades y controles también era común entre las distintas enfermedades, pero no exclusivamente para la vía de señalización del interferón. Desde el punto de vista clínico, esta información pudiera ser importante con relación al uso potencial de tratamiento con el receptor anti-IFN (Ej. Anifrolumab), incluso para subgrupos de AR y EsS, una vez estén disponibles los patrones moleculares que caracterizan a los distintos pacientes ²⁴.

Se ha observado hipometilación del ADN generalizada en varias células y tejidos, con patrones similares en diversas enfermedades. Esto se observó en AR y LES en los linfocitos T, el tejido sinovial, las células mononucleares sinoviales y sangre periférica^{25,26}. En estudio de todo el genoma, se confirmó dicha hipometilación global de los linfocitos T para EsS y SjS^{14,27}, mas no para dermatomiositis ²⁷. En LES, EsS y SjS se observó el patrón hipometilado en los linfocitos B, monocitos, fibroblastos dérmicos y leucocitos ²⁸⁻³⁰. Estos patrones se correlacionaban con una menor expresión de los genes del mecanismo de metilación del ADN, *DNMT1*, *DNMT3B* o *MBD4*. En LES y en SjS, los genes hipometilados están enriquecidos con los genes de la vía del interferón tipo 1 ^{14,28,31}. Cabe mencionar que los genes del mecanismo de metilación dependen de factores ambientales tales como la presencia de folatos en la dieta ^{32,33}. Por otra parte, la variedad de células que muestran la impronta del IFN tipo 1 sugiere que cualquiera que sea el inductor, es sistémico, posiblemente viral. Un estudio reciente mostró que el 50% de los promotores de loci de riesgo genético conocidos para LES están ocupados por la proteína EBNA2 del virus del Epstein-Barr, que en su mayoría se co-agrupan con otros factores de transcripción humanos. Este es un primer ejemplo de una interacción génica-ambiental con posible regulación epigenética y que condiciona los efectos de los loci de riesgo genético a través de un factor de transcripción viral ³⁴.

El promotor *IFI44L* está hipometilado en los pacientes con LES y es el sitio más hipometilado entre los genes inducidos por interferón. Al comparar la AR contra el síndrome de Sjögren (SjS), a pesar de que el promotor *IFI44L* está hipometilado en todas las enfermedades, los niveles de metilación diferencian al LES de las demás patologías ³⁵. Recientemente observamos que *IFI44L* mostraba una mayor variabilidad en la metilación en pacientes con enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) siendo imposible diferenciar entre EMTC y LES ³⁶, lo cual sugiere que este gen puede no ser de utilidad para diferenciar entre las dos condiciones. Otro estudio comparó la metilación del ADN en gemelos monocigóticos discordantes para tres enfermedades (incluyendo LES y AR). Los autores identificaron solo 49 genes con diferencias significativas en la metilación del ADN ³⁰.

Un tema de gran interés es cuál sería la respuesta de la expresión génica durante la actividad de la enfermedad y si esto pudiera estratificar a los pacientes o revelar la existencia de diferentes grupos o clases de pacientes que nos ayude a definir la heterogeneidad del LES.

Con esta idea en mente, Banchereau y colaboradores³⁷ utilizaron por primera vez datos longitudinales de la expresión génica en sangre total, identificando 7 grupos de pacientes pediátricos con LES; cada uno de los grupos se asoció a módulos específicos de expresión génica³⁷. También identificaron la relación entre la expresión génica de neutrófilos y nefritis lúpica.

Una vez más el análisis utilizado fue el WGCNA⁸. Los autores seleccionaron el SLEDAI más correlacionado de cada paciente, en cada momento en el tiempo, proyectando sus perfiles de expresión a los módulos de Chaussabel⁸. Los 7 grupos de pacientes descritos correspondían a 5 improntas inmunológicas diferentes entre si en términos de los tipos de mecanismos celulares: linfoides, eritropoyesis, célula plasmática, neutrófilo/mieloide e IFN Tipo 1. Sin embargo, al menos 3 de los grupos de pacientes tenían un módulo IFN.

Un grupo de pacientes en el cual todos tenían nefritis, se correlacionó con los módulos asociados a IFN, neutrófilos y plasmablastos. Estos pacientes tenían anticuerpos anti-dsDNA y la clínica más severa de la enfermedad. Las improntas de neutrófilos y de IFN se correlacionaban marcadamente con el desarrollo de nefritis lúpica y se modificaron mediante tratamiento con Micofenolato Mofetil (MMF), especialmente en pacientes con glomerulonefritis proliferativa más que membranosa.

