

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Aumento de miR-146a en exosomas urinarios y niveles de ARNm de sus dianas moleculares STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6 en nefropatía lúpica.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Miriam Galera Martos
TUTOR/A UPV: M. Desamparados Pascual-Ahuir Giner
COTUTOR/A EXTERNO/A: Raquel Cortés Vergaz
COTUTOR/A EXTERNO/A: Javier Pérez Hernández

Curso Académico: 2017/18

VALENCIA, MARZO DE 2018

AUTORIZACIÓN DEL COTUTOR PARA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

EL(LA) COTUTOR(A):

D./D.^a RAQUEL CORTÉS VERGAZ Y D. JAVIER PÉREZ HERNÁNDEZ

Adscrito al organismo INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA INCLIVA donde se ha realizado el Trabajo

Fin de Máster titulado:

AUMENTO DE miR-146a EN EXOSOMAS URINARIOS Y NIVELES DE ARNm DE SUS
DIANAS MOLECULARES STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6 EN NEFROPATÍA LÚPICA

de la que es AUTOR(A)

D./D.^a MIRIAM GALERA HARTOS

AUTORIZA(N) la presentación del TRABAJO FIN DE MÁSTER para su defensa.

(lugar, fecha y firma)

VALENCIA, 14 DE FEBRERO DE 2018

EL(LA) COTUTOR(A)

Fdo.: D./D.^a RAQUEL CORTÉS VERGAZ Y
D. JAVIER PÉREZ HERNÁNDEZ

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abreviaturas..... | 1 |
| RESUMEN/ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1. Lupus eritematoso sistémico (LES)..... | 5 |
| 1.1.1. Definición y epidemiología..... | 5 |
| 1.1.2. Etiopatogenia y clínica..... | 5 |
| 1.1.3. Daño renal. Nefropatía lúpica (NL)..... | 7 |
| 1.2. Vesículas extracelulares (VE)..... | 8 |
| 1.2.1. Exosomas..... | 9 |
| 1.3. Micro ARN | 10 |
| 1.3.1. Definición | 10 |
| 1.3.2. miARNs en la enfermedad renal y LES | 11 |
| 1.3.3. miR-146a y sus moléculas diana..... | 12 |
| 1.3.3.1. STAT1 y STAT2 | 12 |
| 1.3.3.2. TLR4, IRAK1 y TRAF6..... | 13 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 14 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1. Selección de pacientes y controles | 15 |
| 3.2. Obtención y procesamiento de las muestras..... | 16 |
| 3.2.1. Aislamiento de vesículas extracelulares por ultracentrifugación diferencial | 16 |
| 3.3. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas..... | 17 |
| 3.3.1. Estudio de microscopia electrónica de transmisión (MET)..... | 17 |
| 3.3.2. <i>Western Blot</i> | 17 |
| 3.3.3. Perfil de tamaños mediante <i>qNano</i> (TRPS)..... | 18 |
| 3.4. Extracción de ARN de sedimento urinario y vesículas extracelulares..... | 18 |
| 3.4.1. Extracción de ARN de sedimento urinario | 18 |
| 3.4.2. Extracción de ARN de vesículas extracelulares | 19 |
| 3.4.3. Control de normalización: <i>spike-in</i> sintético cel-miR-39..... | 20 |
| 3.5. Cuantificación de miARN..... | 21 |
| 3.5.1. Retrotranscripción (RT) | 21 |
| 3.5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) | 21 |
| 3.5.3. Análisis de los resultados y normalización | 22 |
| 3.6. Cuantificación de ARNm..... | 23 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.1. Retrotranscripción (RT) | 23 |
| 3.6.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) | 23 |
| 3.6.3. Análisis de los resultados y normalización | 25 |
| 3.7. Análisis estadístico | 26 |
| 4. RESULTADOS..... | 27 |
| 4.1. Características generales de la población de estudio | 27 |
| 4.2. Caracterización de vesículas extracelulares en orina..... | 28 |
| 4.3. Niveles de miR-146a en exosomas y microvesículas | 29 |
| 4.4. Incremento de miR-146a en exosomas de pacientes con nefropatía lúpica. Asociación con la proteinuria..... | 29 |
| 4.5. Niveles de los ARNm diana de miR-146a | 31 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 33 |
| 6. CONCLUSIONES | 37 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 38 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 44 |

Abreviaturas

3'UTR: región 3' no traducida (del inglés, *3' untranslated region*).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

Amplicón: producto de PCR, ADN amplificado.

Anti-ADNc: anticuerpos frente ADN de doble cadena.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

BLAST: herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*).

BSA: albúmina de suero bovino (del inglés, *bovine serum albumin*).

Cebador *forward*: oligonucleótido cebador para la transcripción, retrotranscripción o replicación de la hebra de ADN/ARN en sentido directo.

Cebador *reverse*: oligonucleótido cebador para la transcripción, retrotranscripción o replicación en sentido inverso (de la hebra complementaria de ADN/ARN).

Ct: ciclo umbral (del inglés, *threshold cycle*) = Cp (*crossing point*) = Cq (*quantification cycle*).

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

DTT: ditioneitol.

EBV: virus de *Epstein-Barr* (del inglés, *Epstein-Barr virus*).

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Exo: exosomas.

FGR: filtrado glomerular renal.

IRAK1: quinasa 1 asociada a receptor de interleucina 1 (del inglés, *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*).

JAK: quinasa Janus (del inglés, *Janus kinase*).

LES/SLE: lupus eritematoso sistémico/en inglés, *systemic lupus erythematosus*.

MDRD: referente a la ecuación que se utiliza para estimar la FGR a partir del valor de la creatinina sérica (del inglés, *Modification of Diet in Renal Disease*).

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*).

miARN: micro ARN.

miRBase: base de datos de micro ARNs (del inglés, *microRNA database*).

MV: microvesículas.

NBT/BCIP: nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato (del inglés, *nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*).

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*).

NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa beta (del inglés, *nuclear factor kappa beta*).

NL: nefropatía lúpica.

NLA: nefropatía lúpica activa.

NLR: nefropatía lúpica en remisión.

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica (del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*).

PBS: tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*).

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés, *quantitative PCR*).

RNasa: ribonucleasa.

RT: retrotranscripción de ARN a ADNc. Transcripción inversa.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SLEDAI: índice de actividad del lupus eritematoso sistémico (del inglés, *systemic lupus erythematosus disease activity index*).

Sn: sobrenadante libre de exosomas.

STAT1: transductor de señal y activador de la transcripción 1 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 1*).

STAT2: transductor de señal y activador de la transcripción 2 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 2*).

TLR4: receptor tipo *Toll* (del inglés, *Toll-like receptor 4*).

Tm: temperatura de separación de las hebras (del inglés, *melting temperature*).

TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés, *tumor necrosis factor*).

TRAF6: factor asociado al receptor TNF 6 (del inglés, *TNF receptor-associated factor 6*).

TRPS: detección de pulso resistivo sintonizable, técnica de análisis de partícula única (del inglés, *Tunable Resistive Pulse Sensing*).

VE: vesículas extracelulares.

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica en la que se producen autoanticuerpos frente ADN de doble cadena, y otros componentes nucleares y citoplasmáticos, que afectan a numerosos órganos; siendo la afectación renal "nefropatía lúpica" (NL) la más frecuente. En el desarrollo de esta enfermedad parece jugar un papel importante la comunicación intercelular vía vesículas extracelulares (VE), sobre todo exosomas (Exo), que contienen proteínas, ARN mensajero (ARNm), micro ARN (miARN) y ADN. Se ha visto que la expresión de miARNs está modulada en el contexto del LES, especialmente cuando se produce NL activa (NLA), lo que sugiere que los miARNs tienen una función relevante en la patología. El miARN 146a (miR-146a), en concreto, se ha encontrado 100 veces aumentado en Exo urinarios en NLA, siendo capaz de discriminar la presencia o no de esta condición. El objetivo de este trabajo es cuantificar si hay mayor cantidad de miR-146a en Exo que en microvesículas (MV); comprobar si se observa incremento de este miARN tanto en Exo como MV en orina de pacientes de LES con NL respecto al grupo control o pacientes sin NL y si ese incremento está asociado a la proteinuria; y estudiar el efecto sobre los niveles de ARNm de sus dianas moleculares: STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6, involucradas en la activación de genes de respuesta inflamatoria. Se obtuvieron muestras de orina de 40 pacientes de LES, 15 con NLA, 10 con NL en remisión (NLR) y 15 sin NL (LES), además de 20 controles sanos. El aislamiento de las VE (Exo y MV) se realizó por ultracentrifugación diferencial. Se extrajo el ARN total de las VE para cuantificar los niveles de miR-146a y del sedimento urinario (pellet celular) para la cuantificación de ARNm, en ambos casos mediante RT-qPCR. Los resultados mostraron un incremento significativo de los niveles de miR-146a en Exo respecto a MV en el grupo de pacientes con NLA (20 veces, $p = 0,0098$). Los niveles de miR-146a en Exo en NLA estuvieron 79 veces aumentados frente al grupo control ($p < 0,0001$), 39 veces respecto a NLR y 26 veces frente a LES sin NL. Además, los niveles exosomales de miR-146a se correlacionaron directamente con la proteinuria mostrada por los pacientes ($r = 0,71$, $p = 0,0004$). Por último, se observó una disminución de los niveles de ARNm de las moléculas diana de miR-146a en pacientes de LES, especialmente con NLA. En conclusión, miR-146a está enriquecido en exosomas urinarios en NLA y un aumento en sus niveles está asociado con la presencia de proteinuria. Los niveles exosomales de miR-146a en orina serían un potencial marcador no invasivo de daño renal en el LES.

Palabras clave: Lupus eritematoso sistémico, nefropatía lúpica, miR-146a, exosomas, niveles de ARNm, STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1, TRAF6, orina.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease in which autoantibodies are produced against double-stranded DNA, and other nuclear and cytoplasmic components,

and it affects many organs. Renal affectation “lupus nephritis” (LN) is the most frequent one. Intercellular communication by extracellular vesicles (EV), especially exosomes (Exo), which contain proteins, messenger RNA (mRNA), micro RNA (miRNA) and DNA, seems to play an important role in the development of this disease. It has been shown that miRNA expression is modulated in SLE, especially in active LN (ALN), which suggests that miRNAs have a relevant role in the pathology. MicroRNA-146a (miR-146a), in particular, has been found to be 100-fold increased in Exo in ALN, being able to discriminate the presence or not of this condition. The objective of this work is to quantify whether there is a higher amount of miR-146a in Exo than microvesicles (MV); to check whether there is an increase of this miRNA both in Exo and MV in urine from SLE patients with LN compared to the control group or patients without LN and whether this increase is associated with proteinuria; and to study the effect on mRNA levels of miR-146a molecular targets: STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 and TRAF6, involved in the activation of inflammatory response genes. Urine samples were collected from 40 patients with SLE, 15 with ALN, 10 with LN with remission (RLN) and 15 without NL (SLE), and 20 healthy controls. Extracellular vesicles (Exo and MV) purification was performed by differential ultracentrifugation. Total RNA was extracted from EV to quantify miR-146a levels and from the urine cell pellet for mRNA quantification, in both cases by RT-qPCR. The results showed a significant increase in miR-146a levels in Exo compared to MV in ALN patients (20-fold, $p = 0.0098$). The amount of urinary exosomal miR-146a in ALN showed a 79-fold change compared to that for controls ($p < 0.0001$), a 39-fold change compared to LN in RLN and a 26-fold change compared to SLE without LN. In addition, urinary exosomal miR-146a levels correlated directly with proteinuria ($r = 0.71$, $p = 0.0004$). Finally, a decrease in mRNA levels of miR-146a target molecules was observed in patients with SLE, especially in ALN. In conclusion, miR-146a is enriched in urinary exosomes in NLA and an increase in its levels is associated with the presence of proteinuria. Urinary exosomal miR-146a levels would be a potential non-invasive marker of renal injury in SLE.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, miR-146a, exosomes, mRNA levels, STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1, TRAF6, urine.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Lupus eritematoso sistémico (LES)

1.1.1. Definición y epidemiología

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica en la que tiene lugar una alteración del sistema inmune innato y adquirido que lleva a la pérdida de tolerancia frente a antígenos propios. Esto da lugar a un cuadro inflamatorio de afectación multisistémica con una amplia variedad de formas clínicas.

Esta patología se da principalmente en mujeres en edad fértil (15-40 años), con una relación mujer:hombre de 9:1 (Simard y Costenbader, 2007). Aunque la prevalencia global del LES es de aproximadamente 1 caso por cada 2.500 habitantes (Kelly *et al.*, 2002), su incidencia ha aumentado en los últimos años debido, en gran parte, al avance en las técnicas de diagnóstico. Además, tanto la prevalencia como la incidencia del LES varían en función del área geográfica y del grupo étnico analizados; siendo más elevadas en afroamericanos (prevalencia de 20 cada 10.000 habitantes) y también en caucásicos del norte de Europa. En España se estima una prevalencia de 9 casos por cada 10.000 habitantes (Rúa-Figueroa, 2014).

Aunque la supervivencia de los pacientes de LES ha mejorado en las últimas décadas, el riesgo de muerte de estas personas sigue siendo de 2 a 3 veces mayor que el de la población general (Rúa-Figueroa y Erasquin, 2008). Además, su enfermedad implica una baja calidad de vida y un gran coste sanitario directo e indirecto.

1.1.2. Etiopatogenia y clínica

La etiología de esta enfermedad es compleja. Existen múltiples factores implicados: factores genéticos como genes del complejo mayor de histocompatibilidad, factores ambientales de muy diverso tipo, factores hormonales, así como también diversas alteraciones celulares y pérdida en el equilibrio de los niveles de algunas citocinas (Vyse and Kotzin, 1996; Gómez-Puerta y Cervera, 2008).

El LES se corresponde con una hipersensibilidad de tipo III, es decir, una enfermedad autoinmune mediada por inmunocomplejos. En ella tiene lugar una presentación antigénica aberrante debido a un proceso alterado de apoptosis y/o insuficiente eliminación de restos celulares que lleva a la acumulación extracelular de componentes nucleares, como fragmentos de ADN de doble cadena, ARN, nucleosomas e histonas, y citoplasmáticos (libres o englobados en micropartículas) que estimula los receptores TLR y la vía del IFN (Lech y Anders, 2013; Pisetsky, 2017). De este modo, se desencadena una respuesta policlonal persistente contra numerosos autoantígenos que da lugar a la formación de inmunocomplejos, activa el complemento y produce inflamación y daño tisular sistémico (Molina, 1989; Morel, 2017).

La afinidad y el tamaño clonal de dichos efectores inmunológicos adaptativos persistentes, anticuerpos y células T autorreactivas, determinan la actividad de la enfermedad (Hiepe *et al.*, 2011). Cualquier estímulo que induce la expansión clonal de los linfocitos autorreactivos puede provocar un aumento de la actividad de la enfermedad (Weidenbusch *et al.*, 2017), como las infecciones víricas por EBV o citomegalovirus (Draborg, 2012), la radiación ultravioleta o determinados fármacos como los derivados de las sulfas, antiarrítmicos o vasodilatadores (Gómez-Puerta y Cervera, 2008; Patel y Richardson, 2015).

El LES es una enfermedad de presentación clínica heterogénea, ya que como su nombre indica produce inflamación y daño multisistémico, lo que incluye la afectación de gran variedad de órganos y tejidos. Entre sus manifestaciones clínicas son frecuentes los síntomas inespecíficos como malestar general, fatiga, fiebre y pérdida de peso. Además de esto, la mayoría de los pacientes de LES presentan lesiones en la piel, articulaciones, membranas serosas y riñones, que da lugar a nefropatía. También se asocia con una gran variedad de trastornos del sistema nervioso, gastrointestinales y cardiovasculares, por lo que abarca un amplio rango de afectación que va desde únicamente epitelial (Bodemer, 2004) hasta graves alteraciones hematológicas, neuropsíquicas, etc. (Shaikh *et al.*, 2010; Morrison *et al.*, 2014). Para mayor complicación, la gravedad de las manifestaciones es variable y se suelen alternar exacerbaciones de la enfermedad con periodos de relativa remisión.

