

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, se
procede, con fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis en el Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado, con número de páginas: _____.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20_____



Pilar de la Vega Gallego
Fdo. El Funcionario



Programa de doctorado de Medicina Clínica (RD 99/2011)

ESTUDIO DEL CD163 URINARIO COMO
BIOMARCADOR DE RECAIDA EN VASCULITIS RENAL
ASOCIADA A ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE
NEUTRÓFILO.

Tesis doctoral presentada por:

JAVIER VILLACORTA PEREZ

Directora:

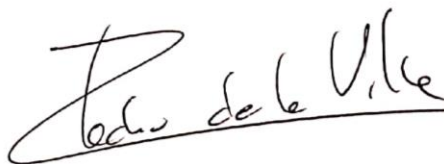
Dra. Gema Fernández Juárez.

ALCALÁ DE HENARES, OCTUBRE DE 2019.

Dr. D. Pedro de la Villa Polo, Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud.

INFORMA que la Tesis Doctoral titulada **ESTUDIO DEL CD163 URINARIO COMO BIOMARCADOR DE RECAIDA EN VASCULITIS RENAL ASOCIADAS A ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTRÓFILO**, presentada por D. **JAVIER VILLACORTA PÉREZ**, bajo la dirección de la Dra. Dña. Gema María Fernández Juárez, reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. Esta Comisión ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 28 de octubre de 2019.



Fdo.: Pedro de la Villa Polo

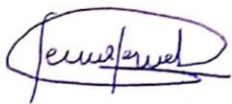


GEMA MARIA FERNANDEZ JUÁREZ, DOCTORA EN MEDICINA, JEFA DE SERVICIO DE NEFROLOGIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO FUNDACION ALCORCON, Y MAITE RIVERA GORRIN, DOCTORA EN MEDICINA, Y JEFA DE SECCIÓN DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMON Y CAJAL,

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por el D Javier Villacorta Pérez, realizado bajo mi dirección, y titulado: "Estudio del CD163 urinario como biomarcador de recaída en vasculitis renal asociada a anticuerpo anticitoplasma de neutrófilo", reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste dónde proceda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares, Septiembre 2019.



Gema María Fernández Juárez
Directora Tesis Doctoral
DNI: 02234399H



Maite Rivera Gorrín
Tutora Tesis Doctoral
DNI: 42096232E



Universidad
de Alcalá

INFORME DEL DIRECTOR/A DE TESIS SOBRE "ANÁLISIS DE COINCIDENCIAS"
DE LA TESIS DOCTORAL A TRAVÉS DEL PROGRAMA TURNITIN

D./D^a Gema Maria Fernández Juárez

(en el caso de varios directores se debe incluir a todos ellos), director/es de tesis, AUTORIZA/N a

D/D^a Javier Villacorta Pérez, defender la Tesis Doctoral que tiene por título "Estudio del CD163 urinario como biomarcador de recaída en vasculitis renal asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo"

El trabajo presentado ha sido analizado por la plataforma TURNITIN, arrojando un porcentaje de coincidencias del 13 %.

Justificación de la autorización (obligatorio en caso de que el porcentaje supere el 24%):

(Aunque solo es obligatorio cuando supera el 24%, puede ser adecuado comentar a que se deben las coincidencias detectadas cuando el porcentaje sea inferior, despejando cualquier duda sobre la originalidad del trabajo)

En Madrid, a 14 de Octubre de 2019

Firmado: Gema Fdez Juárez

Informada la Comisión Académica:

Fecha: 28-10-2019

Firmado: Presidente de la Comisión Académica del Programa



AGRADECIMIENTOS.....	9
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
RESUMEN.....	18
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. Vasculitis asociada a ANCA y afectación renal.....	19
1.2. Patogenia de la Vasculitis asociada a ANCA.....	28
1.2.1. Patogenia de la vasculitis: visión general.....	28
1.2.2. Factores genéticos en vasculitis asociada a ANCA.....	29
1.2.3. Factores ambientales en vasculitis asociada a ANCA,.....	32
1.2.4. Papel de los ANCA en la patogenia.....	33
1.2.5. Participación de las redes extracelulares de cromatina (NETs) en la patogenia.....	36
1.2.6. Mecanismos celulares implicados en la patogenia de la vasculitis.....	37
1.2.7. Participación del sistema del complemento en la patogenia.....	39
1.2.8. Papel de los macrófagos en el proceso vasculítico.....	42
1.2.9. Biomarcadores de actividad en vasculitis asociada a ANCA.....	49

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	59
3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO.....	61
4. OBJETIVOS.....	62
4.1. Objetivo primario.....	62
4.2. Objetivos secundarios.....	62
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
5.1. Pacientes y muestras.....	63
5.2. Criterios de inclusión.....	65
5.3. Criterios de exclusión.....	66
5.4. Variables del estudio.....	66
5.5. Definiciones del estudio.....	68
5.5.1. Definiciones clínicas.....	68
5.5.2. Definiciones histológicas.....	70
5.6. Análisis del CD163s urinario.....	73
5.7. Análisis estadístico.....	73
6. RESULTADOS.....	75
6.1. Población incluida en el estudio.....	75
6.2. Características demográficas, clínicas e histológicas de los pacientes con vasculitis activa.	75
6.3. Características demográficas, clínicas e histológicas de los pacientes controles con vasculitis en remisión	81
6.4. Características demográficas de los controles sanos.....	84

6.5. Niveles de CD163su en pacientes con vasculitis activa, vasculitis en remisión y controles sanos.	85
6.6. Concentraciones de CD163su al debut en pacientes con vasculitis activa y su correlación clínica.	86
6.7. Evolución de CD163su durante el seguimiento de los pacientes con vasculitis renal.	91
6.8. Correlación de los niveles de CD163su con actividad vasculítica.....	94
6.9. Cambios en el CD163s urinario en los pacientes con recaída renal.....	95
6.10. Estudio del CD163s urinario como marcador de recaída renal.....	98
 7. DISCUSIÓN.....	 101
7.1. Relevancia del Estudio.....	101
7.2. Papel de los macrófagos en la patogenia de la vasculitis.....	102
7.3. CD163s urinario como biomarcador diagnóstico de vasculitis renal.....	106
7.4. CD163s urinario como biomarcador de respuesta al tratamiento y remisión.....	109
7.5. CD163s urinario como biomarcador de recaída renal en vasculitis.....	112
7.6. Comparación del CD163s con otros biomarcadores de actividad vasculítica.....	114
7.7. Limitaciones y fortalezas del estudio.....	118

8. CONCLUSIONES.....	121
-----------------------------	------------

9.BIBLIOGRAFÍA.....	123
----------------------------	------------

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora, la Dra. Gema Fernández Juárez porque sin su esfuerzo y dedicación no hubiera sido posible alcanzar este logro.
- A mi tutora, la Dra. Maite Rivera, por su motivación y apoyo continuo para la realización del estudio.
- A Laura Lucientes y Elena Goicoechea, miembros del Departamento de Inmunología del Centro de Investigaciones Biológicas y la Universidad Complutense, porque sin su colaboración y esfuerzo no habría sido posible la consecución del estudio.
- A los Servicios de Nefrología y Anatomía Patológica del Hospital Fundación Alcorcón, Hospital Virgen de la Salud de Toledo, Hospital Doce de Octubre de Madrid y Hospital Gregorio Marañón, en especial a Mercedes Acevedo, Teresa Caverro, Luis Sánchez Cámara y Marian Goicoechea, porque sin su participación no habría sido posible alcanzar los objetivos del estudio.
- Al Laboratorio de Biomarcadores y Dianas terapéuticas del Hospital Ramón y Cajal, y en particular a la Dra Laura García Bermejo y Sara Gimenez, por su cooperación en el estudio.
- Al Biobanco del Hospital Fundación Alcorcón por el soporte técnico necesario para la consecución del estudio.
- A Elia Pérez de la Unidad de Investigación del Hospital Fundación Alcorcón, por su ayuda en el análisis estadístico de los resultados del estudio.
- A los pacientes, porque a pesar de su padecimiento, han permitido la utilización de sus muestras y datos clínicos y, con ello, contribuir al entendimiento de la patología glomerular.
- A mi familia, porque son mi motor, y con su apoyo incondicional me motivan para lograr mis objetivos y vencer las dificultades.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACR: American College of Rheumatology
ADN: ácido desoxirribonucleico.
ADNasa: actividad desoxirribonucleasa
ANCA: anticuerpo anti-citoplasma de los neutrófilos
antiMBG: anti membrana basal glomerular.
AUC; área bajo la curva
BVAS: Birmingham Vasculitis Activity Score
c-ANCA: ANCA con patrón citoplasmático
CD163s: CD163 soluble.
CD163su: CD163 soluble urinario.
° C: grado Celsius.
CHCC: Chapel Hill Consensus Conference
CKD-EPI: chronic kidney disease epidemiology study formula
CF: ciclofosfamida
Crs: creatinina sérica
Cru: creatinina urinaria
C5aR: receptor del C5a
Dc: decilitro
DS: desviación estándar
ERCT: enfermedad renal crónica terminal
Est: esteroides
EULAR: European league against Rheumatism
EUVAS: European vasculitis Study Group
FGe: filtrado glomerular estimado
Fab: fracción de unión al antígeno.
FC: fracción constante.
GEPA: granulomatosis eosinofílica con poliangéitis
GN: glomerulonefritis
GNEP: glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune
GPA: granulomatosis con poliangéitis
Hem/c: hematíes por campo.
H&E: hematoxilina y eosina
HLA: antígeno leucocitario humano
HR: Hazard ratio
IC: intervalo de confianza
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1
ICs: inmunocomplejos
IFD: inmunofluorescencia directa
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IFN: interferón
Ig: inmunoglobulina
IL.1: interleuquina 1.