Utilizando los datos de Banchereau y colaboradores y un conjunto adicional de pacientes adultos con LES de hospital Johns Hopkins³⁸, se adoptó un abordaje ligeramente distinto. Los genes individuales se seleccionaron en función de su correlación con el SLEDAI, y luego se crearon conglomerados. Este estudio produjo 3 conglomerados que se replicaron en el conjunto de adultos. Luego se utilizó WGCNA para investigar la funcionalidad de los genes dentro de cada conglomerado. Cabe señalar que el SLEDAI es un puntaje semi-cuantitativo con muchos inconvenientes y que un puntaje continuo, basado en mediciones reales que pudieran correlacionarse con los datos transcriptómicos en forma longitudinal sería lo ideal. Los tres conglomerados presentaban características particulares: el primero era heterogéneo y poseía características de los conglomerados 2 y 3, pero los pacientes de ese conglomerado no podían asignarse a ninguno de los otros dos grupos. El conglomerado 2 estaba claramente diferenciado y mostraba una estrecha relación con la impronta del IFN tipo 1. Esto significa que durante actividad de la enfermedad, cuando aumentan los puntajes SLEDAI, la impronta de los genes del IFN Tipo 1 se correlacionaba positivamente con el puntaje. No todos los genes de la impronta del IFN mostraron esta correlación. También hubo una correlación con los incrementos en los niveles de neutrófilos, C3 y la VSG, mientras que hubo una correlación negativa con los niveles de linfocitos. En los datos para adultos, este conglomerado también se asoció con linfopenia. Por otra parte, el conglomerado 3 era totalmente lo contrario,

allí los linfocitos mostraban una correlación positiva con el SLEDAI y una correlación negativa entre SLEDAI y las cifras o proporciones de neutrófilos.

Se observaron diferencias interesantes desde el punto de vista clínico: los pacientes del conglomerado 1 presentaban el mayor riesgo de desarrollar nefritis proliferativa en comparación con el conglomerado 3. Esto fue particularmente obvio en los pacientes adultos, donde el 65% de pacientes del conglomerado 1 estaban en riesgo de desarrollar nefritis proliferativa, contra 13% de los pacientes en el conglomerado 3. Los pacientes del conglomerado 3 mostraron características de enfermedad de la piel, síndrome antifosfolípido y aumento de las enzimas hepáticas. Los pacientes del conglomerado 2 también mostraron un incremento en el desarrollo de nefritis lúpica, pero un punto interesante sería determinar si existen diferencias en el tipo de patología subyacente a la nefritis.

La actividad de la enfermedad no fue un condicionante de los conglomerados y de hecho no hubo diferencias en los componentes del SLEDAI, ni en la magnitud de los componentes entre los diferentes conglomerados. Además, cuando se verificó el tratamiento, se observó que éste no condicionaba la asignación de los pacientes a los conglomerados y una vez más, no se observaron diferencias de tratamiento entre los grupos. Más aún, puesto que aparentemente los neutrófilos eran importantes para la definición de los conglomerados, no hubo diferencias en la cantidad de neutrófilos entre los grupos al hacer el análisis post-tratamiento. De hecho, al hacer una selección característica (génica) contra dosis de tratamiento, en aquellos tratamientos para los cuales había información disponible, solo 2% de los genes seleccionados por tratamiento se solapaban al correlacionarlos con el SLEDAI y organizar los conglomerados. En resumen, los conglomerados tenían patrones moleculares que muy probablemente reflejaban los propulsores de la actividad de la enfermedad, diferenciándose principalmente por tipo de célula: neutrófilos por una parte y linfocitos por la otra. El presente estudio sugiere entonces un abordaje simple y es el uso de un índice neutrófilos:linfocitos (INL). Efectivamente, un estudio ha demostrado que un incremento de neutrófilos, y por ende un mayor INL, se asocia a una mayor actividad de la enfermedad y anticuerpos dsDNA, así como con la presencia de la impronta IFN. Interesantemente, los autores también determinaron que un alto recuento neutrofilico se asociaba con marcadores de activación de los neutrófilos, en tanto que un bajo recuento linfocitario se asociaba con actividad del IFN Tipo 1 y cifras elevadas de granulocitos de baja densidad (GBD) ³⁹.