Los criterios del *American College of Rheumatology* para la clasificación del lupus eritematoso sistémico son los siguientes (Tabla 1):

Tabla 1. Criterios del *American College of Rheumatology* para la clasificación del LES.

| Criterio | Definición |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Eritema malar | Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares respetando los pliegues nasolabiales. |
| 2. Eritema discoide | Zonas eritematosas elevadas con escamas queratóticas adherentes y con taponamiento folicular. En las lesiones antiguas puede producirse cicatrización atrófica. |
| 3. Fotosensibilidad | Erupción cutánea desproporcionada tras la exposición a la luz solar. |
| 4. Úlceras orales | Úlceras orales o nasofaríngeas normalmente indoloras. |
| 5. Artritis | Artritis no erosiva en dos o más articulaciones periféricas, con inflamación, derrame sinovial o dolor a la palpación. |
| 6. Serositis | Pleuritis o pericarditis. |
| 7. Nefropatía | Proteinuria persistente superior a 0,5 g/24h. Cilindruria: de hematíes o hemoglobina, cilindros granulosos, tubulares o mixtos. |
| 8. Alteración neurológica | Convulsiones o psicosis, en ausencia de trastorno metabólico, electrolítico o de fármacos que las puedan producir. |
| 9. Alteración hematológica | Anemia hemolítica con reticulocitosis o Leucopenia < de 4.000/mm ³ en 2 ocasiones o Linfopenia < de 1.500/mm ³ en 2 ocasiones o Trombocitopenia < de 100.000/mm ³ no secundaria a fármacos. |
| 10. Alteración inmunológica | Anti-ADNdc positivo o Anti-Smith positivo o Anticuerpos antifosfolípidos positivos basado en: 1) Anticuerpos anticardiolipinas (IgG o IgM). 2) Anticoagulante lúpico. Falso positivo en el test serológico para la sífilis . |
| 11. Anticuerpos antinucleares positivos | Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o por otro test equivalente en ausencia de sustancias capaces de producir lupus inducido por fármacos. |

(Adaptada de Merino *et al.*, 2013)

En el seguimiento de los pacientes de LES, particularmente en aquellos con afectación renal, se recomienda utilizar determinaciones periódicas de marcadores como las proteínas del complemento C3 y C4, los anticuerpos anti-ADNdc, o la proteinuria como predictores de enfermedad activa. Los niveles bajos de C3 y C4 y valores altos de anti-ADNdc se han asociado con brotes de la enfermedad (Birmingham *et al.*, 2010; Ekblom-Kullberg *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de estar bien establecidos y ser fáciles de medir, clínicamente no son tan específicos ni tan sensibles como se desearía (Narayanan *et al.*, 2010). Actualmente, el índice de actividad del lupus eritematoso sistémico (SLEDAI) es el indicador más comúnmente utilizado. Este último consiste en una lista de 24 características, 16 de las cuales son variables clínicas (donde el especialista decide si cada manifestación determinada está presente o ausente en los últimos 10 días) y 8 son pruebas de laboratorio como el análisis de orina, los niveles de complemento sanguíneo, el aumento de los niveles de anticuerpos anti-ADN y el bajo recuento de plaquetas y glóbulos blancos. Además, se trata de una herramienta ponderada, en la que los descriptores se multiplican por el “peso” del órgano en cuestión; por ejemplo, la artritis se multiplica por 4, los descriptores renales por 4 y los descriptores del sistema nervioso central por 8 (Petri, 2007). Este índice define el grado de afección lúpica en cualquier momento dado, que puede oscilar desde la remisión o actividad mínima o nula, hasta la actividad grave que comprometa la vida del paciente. Una puntuación total de 6 o superior parece ser consistente con un estado de enfermedad activo (Gladman *et al.*, 2002).

La determinación del grado o intensidad de la enfermedad permite identificar el grado de daño progresivo que ha experimentado el paciente. Esto es de gran ayuda para el pronóstico a largo plazo y determinante para indicar el tratamiento, ya que éste es proporcional a la intensidad de la enfermedad y varía de un paciente a otro, según la actividad, los órganos afectados y el daño acumulado (Miniño, 2008). Sin embargo, como se indica más arriba, en el SLEDAI las afectaciones neurológicas reciben un mayor peso de la actividad lúpica, por lo que los clínicos tampoco lo consideran el índice más adecuado de actividad.

1.1.3. Daño renal. Nefropatía lúpica (NL)

La afectación del riñón constituye una importante causa de morbilidad en el LES, puesto que hasta un 75% de los pacientes puede desarrollar algún tipo de daño en este órgano durante el transcurso de la enfermedad (Cervera *et al.*, 2006).

La nefropatía lúpica (NL) es una de las complicaciones más graves asociadas al LES y marca claramente el pronóstico de los pacientes (Jin *et al.*, 2018), siendo aquellos con esta condición los de peor pronóstico. La NL puede progresar a enfermedad renal en etapa terminal dentro de los 15 años siguientes al diagnóstico en un 10-30% de los pacientes (Maroz *et al.*, 2013); requiriendo finalmente hemodiálisis o trasplante y disminuyendo considerablemente la supervivencia de los pacientes (KDIGO guidelines, 2012).

La patogénesis de la NL es un proceso complejo y el mecanismo exacto por el que se produce aún se desconoce a día de hoy (Jin *et al.*, 2018). Los autoanticuerpos dañan el tejido renal al unirse a antígenos propios de la matriz extracelular o glicoproteínas de la superficie de las células glomerulares o al producirse el depósito de inmunocomplejos (Rekvig *et al.*, 2004).

Esto desencadena un aumento en la producción de citocinas y quimiocinas e induce la activación del complemento, neutrófilos y macrófagos, provocando inflamación y fibrosis (Lech y Anders, 2013). Todo ello origina una glomerulonefritis con proteinuria, hematuria, disminución del filtrado glomerular (FGR) y disfunción renal progresiva. En los últimos años, diversos artículos han establecido que en el desarrollo de esta enfermedad parece jugar un papel importante la comunicación intercelular vía vesículas extracelulares, especialmente exosomas (Salih *et al.*, 2014) y su contenido en micro ARNs (miARNs), muy importantes en el mantenimiento de la homeostasis de este órgano (Chandrasekaran *et al.*, 2012; Jaswani *et al.*, 2017).

1.2. Vesículas extracelulares (VE)

Las vesículas extracelulares (VE) son un grupo heterogéneo de estructuras membranosas recubiertas por bicapa lipídica producidas por células pueden ser divididas en dos categorías principales: exosomas (Exo) y microvesículas (MV), que se originan en el sistema endosomal o se desprenden de la membrana plasmática, respectivamente (van Niel *et al.*, 2018) (Figura 1). El contenido de las VE (*carga*) puede incluir proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, incluyendo secuencias de ADN y ARN (ARNm y ARN no codificante, como miARN) (Valadi *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2014).

| a | Exosomes | Microvesicles |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Origin | Endosome | Plasma membrane |
| Size | 50–150 nm | 50–500 nm (up to 1 μ m) |
| Other names (according to their origin, size and morphology) | <ul style="list-style-type: none"> • Protasomes • Tolerosomes • Dexosomes • Nanovesicles • Exosome-like vesicles and others | <ul style="list-style-type: none"> • Microparticles • Blebbing vesicles • Shedding vesicles • Oncosomes • ARMs • Migrasomes • Neurospheres • Apoptotic bodies |

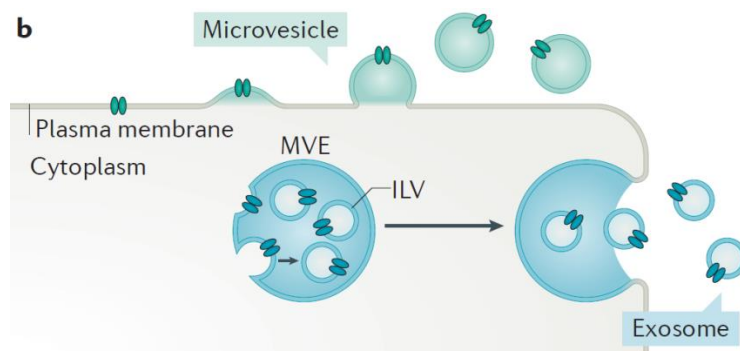


Figura 1. Características principales de las vesículas extracelulares. **a)** Las VE comprenden una población heterogénea de vesículas membranosas de diverso origen cuyo tamaño varía de 50 nm hasta 1 μ m. **b)** Las VE se forman por evaginación de la membrana plasmática, en el caso de las MV, o como vesículas intraluminales (VIL/ILV) en endosomas multivesiculares (EMV/MVE) que dan lugar a los exosomas al fusionarse los EMV con la membrana plasmática. (Extraída de van Niel *et al.*, 2018)

Las VE constituyen un nuevo sistema de comunicación paracrina; pueden ser liberadas por una célula donadora e incorporadas por una célula receptora, modificando su fenotipo (Raposo y Stoorvogel, 2013). Al llegar a la célula receptora, las vesículas pueden incorporarse a ésta por fusión directa con la membrana plasmática o con la membrana endosómica, tras su internalización por endocitosis directa (fagocitosis) o facilitada (por clatrina o caveolina). La fusión de las membranas es necesaria para liberar el contenido intraluminal de las vesículas en el citoplasma de las células receptoras y producir cambios en las células. Además, las VE también pueden presentar antígenos a la célula receptora o unirse a proteínas de su superficie como proteoglicanos o integrinas, activando cascadas de señalización. De este modo, tanto la unión en superficie de las VE como la incorporación del *cargo* transportado por éstas puede activar diferentes respuestas y procesos en la célula receptora (van Niel *et al.*, 2018) (Figura 2).

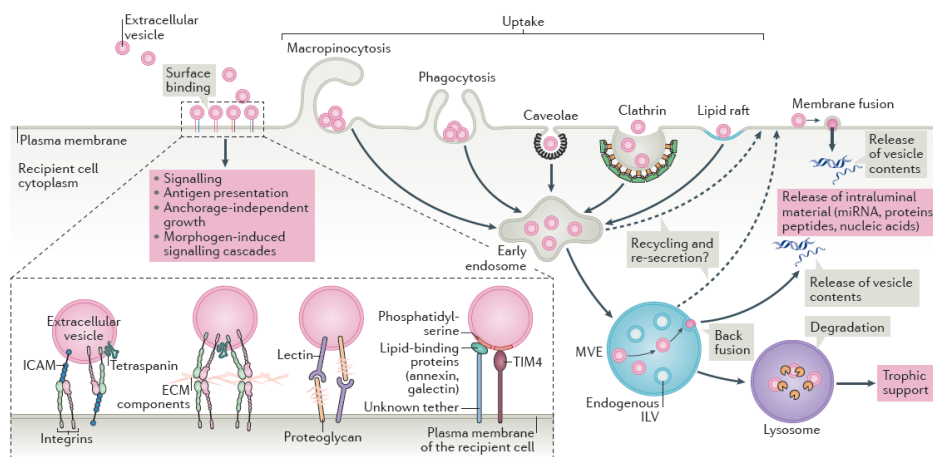


Figura 2. Destino de las vesículas extracelulares en las células receptoras. En la célula receptora, las VE pueden unirse en superficie (p.e. a integrinas) e iniciar cascadas de señalización; internalizarse y entrar en la vía canónica endosomal para re-secreción, liberación del *cargo* al citoplasma, metabolismo y/o reciclaje de componentes; o fusionarse directamente con la membrana plasmática y entregar el *cargo* transportado. (Extraída de van Niel *et al.*, 2018)

Así, estas vesículas permiten intercambiar gran variedad de material e información entre células y, por ello, en la actualidad se consideran un mecanismo adicional para la comunicación intercelular involucrado en múltiples procesos fisiológicos y patológicos (van Niel *et al.*, 2018). Su presencia ha sido descrita en diferentes fluidos biológicos, como saliva, plasma sanguíneo, suero u orina, de los que pueden aislarse (Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Entre ellos, la orina constituye una fuente accesible y muy útil para la obtención de VE, y un método no invasivo para analizarlas y poder identificar nuevos biomarcadores para enfermedades renales como la nefropatía lúpica.

1.2.1. Exosomas

Los exosomas (Exo) son vesículas de un tamaño comprendido entre 50 y 150 nm (van Niel *et al.*, 2018). Se forman por la invaginación de la membrana endosomal durante la

maduración de los cuerpos multivesiculares y se secretan tras la fusión de estos compartimentos con la superficie celular (Figura 1b). Además de proteínas, lípidos y pequeños fragmentos de DNA, su *carga* está enriquecido en miARNs, ARNm, ARN de transferencia, ARN pequeño nuclear y ARN largo intergénico (Bellingham, 2012). La naturaleza y abundancia del *carga* varían según el tipo celular del que provienen y con frecuencia están influenciadas por el estado fisiológico o patológico del individuo (Minciacchi *et al.*, 2015).

Por lo que respecta a la secreción de exosomas, ésta se ha descrito en muchos tipos celulares diferentes, y sus implicaciones en la comunicación intercelular tanto en estados normales, como en estados patológicos están ahora bien documentadas (Colombo *et al.*, 2014). En cuanto a su implicación a nivel renal, estas vesículas pueden derivar de varios tipos celulares del riñón y el tracto urinario, desde los podocitos en el interior del glomérulo renal, hasta las células epiteliales que recubren el túbulo renal y el tracto urogenital (Fang *et al.*, 2013). Los exosomas aislados de la orina se conocen como exosomas urinarios y su estudio puede ofrecer información sobre el estado fisiopatológico del sistema urogenital (Chandrasekaran *et al.*, 2012).

1.3. Micro ARN

1.3.1. Definición

Los micro ARNs (miARNs) son ARNs cortos no codificantes de entre 20 y 24 nucleótidos que están implicados en la regulación postranscripcional de la expresión génica en organismos multicelulares. Los miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II como parte de transcritos primarios poliadenilados y con caperuza (pri-miARN). El transcrito primario se escinde mediante la enzima ribonucleasa de tipo III *Drosha* para producir un miARN precursor en forma de horquilla de aproximadamente 70 nucleótidos (pre-miARN), que se escinde adicionalmente mediante la ribonucleasa citoplasmática *Dicer* para generar el miARN maduro. Éste se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que reconoce a los ARNm diana a través del apareamiento de bases con el miARN (NCBI) (Figura 3).

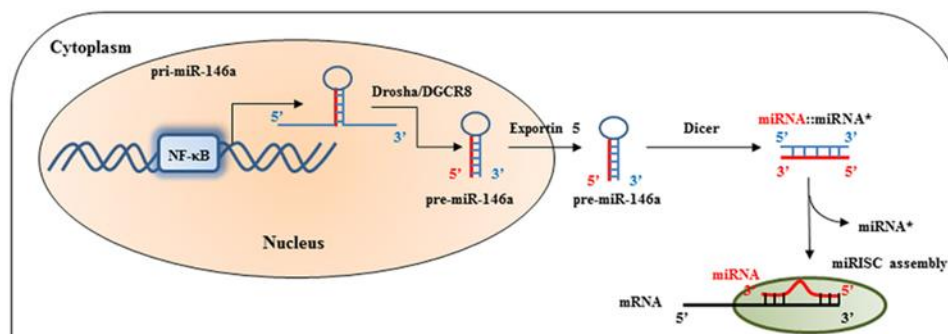


Figura 3. Formación y maduración del miARN. (Adaptada de Saba *et al.*, 2014)

Debido a su modo de actuación, los miARNs son especialmente adecuados para formar parte de bucles de regulación génica. Los miARNs actúan sobre los ARNm diana uniéndose a secuencias parcialmente complementarias en la región 3'UTR, lo que lleva a la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la represión de la traducción por parte del ribosoma, degradación directa del ARNm o desadenilación y decaimiento del mismo (Saba *et al.*, 2014).