IL-5: interleuquina 5
 IL-6: interleuquina 6
 IL-13_ interleuquina 13.
 IL-17: Interleuquina 17
 IL-10: Interleuquina 10
 Iv: intravenoso
 L: litro
 LAMP-2: proteína de membrana asociada a lisosomas2
 LPS: lipopolisacárido
 MASP-2: Lectina serina-proteasa 2 asociado a manosa
 ME: Microscopía electrónica
 Mg: miligramos.
 Mmol: milimol
 MPO: mieloperoxidasa
 MCP1: proteína quimiotáctica de monocitos 1
 N: número
 NET: red extracelular de cromatina
 Ng: nanogramo
 NIH: National Health Institute
 PAM: poliangéitis microscópica
 p-ANCA: ANCA con patrón perinuclear
 PCR: proteína C reactiva
 PMN: polimorfonucleares.
 PR3: proteinasa 3
 PTPN: receptor de la proteína tirosina fosfatasa
 Rag2: gen 2 activador de la recombinasa
 RIC: rango intercuartil
 ROC: receiving operating characteristic
 ROS: especies de oxígeno reactivo.
 RR: riesgo relativo
 RTX: rituximab
 SNP: polimorfismo de nucleótido único.
 SVV: vasculitis de pequeño vaso
 TGF: factor de crecimiento
 TH1:linfoctio T helper 1
 TH2: linfocito T helper 2
 TH17: linfocito T helper 17.
 TNF: factor de necrosis tumoral
 Treg: linfocitos T reguladores
 Tto: tratamiento
 T1: tercil 1
 T2: tercil 2
 T3: tercil 3
 U: unidades
 VAA: vasculitis asociadas a ANCAs
 VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VLR: vasculitis limitada al riñón
VPN: valor predictivo negativo
VPP: valor predictivo positivo.
VSG: velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de afectación orgánica en función del subtipo de vasculitis asociada a ANCA.	19
Tabla 2. Características serológicas de las diferentes formas clínicas de vasculitis asociada a ANCA.....	23
Tabla 3. Genes implicados en vasculitis asociada a ANCA.....	28
Tabla 4. Grado de infiltración por macrófagos CD163 en los distintos compartimentos renales en las biopsias de pacientes con VAA.	41
Tabla 5. Características demográfica y clínicas de 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.....	74
Tabla 6. Características renales de los 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.....	75
Tabla 7. Características histológicas de los 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA	76
Tabla 8. Tratamiento y evolución de los 24 pacientes incidentes con vasculitis renal asociada a ANCA.....	78
Tabla 9. Características demográfica y clínicas de 23 pacientes controles con vasculitis renal asociada a ANCA en remisión	79
Tabla 10. Características histológicas de los 23 pacientes controles con vasculitis renal asociada a ANCA en remisión	81

Tabla 11. Concentraciones urinarias de CD163s normalizado por creatinina en función del subtipo de vasculitis y serotipo de ANCA	83
Tabla 12. Características clínicas al diagnóstico de los pacientes según los niveles de CD163su normalizado por creatinina agrupados por terciles	84
Tabla 13. Características renales de los pacientes según los niveles de CD163su normalizado por creatinina al diagnóstico agrupados por terciles.....	85
Tabla 14. Características histológicas de los pacientes según los niveles de CD163su normalizado por creatinina al diagnóstico agrupados por terciles	86
Tabla 15. Diferencias en el esquema terapéutico, tasa de remisión e incidencia de recaídas entre los pacientes con VAA en función de los niveles al debut de CD163su	87
Tabla 16. Evolución de la creatinina sérica, microhematuria, título de ANCA y concentraciones de CD163su en pacientes que presentaron recaída renal de la vasculitis.	93
Tabla 17. Cambios en las concentraciones urinarias de CD163s en los pacientes que presentaron elevación o positivización en el título de ANCA durante el seguimiento	94
Tabla 18. Área bajo la curva, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el diagnóstico de recaída renal considerando un incremento absoluto de la concentración de CD163su de 20 ng/mmol o un incremento relativo del 20%, con respecto al valor previo.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación morfológica de las vasculitis por el tamaño del vaso afectado, según el consenso de Chapel Hill.....	18
Figura 2. Frecuencia de afectación de órganos en función del serotipo de ANCA en pacientes con VAA.	20
Figura 3. Diferencias en las curvas de supervivencia libres de recaída en función del serotipo de ANCA (PR3 vs MPO) y el fenotipo clínico (GPA vs PAM vs VLR)	24
Figura 4. Diferencias epidemiológicas en la prevalencia de los serotipos de ANCA y formas clínicas de vasculitis (GPA vs PAM)	27
Figura 5. Modelo patogénico de vasculitis asociada a ANCA	32
Figura 6. Mecanismos fisiopatológicos en el compartimento celular (linfocitos T) implicado en la generación del daño vasculítico	36
Figura 7. Implicación del sistema del complemento en la patogenia del proceso vasculítico.....	39
Figura 8. Infiltración por macrófagos en biopsias renales de pacientes con vasculitis asociada a ANCA. Técnica inmunohistoquímica para CD163. A y B: Infiltración de células CD163 en el compartimento glomerular. C: Infiltración de células CD163 a nivel túbulo-intersticial y D: Infiltración de células CD163 en los capilares peritubulares.....	43

Figura 9. Diferencia en el número medio de macrófagos CD163 en el intersticio entre los subtipos histológicos de pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA	44
Figura 10. Diferencias en el número medio de macrófagos CD163 en los capilares peritubulares entre los subtipos histológicos de pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.....	45
Figura 11. Metanálisis de estudios que analizan la probabilidad positiva y negativa de la elevación del título de ANCA para predecir la aparición de recaídas en VAA.....	50
Figura 12. Concentraciones de CD163su en pacientes con vasculitis renal activa, vasculitis renal en remisión y controles sanos.....	82
Figura 13. Evolución de los niveles urinarios de CD163s normalizados durante el seguimiento de 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA,,,,,,,,,,,,,	89
Figura 14. Mediana de niveles de CD163su durante el seguimiento en función del tipo de tratamiento inmunosupresor.....	90
Figura 15. Correlación entre las concentraciones de CD163su y el score BVAS al sexto mes de seguimiento de pacientes con brote renal de VAA.....	91
Figura 16. Curva ROC para diagnosticar recaída renal considerando los cambios absolutos del CD163su con respecto a su valor previo.....	96

Figura 17. Curva ROC para diagnosticar recaída renal considerando los cambios porcentuales (relativos) del CD163su con respecto a su valor previo.....96

RESUMEN

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento del proceso patogénico que ocurre en la afectación vasculítica renal, implicando a nuevos mecanismos de daño molecular y celular. Entre ellos destaca el papel de los macrófagos como células efectoras con un rol primario en el proceso patogénico. Los estudios histológicos han demostrado que los macrófagos CD163 son el tipo de célula infiltrante predominante en las biopsias de pacientes con vasculitis, donde parecen infiltrar en estadios precoces de la enfermedad. Modelos experimentales han analizado la presencia de CD163 soluble (CD163s) en la orina de ratas a las que se les ha inducido vasculitis, demostrando concentraciones elevadas al mes de la inmunización con ANCA-MPO. Estos hallazgos posicionan al CD163s como un posible biomarcador de actividad vasculítica y la medición de las concentraciones urinarias de CD163s durante el seguimiento de pacientes con vasculitis asociada a ANCA (VAA) podría ser de utilidad para la monitorización de la respuesta al tratamiento, la identificación de actividad vasculítica residual y el diagnóstico de recidiva renal.

Partiendo de esta hipótesis, nos propusimos estudiar los niveles urinarios de CD163s en una cohorte prospectiva de 24 pacientes incidentes con brote de vasculitis renal, un grupo control de 23 pacientes con vasculitis renal en remisión, y un grupo control de 20 sujetos sanos. En los pacientes incidentes se realizaron determinaciones de CD163su al debut de la enfermedad y posteriormente cada 3 meses hasta el final del seguimiento. El CD163 soluble urinario (CD163su) se analizó mediante ELISA y los valores fueron normalizados según concentración de creatinina urinaria. Se identificó la aparición de recaídas durante el seguimiento estudiando los cambios en las concentraciones del CD163su en estos pacientes y su correlación con otros parámetros de actividad vasculítica

Los 24 pacientes con brote renal de vasculitis mostraron al diagnóstico unos niveles elevados de CD163su en comparación con los pacientes en remisión y los controles sanos. Las concentraciones de CD163su decrecieron progresivamente tras el tratamiento en todos los enfermos que alcanzaron remisión, mientras que permanecieron elevados a pesar del tratamiento cuando no existió respuesta al mismo. En los pacientes que presentaron una recaída renal se produjo una elevación significativa de las concentraciones de CD163su con respecto a los valores previos. Un incremento absoluto de 20 ng/mmol o un incremento relativo del 20% con respecto a las concentraciones previas de CD163su permitió discriminar la presencia de recaída renal de la vasculitis con una sensibilidad del 100%, y una especificidad del 89,3% para los cambios absolutos y del 87,5% para los cambios relativos. El AUC del cambio absoluto y relativo de las concentraciones de CD163su con respecto al valor previo para discriminar una recaída renal fue de 0.9679 (IC 95% 0,915-1.000; $p=0.001$) y 0,9571 (IC 95% 0,9032-1,000, $p=0.001$), respectivamente. Las concentraciones de CD163su se correlacionaron con el valor del score BVAS al 6° mes ($r=0,737$, $p=0,006$) y al 12° mes ($r=0,804$, $p=0,005$), demostrando la capacidad del CD163su para monitorizar actividad vasculítica.

Nuestros resultados posicionan al CD163su como un biomarcador fiable y preciso para monitorizar la respuesta al tratamiento, identificar actividad vasculítica residual y diagnosticar la presencia de recaídas renales durante el seguimiento de pacientes con VAA.

1. INTRODUCCION.

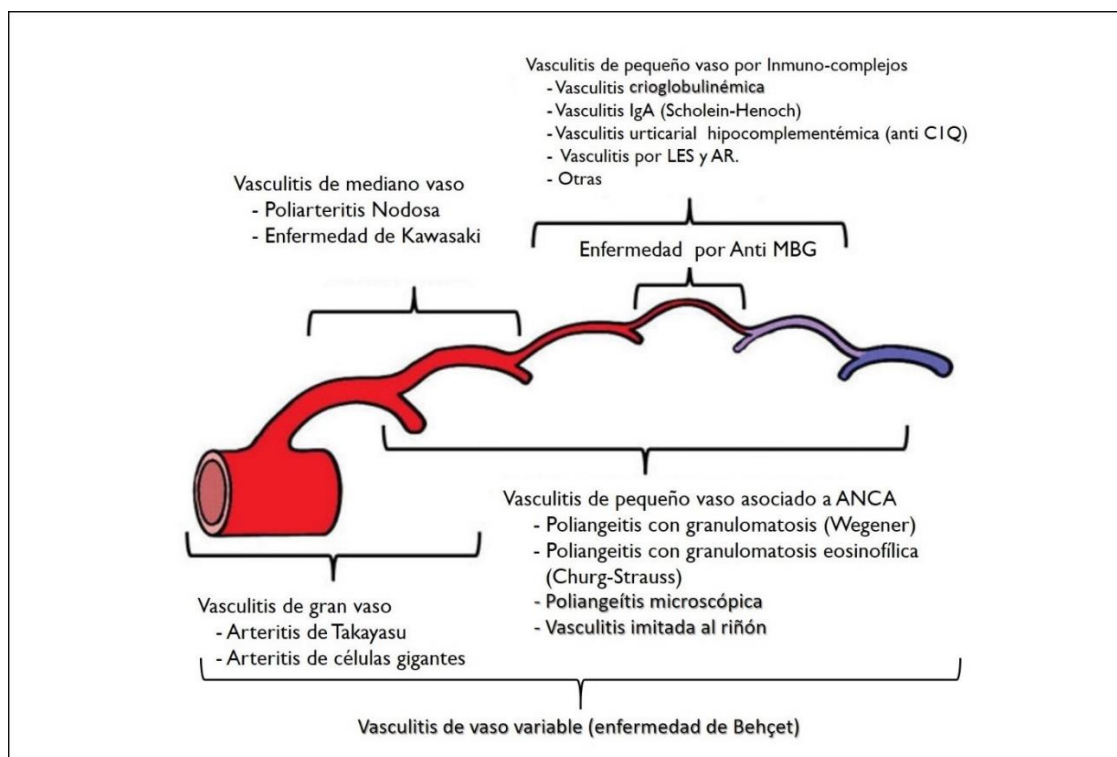
1.1. Vasculitis asociada a ANCA y afectación renal.