Ciertamente es posible que una vez se hayan estratificado los grupos entre patrones moleculares sanguíneos, los patrones de los tejidos pudieran dar lugar a una sub-estratificación de cada conglomerado y dicha sub-estratificación pudiera ser importante para el tratamiento, por ejemplo de la nefritis lúpica. Creo que este sería el caso en LES, especialmente en función de las diferencias observadas en cuanto al riesgo de desarrollar nefritis en los conglomerados 1 y 2, e incluso en el 3, que está conformado por individuos con síndrome de Sjögren y con síndrome antifosfolípido y quienes pudieran desarrollar otras clases patológicas relacionadas con la glomerulonefritis.

Un punto importante a considerar es que los pacientes que tienen una impronta IFN en una ventana de tiempo determinada, no necesariamente responden con cambios en la expresión de los genes de interferón durante periodos de actividad o inactividad de la enfermedad. Por lo tanto, el identificar pacientes con una alta o baja expresión de la impronta génica de IFN es un momento en particular, puede no reflejar la realidad del proceso que se desarrolla durante exacerbaciones.

Un segundo estudio ⁴⁰ comparó los datos de la expresión génica de LES con las improntas génicas inducidas por medicamento, tomados de la base de datos CLUE, a fin de calcular un puntaje de conectividad que reflejara la capacidad de un medicamento para revertir las improntas de los pacientes. Esta comparación reveló conglomerados robustos idénticos a los que obtuvieron previamente con los datos de la expresión génica de los pacientes, sugiriendo que el uso de tratamiento diferencial podría depender del conglomerado al que pertenesca el paciente. Se encontró que los mejores fármacos potenciales fueron los inhibidores mTOR o los que reducen el estrés oxidativo, ya que mostraron la mayor especificidad con el conglomerado, como se demostró anteriormente. Estos patrones farmacológicos siguen la especificidad celular de los conglomerados e, interesantemente, aun cuando no de manera significativa, sugirieron en cierta medida las posibles causas de la falta de respuesta; es decir, utilizar el medicamento equivocado en un paciente perteneciente a un conglomerado no compatible con tal medicamento.

En un análisis conjunto del transcriptoma y los patrones de metilación en sangre, Barturen, y colaboradores ⁴¹ pudieron agrupar 7 enfermedades diferentes, a saber: LES, AR, síndrome de Sjögren's, esclerosis sistémica, síndrome antifosfolípido primario y enfermedad mixta del tejido conjuntivo, así como a pacientes con enfermedad no diferenciada del tejido conjuntivo (ENDTC), y agruparon las enfermedades en 4 conglomerados. Tres de ellos se identificaron durante la enfermedad activa y se consideraron patogénicos, representando a un conglomerado inflamatorio, un conglomerado linfoide y un conglomerado de interferón. El cuarto conglomerado era indefinido e incluía casos con baja actividad de la enfermedad y varios pacientes con esclerosis sistémica y artritis reumatoide. Interesantemente, al analizar una cohorte inicial que se siguió prospectivamente durante 6 y 14 meses luego del reclutamiento, la asignación a los conglomerados fue estable y si algún individuo cambiaba de conglomerado era casi exclusivamente hacia el conglomerado no identificado, pero luego regresaba a su conglomerado patológico, reafirmando la identidad de este conglomerado en individuos en remisión. Por ejemplo, un paciente que pertenecía inicialmente al conglomerado linfoide, podría después de 6 meses pertenecer al conglomerado indefinido y al mes 14 estar de vuelta en el conglomerado linfoide. Esto se observó en aproximadamente el 34% de los casos que tuvieron seguimiento durante todo el proceso. El conglomerado de interferón se asoció con uno de los fenotipos más extremos, tales como anomalías de la función renal (incluyendo nefritis), trombosis, compromiso del sistema nervioso central y leucopenia, además de otras comorbilidades menores. Las complicaciones por fibrosis tanto en piel como en el sistema musculoesquelético, se encontraron más acentuadas en el conglomerado inflamatorio. El conglomerado linfoide en general presentó fenotipos menos agresivos

que los otros conglomerados, con un aumento de las dislipidemias, presencia de manifestaciones gastrointestinales como dolor abdominal, diarrea y estreñimiento. En este conglomerado también se encontró una asociación el síndrome *sicca*. El conglomerado de interferón mostró un enriquecimiento de anti-dsDNA, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-U1RNP y cadenas livianas libres de proteínas, así como aumento de IP-10, BAFF, MCP-2 y TNF- α ; el conglomerado inflamatorio tenía aumento de MMP-8 y de proteína C-reactiva, mientras que los niveles elevados de IL-1RA y CXCL13 eran comunes tanto al conglomerado de interferón como al inflamatorio. Como era de esperarse, el conglomerado de interferón estaba dominado por LES y por Sjögren, pero también por enfermedad mixta del tejido conjuntivo y algo de enfermedad no diferenciada del tejido conjuntivo, AR y esclerosis sistémica; entretanto, los conglomerados inflamatorio y linfocitario tenían todas las enfermedades representadas más o menos en la misma proporción. En resumen, los conglomerados tienen características clínicas y serológicas específicas, pero también escenarios regulatorios y genéticos muy distintos que están fuera de esta discusión, pero pudieran sugerir 3 vías moleculares alternas y diferentes que definirían la enfermedad individual en cada paciente.