Dado que, en promedio, cada miARN es capaz de reprimir cientos de ARNm diana, el análisis computacional predice que hasta el 60% de los genes de mamífero podrían ser regulados por estas moléculas (Friedman *et al.*, 2009). Los miARNs desempeñan funciones críticas como reguladores de numerosas vías y procesos biológicos en órganos y tejidos (Kloosterman y Plasterk, 2006). Además, cambios en el perfil de los miARNs se han correlacionado con diferentes condiciones fisiopatológicas y pueden ser específicos de estados patológicos particulares; p. e. en cáncer, enfermedades reumáticas o enfermedades renales, incluyendo el LES (Calin *et al.*, 2006; Alevizos e Illei, 2010; Zhang *et al.*, 2014; Pérez-Hernández *et al.*, 2015; Cárdenas-González *et al.*, 2017). Por todo esto, en los últimos años ha habido un incremento en el interés por el estudio de micro ARNs como biomarcadores en diferentes enfermedades.

1.3.2. miARNs en la enfermedad renal y LES

Se ha descrito un papel importante para los miARNs en el desarrollo, homeostasis y función del riñón (Chandrasekaran *et al.*, 2012), con una mayor abundancia de miARNs en éste en comparación con otros órganos (Schena *et al.*, 2013). Asimismo, los miARNs regulan la progresión de la enfermedad renal, tanto a nivel glomerular como tubular y constituyen importantes mediadores de la fibrosis tisular (Lorenzen *et al.*, 2011).

Estos miARNs específicos de tejido pueden ser liberados al torrente sanguíneo, así como a la orina (Mitchell *et al.*, 2008), en gran medida contenidos en exosomas y otras VE, y su estudio permite conocer de manera sencilla y no invasiva información acerca del estado fisiopatológico del individuo (Fang *et al.*, 2013). Así, el estudio del perfil de expresión de miARNs en células sanguíneas, fluidos biológicos o tejidos diana obtenidos de pacientes con LES ha revelado firmas únicas al compararlos con individuos sanos o con otras enfermedades (Dong *et al.*, 2009; Delic *et al.*, 2016). Además, se ha visto que la desregulación de estos miARNs está asociada con la actividad de la enfermedad y afectación de órganos en el LES (Shen *et al.*, 2012); como se ha visto para los niveles bajos de expresión de miR-146a en PBMCs y altos en el glomérulo y en plasma sanguíneo, asociados en particular con la enfermedad renal y su grado de actividad en los pacientes estudiados (Tang *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012; van Craenenbroeck *et al.*, 2015).

De esta manera, los niveles de miARNs suponen una herramienta valiosa a la hora de comprender, diagnosticar y descubrir opciones terapéuticas para las enfermedades renales y para el LES; y el miR-146a en concreto muestra indicios de ser relevante en el caso que nos ocupa, enfermedad renal en el LES (Shen *et al.*, 2012; Schena *et al.*, 2013).

1.3.3. miR-146a y sus moléculas diana

El micro ARN 146a (miRBase: MI0000477) es un miembro de la familia de micro ARNs “miR-146”, que se compone de dos miARNs conservados evolutivamente: miR-146a y miR-146b, y está presente en mamíferos.

El estudio de miR-146a ha puesto de manifiesto que es uno de los miARNs más importantes en el control de la señalización inmunológica e inflamatoria (Saba *et al.*, 2014). La alteración de sus niveles se ha relacionado con la fibrosis e inflamación renal en la diabetes y el lupus (Feng *et al.* 2011; Chandrasekaran *et al.*, 2012; Ichii *et al.*, 2012). Además, los niveles de este miARN se han visto elevados en nefropatía por IgA (Wang *et al.*, 2011). En el caso del LES, se ha demostrado que los niveles de miR-146a se hallan incrementados en exosomas urinarios, sobre todo en pacientes con nefropatía lúpica activa (NLA) y que son capaces de discriminar la presencia o no de esta condición (Ichii, *et al.*, 2012; Pérez-Hernández *et al.*, 2015).

Este miARN constituye un regulador clave de la respuesta inmune, modulando negativamente las rutas de señalización del interferón (IFN) y TLR (Saba *et al.*, 2014), al reprimir los ARNm de proteínas que participan en ellas. Entre las dianas moleculares de miR-146a se encuentran el transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1) y 2 (STAT2), el receptor tipo *Toll* 4 (TLR4), la quinasa 1 asociada a receptor de IL-1 (IRAK1) y el factor asociado al receptor de TNF 6 (TRAF6) (He *et al.*, 2017; Weidenbusch *et al.*, 2017).

1.3.3.1. STAT1 y STAT2

Todos los miembros de la familia IFN-I (IFN α e IFN β) se unen a dos únicos receptores de superficie de tipo I, IFNR1 e IFNR2 y los genes inducidos por ellos se han agrupado bajo el nombre de la “firma del IFN” que se identificó como característica de los pacientes con LES en estudios con *microarrays* (Baechler *et al.*, 2003). El IFN γ , miembro de la familia de IFN-II, se une a receptores IFNRs de tipo II.

Estas citocinas inician la ruta de las quinasas JAK/STAT, que acaba con la estimulación, por parte de complejos formados por STAT1, STAT2 e IRF9, de la transcripción de múltiples genes que participan en diversos procesos biológicos asociados con LES, como la supervivencia de las células B y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos; proliferación de las células dendríticas mieloides; aumento de la expresión del MHCII, CD86 y CD80; activación de linfocitos T citotóxicos; y supresión de linfocitos T reguladores. Debido a la actuación de miR-146a, la formación de los complejos nombrados se ve impedida y, por ende, su estimulación de la transcripción de dichos genes (Weidenbusch *et al.*, 2017) (Figura 4).

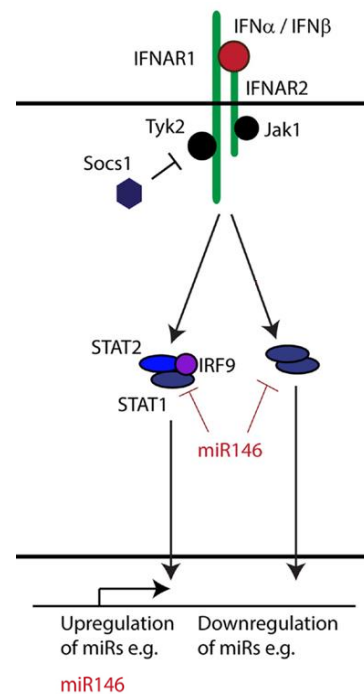


Figura 4. Vía del IFN α/β . miR-146a regula en forma de retroalimentación negativa. (Adaptada de Forster *et al.*, 2015)

1.3.3.2. TLR4, IRAK1 y TRAF6

TLR4 es un receptor de superficie celular perteneciente a la familia de los receptores tipo *Toll* (TLRs), mientras que IRAK1 y TRAF6 son proteínas adaptadoras que intervienen en la misma ruta y son cruciales en la señalización proinflamatoria (Boldin *et al.*, 2011).

La familia de los TLRs comprende diez miembros que reconocen patrones moleculares característicos de patógenos que desencadenan la respuesta del sistema inmune: ARN de doble cadena (ARNdc), lipopolisacárido de la membrana externa bacteriana (LPS), proteínas flagelares y algunos lipopéptidos. TLR4 reconoce compuestos como el LPS, proteínas hsp (*heat shock proteins*), ácido hialurónico, heparán sulfato, etc. Los componentes acumulados extracelularmente el LES son capaces de activarlos (Lech y Anders, 2013; Ma *et al.*, 2015).

IRAK1 se considera un enlace del TLR con TRAF6, proteína que continúa la señalización de los miembros de la superfamilia de receptores de TNF y la superfamilia TLR/Receptor de IL-1, y funciona como activador intracitoplasmático del factor de transcripción NF- κ B (Zhong *et al.*, 2017).

El miR-146a actúa sobre el ARNm de las moléculas que participan en la cascada de señalización dependiente de MyD88 (Figura 5). Mediante el mecanismo de actuación característico de los miARNs, inhibe la síntesis de TLR4, IRAK1 y TRAF6 y esto se traduce en la disminución de la translocación al núcleo de NF- κ B (He *et al.*, 2017). De esta manera, se produce un descenso en la transcripción de genes que codifican para mediadores inflamatorios, como son TNF e IL-1 β y otras citocinas proinflamatorias como IFN γ , IL-6 e IL-8 (López-Bojorquez, 2004).

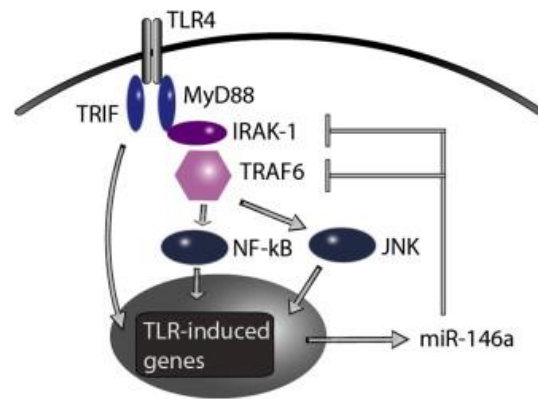


Figura 5. Ruta de señalización de TLR4. miR-146a actúa como retroalimentación negativa de la señalización. (Extraída de Junker, 2011)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se ha demostrado que perfiles específicos de miARNs están asociados a diferentes condiciones fisiopatológicas y que cambios en ellos están vinculados a la progresión de diferentes enfermedades. En el caso del lupus eritematoso sistémico, se han establecido correlaciones entre los niveles de ciertos miARNs en sangre, orina y en el interior de vesículas extracelulares con el grado de actividad y presencia de daño renal en la nefropatía lúpica, con especial relevancia para miR-146a. Sin embargo, si el aumento en los niveles de miR-146a en el LES es específico de exosomas o también se da en microvesículas, si este aumento se da especialmente en la nefropatía lúpica activa y si está relacionado con la presencia de proteinuria, no se ha analizado hasta el momento. Así como tampoco se han medido los niveles de sus ARNm diana en el sedimento urinario.

Por ello, los objetivos de este estudio son:

1. Cuantificar los niveles de miR-146a en vesículas extracelulares urinarias, exosomas y microvesículas, y comparar los valores entre las dos subpoblaciones en pacientes de LES, con y sin nefropatía lúpica y también en controles sanos.
2. Comprobar si se observan cambios en los niveles de miR-146a, tanto en exosomas como en microvesículas, en pacientes con nefropatía lúpica respecto al grupo control o pacientes de LES sin daño renal. Además, estudiar si esos cambios en los niveles de miR-146a están asociados con la proteinuria.
3. Analizar los niveles de ARN mensajero de los genes regulados por miR-146a: STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6 en el sedimento urinario de pacientes de LES, con y sin nefropatía lúpica y controles sanos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de pacientes y controles

Un total de 20 controles sanos voluntarios y 40 pacientes diagnosticados de lupus eritematoso sistémico (15 sin afectación renal, 15 con NL activa y 10 con NL en remisión), fueron seleccionados de las consultas externas por especialistas del servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valencia, donde se realizaron las entrevistas personales protocolizadas junto con las pruebas clínico-bioquímicas para evaluar el estado del LES que permitieron obtener los tres grupos de pacientes.

Todos los controles sin diagnóstico previo de LES o NL presentaron una historia clínica negativa de enfermedad crónica y/o patología aguda conocida en el momento de su inclusión en el estudio. Todos los pacientes con LES cumplieron con los criterios de clasificación del *American College of Rheumatology* para la actividad de la enfermedad.

Los datos clínicos que se midieron incluyeron: recuento sanguíneo, creatinina sérica, tasa de filtración glomerular renal (FGR) estimada a partir del valor de la creatinina mediante la ecuación MDRD (Levey *et al.*, 2006), niveles de las proteínas del complemento C3 y C4, autoanticuerpos anti-ADNdc, proteinuria de 24 horas y el índice de actividad SLEDAI (Bombardier *et al.*, 1992). La confirmación de la afectación renal se llevó a cabo en el Hospital Clínico mediante biopsia renal.

Según el documento de consenso del Grupo de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (GEAS) de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) y de la Sociedad Española de Nefrología, se consideró NL activa a la presencia de función renal deteriorada con proteinuria ($> 0,5$ g/24h ó > 1 g/24h con proteinuria previa), o con sedimento urinario activo que incluya hematuria, especialmente leucocituria en ausencia de infección, cilindros eritrocitarios y leucocitarios, o biopsia renal con glomerulonefritis activa. Se considerará NL en remisión cuando los pacientes alcancen niveles de proteinuria $< 0,5$ g/24h y un sedimento urinario inactivo (≤ 5 hematíes, ≤ 5 leucocitos, 0 cilindros hemáticos) con función renal estable.

Todos los sujetos participantes del presente trabajo dieron su consentimiento por escrito para formar parte del estudio, el cual se llevó a cabo según las directrices para la investigación con muestras humanas establecidas en la Declaración de Helsinki de 1975 y revisada en 2008 (*World Medical Association Declaration of Helsinki*, 2013), y fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico de Valencia.

3.2. Obtención y procesamiento de las muestras

De cada uno de los sujetos de estudio se recogió una muestra fresca de orina de 100 mL en frascos estériles correspondiente a la primera micción de la mañana. Una vez obtenidas las muestras, se mantuvieron a 4°C y se procesaron dentro de las 2 horas siguientes a su obtención.

3.2.1. Aislamiento de vesículas extracelulares por ultracentrifugación diferencial

El protocolo seguido para el aislamiento de exosomas y microvesículas consistió en la ultracentrifugación diferencial sin ningún tipo de frenado y al vacío para evitar la resuspensión del precipitado.

La orina se repartió en dos tubos de 50 mL estériles y se centrifugó en una centrífuga refrigerada de banco (5804 R. Eppendorf, Hamburg, Germany) a 2.250 g durante 30 min a 4°C. El sedimento urinario se lavó en 1 mL de PBS y se centrifugó a 17.000 g 5 min para obtener el pellet celular definitivo. Del sobrenadante de orina libre de células se congeló una alícuota a -80°C y al resto se le añadió 4.2 mL de una solución inhibidora de proteasas (Aprotinina 0,3 µM, Leupeptina 1 µM, Bestatina 130 µM, EDTA 1 mM, AEBSF 2 mM; Sigma-Aldrich, USA). Seguidamente, se homogenizó bien con la pipeta y se centrifugó en tubos de policarbonato a 19.000 g durante 45 min a 4°C (Ultracentrífuga Optima L 100K; rotor 70.1 Ti, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Tras este paso se obtuvo un pellet rico en microvesículas (MV) y el sobrenadante se centrifugó a 120.000 g durante 70 min a 4°C y para obtener un precipitado o pellet con los exosomas. Este pellet se lavó en 100 µL de PBS filtrado a 0,2 µm e incubó 10 min a 37°C con una solución de Ditiotretitol (DTT) a 200 mg/mL como agente reductor para romper los puentes disulfuro formados en los residuos de cisteína de la proteína THP, abundante en orina. Tras la incubación, la reacción se detuvo añadiendo 5 mL de PBS filtrado a 4°C y se volvió a centrifugar a 120.000 g 70 min, obteniendo así el pellet definitivo de exosomas (EXO) (Figura 6). Los pellets de VE se resuspendieron en 200 µL de PBS, una alícuota de 100 µL se guardó para ser utilizada en *Western Blot*, microscopía electrónica de transmisión y TRPS y otra para la extracción de ARN total. Ambas se congelaron a -80°C hasta su uso.

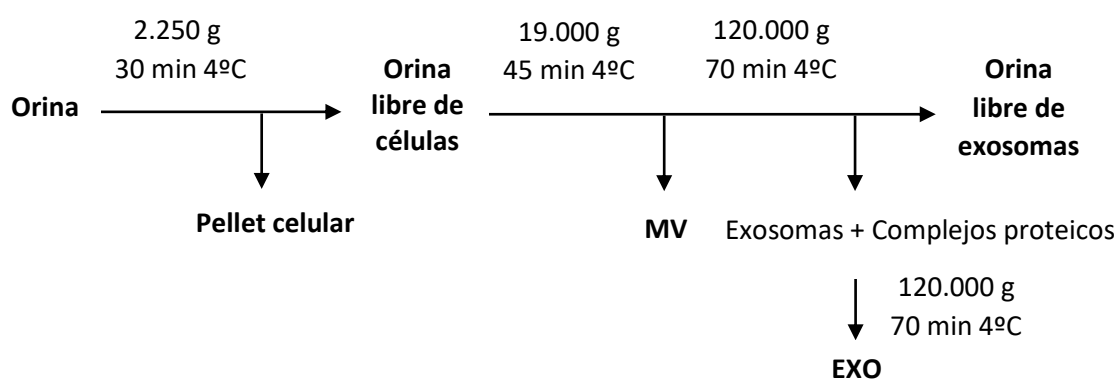


Figura. 6. Esquema del proceso de ultracentrifugación diferencial llevado a cabo. MV: microvesículas; EXO: exosomas.