Las vasculitis sistémicas primarias constituyen un grupo heterogéneo de procesos clínicos con un sustrato patológico común. (1). La localización y el diferente tamaño de los vasos afectados, y el distinto patrón histopatológico, constituyen características que definen los diferentes síndromes vasculíticos y permiten su individualización. Las vasculitis pueden dividirse en primarias, en las que no se ha identificado un factor etiológico, o secundarias. Estas últimas se asocian a otras enfermedades sistémicas, fundamentalmente reumatológicas como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren; o bien con procesos infecciosos, neoplásicos o administración de fármacos (2). En el caso de las vasculitis primarias, la conferencia de Consenso de Chapell Hill estableció unos criterios clasificatorios de los síndromes vasculíticos, basados en el tipo de vaso afectado y las características clínicas y serológicas de las mismas.(3) De esta forma, se distinguen las vasculitis de gran vaso, que incluyen entidades que afectan a vasos grandes, es decir la aorta y sus ramas principales; dentro de este grupo se encuentra la arteritis de Takayasu y la arteritis de células gigantes. Las vasculitis que afectan a vasos medianos, donde el daño afecta a arterias de mediano calibre, fundamentalmente arterias viscerales y arteriolas, dentro de las cuales encontramos la poliarteritis nodosa y la enfermedad de Kawasaki. Y por último, las vasculitis que afectan a vasos pequeños (capilares, venas y vénulas), que a su vez se subdividen en dos subgrupos en base a la presencia o ausencia de depósitos inmunes en la pared del vaso afecto; un primer grupo, las vasculitis asociadas a

anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA), que se caracterizan por la escasez o ausencia de depósitos inmunes, y, un segundo grupo, las vasculitis mediadas por inmunocomplejos, las cuales se caracterizan por la presencia de depósitos inmunes en las paredes de los vasos afectados, y entre las que se encuentran la púrpura de Schonlein-Henoch y las vasculitis crioglobulinémica,

Las vasculitis asociadas a ANCA incluyen la poliangeítis microscópica (PAM); la granulomatosis de Wegener, denominada en la actualidad como Granulomatosis con poliangeítis (GPA); el síndrome de Churg-Strauss, también denominado formalmente como Granulomatosis Eosinofílica con Poliangeítis (GEPA) y la vasculitis limitado al riñón (VLR) (4). Este grupo de enfermedades se caracteriza por una clara asociación patogénica con los ANCA, mostrando reactividad en el 80 y el 90% de los casos (2). Por este motivo, a nivel epidemiológico y terapéutico, este grupo de vasculitis se ha diferenciado del resto de vasculitis.

Figura 1. Clasificación morfológica de las vasculitis por el tamaño del vaso afectado según la Conferencia de Consenso de Chapel Hill 2012.



La PAM es una vasculitis necrotizante no granulomatosa, con escasos o nulos depósitos inmunes y que afecta principalmente a pequeños vasos, aunque ocasionalmente también pueden afectar a vasos de mediano calibre. Se identifican ANCAs circulantes en el 85% de los casos, siendo su patrón habitual el perinuclear o pANCA, y la especificidad de los mismos es anti-mieloperoxidasa (anti-MPO) (5). El promedio de edad de inicio es de 50 años y es un poco más frecuente en los hombres (6). Los síntomas de afectación constitucional, como artralgias o fiebre, pueden estar presentes mucho antes del reconocimiento de la enfermedad. La afectación renal en forma de glomerulonefritis es

muy común, y el cuadro clínico característico es una insuficiencia renal rápidamente progresiva con microhematuria y proteinuria en rango variable, generalmente no nefrótica (7) . Otros órganos afectados en esta entidad son los pulmones en forma de capilaritis pulmonar, que puede ocasionar hemorragia alveolar, o en ocasiones, la presencia de infiltrados intersticiales inflamatorios sin hemorragia asociada.(8,9) También es común la afectación de la piel y las mucosas, siendo característica la presencia de una púrpura palpable cuyo sustrato histológico es una vasculitis leucocitoclástica (10). En el 50% de los casos se produce afectación intestinal, principalmente en forma de hemorragia digestiva, úlceras colónicas, o dolor abdominal difuso (11). Por último, la afectación neurológica no es infrecuente y se aprecia neuropatía periférica en hasta el 30% de los casos (Tabla 1) (12).

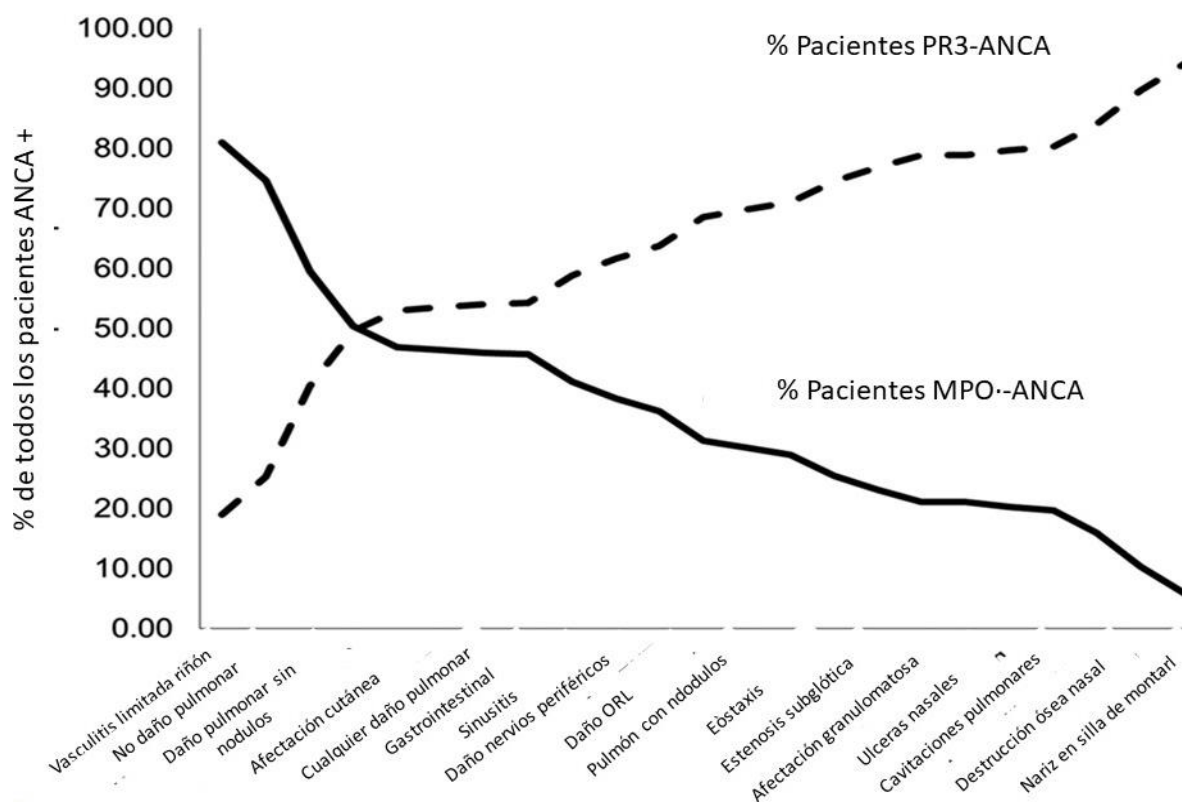
Tabla 1. Porcentaje de afectación orgánica en función del subtipo de vasculitis asociada a ANCA.

Tipo de afectación	Cutánea	Renal	Pulmonar	ORL	Neurológico	Digestivo	Ocular
Granulomatosis con Poliangeitis (GPA)	50%	80%	90%	90%	50%	50%	40%
Poliangeitis microscópica (PAM)	75%	95%	50%	35%	30%	50%	20%
Granulomatosis eosinofílica con poliangeitis (GEPA)	70%	45%	70%	50%	70%	50%	10%

La GPA se caracteriza por la presencia de vasculitis granulomatosa necrotizante de capilares, vénulas, arteriolas y arterias de mediano calibre. Es más común en los hombres,

siendo la edad media de aparición los 40 años (13). Afecta característicamente el tracto respiratorio superior e inferior, siendo típica la afectación en forma de sinusitis, exudado nasal, rinitis crónica, otitis media serosa, epistaxis y úlceras nasales (14,15). Esta vasculitis se relaciona principalmente con los ANCA con patrón citoplasmático o cANCA que generalmente presentan especificidad para la proteinasa-3 (PR3-ANCA) (16). En el 80% de los casos puede presentarse afectación renal durante la evolución de la enfermedad, habitualmente su aparición es posterior a la presencia de manifestaciones respiratorias altas. El cuadro renal, al igual que en la PAM, consiste en una insuficiencia renal rápidamente progresiva con microhematuria (17), y su sustrato histológico es una glomerulonefritis necrotizante focal por proliferación extracapilar. Una característica adicional de esta entidad es la afectación ocular, que puede ocurrir en forma de pseudotumor orbitario, escleritis, queratitis o uveítis (18,19). Respecto de las manifestaciones neurológicas, estas aparecen en un 35 a un 50% de los pacientes, siendo la afectación predominante del sistema nervioso periférico, generalmente en forma de mononeuropatía recurrente o polineuropatía simétrica (20). Los pacientes con compromiso del sistema nervioso central (SNC) pueden presentar neuropatías craneales, con mayor frecuencia de los pares II, VI y VII, hemiparesia, convulsiones, defectos del campo visual o vasculitis del SNC (21). Son menos frecuentes las apoplejías isquémicas, la encefalopatía, la meningitis granulomatosa basilar o la mielitis (22).

Figura 2. Frecuencia de afectación de órganos en función del serotipo de ANCA en pacientes con VAA (23).