Los patrones del transcriptoma molecular unicelular derivados de la sangre

La tecnología ha llegado al punto en el que podemos evaluar el transcriptoma de una sola célula. Solo hay un estudio publicado en sangre periférica. Estos estudios permiten definir con exactitud en cuáles células hay anomalías y posiblemente los mecanismos unicelulares responsables de la anomalía. El trabajo de Nehar-Belaid y Hong (quienes contribuyeron por igual)⁴² describe el análisis de las células mononucleares en sangre periférica, mas no de los neutrófilos. La razón fundamental es que el ARN de los neutrófilos se degrada rápidamente y resultan difíciles de obtener para un análisis transcriptómico apropiado con el método utilizado, 10x-Genomics. Al igual que antes, la impronta del interferón Tipo 1 se expresa de manera generalizada, pero curiosamente la impronta del interferón se observó en subpoblaciones definidas de los principales tipos de células, incluyendo las células plasmáticas. Estos análisis precisan que se separen conglomerados de poblaciones celulares según los genes expresados, de manera tal que se diferencien y algunas veces poder identificar posibles nuevas poblaciones de células. Los conglomerados o grupos luego reciben nombres un tanto arbitrarios. Las células que expresaron principalmente los genes de la impronta del interferón fueron: el conglomerado principal de monocitos (llamado C0) y todos los siete conglomerados menores, C11 (un conglomerado menor de células CD4+ T); C13 (CD16+ monocitos), C15 (megacariocitos), C16 (cDCs), C17 (PCs), C18 (pDCs), y C19 (ISGhiGzK+acCD8+ células T). Algunos genes permitieron agrupar a los pacientes en 9 grupos llamados G1-G9; el G1 era el grupo en el que había mayor sobre-regulación de los genes del interferón Tipo 1, caracterizados por *ISG15* y *IFI27*; G2 por *IFI35* y *ADAR*; G3 por *IFI44L* y *PAPR9*; G4 por *TMEM140*, principalmente sobre-regulado en megacariocitos; los genes G5 eran *IFNGR1*, *CASP1* y *FCGR1A*, expresados principalmente en monocitos, células dendríticas y megacariocitos; los genes G6 fueron *CCL4*, *CCL5* y *IFNG* y estaban sobre-expresados en las células NK, C3_GzH_acCD8+ T y C19_ISGhi_GzK+_acCD8+ células T;

G7 tenían sobrerregulado *SOCS1* y se encontraron en las células dendríticas plasmacitoides (pDC), pero también en subgrupos o conglomerados de células T; G8 incluía *IRF7* e *IFNLR1* que se encontraban en las células plasmáticas en pacientes con LES y los genes G9 tenían *IFNAR* en PCs.

Muchas de las poblaciones mostraron una sobrerregulación similar en los pacientes y en los controles, demostrando cómo estos genes se expresan normalmente en tipos celulares específicos, pero otros están evidentemente sobre-regulados en LES y aumentan los subconjuntos celulares. Los autores analizaron genes que se co-expresan en las poblaciones celulares y los genes mayores definen los conglomerados; se encontró que en monocitos con una alta impronta de interferón, los genes también coexpresaban *IL1B*. Las células que co-expresan *IL1B* se podían subdividir en tres improntas de células: un grupo celular que co-expresa *IFITM3* e *IL1B*, otro *ISG15* e *IL1B* y un tercero que contenía ambos (10% de las células).

Cada una de las principales poblaciones de células estaba debidamente caracterizada al igual que las improntas más asociadas con la actividad de la enfermedad. Por ejemplo, *ISG15* estaba sobre-expresada en monocitos CD14+ en pacientes con alta actividad de la enfermedad. Curiosamente, la expresión de *ISG15* se restringía a la subpoblación de células B que los autores denominaron B-SC5, que era el único tipo celular que expresaba *TBX21* (el factor de transcripción T-bet) y otros genes expresados exclusivamente en este tipo celular, sugiriendo que correspondían a los genes previamente descritos como extrafoliculares, llamados también células DN2 B⁴³. Estos genes son *ITGAX* (CD11c), *FGR*, *TFEC*, *FCRL2*, *FCRL3* y *FCRL5*, e *IL10RA*.