3.3. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas

Para poder analizar el aspecto y tamaño de las VE y comprobar que las poblaciones de vesículas se separaran bien, comprobando la pureza de la fracción de exosomas aislados, se realizaron los siguientes análisis tras el proceso de ultracentrifugación.

3.3.1. Estudio de microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para comprobar el tamaño las VE aisladas de la orina y su morfología, la tinción negativa es la más utilizada en microscopía electrónica por su rapidez y sencillez. Este tipo de tinción nos permite visualizar vesículas con forma redondeada donde se aprecia claramente la bicapa lipídica también característica de los exosomas (Vlassov *et al.*, 2012). En este caso, se utilizó un contraste con Acetato de Uranilo al 2%.

Partimos de 20 μL de una suspensión de exosomas purificados en PBS, que se depositaron formando una gota en una placa Petri. Pusimos una rejilla de cobre recubierta con una película de Carbón-Formvar encima de la muestra e incubamos durante 15 minutos. A continuación, se puso la rejilla impregnada con nuestra muestra encima de una gota de acetato de uranilo al 2% y se incubó durante 3 minutos en oscuridad. Finalmente, se secó bien la rejilla al aire y se observó la muestra al microscopio electrónico de transmisión (Phillips CM-10 equipado con cámara digital *Soft Image System*, y *software* de adquisición de imágenes ITEM).

Para medir el tamaño de las VE se emplearon 2 muestras de cada fracción, de las que se obtuvieron 10 micrografías de cada tipo (5 de cada muestra). De esta forma, se midió el tamaño de 251 exosomas y 120 microvesículas mediante el programa de análisis de imagen *Image J*, *National Institutes of Health*, y hallamos su media y desviación típica.

3.3.2. Western Blot

Además de características morfológicas como el tamaño, los exosomas pueden ser caracterizados gracias a proteínas de membrana específicas. Se escogió un anticuerpo contra la proteína de membrana CD9 y la proteína TSG-101 del complejo ESCRT-1 clave en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares (Lu *et al.*, 2003).

Una alícuota de 10 μL de pellet de exosomas mezclada con tampón de lisis RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS), se utilizó para determinar el contenido de proteína total mediante el método de Lowry y el kit *Total protein, Micro Lowry, Peterson's modification* (*Sigma-Aldrich, USA*), usando BSA como curva patrón. En una cubeta de electroforesis vertical *XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System* (*Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA*), se cargaron 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de muestra por pocillo en geles de electroforesis 4-12% Bis-Tris NuPAGE® SDS-PAGE (*Life Technologies™, USA*) y se corrió a 200 V y 120 mA durante 90 min, en tampón NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) (*Thermo Fisher Scientific*). Se utilizó un marcador de peso molecular con rango 3-188kDa (*SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard, Thermo Fisher Scientific*).

Tras la electroforesis, mediante el módulo de transferencia *XCell II Blot Module* (*Invitrogen™ Ltd, UK*) las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de polivilideno difloruro (PVDF) a 30 V y 170 mA durante 1 hora y después 10 minutos a 110 mA. Inmediatamente, las membranas se bloquearon durante toda la noche con BSA al 1% en tampón Tris-HCl con Tween 20 al 0.05% (v/v) a 4°C. Tras el bloqueo, se dejó en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos frente antígenos exosomales: el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-CD9 (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA*) a una concentración 1:300 y el anticuerpo primario monoclonal de ratón TSG-101 (*Abcam, UK*) 1:500 en tampón Tris-HCl con Tween 20 al 0.05% (v/v). También se incubó con anticuerpos primarios frente antígenos no exosomales: anticuerpo primario policlonal de conejo frente calnexina 1:600 (*Abcam, UK*), anticuerpo primario monoclonal de conejo GM-130 1:1200 (*Abcam, UK*) y anticuerpo primario policlonal de conejo frente nucleoporina 62 1:500 (*Abcam, UK*).

Después de 3 lavados de 5 min, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (*Sigma, St Louis, MO, USA*) 1:20.000, durante 1h a temperatura ambiente y en agitación suave. Para su visualización, la membrana fue incubada con el colorante NBT/BCIP (*Sigma-Aldrich, USA*) y las bandas obtenidas fueron digitalizadas y cuantificadas usando *Gel capture* (v.4.30) y el programa *TotalLab TL-100* (v.2008).

3.3.3. Perfil de tamaños mediante *qNano* (TRPS)

Para el análisis de partícula única se utilizó el aparato *qNano Gold* (*Izon Science Ltd, Christchurch, New Zelanda*), que se basa en el paso de las partículas a través de un nanoporo de apertura regulable con un voltaje que crea una línea de corriente base de entre 110-130 nA, lo que origina pulsos de resistencia proporcionales al tamaño de las vesículas. Las muestras se compararon con un set de bolas de calibración que presenta un tamaño y concentración conocidos. Las preparaciones de VE se diluyeron 1:100 en PBS, así como las partículas de calibración (suministradas por *Izon*). Los exosomas se midieron usando un nanoporo NP150, que posee un rango de sensibilidad teórico para vesículas de 70 a 420 nm, y perlas de calibración CPC200 (media 203 nm) mientras que para las microvesículas se usó un nanoporo NP400 y CPC400 (media 335 nm). En ambos casos, se cargaron 40 µL de 4 muestras y se midieron al menos 300 eventos por cada muestra (n=8). Los datos se registraron utilizando el programa *Izon Control Suite Software* versión 2.2.2.111. Para la detección de partículas se usó la altura de bloqueo mínima predeterminada (0,05 nA) y la presión se ajustó a 1,2 kPa.

3.4. Extracción de ARN de sedimento urinario y vesículas extracelulares

3.4.1. Extracción de ARN de sedimento urinario

Se realizó la extracción de ARN total del pellet urinario utilizando el kit *RNeasy® Mini Kit* (*QIAGEN®, CA, USA*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la técnica

conocida como “extracción en fase sólida”. Se trata del uso de pequeñas columnas que poseen una matriz formada por fibras de silicio que unen específicamente el ARN y lo retienen.

Al sedimento urinario se le añadió 700 µl del reactivo *QIAzol*[®] para la lisis y homogenización de la muestra. Para separar la fase acuosa y fenólica, se añadió 140 µl de cloroformo, se homogenizó e incubó a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa, se precipitó el ARN total añadiendo etanol al 100% y, tras varios pasos de lavado con tampones específicos (*Wash Solutions*) y sus correspondientes centrifugaciones, se eluyó el ARN retenido en la columna con 50 µL de solución de elución.

Extraído el ARN, se midió su concentración empleando el equipo espectrofotométrico *NanoDrop*[™] *ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA*) midiendo el cociente de absorbancia 260/280. Una vez hecho esto, las muestras se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su utilización, para evitar así la degradación del ARN e impedir la acción de las ribonucleasas (RNAsas).

3.4.2.Extracción de ARN de vesículas extracelulares

El ARN total de exosomas y microvesículas se extrajo empleando el kit de extracción *Total exosome RNA and protein isolation kit* (*Invitrogen*[™], *Life Technologies*[™], *USA*). Basado también en la extracción en fase sólida, utilizando una extracción orgánica con fenol-ácido:cloroformo en pequeñas columnas de silicio.

El volumen de partida fue 100 µL de exosomas purificados y resuspendidos en un tampón proveído por el kit, *Exosome Resuspension Buffer*. Se añadió un volumen de la solución desnaturante inicial: *2X Denaturing Solution*, con alta concentración de sales como el tiocianato de guanidinio que desnaturiza proteínas como las ribonucleasas que podrían degradar el ARN de la muestra. Tras una incubación de 5 min en hielo, se añadió 400 µL de fenol-ácido:cloroformo que ayuda a precipitar las proteínas y lípidos de la muestra, mientras el ARN permanece disuelto en la fase acuosa. Se centrifugó la mezcla 5 min a máxima velocidad (≥ 10.000 g) y se obtuvieron tres fases: acuosa rica en ARN, interfase que contiene ADN y fase orgánica con restos proteicos, lipídicos y fenoles.

Tras extraer la fase acuosa rica en ARN (normalmente entre 350-500 µL), esta se mezcló con etanol (1,25 volúmenes) y se pasó por la columna. Tras ser lavada con varios tampones (*Wash Solutions*) y subsecuentes centrifugaciones, se eluyó el ARN unido a las fibras de la columna con 50 µL de la solución de elución y se congeló a -80°C inmediatamente hasta su utilización (Figura 7).

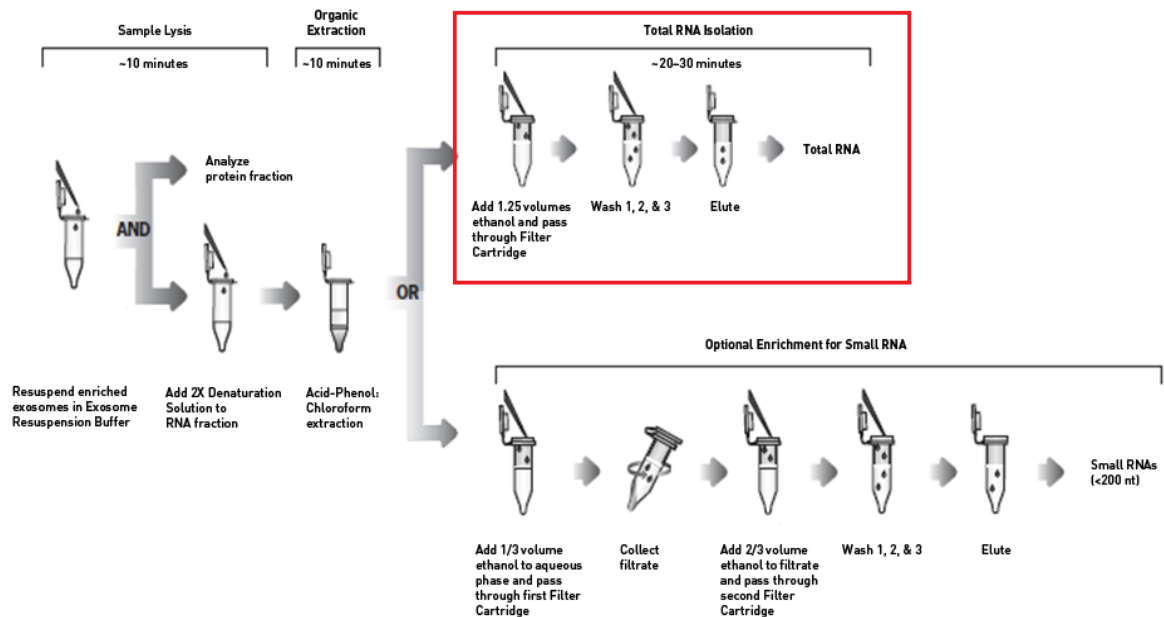


Figura 7. Esquema de la extracción de ARN mediante *Total exosome RNA and protein isolation kit (QIAGEN®)*. Sistema de purificación columnar de extracción en fase sólida. En rojo se muestra el tipo de extracción seguida: aislamiento de ARN total.

3.4.3. Control de normalización: *spike-in* sintético cel-miR-39

Para equiparar las variaciones entre las muestras biológicas y la variabilidad de la técnica de extracción, se introdujo (*spike-in*) un miARN sintético no humano. De este modo, una misma cantidad de miARN sintético sigue todo el proceso desde la extracción inicial hasta la cuantificación por qPCR de una alícuota del eluido, proporcionando una referencia interna de normalización frente a las variaciones técnicas entre las muestras (Kroh *et al.*, 2010).

En este caso, se escogió el miARN cel-miR-39 (QIAGEN®, Germany) que se trata de un miARN conocido en el organismo modelo *C. elegans* y que no presenta secuencias homólogas en humanos. Su secuencia es la siguiente: UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (*miRBase*). El miARN es comprado liofilizado y se resuspende en agua Gibco libre de RNasas. Tras realizar las diluciones indicadas por el fabricante, alcanzamos la concentración stock de trabajo recomendada 1.6×10^8 copias por μL . Se añadieron 3,5 μL de la concentración de trabajo conocida (1.6×10^8 copias por μL) en cada muestra. En todos los casos, la adición del *spike-in* cel-miR-39 se produjo casi al inicio del proceso, tras añadir 2X *denaturing solution* e incubar 5 min, para así inactivar las RNasas presentes en las muestras antes de la inyección del miARN control.

Extraído el ARN, se midió su concentración en el equipo espectrofotométrico NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) midiendo el cociente absorbancia 260/280. Las muestras se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su utilización, para evitar así la degradación del ARN e impedir la acción de las RNasas.

3.5. Cuantificación de miARN

La determinación de los niveles de miARN se realizó a partir del ARN total extraído de las VE (enriquecidas en miARNs) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), que calcula la cantidad de ADN presente en cada ciclo de amplificación mediante la detección de fluorescencia. Para ello, en primer lugar es necesario obtener el ADN complementario (ADNc) a las moléculas de ARN, proceso denominado transcripción inversa o retrotranscripción.

3.5.1. Retrotranscripción (RT)

Se llevó a cabo la retrotranscripción de los miARNs de interés, extraídos de las VE utilizando el kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, USA)* junto a cebadores específicos de cada miARN que forman un *loop* en el extremo 3' del miARN a estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores utilizados en este trabajo. Se utilizaron los cebadores proporcionados por los ensayos *TaqMan® MicroRNA Assays, Thermo Fisher Scientific*.

| miARN | Secuencia del miARN | ID del ensayo <i>Taqman®</i> |
|------------|------------------------|------------------------------|
| cel-miR-39 | UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG | 000200 |
| miR-146a | UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU | 000468 |

Se estableció un preparado (*master mix*) para cada miARN (miR-146a y cel-miR-39) con: 0,15 μ L de dNTPs a 100 mM; 1 μ L de transcriptasa inversa (enzima *MultiScribe™*); 1,5 μ L de buffer 10X; 0,19 μ L de inhibidor de RNasas; 4,16 μ L de agua libre de nucleasas proporcionados por el kit y 3 μ L del cebador proporcionado por el ensayo de ID específica del miARN determinado a 5X. Se dispensaron 12 μ L de *master mix* en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se le añadieron 5 μ L del ARN total extraído. Un control negativo sin ARN fue añadido para cada ensayo.

Una vez añadida la muestra, se incubó cada placa en hielo durante 5 minutos. Seguidamente, se introdujo en el termociclador *Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems®, USA)* y se programó con las siguientes condiciones para llevar a cabo la reacción: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C y 5 min a 85°C. Los productos de la RT fueron congelados a -80°C hasta que se realizó la qPCR.

3.5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Para cuantificar el ADNc obtenido a partir de las moléculas de miARN, se llevaron a cabo qPCRs en las cuales se introdujeron en la misma placa de 384 pocillos dos ensayos, miR-146a y cel-miR-39 para poder normalizar los resultados obtenidos. Cada muestra se cargó por triplicado y se incluyeron controles negativos sin ADNc.

En este caso, utilizamos el *master mix* ya preparado por *Applied Biosystems*[®] para los ensayos *TaqMan*[®], *PCR Universal Master Mix II*, junto a los cebadores específicos correspondientes a la ID del ensayo para la amplificación de cada miARN, tanto el *forward* como el *reverse*, y las sondas *Taqman*[®] conjugadas a fluoróforos, que emiten fluorescencia cada vez que una copia del ADNc es polimerizada. Durante la amplificación que se lleva a cabo en la qPCR, en la extensión (copia) de cada fragmento, un fluoróforo (*reporter*) se desprende de la sonda dando lugar a una señal que irá en aumento a medida que se polimerice más producto.