La GEPA es una vasculitis necrotizante eosinofílica que, al igual que la GPA produce inflamación granulomatosa. La aparición ocurre normalmente entre los 15 y los 70 años de edad. La reactividad para los ANCAs en esta entidad es menos frecuente que en las anteriores, ocurriendo sólo en el 40-60% de los casos (24). La aparición de esta vasculitis está a menudo asociada con un empeoramiento de un cuadro asmático, siendo los síntomas alérgicos, la angitis y la eosinofilia los sellos distintivos de la misma. La afectación de la

piel, generalmente con formación de nódulos subcutáneos o una erupción urticariforme, ocurre en dos tercios de los pacientes. La afectación característica pulmonar consiste en una infiltración eosinofílica del parénquima que puede ocasionar eosinofilia pulmonar simple (síndrome de Loeffler) o neumonía eosinofílica crónica (25). En esta enfermedad es importante reconocer la afectación gastrointestinal que suele ocasionar una gastroenteritis eosinofílica (26), y particularmente la cardíaca, que puede debutar en forma de pericarditis, miocarditis, o insuficiencia cardíaca, y que constituye la primera causa de muerte en estos pacientes (27,28).

Por último, la vasculitis limitada al riñón es una forma vasculítica con afectación exclusivamente renal y su incidencia es muy frecuente tanto en el área mediterránea como en Extremo Oriente, donde constituye el tipo de vasculitis asociada a ANCA más frecuentemente observada (29,30). Generalmente el serotipo de ANCA asociado es el anti-MPO con patrón perinuclear (31). Esta afectación vasculítica localizada se caracteriza por la ausencia de síntomas sistémicos o extrarrenales, lo cual implica en muchas ocasiones su demora en el diagnóstico.

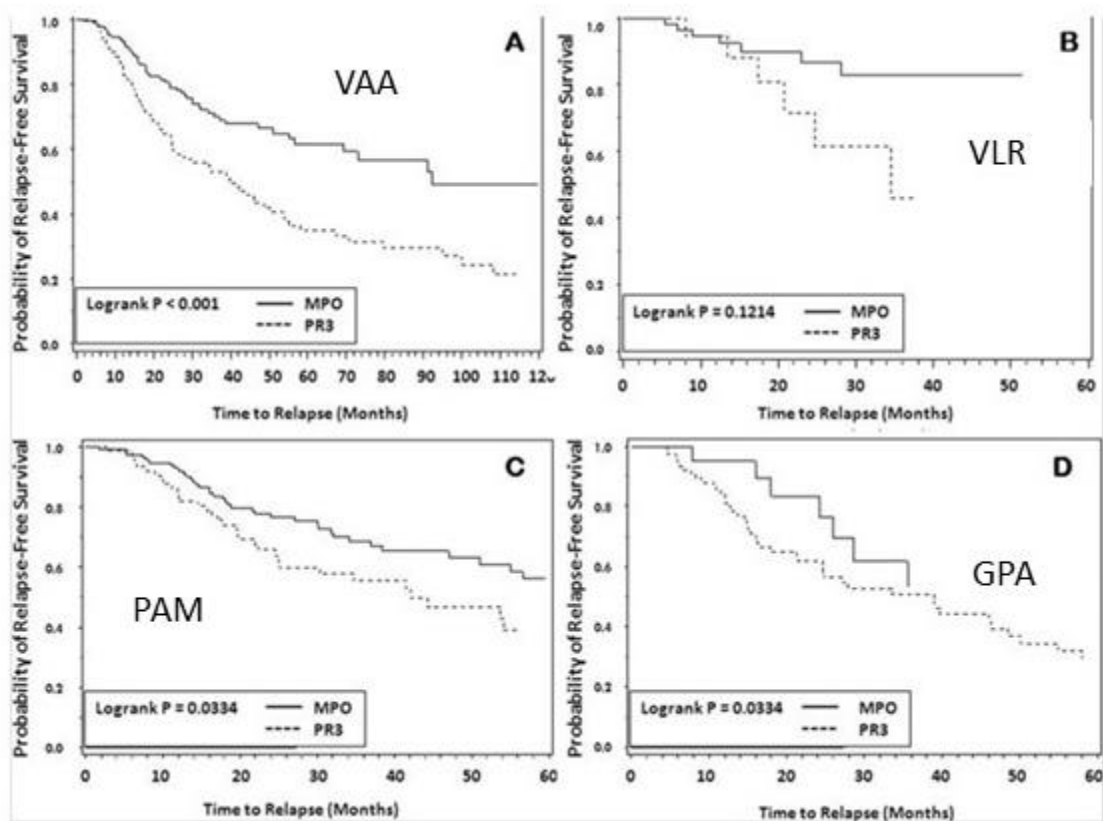
Tabla 2. Características serológicas de las diferentes formas clínicas de vasculitis asociada a ANCA.

Tipo de vasculitis	PR-3 / cANCA	MPO / pANCA	Negativo
Granulomatosis con Poliangeitis (GPA)	80-90%	10-20%	5%
Poliangeitis microscópica (PAM)	10-20%	80-90%	30%
Granulomatosis eosinofílica con poliangeitis (GEPA)	30%	60%	10-50%
Vasculitis limitada al riñón (VLR)	30%	70%	10%

La distinción del fenotipo clínico así como el serotipo de ANCA, resulta muy relevante a la hora de evaluar un paciente con vasculitis, puesto que ambas condiciones tienen implicaciones clínicas y pronósticas. Hoy en día sabemos que los pacientes con serotipo ANCA-PR3 presentan una tasa superior de recaídas durante el seguimiento, que puede llegar a ser el doble de la que presentan los pacientes con serotipo ANCA-MPO (32,33). Es por ello que en este subgrupo de enfermos el seguimiento de la glomerulonefritis en los primeros años ha de ser muy cuidadoso y algunas guías de práctica clínica recomiendan, en base a este riesgo incrementado de recaída, la realización de un tratamiento inmunosupresor más prolongado (34,35). Pero el fenotipo clínico también condiciona la evolución y pronóstico de los pacientes con VAA, de tal manera que en los pacientes con formas sistémicas de vasculitis (poliangeítis microscópica y granulomatosis con poliangeítis) la probabilidad de una recidiva precoz de la vasculitis es

significativamente superior a la observada en los pacientes con exclusivamente afectación renal, como ocurre en la vasculitis limitada al riñón (23). Por lo tanto, una buena evaluación y correlación del fenotipo y el serotipo al diagnóstico permite estratificar el riesgo de recaída e individualizar el tratamiento inmunosupresor, siendo los pacientes con GPA y serotipo ANCA-PR3 los que se presenta un riesgo más elevado de recidiva precoz de la enfermedad durante el seguimiento (36,37). Sin embargo, la clasificación clínica de la vasculitis ha quedado en un segundo plano en la práctica clínica dado que los estudios genéticos, como desarrollaremos más adelante, han demostrado que existe un sustrato genético asociado con los distintos serotipos de vasculitis y no con las formas clínicas o fenotípicas, y esta genética diferencial entre vasculitis ANCA-MPO y ANCA-PR3 hace que hoy en día podamos hablar de ellas como dos entidades diferenciadas con un origen, curso clínico y pronóstico distinto.

Figura 3. Diferencias en las curvas de supervivencia libres de recaída en función del serotipo de ANCA (PR3 vs MPO) y el fenotipo clínico (GPA vs PAM vs VLR) (23).



1.2. Patogenia de la vasculitis asociada a ANCA.

1.2.1. Patogenia de la vasculitis: visión general.

Hoy en día la patogenia de vasculitis asociada a ANCA se entiende como un proceso en el que están implicados múltiples hitos, que son necesarios para que se produzca el daño vasculítico. El proceso patogénico implica susceptibilidad genética, factores

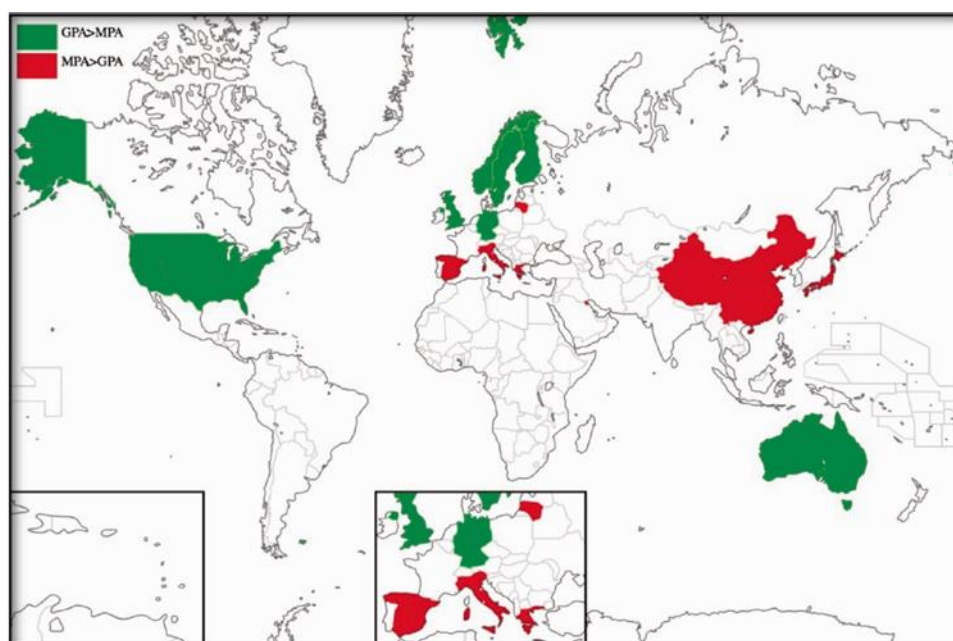
ambientales, tales como infecciones, pero también una serie de alteraciones en los mecanismos de regulación humoral y celular que favorecen el desarrollo del daño. Entre estos últimos factores destacan, por el reciente descubrimiento de su implicación en la patogenia, las redes extracelulares de cromatina (NETs), la activación de la vía alternativa del complemento y la participación de los macrófagos. En los próximos párrafos se describirán con detalle los distintos hitos implicados y la necesaria e intensa interrelación entre ellos para que se pueda desarrollar el daño vasculítico.

1.2.2. Factores genéticos en vasculitis asociada a ANCA.

Los estudios de asociación genómica realizados en la última década (GWAS) han identificado varios genes que predisponen al desarrollo de VAA (Tabla 1) (38–40). Los análisis realizados en población europea demostraron que la GPA con ANCA-PR3 se encontraba fuertemente asociada con el HLA-DP y que la PMA con el serotipo ANCA-MPO se asociaba con la región HLA-DQ. De manera interesante, estos estudios demostraron que las características genómicas del HLA se asociaban con la especificidad del ANCA, es decir, PR3 o MPO, más que con el fenotipo clínico (GPA o PAM), apoyando el hecho de que la vasculitis ANCA-MPO y ANCA-PR3 son entidades distintas con un sustrato genético diferenciado. En un estudio realizado en población norteamericana también encontraron que el locus HLA-DP tenía una fuerte asociación con la GPA. Se identificó además el HLA-DPB104 como un alelo de riesgo para el desarrollo de GPA(39). Otro alelo, el HLA-DRB09:01, que es común en la población asiática pero infrecuente en las poblaciones europeas, mostró una fuerte asociación con el desarrollo de PAM en una población japonesa (41). Estas diferencias étnicas en las frecuencias alélicas del complejo

de histocompatibilidad de clase II traducen las diferencias epidemiológicas observadas en VAA (42); es decir, el predominio de GPA con serotipo ANCA-PR3 en poblaciones caucásicas del Norte de Europa y el predominio de PAM con MPO-ANCA en poblaciones asiáticas (43).