Un tipo de pDC, llamado PDC-SC1 estaba expandido en LES y contribuía a la impronta del interferón. Por otra parte, solamente la población DC estaba expandida en LES y no mostró diferencia en cuanto a la actividad de la enfermedad. El conglomerado de células expandidas se denominó DC-SC2, que correspondía a AXL+SIGLEC6+ DCs, el subconjunto principal que expresaba los genes de la impronta del interferón. Finalmente, los subconjuntos de células T que principalmente expresaban genes de la impronta del interferón, eran células T citotóxicas, a saber las células T-SC4. Estas células estaban particularmente expandidas en LES e incluían a las células CD4+T que conforman el conglomerado ISGhiC11_CD4+T, a su vez expandido en LES.

Un conglomerado específico de células NK, que también era específico para LES, era el ISGhi. Dos conglomerados de NK, NK-SC2 y NK-SC3 estaban expandidos en LES y ambos tenían interferón sobrerregulado y genes que codificaban para citotoxicidad, con particular incremento de *ISG15* y *CD56* en el subconjunto NK-SC2.

Dado que la cohorte utilizada para el estudio unicelular incluía principalmente pacientes pediátricos con LES, los autores también analizaron la expresión de los genes mutados en las enfermedades monogénicas relacionadas con LES, como los componentes del complemento *C1Q*, *C1R* o *C2*, *TREX1* o *DNASE1L3*, entre otros. Los autores encontraron que la mayoría de estos genes, con excepción de los genes de

complemento, se expresaban principalmente en pDCs y DCs, pero también en las células plasmáticas, en el subconjunto B- SC5, y en el subconjunto NK-SC3.

Finalmente, los autores utilizaron la abundancia unicelular para clasificar a los pacientes con LES en grupos, validando los grupos con una segunda cohorte de adultos, revelando expansiones similares de poblaciones celulares que se asociaban a la severidad de la enfermedad.

Transcriptoma unicelular en tejidos

El Consorcio RA/SLE publicó dos trabajos que realizaron secuenciación del transcriptoma unicelular de dos tejidos principales: el riñón y la piel de pacientes con lupus. El estudio que analizó la piel, combinó dicho análisis con los datos del riñón, mostrando un cierto reflejo de los genes expresados diferencialmente en el riñón, en algunos tipos celulares específicos de la piel.

Arazi y colaboradores ⁴⁴ llevaron a cabo un análisis unicelular de riñones de pacientes con lupus e identificaron 21 subconjuntos de células infiltrantes con respuestas pro-inflamatorias. Además, los autores encontraron una marcada correlación entre la respuesta del interferón renal y sistémica. Curiosamente, también identificaron una activación local de las células B, donde un subconjunto de células B mostró una impronta similar a las de las células pro-inflamatorias, también llamadas células B asociadas con la edad, de manera algo similar a las DN2 ya mencionadas. La mayoría de las células mostraron una impronta génica del interferón y, en particular, dos genes de quimiocinas estaban ampliamente expresados, CXCR4 y CX3CR1, sugiriendo un papel importante del tráfico celular. Los autores también analizaron las células de la orina y encontraron una importante correlación entre éstas y las improntas génicas encontradas en el riñón. Esto tiene importantes implicaciones clínicas pues se usarían los marcadores de las células de la orina en lugar de tomar biopsias de riñón.

Der y cols⁴⁵, analizaron conjuntamente las biopsias de riñón y de piel, enfocándose más en las células tubulares renales; identificaron una impronta de interferón en estas células y en los queratinocitos de la piel. También observaron una impronta de fibrosis en las células tubulares, asociada a la no respuesta a tratamiento, lo cual es en cierta medida similar a lo observado en el tejido sinovial en artritis reumatoide ⁴⁶. Esto es muy interesante pues sugiere que algunas nefritis pudieran no ser inmunológicas ni un proceso fibrótico rápido. En el caso de las células tubulares en lupus, un análisis de la vía demostró que los genes *TIMP1* y *SERPING* eran moléculas extracelulares que interactuaban en la matriz. Los autores también observaron en los no respondedores una sobreexpresión del complemento y de las cascadas de la coagulación, incluyendo los genes *C1S* y *C1R*. Se observó un patrón similar en los queratinocitos de los no respondedores. En este caso, los no respondedores también mostraron algunos genes de colágeno que se solapaban parcialmente con los encontrados en el riñón, tales como *COL1A1* en ambos tejidos, o *COL17A1* solo en los queratinocitos. Mediante un modelo predictivo, los autores encontraron que la expresión de cuatro genes: *COL1A1*, *COL14A1*, *COL1A2*, y *COL5A2* podría predecir la