Se dispensaron 10 µL de *master mix* en cada pocillo de una placa de 384 pocillos a los que se añadió 1 µL de cebador específico para detectar cada miARN a estudio; 7,67 µL de agua libre de nucleasas y 1,33 µL del ADNc producido en el paso anterior de la retrotranscripción. Se incluyeron controles negativos sin ADNc para cada ensayo y la placa se centrifugó brevemente antes de ser cargada al termociclador de qPCR *LightCycler*[®] 480 (*Roche*). El protocolo utilizado fue el recomendado para este tipo de ensayos por el fabricante: desnaturalización inicial de 10 min a 95°C para la activación de la enzima; seguidos de 40 ciclos de amplificación; 15 seg a 95°C para la deshibridación de la doble cadena de ADN y 1 min a 60°C para la extensión de los fragmentos mediante los cebadores específicos.

3.5.3. Análisis de los resultados y normalización

Los datos fueron analizados con el programa *LightCycler*[®] 480 II, mediante el análisis *fit points*, fijando de manera automática los mismos valores de umbral (*threshold*) y ruido de fondo (*noiseband*). El análisis de los datos y cuantificación del producto se realiza en la fase exponencial de amplificación de la PCR, ya que ahí es donde existe una correlación directa con la cantidad de ADNc molde inicial.

La cantidad de cada miARN fue comparada mediante el valor de "Ct" (ciclo *threshold*), también denominado punto de corte o ciclo de cuantificación. Se trata del número de ciclo de PCR al que la emisión de fluorescencia supera el umbral fijado (*threshold*), de manera que a menor valor de Ct, mayor será la cantidad de ARN presente en la muestra.

Para la normalización de los valores de Ct de los miARNs entre muestras por el *spike-in* cel-miR-39, se empleó un procedimiento de normalización por la mediana (Mitchell *et al.*, 2008). Los valores "crudos" (*raw*) de Ct obtenidos para cada miARN se ajustaron de la siguiente manera:

Media de las réplicas de *raw* Ct en la muestra - [(Media de las réplicas de Ct del *Spike-in* en la muestra) - (Mediana de Ct del *Spike-in* en todas las muestras)]

Las cantidades relativas de cada miARN entre muestras se calcularon como cambio de expresión en número de veces (*fold-change*) obteniendo previamente los valores de $\Delta\Delta Ct$. El *fold-change* se calcula de la siguiente manera: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{miARN muestra A}) - \Delta Ct (\text{miARN muestra B})$$

3.6. Cuantificación de ARNm

La determinación de los niveles de ARNm se realizó a partir del ARN total extraído del sedimento urinario o pellet celular también mediante PCR cuantitativa a tiempo real, de manera que el procedimiento a seguir fue el siguiente.

3.6.1. Retrotranscripción (RT)

Se llevó a cabo la retrotranscripción del ARN total extraído del sedimento urinario mediante el kit *Ready-to-go You-primer first-strand beads kit*[®] (GE HealthCare, UK), utilizando las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Gracias a la anterior cuantificación del ARN en *NanoDrop*[™], pudimos saber qué volumen de ARN tomar para obtener una concentración de 300 ng en todas las muestras. De tal forma, según la concentración de las muestras se diluyeron con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) hasta tener un volumen final de 34 μ L a una concentración de 300 ng/ μ L. Para llevar a cabo la reacción, se utilizaron 2 μ L de cebador universal concentrado a 100 ng/ μ L, que está compuesto por hexanucleótidos al azar. Se introdujo en el termociclador a 65°C durante 10 minutos e inmediatamente después, 2 minutos en hielo. A continuación, todo el volumen se traspasó a un *ependorf* proporcionado por el kit, el cual contiene dos bolitas con todos los reactivos necesarios para la reacción. Se dejó reposar durante 1 minuto y se mezcló durante otro minuto para que se disolvieran las bolas. Se centrifugó para asegurarnos que toda la muestra quedara en la parte inferior. El programa de tiempo constó de 25°C durante 10 min y después 90 minutos a 37°C. Una vez finalizada la retrotranscripción, se preparó una dilución 1:10 del ADNc que fue la solución de trabajo. El *stock* y la dilución se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.6.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Los cebadores utilizados se diseñaron de *novo* a partir de las secuencias nucleotídicas almacenadas en la base de datos *GenBank* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para ello se utilizó el programa *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-O.4.0/>). En la tabla 3 se resumen los parámetros que se tuvieron en cuenta para su diseño.

Tabla 3. Parámetros utilizados en el diseño de cebadores.

| Parámetros | Requisitos cebadores |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Tamaño de amplicón | 80-130 pb |
| T _m (idéntico para los 2 cebadores) | 60-62°C |
| Máxima diferencia de T _m | 3°C |
| Longitud secuencia cebador | 18-22 pb |
| Inestabilidad 3' | Máximo 3 (Gs/Cs) en las últimas bases del extremo 3' |
| Exón-exón | Sí (al menos en uno de los cebadores) |

El programa proporcionó varios oligonucleótidos según los parámetros y para elegir el más adecuado se consultó la base de datos *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), la cual compara la secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias dando un parámetro que permite decidir si el cebador tiene una secuencia lo suficientemente específica para que no hibride en otras regiones del genoma. Además, se miró la base de datos *Ensembl Genome Browser* en donde se vieron los cambios de secuencia que pudieran haber en cada gen (SNP, los distintos tipos de mutaciones, etc.) y así poder escoger un cebador que no tuviera muchos cambios, asegurando una buena hibridación. La síntesis de los cebadores empleados se encargó a la empresa *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri, USA), y sus principales características se recogen en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los cebadores utilizados en este trabajo.

| Gen | Oligonucleótido | Secuencia 5'→3' | Tamaño del oligonucleótido (pb) | Tamaño de amplicón (pb) |
|-------|-----------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| STAT1 | <i>forward</i> | agctcgtttggtggaaagac | 22 | 118 |
| | <i>reverse</i> | gctcttgcaatttcaccaacag | 22 | |
| STAT2 | <i>forward</i> | tacctgactctggtggagcaac | 22 | 132 |
| | <i>reverse</i> | ctcctgcttcagaccctggtag | 22 | |
| IRAK1 | <i>forward</i> | cctctcccagctttccag | 20 | 121 |
| | <i>reverse</i> | gcctggcttggtagaagaagg | 21 | |
| TLR4 | <i>forward</i> | gatttatccagggtgaaatccag | 24 | 117 |
| | <i>reverse</i> | aaaggctcccagggtctaac | 20 | |
| TRAF6 | <i>forward</i> | aatcaataaggatgacaggtcac | 23 | 104 |
| | <i>reverse</i> | cagagaaagaatctcacgttttgc | 24 | |

Para determinar los niveles de cada ARNm diana se hicieron varias pruebas ajustando las condiciones de la qPCR para obtener una cuantificación óptima de todas las muestras. Al ser un ARN extraído de un sedimento urinario de pacientes con daño renal, no es tan abundante como en tejido, lo que ha requerido estos ajustes en el protocolo. Se variaron los parámetros de temperatura de amplificación, concentración de cebadores y las diferentes diluciones hasta alcanzar el protocolo adecuado.

Se utilizó el *Master Mix* de *QIAGEN*® (CA, USA) y el fluoróforo *LC Green*® (*Biofire Diagnostics*, Utah, USA) como sistema de detección. El *Master Mix* de *QIAGEN*® está compuesto por la enzima la enzima *Multiplex*® y los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y se mezcló a concentración 1 µM con el *LC Green*® a 0,7 µM y agua libre de RNasas. Los ensayos se llevaron a cabo en placas blancas de 384 pocillos, en las que se introdujeron al mismo tiempo los pacientes y los controles para la cuantificación de cada ARNm, por triplicado e incluyendo controles negativos sin ADNc. Además, también se cuantificó el ARNm de dos genes de referencia, expresados constitutivamente (*Housekeeping genes*, *HKGs*); β-2-Microglobulina y la β-Actina. Para cada reacción/pocillo, con un volumen final de 10 µl, se utilizaron 6,8 µL del preparado con *LC Green*® y *Master Mix*, 1,2 µL de la mezcla de ambos cebadores (*forward* y *reverse*) a 10 mM y 2 µL de ADNc diluido 1/10. Finalmente, la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en el termociclador modelo *LightCycler*® 480 II (Roche), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 15 min a 95°C para la activación de la enzima; seguida de 40 ciclos de amplificación de 20 seg a 95°C para la deshibridación; 30 seg a

62°C para la unión de los cebadores y 10 seg a 72°C para la extensión de los fragmentos mediante los cebadores específicos.

3.6.3. Análisis de los resultados y normalización

El diseño de cuantificación empleado en el presente trabajo utiliza un fluoróforo (*LC Green*[®]) que marca cada producto de PCR de forma que la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto. Se cuantifica la cantidad de fluorescencia en cada ciclo y se representa una gráfica a escala semilogarítmica: fluorescencia vs. ciclo de PCR. El análisis de los datos y cuantificación del producto se realiza en la fase exponencial de amplificación de la PCR, ya que ahí es donde existe una correlación directa con la cantidad de ADN molde inicial.

Para evaluar la especificidad de la reacción en cada uno de los genes se evaluó la curva de disociación o *melting curve*. Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente tras la PCR que posibilita la caracterización de las secuencias amplificadas según su temperatura de *melting* o *T_m*, definida como la temperatura a la cual el 50% de la molécula de ADN está desnaturalizada (la fluorescencia desciende rápidamente cuando el ADN se disocia). La *T_m* es función de la longitud del producto y de su composición de bases. De esta manera, verificamos la calidad de ADN amplificado viendo si se ha formado un producto único o si hay presencia de dímeros de cebadores en las reacciones de PCR (Figura 8).

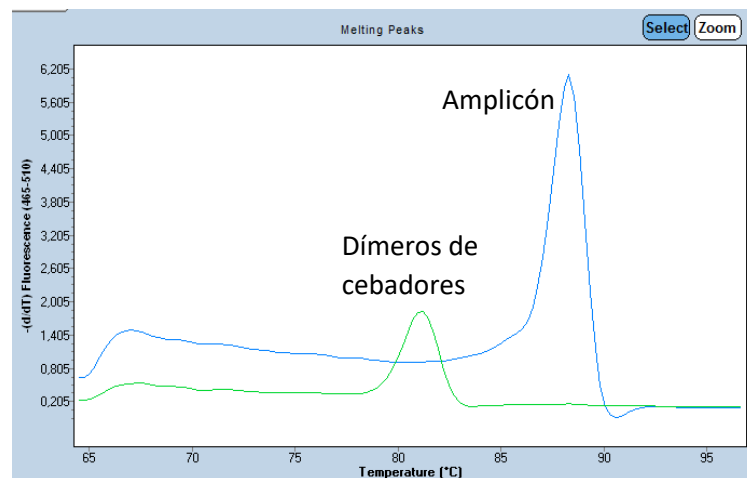


Figura 8. Análisis de la curva de disociación. El amplión (ADN amplificado) producido generalmente es de mayor longitud que los dímeros de cebadores y se disocia a una temperatura más alta.

Una vez obtenido el valor de Ct de los ARNm seleccionados en muestras de paciente para comparar frente a muestras control, se normalizó por la expresión de los genes de referencia expresados constitutivamente y así corregir diferencias de expresión relacionadas con la cantidad de ARN resultante de la retrotranscripción anterior. La concentración del ARNm problema se dividió por la media del número de copias de los dos ARNm de referencia en cada muestra (β -2-Microglobulina y la β -Actina) y, finalmente, se calculó el logaritmo de ese valor.

3.7. Análisis estadístico

Para cada variable, los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar, frecuencia o porcentaje según se indica. Para determinar la significatividad estadística de las diferencias de las características clínicas entre dos grupos se utilizó el test *t de Student* y el test *exacto de Fisher* cuando fue apropiado. Las comparaciones de los niveles de ARN (tanto miARN como ARNm) entre muestras se presentaron como niveles medios de *fold-change*. Los análisis estadísticos se completaron con *GraphPad Prism Software* (*GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA, versión 6.0*) y el programa *SPSS* (*Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA, versión 12.1.3 para Windows*). Para determinar la significatividad de las diferencias tanto de la expresión de ARN entre las subpoblaciones de vesículas extracelulares (miARN) como entre grupos de pacientes de lupus y controles (miARN y ARNm) se usó el test *U de Mann-Whitney* para variables continuas. Como umbral de significación se estableció un p valor < 0.05 . Además, los niveles de miR-146a se correlacionaron con los niveles de proteinuria en orina usando el coeficiente de correlación de *Spearman*.

4. RESULTADOS

4.1. Características generales de la población de estudio

Los resultados fueron obtenidos a partir de 40 pacientes de LES (edad media $41,2 \pm 12,43$ años, 82,5% mujeres), de los cuales 15 habían sido diagnosticados de LES en ausencia de NL ($0,22 \pm 0,15$ g/24h); 15 padecían NL activa ($2,98 \pm 4,12$ g/24h) y 10 tenían NL en remisión ($0,44 \pm 0,21$ g/24h) (Tabla 5). Además, contamos con un grupo control de 20 sujetos sanos (edad media $35,3 \pm 7$ años, 85% mujeres), estables clínicamente, sin infecciones del tracto urinario, cálculos renales, insuficiencia renal u otra patología crónica conocida. Todos los pacientes fueron citados en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Los pacientes con NL activa tenían un filtrado glomerular disminuido (FGR $p < 0,01$), con una mayor proteinuria ($p < 0,05$) que los controles, los pacientes con NL en remisión y pacientes sin NL. Los niveles basales de las proteínas del complemento C3 y C4 fueron también significativamente inferiores en pacientes con NL activa comparado con pacientes con NL en remisión y pacientes sin NL ($p < 0,05$). La media más alta de anti-ADNdc se obtuvo en el grupo con NL activa.

Tabla 5. Datos clínicos basales de los sujetos del estudio.

| Características | NL activa (n=15) | NL en remisión (n=10) | LES sin NL (n=15) | Controles (n=20) |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
| Edad | $36,9 \pm 21,4$ | $42,2 \pm 6,6^*$ | $44,5 \pm 9,3^*$ | $35,3 \pm 7,0$ |
| Género (M/F) | 4/11 | 2/8 | 1/14 | 3/17 |
| Creatinina sérica (mg/dL) | $1,08 \pm 0,50^*$ | $0,92 \pm 0,42$ | $0,75 \pm 0,23^\dagger$ | $0,72 \pm 0,12$ |
| FGR (mL/min/1,73m ²) | $75,3 \pm 33,9^*$ | $83,8 \pm 29,5^*$ | $103,0 \pm 33,8$ | $104 \pm 13,8$ |
| Proteinuria (g/24h) | $2,98 \pm 4,12$ | $0,44 \pm 0,21^\ddagger$ | $0,22 \pm 0,15^\ddagger$ | n.d. |
| Anti-ADNdc (U/mL) | $154,6 \pm 128,5$ | $138,5 \pm 113,1$ | $113,2 \pm 113,3$ | n.d. |
| C3 (mg/dL) | $43,1 \pm 27,9$ | $72,1 \pm 36,9^\dagger$ | $78,5 \pm 32,9^\ddagger$ | n.d. |
| C4 (mg/dL) | $5,8 \pm 6,4$ | $15,2 \pm 11,2^\dagger$ | $17,3 \pm 10,1^\ddagger$ | n.d. |
| SLEDAI | $10,8 \pm 4,4$ | $8,8 \pm 7,4$ | $6,3 \pm 3,9^\dagger$ | n.d. |
| Tratamiento | | | | |
| HCQ | 18,8 % | 100,0 % [†] | 66,7 % [†] | - |
| Azathioprina | - | 30,0 % | 26,7 % | - |
| Micofenolato | 31,3 % | 10,0 % | - | - |
| Acenocoumarol | 6,3 % | 10,0 % | - | - |
| Rituximab | 12,5 % | 20,0 % | - | - |
| Prednisona | 12,5 % | 30,0 % | 33,3 % | - |
| Metotrexato | - | - | 6,7 % | - |
| ASA | 6,3 % | 10,0 % | - | - |
| Duración de LES (años) | 4,11 | 8,75 | 8,14 | - |

Los datos están expresados como media \pm desviación estándar o frecuencia.