Figura 4. Diferencias epidemiológicas en la prevalencia de los serotipos de ANCA y formas clínica de vasculitis (GPA vs PAM) (44).



Los genes no relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad que se han identificado como asociados con la VAA incluyen PTPN22 (codificante de tirosina-proteína fosfatasa no receptor tipo 22), SERPINA1 (codificando la α 1-antitripsina), PRTN3 (codificando PR3) y SEMA6A (codificando semiforfina 6a). La frecuencia de un

polimorfismo de nucleótido único (SNP) de ganancia de función en PTPN22 es más alta en pacientes de población caucásica americana (38,39,45). Esta variante aumenta la actividad de PTPN22, que regula negativamente la producción de IL-10, una citoquina inmunosupresora, lo cual resulta en una hiperactivación del sistema inmunitario en pacientes con VAA. La presencia de SNP cerca de SERPINA1 se asocia con resistencia al desarrollo de vasculitis ANCA-PR3 (46), mientras que SNP en SEMA6A se asocia con resistencia al desarrollo de GPA (39,40).

Tabla 3. Genes implicados en vasculitis asociada a ANCA,

Genes	Tipo de vasculitis	RR
HLA-DP	GPA	5.39
	PR3-AAV	7.03
HLA-DQ	MPA	0.67
	MPO- AAV	0.65
HLA-DR	MPA	1.56
	MPO- AAV	1.57
PTPN22	PR3-AAV	1.63
SERPINA1	GPA	0.54
	PR3-AAV	0.53
PRTN3	GPA	0.78
	PR3-AAV	0.73
SEMA6A	GPA	0.78

1.2.3. Factores ambientales implicados en la vasculitis asociada a ANCA.

Los factores ambientales que se han documentado como posibles desencadenantes de la VAA incluyen agentes infecciosos, drogas como el propiltiouracilo, la hidralazina y la cocaína, y partículas ambientales en el aire como el polvo de sílice. Aunque la asociación de sílice con VAA ha sido discutida, una revisión sistemática y un metanálisis confirmaron la vinculación entre la exposición al polvo de sílice y el desarrollo de VAA (47). Esta asociación sustenta el hecho de que la incidencia y gravedad de la enfermedad vasculítica aumentase después de los grandes terremotos en Japón en 1995 y en 2011 (48,49). Se postula que el polvo de sílice en el aire, causado por la destrucción masiva y la posterior reconstrucción de las ciudades, podría haber afectado la forma de presentación y la epidemiología de la VAA en estas regiones, especialmente sus manifestaciones respiratorias, como la hemorragia alveolar y neumonitis intersticial (50).

Por otra parte, la infección es una de las condiciones clínicas que más claramente se ha asociado con el desarrollo de VAA. Un proceso infeccioso activo condiciona una mayor liberación de citoquinas y activación celular, los cuales pueden constituir un desencadenante del proceso vasculítico. Por ejemplo, la toxina 1 del síndrome de shock tóxico, que es secretada por *Staphylococcus aureus*, se ha demostrado que constituye un factor de riesgo para la aparición de recaídas de la enfermedad en la GPA (51). Además, los pacientes con vasculitis activa presentan niveles más elevados de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y sobreexpresión de los antígenos de los ANCA en la superficie de los neutrófilos, permitiendo que se produzca la interacción entre estos y los ANCA circulantes. Se ha descrito la presencia de ANCA en pacientes con infección pero sin vasculitis clínica, los cuales desaparecen tras la resolución del proceso infeccioso con tratamiento

antimicrobiano. Por lo tanto, los ANCA pueden aparecer transitoriamente en el contexto de una infección, pero posiblemente la presencia de un mimetismo molecular con alguno de los antígenos infecciosos, es lo que condicionaría la persistencia de la respuesta de los ANCA en los pacientes que desarrollan la vasculitis.

1.2.4. Papel de los ANCA en la patogenia de la vasculitis.

Se han documentado la presencia de ANCA en sujetos sanos y en pacientes con otras patología inflamatorias y autoinmunes, sin que en estos casos se desarrolle la vasculitis renal (52). Por tanto, se presupone que existen una serie de características cuantitativas y cualitativas en los ANCA que determinan su patogenicidad. Los ANCA no patogénicos tienen menor capacidad para activar neutrófilos in vitro, menor afinidad por los antígenos y se encuentran en menor concentración (53). Por otra parte, la especificidad de los epítomos es diferente entre los ANCA patogénicos y aquellos que no tienen capacidad para desarrollar la vasculitis. Se han identificado más de 20 epítomos que pueden ser reconocidos por los ANCA-MPO en sujetos con VAA (54). La modulación de la especificidad de estos epítomos parece estar influenciada por estímulos endógenos y exógenos, los cuales podrían convertir los anticuerpos no patogénicos en patogénicos (53). De hecho, se ha identificado la presencia de ANCA en sueros de archivo antiguos de pacientes que posteriormente han presentado enfermedad vasculítica a diferencia de controles sanos que no desarrollan la enfermedad (55), lo cual apoya la hipótesis de que los ANCA están presentes en estos sujetos desde mucho antes de desarrollar la enfermedad, y es la influencia de otros factores ambientales o humorales lo que provoca una variación en

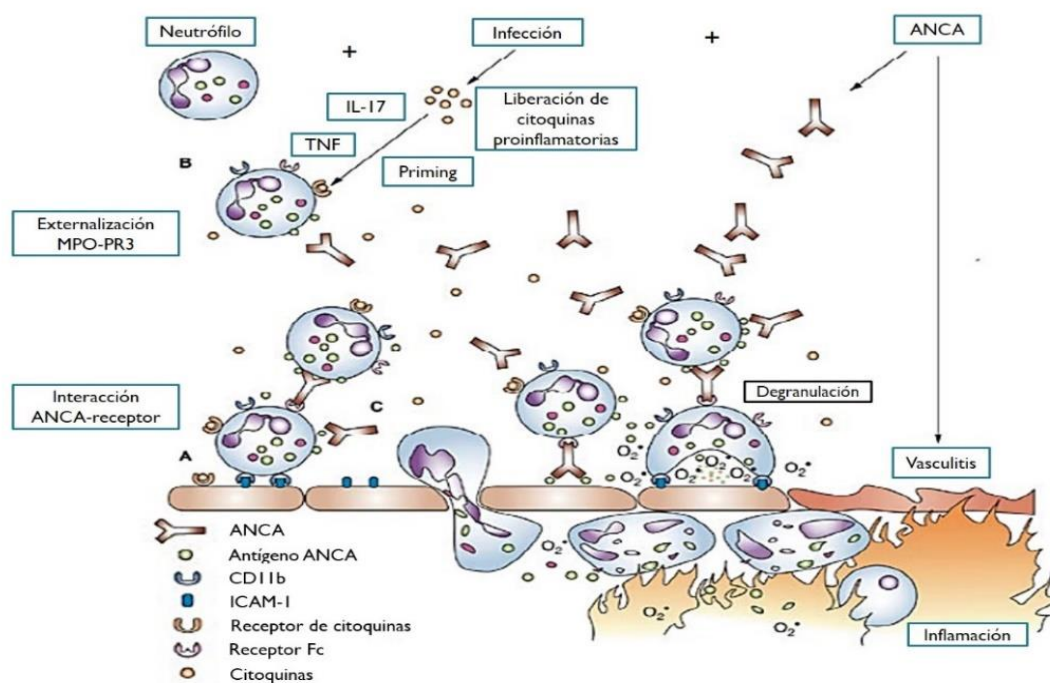
la especificidad de los epítomos convirtiéndolos en patogénicos y desarrollando consecuentemente la vasculitis. .

Los ANCA son capaces de generar in vitro daño renal como así lo han demostrado los modelos animales. Los ratones MPO $-/-$, después de ser inmunizados con MPO, generan anticuerpos anti-MPO de alta afinidad (56). La transferencia de esplenocitos de estos animales a ratones Rag $-/-$, o de IgG con anticuerpos anti-MPO a ratones normales, provoca al desarrollo de una glomerulonefritis crescética y necrotizante (57) . Al agregar lipopolisacárido (LPS) al modelo se observó cómo se incrementaban los niveles de TNF α y consecuentemente, la severidad histológica del daño vasculítico era mayor (58). Por tanto, los ANCAS son capaces de generar el daño, pero siempre que se den otras condiciones humores y celulares necesarias. Cuando se produce un fenómeno inflamatorio como pueda ser una infección, los leucocitos polimorfonucleares (PMN), estimulados por productos bacterianos (LPS) o diversas citoquinas (TNF, IL1, IL6 y IL8) se transforman en PMN activados (59,60). Como resultado de esta activación se produce una externalización y liberación de sus enzimas lisosómicas entre las que se encuentran la mieloperoxidasa y la proteinasa 3. La interacción de los ANCA con los neutrófilos ocurre a través de los antígenos (MPO y PR3) presentados en la membrana del neutrófilo, y esta interacción se produce mediante la porción Fab'2 y por la unión del fragmento Fc del ANCA con receptores Fc en la superficie celular (61) (Figura 5).

El complejo antígeno-anticuerpo que se forma en la superficie del neutrófilo es posteriormente internalizado. Como consecuencia de ello, el neutrófilo inicia un proceso de estimulación en el cual sintetiza y libera gran cantidad de enzimas lisosómicas y radicales libres de O₂ (ROS) con capacidad necrotizante y bactericida (62). Las enzimas liberados se

combinan a su vez con los ANCAs, confiriendo a los neutrófilos una mayor resistencia a la acción neutralizante de su inhibidor, la alfa1antitripsina, y como consecuencia de ello prolongando sensiblemente su vida media (63). La liberación masiva de enzimas lisosómicas y la prolongación de la vida media hacen que la capacidad destructiva de los neutrófilos se vea incrementada dando lugar a la necrosis en la pared del vaso (64).

Figura 5. Modelo patogénico de vasculitis asociada a ANCA.