respuesta a tratamiento con una precisión del 92% (AUC de 0,96). Sin embargo, los puntajes de fibrosis de la impronta no se correlacionaron con otros puntajes de actividad de la enfermedad o de cronicidad. Tampoco los autores pudieron correlacionar los perfiles de expresión génica de fibrosis con el patrón histológico de la fibrosis mediante el uso de microscopía. Adicionalmente, las PBMCs de los mismos individuos no mostraron marcadores de fibrosis. Analizando las interacciones receptor – ligando de la célula infiltrante, se encontraron interacciones entre los leucocitos infiltrantes y posibles ligandos dentro de las células tubulares. Por ejemplo, genes como el receptor de fibrosis *FGFR3* estaban expresados en las células tubulares renales, en tanto que su ligando *FGF13* estaba expresado en leucocitos. Los autores analizaron entonces biopsias separadas de nefritis proliferativa, membranosa y mixta e identificaron diferentes vías proliferativas. De acuerdo con las observaciones, en la nefritis proliferativa los queratinocitos sobrerregulan el TNF y las vías del interferón; no así en el caso de la nefritis membranosa. Con respecto a las células tubulares, hubo una sobrerregulación de la señalización *TNFR1* en la clase proliferativa.

Conclusión

Ya se han publicado los primeros estudios que utilizaron el análisis del transcriptoma unicelular en sangre periférica, riñón y piel en LES, ofreciendo granularidad de la información descrita previamente. Será interesante comprender cómo los estudios unicelulares ayudan a discernir la heterogeneidad del LES en el seguimiento de pacientes durante períodos de recidiva y remisión, así como ante respuesta a tratamiento. La combinación de tejido y células mononucleares en sangre periférica en un estudio longitudinal, será esencial para ampliar el conocimiento sobre cómo utilizar estos métodos para clasificar a los pacientes con LES y cómo la sangre podría o no reflejar patrones de tejidos de expresión génica luego de tratamiento y posiblemente durante estudios clínicos. Todavía se están desarrollando los métodos para distinguir los tipos celulares, pero se está avanzando rápidamente y sin contratiempos. Proyectos como el AMP RA/SLE del NIH (<https://www.nih.gov/research-training/accelerating-medicines-partnership-amp>), o el European 3TR (3tr-imi.eu), serán fundamentales para lograr un conocimiento integral. El AMP Consortium ha venido publicando trabajos fundamentales que representan avances importantes para que podamos comprender una enfermedad tan compleja como el LES.

Referencias

1. Bennett, L. et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* **197**, 711-23 (2003).
2. Baechler, E.C. et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2610-5 (2003).
3. Baechler, E.C. et al. Gene expression profiling in human autoimmunity. *Immunol Rev* **210**, 120-37 (2006).

4. Sanchez, E. et al. Impact of genetic ancestry and sociodemographic status on the clinical expression of systemic lupus erythematosus in American Indian-European populations. *Arthritis and Rheumatism* **64**, 3687-94 (2012).
5. Alarcon, G.S. et al. Systemic lupus erythematosus in a multi-ethnic cohort (LUMINA): contributions of admixture and socioeconomic status to renal involvement. *Lupus* **15**, 26-31 (2006).
6. Bradley, S.J., Suarez-Fueyo, A., Moss, D.R., Kyttaris, V.C. & Tsokos, G.C. T Cell Transcriptomes Describe Patient Subtypes in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS One* **10**, e0141171 (2015).
7. Flint, S.M. et al. Leucocyte subset-specific type 1 interferon signatures in SLE and other immune-mediated diseases. *RMD Open* **2**, e000183 (2016).
8. Chaussabel, D. et al. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity* **29**, 150-64 (2008).
9. McKinney, E.F. et al. A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease. *Nat Med* **16**, 586-91, 1p following 591 (2010).
10. Bonasio, R., Tu, S. & Reinberg, D. Molecular signals of epigenetic states. *Science* **330**, 612-6 (2010).
11. Jones, P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* **13**, 484-92 (2012).
12. Aslani, S. et al. Epigenetic alterations underlying autoimmune diseases. *Autoimmunity* **49**, 69-83 (2016).
13. Coit, P. et al. Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poisoning of interferon-regulated genes in naive CD4+ T cells from lupus patients. *Journal of Autoimmunity* **43**, 78-84 (2013).
14. Altorok, N. et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* **66**, 731-9 (2014).
15. Maas, K. et al. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* **169**, 5-9 (2002).
16. Maas, K., Chen, H., Shyr, Y., Olsen, N.J. & Aune, T. Shared gene expression profiles in individuals with autoimmune disease and unaffected first-degree relatives of individuals with autoimmune disease. *Hum Mol Genet* **14**, 1305-14 (2005).
17. Liu, Z., Maas, K. & Aune, T.M. Identification of gene expression signatures in autoimmune disease without the influence of familial resemblance. *Hum Mol Genet* **15**, 501-9 (2006).
18. Olsen, N. et al. A gene expression signature for recent onset rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis* **63**, 1387-92 (2004).
19. Assassi, S. et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum* **62**, 589-98 (2010).
20. Gardner, H. et al. Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts. *Arthritis Rheum* **54**, 1961-73 (2006).