Anti-ADNdc, anticuerpos contra ADN de doble cadena; ASA, ácido acetilsalicílico; C3, complemento 3; C4, complemento 4; F, femenino; FGR, filtrado glomerular renal; HCQ, Hidroxicloroquina; n.d, no determinado; NL, nefropatía lúpica; M, masculino; LES, lupus eritematoso sistémico; SLEDAI, índice de actividad del lupus eritematoso sistémico.

* $p < 0,05$ comparado con los controles. [†] $p < 0,05$ comparado con nefropatía lúpica activa. [‡] $p < 0,01$ comparado con nefropatía lúpica activa.

4.2. Caracterización de vesículas extracelulares en orina

Para evaluar el correcto aislamiento por ultracentrifugación de fracciones ricas en exosomas o microvesículas se llevaron a cabo varias técnicas. En cuanto a la morfología y tamaño de las VE aisladas, analizado por microscopía electrónica de transmisión (MET), tanto en la fracción de exosomas como en la de microvesículas se observó la forma redondeada, presencia de la bicapa lipídica y contenido electrodensos correspondiente al *cargo* que transportan en su interior. En el análisis de las micrografías se observaron 251 exosomas de un tamaño medio de $58,02 \pm 20,31$ nm y 120 microvesículas de un tamaño medio de $160,22 \pm 79,10$ nm (Figura 9A y 9B). La distribución del tamaño de las VE obtenida por TRPS mostró una clara separación de las dos poblaciones de VE, obteniéndose un promedio de 110 nm para los exosomas y 230 nm para las microvesículas (Figura 9C). En el análisis de la composición proteica de las vesículas por *Western Blot*, se observaron marcadores específicos de exosomas: CD9 muy predominantemente en la fracción de exosomas, y TSG-101 exclusivamente en la fracción de exosomas. Además, se observaron los marcadores no exosomales altamente enriquecidos en lisados de la línea celular HuH7 (control positivo), ligeramente en la fracción de microvesículas (calnexina y GM-130), y ausentes en la fracción de exosomas (Figura 9D).

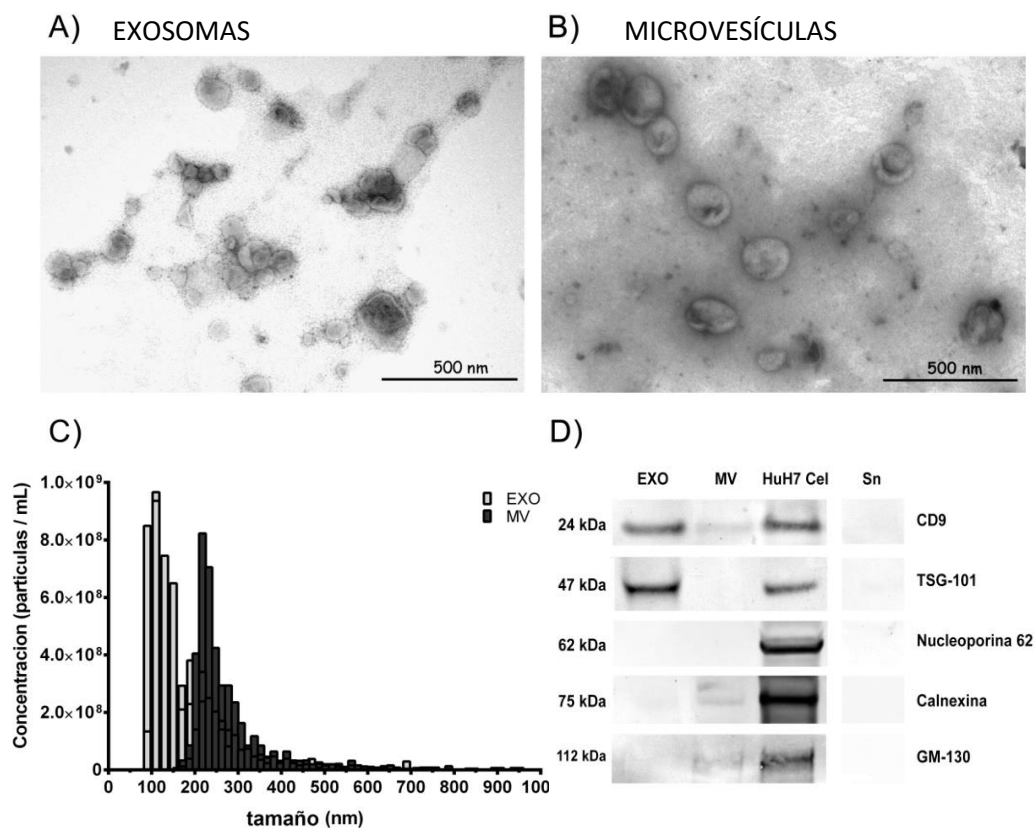


Figura 9. Caracterización de vesículas extracelulares urinarias aisladas por ultracentrifugación. Micrografías de MET de VE teñidas con acetato de uranilo, exosomas (A) y microvesículas (B), barras de tamaño de 500 nm. (C) Distribución del tamaño de exosomas y microvesículas mediante TRPS de 300 eventos por cada muestra (n=8). (D) *Western Blot* de exosomas y microvesículas urinarias con marcadores exosomales: TSG-101 y CD9, y no exosomales: calnexina, nucleoporina p62 y GM-130. Se cargaron lisados de células HuH7 como control positivo y sobrenadante libre de exosomas (Sn) como control negativo.

4.3. Niveles de miR-146a en exosomas y microvesículas

Tras analizar los resultados de la cuantificación de miARN por RT-qPCR se observó que los niveles relativos de miR-146a en exosomas muestran un incremento significativo respecto a los niveles obtenidos en microvesículas dentro del grupo de pacientes con nefropatía lúpica activa. Concretamente, los niveles son 20 veces más elevados en exosomas que en microvesículas en el grupo de NLA, con un p valor = 0,0098. Además, en los exosomas del grupo de pacientes de LES sin nefropatía también se observó un aumento de 4 veces, aunque no se alcanzó significación estadística (Figura 10).

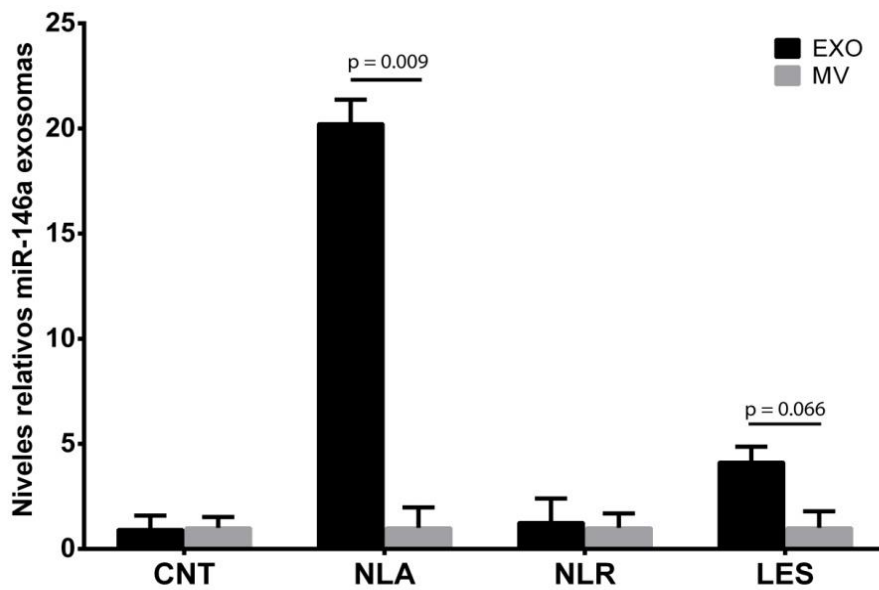


Figura 10. Niveles relativos de miR-146a en exosomas y microvesículas de pacientes con NL activa (NLA), en remisión (NLR), pacientes de LES sin NL (LES) y grupo control (CNT). La expresión relativa mostrada se calculó usando el método $\Delta\Delta Ct$. Datos comparados por el test *U de Mann-Whitney*. Se muestran los p valores de las diferencias entre grupos. EXO: exosomas; MV: microvesículas.

4.4. Incremento de miR-146a en exosomas de pacientes con nefropatía lúpica.

Asociación con la proteinuria.

Los niveles exosomales de miR-146a se observaron significativamente más aumentados en pacientes de LES con nefropatía lúpica activa al compararlos con controles sanos y pacientes de LES con nefropatía lúpica en remisión, así como en pacientes de LES sin nefropatía lúpica. Concretamente, los niveles de miR-146a en exosomas en NLA estuvieron 79 veces incrementados frente al grupo control ($p < 0,0001$), 39 veces respecto a NLR ($p = 0,002$) y 26 veces frente a LES sin NL ($p = 0,005$) (Figura 11).

Los niveles microvesiculares de miR-146a también se observaron unas 3 veces más elevados en NLA que en el grupo control y pacientes de LES sin NL, aunque sin alcanzar el umbral de significación estadística ($p = 0,074$ y $p = 0,054$, respectivamente) (Figura 11).

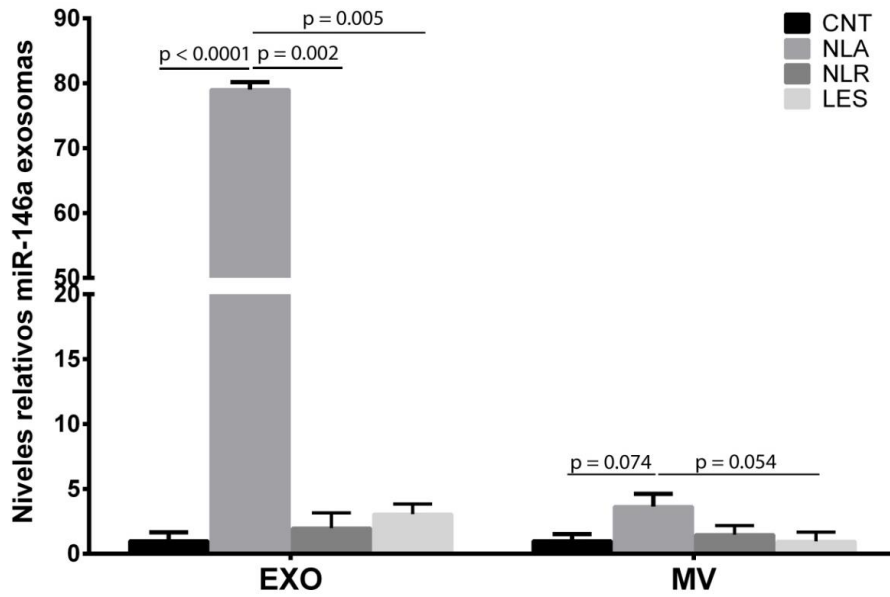


Figura 11. Niveles relativos de miR-146a en exosomas y microvesículas al comparar los distintos grupos de estudio (NLA, NLR, LES y CNT). La expresión relativa mostrada se calculó usando el método $\Delta\Delta Ct$. Los datos fueron comparados por el test *U de Mann-Whitney*. Se muestran los p valores de las diferencias entre grupos. EXO: exosomas; MV: microvesículas.

Además, los niveles exosomales de miR-146a en orina mostraron una asociación directa con los niveles de proteinuria en todo el grupo de pacientes de LES ($r = 0,71$, $p = 0,0004$) (Figura 12).

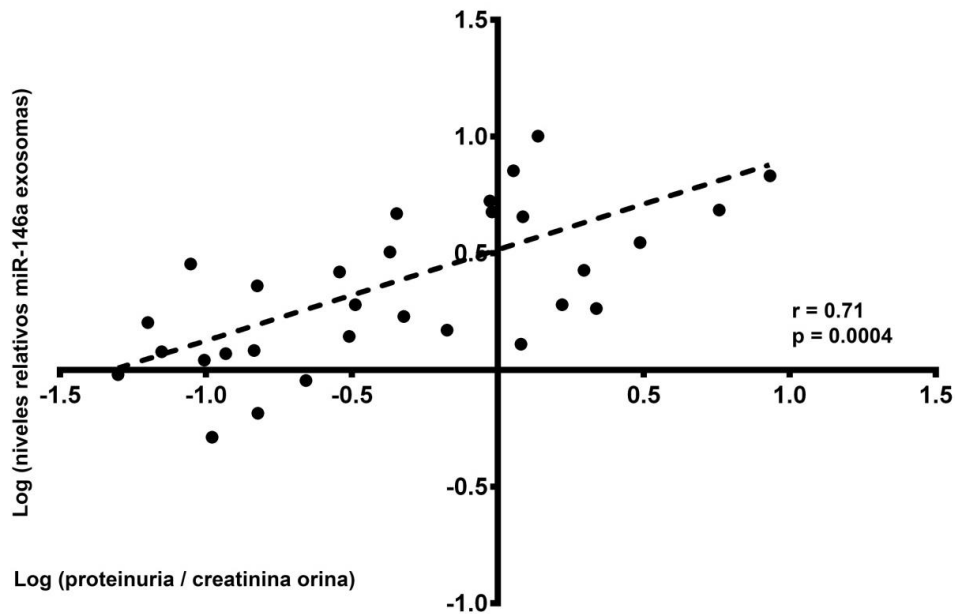


Figura 12. Correlación entre niveles exosomales de miR-146a en orina con el logaritmo de la proteinuria normalizada por la creatinina. Se utilizó el test del coeficiente de correlación de *Spearman*. Se muestra el coeficiente de *Spearman* (r) y el p valor de la correlación.

4.5. Niveles de los ARNm diana de miR-146a

Tras analizar los resultados de la cuantificación de ARNm por RT-qPCR se observó que los niveles de ARNm de las moléculas diana de miR-146a muestran una disminución estadísticamente significativa en pacientes de LES, más pronunciada en aquellos con nefropatía lúpica activa y pacientes de LES sin nefropatía lúpica.

Los niveles de ARNm de TLR4 se observaron 3,73 veces disminuidos en LES respecto al grupo control como referencia ($p = 0,006$) y 2,53 veces disminuidos en NLA respecto al grupo control como referencia ($p = 0,021$) (Figura 13A). Los niveles de ARNm de IRAK1 fueron 2,94 veces inferiores en LES respecto al grupo control ($p = 0,018$) y 2,41 veces en NLA respecto al grupo control ($p = 0,022$) (Figura 13B). Y los niveles de ARNm de TRAF6 se vieron 5,04 veces reducidos en LES respecto al grupo control ($p = 0,002$) y 2,64 veces reducidos en NLA respecto al grupo control ($p = 0,017$). Solamente en el caso de TRAF6, los niveles de ARNm también se observaron 2,49 veces disminuidos en el grupo de pacientes con NLR respecto al grupo control ($p = 0,025$) (Figura 13C). Los niveles de ARNm del resto de genes en NLR respecto al grupo control no presentaron diferencias significativas.