1.2.5. Participación de la redes extracelulares de cromatina (NETs) en la patogenia.

Las redes o trampas extracelulares de cromatina (NETs) son unas moléculas cuya implicación en el daño vasculítico se ha conocido recientemente, adquiriendo un gran protagonismo en su patogenia. Las NETs son una malla de ADN que encierra histonas y proteínas antimicrobianas, liberadas por los neutrófilos al espacio extracelular. Estas trampas extracelulares inmovilizan a los microbios, atrapándolos entre agentes antimicrobianos, como mieloperoxidasa, elastasa, proteinasa 3, catepsina G, lactoferrina, triptasa y gelatinasa, entre otros. Cabe mencionar que la liberación de NETs no se encuentra restringida solo a los neutrófilos. Se ha demostrado que los eosinófilos y los mastocitos también son capaces de liberar trampas extracelulares. Estas NETs son un elemento del sistema inmune innato que resulta esencial para la defensa del huésped frente a los microorganismos, y su formación y liberación se encuentra estrictamente regulado. Su papel patogénico parece ser amplio y se ha especulado que una regulación alterada de los NETs contribuye a la formación de ANCA (65). Durante la formación de las NETs, el contenido de los gránulos de los neutrófilos, incluyendo MPO y PR3, se mezcla con las fibras de cromatina uniéndose al ADN y modificando su estructura. De esta forma se dota de antigenicidad a estas dos proteínas, MPO y PR3, convirtiéndolas en potenciales autoantígenos. (66). Adicionalmente, el ADN de las NETs también puede activar las células B a través de los receptores Toll-like, acelerando la producción de anticuerpos frente a estos autoantígenos (67). Por último, también se ha observado que una sobreexposición a las NETs puede favorecer el daño angiopático (68).

Por otra parte, las NETs se degradan en suero principalmente mediante la acción de la DNasa I y una menor degradación por esta enzima, como ocurre con algunos fármacos potencialmente causantes de vasculitis, como el propiltiouracilo, daría lugar a NETs particularmente resistentes y con vida media más prolongada (69). En modelos murinos, la inyección de células dendríticas y neutrófilos que han formado NETs da lugar a la producción de ANCA-MPO y PR3 y el desarrollo de enfermedad vasculítica. Sin embargo, cuando estas células dendríticas y neutrófilos formadores de NETs, son previamente tratados con DNasa I y posteriormente son inyectadas a los ratones, no dan lugar a la formación de ANCAs ni el desarrollo de la vasculitis (70). Por tanto, estos hallazgos sugieren que el ADN de las NETs resulta necesario para la formación de los ANCA-MPO y ANCA-PR3 patogénicos que posteriormente desarrollarán la vasculitis.

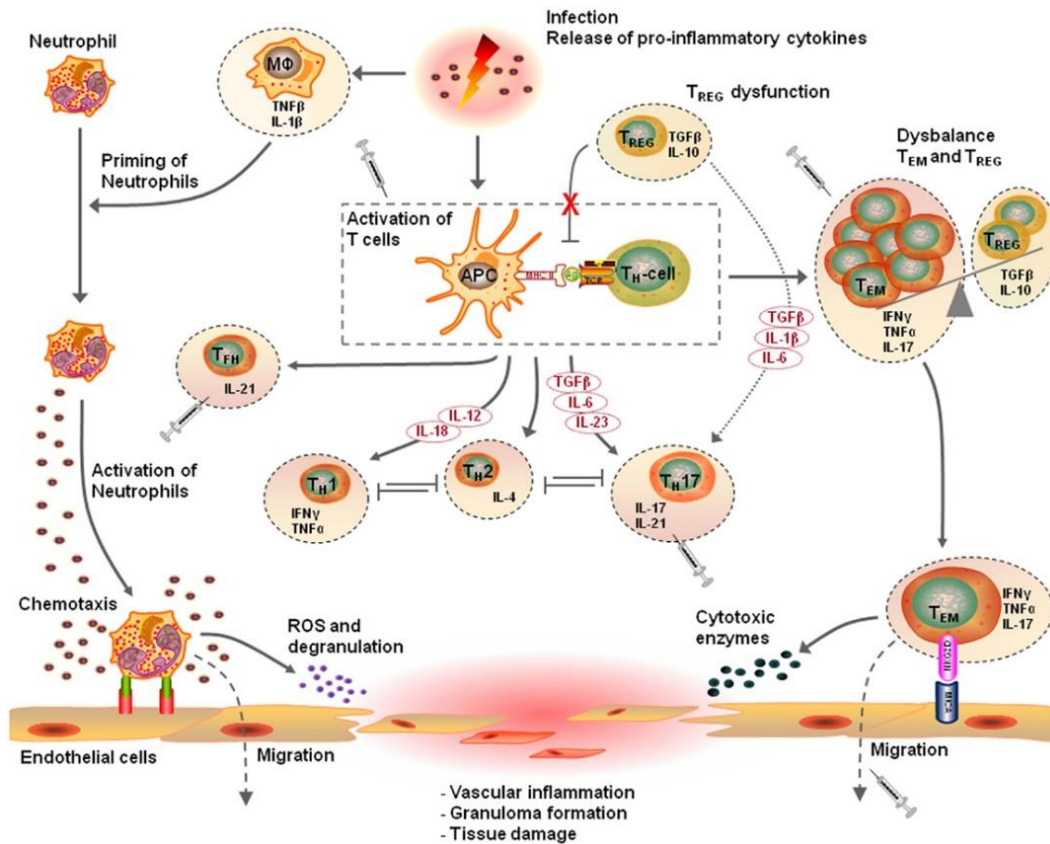
1.2.6. Mecanismos celulares implicados en la patogenia de la vasculitis.

Las alteraciones en el compartimento celular también desempeñan un papel muy relevante en la patogenia del proceso vasculítico, y resulta ser otro de los hitos necesarios para el desarrollo de la enfermedad. En circunstancias normales, cuando se ha producido un estímulo infeccioso, las células dendríticas sintetizan el factor de crecimiento β (TGF β) y la IL-6, que inducen la diferenciación de células T vírgenes a linfocitos T helper 17 (TH17) (71), productoras de la IL-17. Esta IL-17 favorece la liberación por parte de los macrófagos de citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-1 β (72), responsables finales de la señalización y activación de los neutrófilos. Sin embargo

en los pacientes con vasculitis se ha documentado una alteración de la homeostasis de las células T y consecuentemente del proceso de señalización de los neutrófilos. Existen en estos pacientes anomalías funcionales y numéricas de los linfocitos T reguladores (Treg), los cuales suprimen la proliferación de las células T autorreactivas, que se han asociado con el desarrollo de VAA (73). En los pacientes con VAA, una proporción de células Treg se diferencian a células TH17, lo cual resulta en una mayor producción de IL-17 (72). Además, parece existir una alteración en el balance en la respuesta linfocitaria Th1/Th2 en los pacientes con VAA (74).

Los linfocitos T-helper CD4 + se pueden clasificar en dos subconjuntos distintos: tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) en base al perfil de citoquinas y la respuesta efectora inmune que generan. En general, las células Th1 producen de forma característica el interferón gamma (IFN- γ) y participan en reacciones inflamatorias mediadas por células, mientras que las células Th2, promueven la activación de macrófagos mediante la producción de interleucina (IL)-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (75). Parece que hay una respuesta de tipo Th1 aberrante que puede jugar un papel relevante durante el inicio de la VAA en pacientes con GPA con afectación localizada, mientras que se ha documentado una aparición predominante de células Th2 en lesiones granulomatosas del tracto respiratorio superior y en circulación periférica en pacientes con VAA y afectación sistémica (76,77). Todos estos hallazgos orientan a que existen alteraciones específicas en la homeostasis de las células T en los sujetos con VAA que podrían estar contribuyendo de alguna manera al daño vasculítico.

Figura 6. Mecanismos fisiopatológicos en el compartimento celular (linfocitos T) implicado en la generación del daño vasculítico (78).



1.2.7. Participación del sistema del complemento en la patogenia.

En los últimos años algunos estudios han reconocido el papel clave del sistema del complemento, a través de su vía alternativa, como otro de los hitos necesarios para en la daño vasculítico (79). Como se ha comentado anteriormente, la administración de

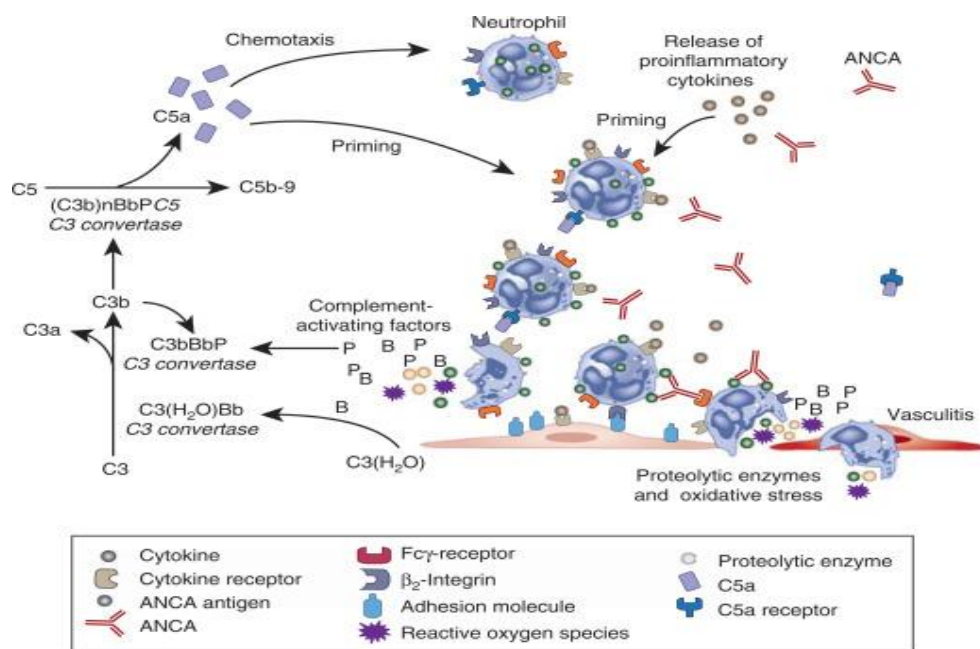
anticuerpos anti-MPO en ratones es capaz de inducir la formación de una glomerulonefritis crescética (57). Sin embargo, en ratones deficitarios de componentes cruciales de la vía alternativa del complemento, como el C5 o factor B, no se desarrolla la glomerulonefritis tras la transferencia del anti-MPO, hecho que sin embargo ocurre en ratones deficitarios de componentes de la vía clásica o de las leptinas (C4) (80).

Los neutrófilos estarían involucrados mediante la liberación de proteasas que podrían activar preferentemente la vía alternativa del complemento, con la consecuente mayor formación de convertasas de C3 y C5. Los neutrófilos en el proceso de degranulación liberan properdina y, cuando están activados, sobreexpresan dicha properdina en su superficie (81). Por lo tanto, la properdina podría dar lugar a una amplificación de la activación del complemento y consecuentemente acelerar la activación de los neutrófilos (82). Por otra parte, el C5a a través de su receptor específico (C5aR) también actúa como un activador de los neutrófilos, y se ha demostrado que las células mieloides deficitarias del C5aR se encuentran protegidas del desarrollo de la vasculitis (83). El bloqueo de la vía alternativa del complemento en ratones, en concreto el bloqueo del C5aR, ha demostrado inhibir la aparición de la glomerulonefritis (84). De hecho, dicho bloqueo de la vía alternativa del complemento constituye ya una diana terapéutica prometedora que se está estudiando en diferentes ensayos clínicos (85,86).