21. Higgs, B.W. et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis* **70**, 2029-36 (2011).
22. Toro-Dominguez, D., Carmona-Saez, P. & Alarcon-Riquelme, M.E. Shared signatures between rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome uncovered through gene expression meta-analysis. *Arthritis Res Ther* **16**, 489 (2014).
23. Tuller, T., Atar, S., Ruppin, E., Gurevich, M. & Achiron, A. Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases. *Genes Immun* **14**, 67-82 (2013).
24. Barturen, G., Beretta, L., Cervera, R., Van Vollenhoven, R. & Alarcon-Riquelme, M.E. Moving towards a molecular taxonomy of autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **14**, 75-93 (2018).
25. Richardson, B. et al. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **33**, 1665-73 (1990).
26. Corvetta, A., Della Bitta, R., Luchetti, M.M. & Pomponio, G. 5-Methylcytosine content of DNA in blood, synovial mononuclear cells and synovial tissue from patients affected by autoimmune rheumatic diseases. *J Chromatogr* **566**, 481-91 (1991).
27. Lei, W. et al. Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol* **38**, 369-74 (2009).
28. Absher, D.M. et al. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4+ T-cell populations. *PLoS Genet* **9**, e1003678 (2013).
29. Altorok, N., Tsou, P.S., Coit, P., Khanna, D. & Sawalha, A.H. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis* **74**, 1612-20 (2015).
30. Javierre, B.M. et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res* **20**, 170-9 (2010).
31. Yeung, K.S. et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Chinese Patients with Systemic Lupus Erythematosus Identified Hypomethylation in Genes Related to the Type I Interferon Pathway. *PLoS One* **12**, e0169553 (2017).
32. Attig, L., Gabory, A. & Junien, C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. *Proc Nutr Soc* **69**, 221-31.
33. Minami, Y. et al. Intakes of vitamin B6 and dietary fiber and clinical course of systemic lupus erythematosus: a prospective study of Japanese female patients. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association* **21**, 246-54 (2011).
34. Harley, J.B. et al. Transcription factors operate across disease loci, with EBNA2 implicated in autoimmunity. *Nat Genet* **50**, 699-707 (2018).
35. Zhao, M. et al. IFI44L promoter methylation as a blood biomarker for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **75**, 1998-2006 (2016).

36. Carnero-Montoro, E. et al. Epigenome-Wide Comparative Study Reveals Key Differences Between Mixed Connective Tissue Disease and Related Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol* **10**, 1880 (2019).
37. Banchereau, R. et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell* **165**, 1548-1550 (2016).
38. Toro-Dominguez, D. et al. Stratification of Systemic Lupus Erythematosus Patients Into Three Groups of Disease Activity Progression According to Longitudinal Gene Expression. *Arthritis Rheumatol* **70**, 2025-2035 (2018).
39. Han BK, W.K., Cain KC, Tyden H, Bengtsson AA, Lood C. Neutrophil and lymphocyte counts are associated with different immunopathological mechanisms in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med* **7**, e000382 (2020).