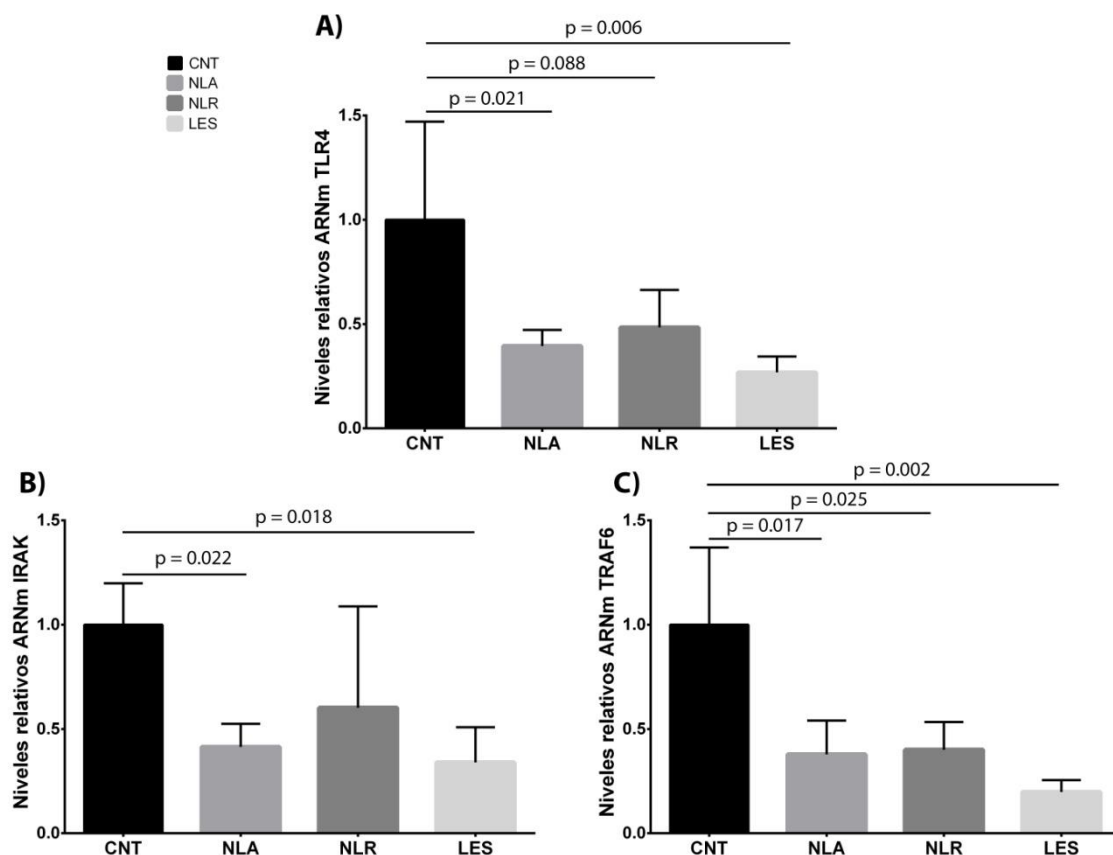


Figura 13. Niveles de ARNm de TLR4 (A), IRAK1 (B) y TRAF6 (C) entre pacientes de LES con NL activa (NLA), pacientes de LES con NL en remisión (NLR), pacientes de LES sin NL (LES) y controles (CNT). La expresión relativa mostrada se calculó usando el método $\Delta\Delta Ct$. La expresión mostrada por el grupo control se tomó como valor máximo de referencia (1). Los datos fueron comparados por el test *U de Mann-Whitney*. Se muestran los p valores de las diferencias entre grupos.

Los niveles de ARNm de STAT2 se vieron significativamente disminuidos en los grupos de pacientes de lupus (NLA, NLR y LES) respecto al grupo control. Se observó un descenso en todos ellos de entre 2,5 y 3 veces, con un p valor inferior a 0,05. En el caso de STAT1, aunque los niveles de su ARNm se observaron más reducidos en los pacientes de lupus respecto a controles sanos, no se obtuvo significación estadística en las diferencias entre ambos (Figura 14A y 14B).

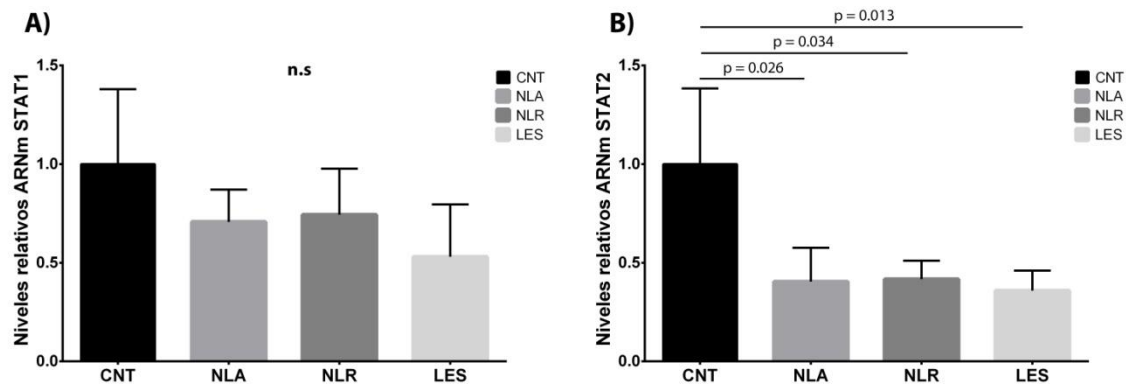


Figura 14. Niveles de ARNm de STAT1 (A) y STAT2 (B) en pacientes de LES con NL activa (NLA), pacientes de LES con NL en remisión (NLR), pacientes de LES sin NL (LES) y controles (CNT). La expresión relativa mostrada se calculó usando el método $\Delta\Delta Ct$. Los datos fueron comparados por el test *U de Mann-Whitney*. Se muestran los p valores de las diferencias entre grupos.

No obstante, al normalizar el descenso en los niveles de ARNm diana de miR-146a por el número de células total en el sedimento urinario de los pacientes, se vio finalmente que el grupo de NLA fue el que presentó los menores niveles de ARNm de las distintas moléculas. Este descenso fue aproximadamente de 14 veces respecto al grupo control en el caso de STAT1 y de aproximadamente 24 veces en el resto de moléculas, con un p valor < 0.0001 en todos los casos.

5. DISCUSIÓN

En estudios anteriores se ha descrito la asociación entre los niveles de miARN circulante y tisular y el daño renal en varias enfermedades como la nefropatía diabética, la nefropatía por IgA, la glomeruloesclerosis segmental focal y la nefropatía lúpica (Zhang, W. *et al.*, 2014; Cárdenas-González *et al.*, 2017). En el contexto del LES, se ha visto que la expresión de miARNs está modulada, especialmente cuando se produce daño renal activo (nefropatía lúpica activa) y sobre todo en el interior de los exosomas. El miR-146a exosomal, en concreto, se ha visto aumentado 100 veces en orina de enfermos de nefropatía lúpica activa, siendo capaz de discriminar la presencia o no de esta condición (Ichii, *et al.*, 2012; Pérez-Hernández *et al.*, 2015).

Diversos autores han demostrado que el aislamiento de exosomas mejora la sensibilidad de la cuantificación de miARN en orina de pacientes de lupus, en mayor medida en orina de pacientes con nefropatía lúpica (Gallo *et al.*, 2012). Sin embargo, si el aumento en los niveles de miR-146a en el LES es específico de exosomas o también se da en microvesículas y si este aumento se da especialmente en la NLA entre los diferentes pacientes de lupus no había sido analizado hasta el momento.

En este trabajo se aislaron exosomas y microvesículas de una cohorte de pacientes de LES. Aunque no existe una técnica única para aislar VE de fluidos biológicos, en este caso, ambas poblaciones de vesículas se aislaron correctamente mediante la técnica de centrifugación diferencial, el método más extendido para separar distintas subpoblaciones de VE (Van Deun *et al.*, 2017). Esto se pudo comprobar gracias a los estudios de TRPS (*qNano*) junto a la microscopía electrónica de transmisión (MET), tras los cuales se observó en cada fracción aislada un aspecto y tamaño medio característico de los exosomas y característico de microvesículas, respectivamente (van Niel *et al.*, 2018). Por su parte, los perfiles de tamaño obtenidos por TRPS muestran la correcta separación de ambas poblaciones de VE. Aunque se observaron diferencias en el tamaño medio de VE al comparar ambas metodologías, esto puede deberse al propio procesado de las preparaciones de vesículas para su utilización en MET, con fases de contracción y deshidratación, que provoque una disminución en el tamaño final observado (Dragovic *et al.*, 2011). Además, los resultados se corroboraron mediante *Western Blot* utilizando marcadores específicos de exosomas, que se mostraron en la fracción correspondiente, y marcadores no exosomales, que estuvieron ausentes en la misma.

El primer objetivo planteado era analizar los niveles de miR-146a en vesículas extracelulares urinarias, exosomas y microvesículas, y comparar los valores entre las dos subpoblaciones en pacientes de lupus y controles. A este respecto, los resultados del estudio indicaron que miR-146a se encuentra altamente enriquecido en los exosomas urinarios en comparación con las microvesículas solamente en la NLA; ya que los niveles de miR-146a en exosomas del grupo de pacientes con esta condición fueron los únicos que mostraron un incremento significativo (concretamente de 20 veces) en relación a sus niveles en microvesículas. Esto también ocurre en otras enfermedades renales como por ejemplo la nefropatía diabética, donde miR-302c y miR-6068 se encuentran fuertemente

sobreexpresados en exosomas urinarios según ha sido descrito en los trabajos del grupo del Dr. Delic (Delic *et al.*, 2016).

El segundo objetivo consistía en comprobar si se observa aumento de los niveles de miR-146a, tanto en exosomas como en microvesículas, en pacientes con nefropatía lúpica respecto al grupo control o pacientes sin nefropatía lúpica. Tras el estudio se observó que los niveles de miR-146a exosomales estaban altamente incrementados en los pacientes de LES con NLA con respecto a controles sanos (hasta 79 veces) y pacientes de LES sin nefropatía lúpica (hasta 26 veces). Además, estos niveles también se hallaron altamente elevados en NLA con respecto a pacientes con NLR, es decir, nefropatía lúpica en remisión (hasta 39 veces). Por otro lado, el incremento de los niveles de miR-146a en microvesículas en pacientes con NL respecto al grupo control o pacientes sin NL no alcanzó la significación estadística. De este modo, podemos decir que el estado patológico del grupo NLA aumenta la cantidad del miR-146a en orina especialmente en los exosomas. Estos resultados concuerdan con publicaciones anteriores que, utilizando orina y otros biofluidos, han descrito cómo la mayoría de miARNs detectables en fluidos biológicos están concentrados en exosomas en estados patológicos como cáncer y la enfermedad renal (Mitchell *et al.*, 2008; Gallo *et al.*, 2012). Además, otros miARNs como los de la familia de miR-200 también se han visto asociados a la enfermedad renal activa (Ramachandran *et al.*, 2013; Pérez-Hernández *et al.*, 2015).

Otro aspecto que no se había analizado hasta el momento es si los cambios en los niveles de miR-146a están relacionados con la proteinuria en los pacientes de lupus. La proteinuria es un parámetro que indica disfunción en el riñón (Kong *et al.*, 2012). El análisis de nuestros datos determinó que los niveles de miR-146a en exosomas urinarios correlacionan directamente con los niveles de proteinuria. La asociación de los niveles de miR-146a con la proteinuria reafirma la existencia de una relación entre dichos niveles y el desarrollo de daño renal activo en el LES. De manera similar, otros autores han descrito cambios puntuales en los niveles de miR-130b y miR-192 en suero, correlacionando los cambios de los niveles de miARNs con variables clínicas de función renal como FGR o la excreción urinaria de albúmina (Lv *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016).

Por otro lado, hasta el momento tampoco se había analizado la posible alteración de los niveles de las moléculas diana de miR-146a. El tercer objetivo de este trabajo era estudiar el efecto sobre los niveles de ARNm de STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6, proteínas involucradas en la activación de genes de respuesta inflamatoria y asociadas al desarrollo de la enfermedad renal en lupus (Weidenbusch *et al.*, 2017). Tras este ensayo se ha podido comprobar que los niveles de ARNm de las proteínas mencionadas se encuentran disminuidos en el sedimento urinario de los pacientes de lupus respecto a individuos sanos, especialmente en aquellos con nefropatía lúpica activa, al normalizar por el número de células del sedimento urinario de los pacientes. El hecho de que inicialmente los niveles de estas moléculas se vieran disminuidas de manera similar en pacientes con NLA y pacientes de LES sin NL, y que la reducción de los niveles del ARNm de STAT 1 no alcanzara la significación estadística estaría debido al desajuste en la cantidad de células presente en el sedimento urinario de cada paciente. De esta manera, tras corregir los resultados por número total de células en el sedimento urinario de los pacientes, se observó cómo el grupo de NLA era el que presentaba menores niveles de ARNm de las distintas moléculas, y cómo la reducción de los niveles del

ARNm de STAT1 resultaba ser significativa, siendo éstos aproximadamente 14 veces inferiores a los del grupo control y aproximadamente 24 veces para el resto de ARNm: STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6.

Los resultados obtenidos son coherentes con el incremento de miR-146a exosomal en enfermos de LES con NL si tenemos en cuenta la función biológica de miR-146a, que como regulador negativo de la respuesta inmune actúa disminuyendo la expresión de los genes que producen estas proteínas de la ruta de señalización del interferón (IFN) y TLR; sus dianas moleculares. Además, el incremento de la secreción de miR-146a en exosomas podría explicarse como un mecanismo de retroalimentación negativa en el que este miARN es producido en respuesta a una situación patológica, puesto que su transcripción está estimulada por las rutas del IFN y TLR (Junker, 2011; Forster *et al.*, 2015), con el fin de frenar la respuesta inmunológica e inflamatoria descontrolada que lo está produciendo. Anteriormente, ya se había descrito que miR-146a está regulado al alza (*upregulated*) en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide o la aterosclerosis (Li *et al.*, 2010; Raitoharju *et al.*, 2011; van Craenenbroeck *et al.*, 2015). A través de este mecanismo de defensa, se conseguiría la interrupción de las cascadas de señalización que llevan a la transcripción de genes implicados en gran cantidad de procesos biológicos, asociados con LES, como son la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, la proliferación de células dendríticas mieloides, la activación de linfocitos T citotóxicos y supresión de linfocitos T reguladores, la estimulación de la supervivencia de las células B y la diferenciación de éstas a células plasmáticas productoras de anticuerpos (He *et al.*, 2017; Weidenbusch *et al.*, 2017).

En cuanto a las limitaciones de este trabajo, en primer lugar se ha de tener en cuenta que el tamaño de los grupos de estudio es relativamente pequeño. Siendo así, los resultados obtenidos deberían ser confirmados en posteriores estudios con mayor número de pacientes. Por otro lado, con respecto a las limitaciones de las técnicas. Por otro lado, para minimizar las diferencias en el contenido lipídico y proteico de las muestras vesiculares de los pacientes, así como la posible variabilidad en el proceso de extracción de ARN (Blondal *et al.*, 2017), se introdujo el miARN sintético no humano cel-miR-39 como referencia interna; la denominada técnica del *spike-in* (Kroh *et al.*, 2010). Además, en este trabajo se llevó a cabo una normalización por volumen de ARN eluído, partiendo del mismo volumen inicial de muestra por paciente para aislar exosomas y microvesículas. Este tipo de aproximación se ha utilizado para reducir variaciones técnicas ante la falta de controles internos (*housekeeping*) en los estudios de miARN circulantes (Freedman *et al.*, 2016), hecho que también se da en los estudios de cuantificación de miARN exosomales/vesiculares por RT-qPCR (Li *et al.*, 2015; Garcia-Contreras *et al.*, 2017).

Como futuros estudios a realizar, sería interesante llevar a cabo estudios funcionales a fin de conocer los mecanismos patofisiológicos exactos de actuación del miR-146a (tanto a nivel del tipo celular al que implica, mecanismo de secreción, etc.) y establecer la asociación causal entre el aumento exosomal de miR-146a y la nefropatía lúpica para ayudar a definir nuevas perspectivas terapéuticas. Por otra parte, sería también interesante la secuenciación masiva (NGS) del ARN exosomal de los pacientes, ya que podría permitir encontrar otros miARNs relevantes en la fisiopatología de la enfermedad, dando lugar así a un perfil de miARNs exosomales alterados y asociados a la aparición de daño renal en el LES.

En conclusión, los resultados de este trabajo, en concordancia con los estudios previos y a pesar de las limitaciones, reafirman que miR-146a está incrementado en exosomas respecto a microvesículas; que los niveles más altos en el interior de exosomas se encuentran en la condición de nefropatía lúpica activa y que sus niveles se correlacionan directamente con los niveles de proteinuria, siendo así un reflejo del daño renal. Además, los niveles de ARNm de las moléculas diana de miR-146a STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6 se encuentran disminuidos en el sedimento urinario de pacientes de lupus, especialmente en aquellos con nefropatía lúpica activa.