Por otra parte, la presencia de niveles más bajos, aunque dentro del rango de normalidad, de C3 al diagnóstico de la enfermedad vasculítica, se han asociado con un peor pronóstico renal en varios estudios (87–89). A nivel histológico, un estudio realizado por nuestro grupo observó que el depósito de factores derivados de la vía alternativa del complemento se asoció con mayor severidad del daño y un peor pronóstico renal (90). Los

estudios histológicos mostraron que la mitad de las biopsias de pacientes con VAA presentaban depósito de C3d y de C4d a nivel glomerular, a pesar de que el daño de las VAA era clásicamente considerado como “pauci-inmune” cuando se estudiaban las técnicas habituales de inmunofluorescencia directa. Si bien el depósito del C4d (vía clásica-vía de las leptinas) no demostró tener ninguna asociación clínica ni pronóstica, la presencia de C3d (vía alternativa) se comportó como un factor pronóstico independiente para la supervivencia renal. Todos estos hallazgos apoyan la importancia que desempeña la activación de la vía alternativa del complemento en la enfermedad vasculítica. De hecho, en estudios en los que se han analizado los factores del complemento en suero de pacientes con VAA, se ha observado que existen concentraciones elevadas de factores de la vía alternativa del complemento al debut de la enfermedad, en concreto de C5a y C3a, observándose como retornan a la normalidad tras alcanzar la remisión, y postulándose como posibles biomarcadores de actividad vasculítica (91,92).

Figura 7. Implicación del sistema del complemento en la patogenia del proceso vasculítico (79).



1.2.8. Papel de los macrófagos en el proceso vasculítico.

En los últimos años se está estudiando con gran interés el papel de los macrófagos en la patogenia de la vasculitis. Los macrófagos son células que tienen una participación crucial en la homeostasis, inflamación y procesos de autoinmunidad. Se caracterizan por la heterogeneidad y plasticidad, pudiendo adoptar una gran variedad de fenotipos en diferentes circunstancias, entre los que se incluyen los macrófagos M1 y M2, los cuales constituyen fenotipos opuestos. Varios estudios han descrito cambios significativos en el

fenotipo y la actividad de los monocitos circulantes en pacientes con VAA (93–95). Los pacientes con GPA muestran un aumento de los niveles de neopterinina (un marcador soluble de respuesta de los macrófagos al interferón γ), y se ha demostrado una correlación positiva de los niveles de neopterinina e IL-6 con la actividad de la enfermedad (96). Los monocitos circulantes en pacientes con GPA también muestran una mayor expresión de CD63, un marcador de desgranulación (17). Además, se han observado niveles más altos de integrinas (CD29, CD18, CD11a, CD11b) que son esenciales para la interacción leucocito-endotelio y la diapédesis de los leucocitos, lo que sugiere que los monocitos en la VAA podrían causar daño tisular mediante una interacción más intensa con las células endoteliales activadas (97). Algunos marcadores de activación de monocitos solubles, como MCP1 α y VEGF, que reflejan actividad quimiotáctica e inflamatoria, muestran niveles significativamente más altos en pacientes con enfermedad vasculítica activa (98).

A nivel histológico, la presencia de monocitos en el área túbulo-intersticial en las biopsias de pacientes con vasculitis es muy frecuente, especialmente en la proximidad de los glomérulos (96). De hecho, la expresión de la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), una quimiocina importante para el reclutamiento de monocitos, se encuentra aumentada en las biopsias renales de pacientes con VAA, y sus niveles en la orina se ha correlacionado con la actividad de la enfermedad glomerular (99). La infiltración temprana de estas células en el tejido renal sugiere que pueden ser importantes en el inicio del daño renal y que podrían participar en la generación de la necrosis fibrinoide y el desarrollo de proliferación extracapilar (100). Los monocitos/macrófagos CD163⁺ son el tipo de célula infiltrante dominante en las biopsias con glomerulonefritis asociada a ANCA, su presencia se observa tanto en glomérulos aparentemente normales en la microscopía óptica, como en

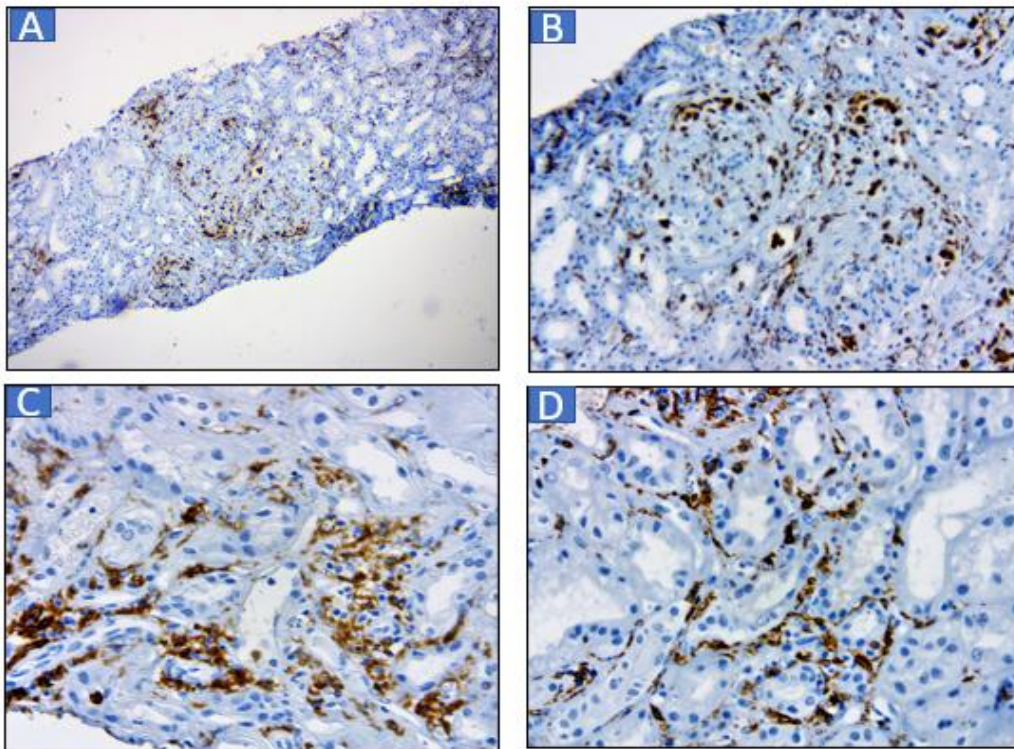
aquellos que ya presentan lesiones establecidas características de la vasculitis (101). En este sentido, nuestro grupo estudió la infiltración de macrófagos CD163 en 23 biopsias renales de pacientes con VAA, con objeto de analizar si existían diferencias en la infiltración de estas células entre los distintos subtipos histológicos (102). Para ello se analizaron 5 biopsias con patrón histológico focal, 7 biopsias con patrón histológico crescéntico, 8 biopsias con patrón mixto y 3 biopsias con patrón esclerótico. El número medio de glomérulos por biopsia estudiado fue de 20.7 ± 9 . La presencia de células que expresaban CD163 se midió en el compartimento glomerular (mediana de 4.8 células/glomérulo, RIC, 0.8-9.7), en el intersticio (mediana 73 células/mm², RIC 20-178), en los capilares peritubulares (mediana 3 células/mm², RIC: 0.5-3) y, por último, en el compartimento tubular (mediana 3.5 células/sección de corte tubular, RIC 0.5-3).

Tabla 4. Grado de infiltración por macrófagos CD163 en los distintos compartimentos renales en las biopsias de 23 pacientes con VAA.

Compartimento	Mediana de macrófagos CD163 (RIC)
Intraglomerular	4.8 cél/glomérulo (0,7-9,7)
Intersticio	73 cél/mm ³ (20-178)
Capilares peritubulares	3 cél/plano de corte (0,5-3)
Intratubular	3.5 cél/sección tubular (0,5-3)

El número de células CD163+ dentro del compartimento glomerular se correlacionó con el número de células CD163+ en el intersticio, en el espacio periglomerular y en los capilares peritubulares. Los pacientes con formas más agresivas de daño renal, aquellos que debutaron con creatinina sérica más elevada, mostraron una mayor presencia de células CD163+ en la región tubulointersticial que los pacientes con función renal menos comprometida al debut de la enfermedad (212 vs 86 células/mm², $p=0.0006$). También observamos una correlación positiva entre la puntuación de score BVAS al diagnóstico y el número de células CD163+ en la región tubulointersticial. ($r; 0,5$; $p=0.01$).

Figura 8. Infiltración por macrófagos en biopsias renales de pacientes con vasculitis asociada a ANCA. Técnica inmunohistoquímica para CD163. A y B: Infiltración de células CD163 en el compartimento glomerular. C: Infiltración de células CD163 a nivel túbulo-intersticial y D: Infiltración de células CD163 en los capilares peritubulares.



Analizando las diferencias entre las clases histológicas, observamos que las biopsias de los enfermos clasificados como subtipos histológicos focal y crescéntico mostraban un mayor grado de infiltración por macrófagos CD163 en comparación con las biopsias de pacientes con los subtipos histológicos mixto o esclerótico ($p=0.02$) (102). Estos hallazgos confirman que las lesiones vasculíticas más precoces se acompañan de una mayor intensidad en la infiltración por macrófagos CD163+ en el tejido renal. Los

resultados del estudio, además, sugieren una probable relación evolutiva entre los subtipos histológicos en el transcurso del proceso vasculítico, de tal forma que el subtipo focal correspondería a una fase inicial del daño renal, evolucionando posteriormente, en ausencia de tratamiento específico, a una forma crescéntica, posteriormente mixta, para finalmente desembocar en el subtipo esclerótico.