40. Toro-Dominguez, D. et al. Differential Treatments Based on Drug-induced Gene Expression Signatures and Longitudinal Systemic Lupus Erythematosus Stratification. *Sci Rep* **9**, 15502 (2019).
41. Guillermo Barturen, S.B., Francesc Català-Moll, Manuel Martínez-Bueno, Zuzanna Makowska, Jordi Martorell-Marugán, Pedro Carmona-Sáez, Daniel Toro-Domínguez, Elena Carnero-Montoro, María Teruel, Martin Kerick, Marialbert Acosta-Herrera, Lucas Le Lann, Christophe Jamin, Javier Rodríguez-Ubreva, Antonio García-Gómez, Jorge Kageyama, Anne Buttgereit, Sikander Hayat, Joerg Mueller, Ralf Lesche, Maria Hernandez-Fuentes, Maria Juarez, Tania Rowley, Ian White, Concepción Marañón, Tania Gomes Anjos, Nieves Varela, Rocío Aguilar-Quesada, Francisco Javier Garrancho, Antonio López-Berrio, Manuel Rodriguez Maresca, Héctor Navarro-Linares, Isabel Almeida, Nancy Azevedo, Mariana Brandão, Ana Campar, Raquel Faria, Fátima Farinha, António Marinho, Esmeralda Neves, Ana Tavares, Carlos Vasconcelos, Elena Trombetta, Gaia Montanelli, Barbara Vigone, Damiana Alvarez-Errico, Tianlu Li, Ricardo Blanco Alonso, Alfonso Corrales Martínez, Fernanda Genre, Raquel López Mejías, Miguel A. Gonzalez-Gay, Sara Remuzgo, Begoña Ubilla Garcia, Ricard Cervera, Gerard Espinosa, Ignasi Rodríguez-Pintó, Ellen De Langhe, Jonathan Cremer, Rik Lories, Doreen Belz, Nicolas Hunzelmann, Niklas Baerlecken, Katja Kniesch, Torsten Witte, Michaela Lehner, Georg Stummvoll, Michael Zauner, Maria Angeles Aguirre- Zamorano, Nuria Barbarroja, Maria Carmen Castro-Villegas, Eduardo Collantes- Estevez, Enrique de Ramon, Isabel Díaz Quintero, Alejandro Escudero-Contreras, María Concepción Fernández Roldán, Yolanda Jiménez Gómez, Inmaculada Jiménez Moleón, Rosario Lopez-Pedrera, Rafaela Ortega-Castro, Norberto Ortego, Enrique Raya, Carolina Artusi, Maria Gerosa, Pier Luigi Meroni, Tommaso Schioppo, Aurélie De Groof, Julie Ducreux, Bernard Lauwerys, Anne-Lise Maudoux, Divi Cornec, Valérie Devauchelle-Pensec, Sandrine Jousse-Joulin, Pierre-Emmanuel Jouve, Bénédicte Rouvière, Alain Saraux, Quentin Simon, Montserrat Alvarez, Carlo Chizzolini, Aleksandra Dufour, Donatienne Wynar, Attila Balog, Márta Bocskai, Magdolna Deák, Sonja Dulic, Gabriella Kádár, László Kovács, Qingyu Cheng, Velia Gerl, Falk Hiepe, Laleh Khodadadi, Silvia Thiel, Emanuele de Rinaldis, Sambasiva Rao, Robert J.Benschop, Chris Chamberlain, Ernst R. Dow, Yiannis

- Ioannou, Laurence Laigle, Jacqueline Marovac, Jerome Wojcik, Yves Renaudineau, Maria Orietta Borghi, Johan Frostegård, Javier Martín, Lorenzo Beretta, Esteban Ballestar, Fiona McDonald, Jacques-Olivier Pers, and Marta E. Alarcón-Riquelme. Integrative Analysis Reveals a Molecular Stratification of Systemic Autoimmune Diseases. *Arthritis Rheumatol* (2020).
42. Nehar-Belaid D, H.S., Marches R, Chen G, Bolisetty M, Baisch J, Walters L, Punaro M, Rossi RJ, Chung CH, Huynh RP, Singh P, Flynn WF, Tabanor-Gayle JA, Kuchipudi N, Mejias A, Collet MA, Lucido AL, Palucka K, Robson P, Lakshminarayanan S, Ramilo O, Wright T, Pascual V, Banchereau JF. Mapping systemic lupus erythematosus heterogeneity at the single-cell level. *Nat Immunol* **21**, 1094-1106 (2020).
43. Jenks, S.A. et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* **49**, 725-739 e6 (2018).
44. Arazi, A. et al. The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis. *Nat Immunol* **20**, 902-914 (2019).
45. Der, E. et al. Tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type I IFN and fibrosis relevant pathways. *Nat Immunol* **20**, 915-927 (2019).
46. Lewis, M.J. et al. Molecular Portraits of Early Rheumatoid Arthritis Identify Clinical and Treatment Response Phenotypes. *Cell Rep* **28**, 2455-2470 e5 (2019).

Financiación: Ninguna

Conflicto de interés: Ninguno