Los miARNs transportados por exosomas son buenas herramientas para el estudio de la patogénesis de enfermedades y tienen el potencial para ser utilizados en el diagnóstico y pronóstico de numerosas patologías. Este hecho junto con los resultados obtenidos en este trabajo nos permite concluir que los niveles de miR-146a en exosomas urinarios son un buen indicador de daño renal en el lupus eritematoso sistémico y que este miARN constituye un potencial biomarcador no invasivo de nefropatía lúpica. Este hallazgo es de gran relevancia teniendo en cuenta la importancia del diagnóstico temprano a la hora de mejorar el compromiso renal y el pronóstico de los pacientes.

6. CONCLUSIONES

1. En la nefropatía lúpica activa existe una mayor cantidad de miR-146a en el interior de exosomas respecto a microvesículas.
2. Los niveles más altos de miR-146a en el interior de los exosomas se observan en el grupo de pacientes con nefropatía lúpica activa. Además, los niveles exosomales de miR-146a correlacionan directamente con los niveles de proteinuria normalizados por creatinina en pacientes de lupus eritematoso sistémico.
3. Los niveles de ARNm de las moléculas diana de miR-146a: STAT1, STAT2, TLR4, IRAK1 y TRAF6 se encuentran disminuidos significativamente en pacientes de lupus eritematoso sistémico, especialmente en aquellos con nefropatía lúpica activa.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alevizos I and Illei GG, 2010. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:391–398.
- Baechler, EC *et al.*, 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2610-2615.
- Birmingham DJ, Irshaid F, Nagaraja HN, Zou X, Tsao BP, Wu H, Yu CY, Hebert LA and Rovin BH, 2010. The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare. *Lupus*. 19(11):1272-80.
- Blondal T, Brunetto MR, Cavallone D, Mikkelsen M, Thorsen M, Mang Y *et al.*, 2017. Genome-wide comparison of next-generation sequencing and qPCR platforms for microRNA profiling in serum. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1580, 21-44.
- Bodemer C, 2004. Manifestations cutanées du lupus de l'enfant. Cutaneous manifestations of lupus in children. *Arch Pediatr.* (6):509-11.
- Boldin MP, Taganov KD, Rao DS *et al.*, 2011. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1189–1201.
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB *et al.*, 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 35(6):630-40.
- Calin GA, Croce CM, 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6:857–866.
- Cardenas-Gonzalez M, Srivastava A, Pavkovic M, Bijol V, Rennke HG, Stillman IE, Zhang X, Parikh S, Rovin BH, Afkarian M, de Boer IH, Himmelfarb J, Waikar SS and Vaidya VS, 2017. Identification, Confirmation, and Replication of Novel Urinary MicroRNA Biomarkers in Lupus Nephritis and Diabetic Nephropathy. *Clin Chem.* 63(9):1515-1526.
- Cervera R, Abarca-Costaiago M, Abramovicz D, Allegri F, Annunziata P, Aydintug AO *et al.* 2006. Systemic lupus erythematosus in Europe at the change of the millennium: lessons from the “Euro-Lupus project”. *Autoimmun Rev* 2006;5:180-6.
- Chandrasekaran K, Karolina DS, Sepramaniam S *et al.*, 2012. Role of microRNAs in homeostasis and disease. *Kidney Int.* 81(7): 617-27.
- Colombo M, Raposo G and Thery C, 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.
- Delic D, Eisele C, Schmid R, Baum P, Wiech F, Gerl M *et al.*, 2016. Urinary exosomal miRNA signature in type II diabetic nephropathy patients. *PLoS One*, 11(3), e0150154.
- Dong S, Cheng Y, Yang J, *et al.*, 2009. MicroRNA Expression Signature and the Role of MicroRNA-21 in the Early Phase of Acute Myocardial Infarction. *The Journal of Biological Chemistry.* 284(43):29514-29525.

- Draborg AH, Duus K and Houen G, 2012. Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical and Developmental Immunology* Vol. 2012, Article ID 370516.
- Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS *et al.*, 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine*. 7(6):780-788.
- Ekblom-Kullberg S, Kautiainen H, Alha P, Leirisalo-Repo M, Miettinen A and Julkunen H, 2014. Smoking, disease activity, permanent damage and dsDNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 34: 341–345.
- Fang DY, King HW, Li JY and Gloadle JM, 2013. Exosomes and the kidney: blaming the messenger. *Nephrology (Cadton)* 18(1):1-10.
- Feng B, Chen S, McArthur K, Wu Y, Sen S, Ding Q, Feldman RD and Chakrabarti S, 2011. miR-146a-Mediated extracellular matrix protein production in chronic diabetes complications. *Diabetes*. 60(11):2975-84.
- Forster SC, Tate MD and Hertzog PJ, 2015. MicroRNA as type I interferon-regulated transcripts and modulators of the innate immune response. *Front Immunol*. 6:334.
- Freedman JE, Gerstein M, Mick E, Rozowsky J, Levy D *et al.*, 2016. Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. *Nature Communications*, 7, 11106.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP, 2009. Most mammalian mRNA sare conserved targets of microRNAs. *GenomeRes* 19(1):92–105.
- Gallo A, Tandon M, Alevizos I and Illei GG, 2012. The majority of MicroRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 7:e30679.
- Garcia-Contreras M, Shah SH, Tamayo A, Robbins PD, Golberg RB, Mendez AJ *et al.*, 2017. Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration type 1 diabetes. *Scientific Reports*, 7(1), 5998-017-05787-y.
- Gladman DD, Ibañez D and Urowltz MB, 2002. "Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000," *The Journal of Rheumatology*, vol. 29, no. 2, pp. 288–291.
- Gómez-Puerta JA and Cervera R, 2008. Lupus eritematoso sistémico. *Medicina & Laboratorio*, Volumen 14, Números 5-6.
- He X, Zheng Y, Liu S, Shi S, Liu Y, He Y, Zhang C and Zhou X, 2017. MiR-146a protects small intestine against ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/TRAF6/NF-κB pathway. *J Cell Physiol*. 233(3):2476-2488.
- Hiepe F, Dorner T, Hauser AE, Hoyer BF, Mei H and Radbruch A, 2011. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol*. 7, 170–178.
- Merino R, Remesal A and Murias S, 2013. Lupus eritematoso sistémico. *An Pediatr Contin*. Vol. 11 Núm. 2. 11:89-97.
- Ichii O, Otsuka S, Sasaki N, Namiki Y, Hashimoto Y and Kon Y, 2012. Altered expression of microRNA miR-146a correlates with the development of chronic renal inflammation. *Kidney Int*. 81(3):280-92.

- Jaswani P *et al.*, 2017. "MicroRNAs Involvement in Renal Pathophysiology: A Bird's Eye View." *Indian Journal of Nephrology* 27.5: 337–341.
- Jin J, Ye M, Zhao L, Zou W, Shen W, Zhang H, Gong J and He Q, 2018. The novel involvement of podocyte autophagic activity in the pathogenesis of lupus nephritis. *Histol Histopathol.* 15:11974.
- Junker A, 2011. Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Letters.* Volume 585, Issue 23, 1 December 2011, Pages 3738-3746.
- Kelly JA, Moser KL and Harley JB, 2002. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun.* 3 (Suppl. 1): S71-S85.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl* 2012; 2:139-274,221-232.
- Kloosterman WP and Plasterk RH, 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell.* 11(4):441-50.
- Kong X, Jia X, Wei Y *et al.*, 2012. Association between microalbuminuria and subclinical atherosclerosis evaluated by carotid artery intima-media in elderly patients with normal renal function. *BMC Nephrology.* 13:37.
- Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS and Tewari M, 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif.)*, 50(4), 298-301.
- Lech M and Anders HJ, 2013. "The Pathogenesis of Lupus Nephritis." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24.9 1357–1366.
- Levey AS, Coresh J, Greene T *et al.*, 2006. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 145(4):247-54.
- Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, Fang Y, Zhang J, Zhang J, Fu X, Liu H, Lu L and Wu Y, 2010. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4 T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R81.
- Li Y, Zhang L, Liu F, Xiang G, Jiang D and Pu X, 2015. Identification of endogenous controls for analyzing serum exosomal miRNA in patients with hepatitis B or hepatocellular carcinoma. *Disease Markers*, 2015, 893594.
- López-Bojorquez LN, 2004. La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Rev Invest Clín* Vol. 56(1):83-92.
- Lorenzen JM, Haller H and Thum T, 2011. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2011;7(5):286-94.
- Lu J, Kwan BC, Lai FM, Tam LS, Li EK *et al.*, 2012. Glomerular and tubulo interstitial miR-638, miR-198 and miR-146a expression in lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* 17: 346–351.
- Lu Q, Hope LW, Brasch M, Reinhard C and Cohen SN, 2003. TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7626-7631.
- Lv C, Zhou YH, Wu C, Shao Y, Lu CL and Wang QY, 2015. The changes in miR-130b levels in human serum and the correlation with the severity of diabetic nephropathy. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, 31(7), 717-724.
- Ma K, Li J, Fang Y and Lu L, 2015. Roles of B Cell-Intrinsic TLR Signals in Systemic Lupus Erythematosus. Lau C-S, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(6):13084-13105.
- Ma X, Lu C, Lv C, Wu C and Wang Q, 2016. The expression of miR-192 and its significance in diabetic nephropathy patients with different urine albumin creatinine ratio. *Journal of Diabetes Research*, 6789402.
- Maroz N and Segal MS, 2013. Lupus nephritis and end-stage kidney disease. *Am. J. Med. Sci.* 346, 319-323.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A *et al.*, 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 10513-10518.
- Minciaccchi VR, Freeman MR and Di Vizio D, 2015. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 41–51.
- Miniño M, 2008. Índice de actividad lúpica y tratamiento del lupus eritematoso en Dermatología. *Rev Mex* 52(1):20-28.
- Molina J, 1989. Principales autoanticuerpos en lupus eritematoso sistémico y esclerosis sistémica. *Acta Médica Colombiana* Vol 14 N°2 » Marzo-Abril – 1989.
- Morel L, 2017. Immunometabolism in systemic lupus erythematosus. Published online 31 Mar 2017 doi:10.1038/nrrheum.2017.43.
- Morrison E, Carpentier S, Shaw E *et al.*, 2014. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: association with global disease activity. *Lupus*. 23(4):370-7.
- Narayanan K, Marwaha V, Shanmuganandan K and Shankar S, 2010. Correlation between Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, C3, C4 and Anti-dsDNA Antibodies. *Medical Journal, Armed Forces India*. 66(2):102-107.
- NCBI. *National Center for Biotechnology Information*, U.S. National Library of Medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA.
- Patel DR and Richardson BC, 2015. Drug-induced lupus. In: Hochberg MC, Stillman AJ, Smolen JS, Weinblatt, ME, Weisman MH, eds. *Rheumatology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby; 2015:chap 132.
- Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R and Redon J, 2015. Increased Urinary Exosomal MicroRNAs in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS ONE* 10(9): e0138618.
- Petri M, 2007. Disease activity assessment in SLE: do we have the right instruments? *Annals of*

- the Rheumatic Diseases*, 66(Suppl 3), iii61–iii64.
- Pisetsky DS, 2017. The role of microparticles in the pathogenesis of SLE: a new look at an old paradigm. *Lupus Science & Medicine* 4:e000220.
- Raitoharju E, Lyytikainen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T *et al.*, 2011. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are upregulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 219: 211–217.
- Ramachandran K, Saikumar J, Bijol V, Koyner JL, Qian J, Betensky RA *et al.*, 2013. Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clin. Chem.* 59:1742–1752.
- Raposo G and Stoorvogel W, 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 200(4):373-83.
- Rekvig OP, Kalaaji M and Nossent H, 2004. Anti-DNA antibody subpopulations and lupus nephritis. *Autoimmun. Rev.* 2004;3:1–6.
- Rúa-Figueroa I and Eurasquin C, 2008. Factores asociados a la mortalidad del lupus eritematoso sistémico. *Semin Fund Esp Reumatol.* 9:219-34.
- Rúa-Figueroa I, López-Longo FJ, Calvo-Alén J *et al.*, 2014. National registry of patients with systemic lupus erythematosus of the Spanish Society of Rheumatology: objectives and methodology. *Reumatol Clin.* 10(1):17-24.
- Saba R, Sorensen DL and Booth SA, 2014. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Frontiers in Immunology*. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00578.
- Salih M, Zietse R and Hoorn EJ, 2014. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Jun 1;306(11):F1251-9.
- Schena FP, Serino G and Sallustio F, 2014. MicroRNAs in kidney diseases: new promising biomarkers for diagnosis and monitoring. *Nephrology Dialysis Transplantation* 29(4):755-63.
- Shaikh MA, Memon I and Ghori RA, 2010. Frequency of anaemia in patients with systemic lupus erythematosus at tertiary care hospitals. *J Pak Med Assoc.* 60(10):822-5.
- Shen N, Liang D, Tang Y, de Vries N and Tak PP, 2012. MicroRNAs--novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* (12):701-9.
- Simard JF and Costenbader KH, 2007. What can epidemiology tell us about systemic lupus erythematosus? *Int. J. Clin. Pract.* 61, 1170-1180.
- Thakur BK *et al.*, 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 24, 766–769.
- Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, de Vries N, Tak PP *et al.*, 2009. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 60(4):1065-75.
- Valadi H, Ekstrom K *et al.*, 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a no-

- vel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Van Craenenbroeck AH, Ledeganck KJ, Van Ackeren K, Jürgens A, Hoymans VY, Franssen E *et al.*, 2015. Plasma levels of microRNA in chronic kidney disease: patterns in acute and chronic exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309(12):H2008-16.
- Van Deun J *et al.*, 2017. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature methods.* 14(3):228-32.
- van Niel G, D'Angelo G and Raposo G, 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2018 Jan 17. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist, R and Conrad R, 2012. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1820(7), 940-948.
- Vyse TJ and Kotzin BL, 1996. Genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 8(6):843–51.
- Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Chow KM, Li PKT and Szeto CC, 2011. Elevated Levels of miR-146a and miR-155 in Kidney Biopsy and Urine from Patients with IgA Nephropathy. *Disease Markers*, 30(4), 171–179.
- Weidenbusch M, Kulkarni OP and Anders HJ, 2017. The innate immune system in human systemic lupus erythematosus. *Clinical Science* 131 625–634.
- Yáñez-Mó M, Siljander PR-M *et al.*, 2015. “Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions,” *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 4, Article ID27066.
- Zhang W, Zhang C, Chen H, Li L, Tu Y, Liu C, Shi S, Zen K and Liu Z, 2014. Evaluation of MicroRNAs miR-196a, miR-30a-5P, and miR-490 as Biomarkers of Disease Activity among Patients with FSGS. *CJASN*, 9(9), 1545–1552.
- Zhong JH, Li J, Liu CF, Liu N, Bian RX, Zhao SM, Yan SY and Zhang YB, 2017. Effects of microRNA-146a on the proliferation and apoptosis of human osteoarthritis chondrocytes by targeting TRAF6 through the NF- κ B signalling pathway. *Biosci Rep.* 2017 Apr 28;37(2).

AGRADECIMIENTOS

Después de un intenso período, hoy es el día en que escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo de fin de máster. Ha sido una gran etapa de aprendizaje, no sólo en el campo científico, sino también a nivel personal. Quisiera dar las gracias en primer lugar a mis tutores de trabajo final de máster, la Dra. Raquel Cortés Vergaz y el Dr. Javier Pérez Hernández, por enseñarme tanto y por todo su apoyo, paciencia y dedicación durante la realización del mismo. En especial, a la Dra. Raquel Cortés, quien fue mi tutora inicial de prácticas. Agradecerle la oportunidad que me ha brindado de poder formar parte del equipo del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Clínico de Valencia-INCLIVA a lo largo de este año.

También, a todos los compañeros de la Unidad de Genómica y Diagnóstico Genético de INCLIVA (sin olvidarme de los que ya no están) por la acogida que me han dado, por su buen hacer y por lo fácil que es trabajar a su lado.

Al Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valencia, especialmente, al Dr. Josep Redón, director de proyecto, y a la doctora M^a José Forner por su implicación en la recogida de muestras. Asimismo, a todas aquellas personas que de alguna u otra manera han prestado su ayuda en el desarrollo de esta investigación.