Figura 9. Diferencias en el número medio de macrófagos CD163 en el intersticio entre los subtipos histológicos de pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA,

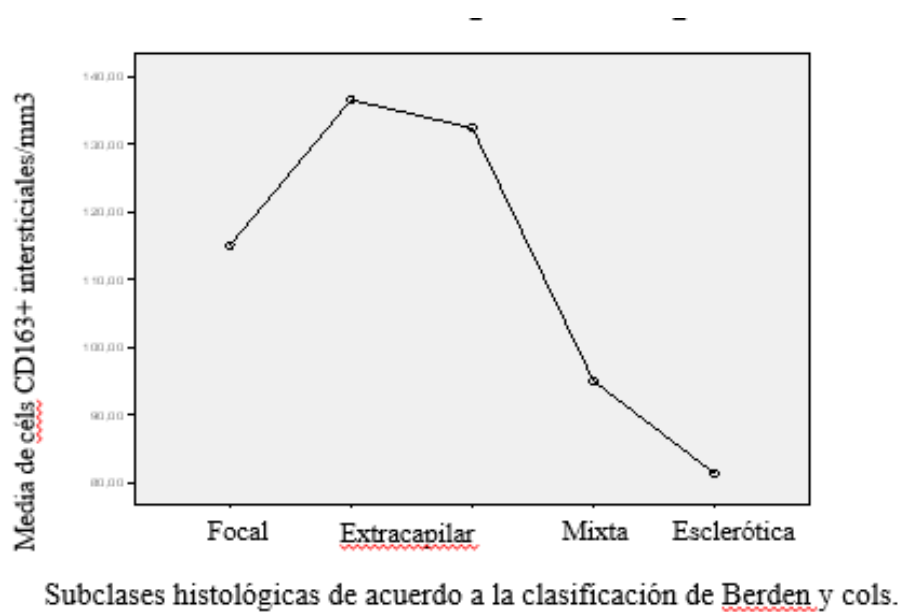
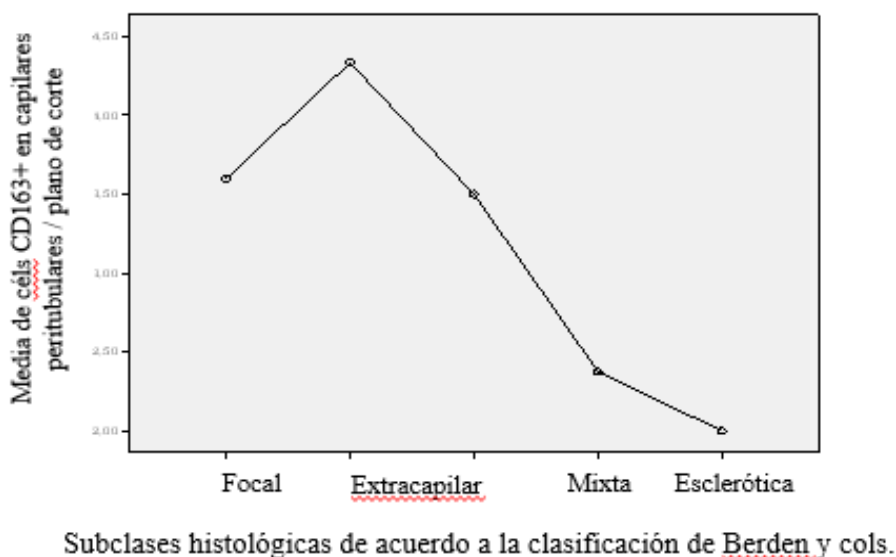


Figura 10. Diferencias en el número medio de macrófagos CD163 en los capilares peritubulares entre los subtipos histológicos de pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.



Esta infiltración precoz de macrófagos Cd163+ en los estadios iniciales del proceso vasculítico renal nos hizo postular que su expresión urinaria, a través de la medición del CD163 soluble urinario (CD163su), podría traducir igualmente actividad vasculítica y comportarse como un biomarcador precoz de actividad y, por tanto, también de recaída en estos enfermos. Esta hipótesis fue confirmada en modelos animales realizados por el grupo de O'Reilly y colaboradores dónde analizaron las concentraciones del CD163su en ratones a los que inducían la vasculitis mediante la inmunización con mieloperoxidasa. Observaron que las concentraciones urinarias de CD163s se incrementaban gradualmente tras la administración de los anticuerpos anti-MPO y el desarrollo consecuente de la glomerulonefritis, de tal forma que el CD163su alcanzaba su

máxima concentración al mes de la inmunización. Las concentraciones posteriormente experimentaban un descenso gradual, alcanzando valores similares a los controles a los tres meses después la inmunización. Curiosamente la afectación histológica máxima se observó muy posteriormente al pico de CD163su, en torno al tercer mes post inmunización, con la aparición de necrosis fibrinoide y proliferación extracapilar características de la vasculitis.

1.2.9. Biomarcadores de actividad en vasculitis asociada a ANCA.

El Instituto Nacional de Salud Americano (NIH) definió biomarcador como alguna característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso biológico patológico o respuesta farmacológica a intervenciones terapéuticas. Esta definición fue posteriormente ampliada para cualquier sustancia, estructura o proceso en el ser humano que se pueda medir y cuyo resultado influye o predice la incidencia o consecuencia de la enfermedad. El uso de biomarcadores en la práctica clínica está ampliamente extendido, especialmente en enfermedades que tienen un curso crónico con periodos de actividad y actividad y remisión. Precisamente la VAA en una patología que se caracteriza por un curso dinámico con una alternancia de fases de actividad y remisión, y en la que una proporción elevada de pacientes (entre el 40-60%) va a presentar un segundo brote de la enfermedad en algún momento durante el seguimiento (42). Por tanto, resulta muy relevante en esta patología el disponer de algún biomarcador que nos permita monitorizar la actividad de la enfermedad y predecir la aparición de una nueva recaída antes que el daño renal secundario sea irreversible.

En los últimos años se han desarrollado numerosas líneas de investigación dirigidas a la identificación de biomarcadores de actividad en vasculitis, pero no se ha logrado encontrar ninguno suficientemente sensible y específico que permita guiar la práctica clínica. Los marcadores inflamatorios clásicos, como la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR), que son comúnmente medidos en los pacientes con vasculitis durante el curso de la enfermedad, son inespecíficos y, por lo tanto, incapaces de diferenciar otros procesos inflamatorios concomitantes, como puede ser una infección, de la propia enfermedad vasculítica (103). Las alteraciones urinarias, principalmente la microhematuria, al igual que ocurre en el resto de glomerulonefritis proliferativas, indica de forma fiable la presencia de actividad vasculítica a nivel renal, no obstante, su presencia es consecuencia de lesiones histológicas proliferativas y por tanto su detección traduce daño renal ya establecido disminuyendo la capacidad regeneradora del tratamiento inmunosupresor (104). Por tanto, la microhematuria supone más una consecuencia del daño, y no nos permite detectar las fases iniciales de activación inmunológica donde la lesión histológica todavía no se ha consolidado. La aparición o empeoramiento de la proteinuria constituye un parámetro menos específico que la microhematuria, ya que muchos enfermos, tras el primer brote de la enfermedad, quedan con algún grado de insuficiencia renal y dicha proteinuria en muchas ocasiones traduce la cronicidad de las lesiones más que enfermedad activa.

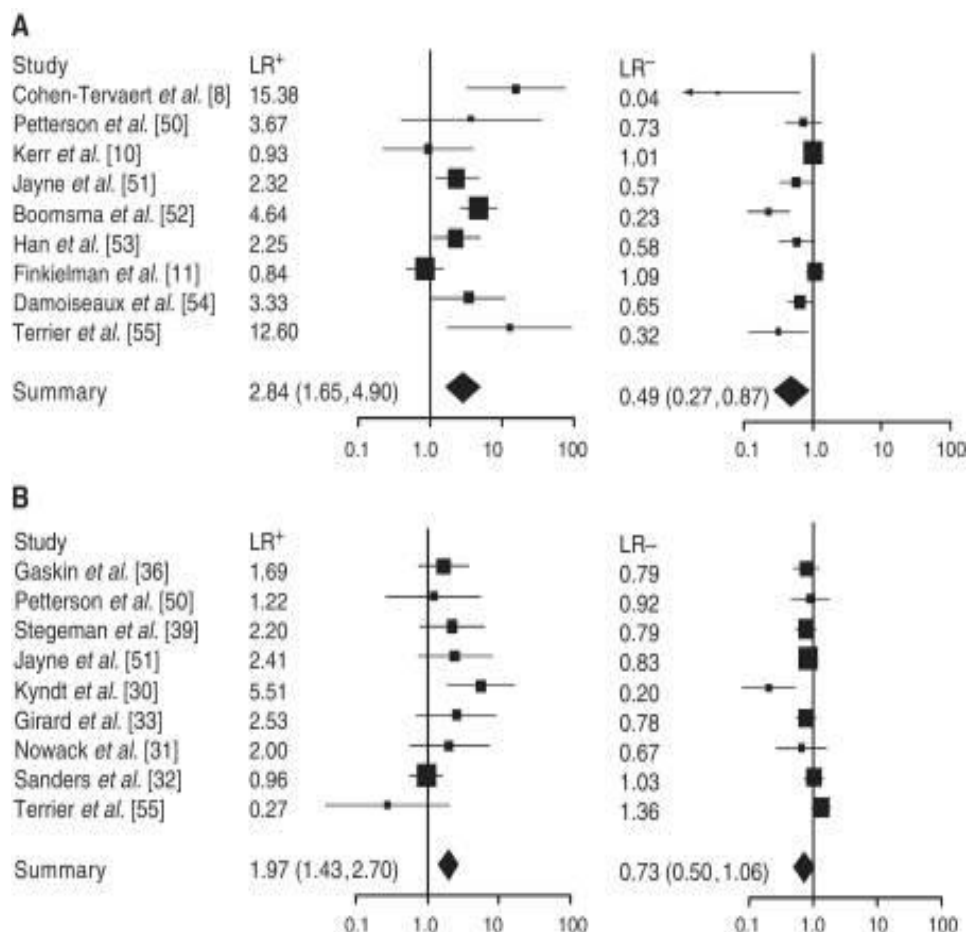
Los ANCA son útiles para el diagnóstico de la VAA, cuando se combinan con datos clínicos y patológicos compatibles (105). Sin embargo, son menos útiles cuando se evalúa la actividad de la enfermedad en pacientes con un diagnóstico de vasculitis ya

establecido o como predictores de recaídas (106). Además, hay que tener en cuenta que hasta un 15% las vasculitis con afectación renal son ANCA negativo.

La mayor parte de los pacientes con VAA presentan una disminución o incluso negativización de los títulos tras alcanzar la remisión con el tratamiento inmunosupresor (107). Sin embargo, una proporción significativa de pacientes sigue manteniendo títulos positivos de ANCA a pesar de experimentar remisión clínica (103). Por lo tanto, el uso de ANCA como marcador de remisión de la enfermedad o inactividad inmunológica tras el tratamiento inmunosupresor de inducción es limitado. En las últimas décadas numerosos estudios han tratado de analizar el papel de los ANCA como marcadores de recaída de esta enfermedad. En 2006, un metanálisis de 22 estudios que estudiaron el valor de los títulos de ANCA para predecir recaída no pudo obtener conclusiones firmes debido a la considerable heterogeneidad metodológica en los estudios: tiempo de seguimiento variable, divergencias en las definiciones de remisión y recaída, y empleo de diferentes técnicas para la medición de los ANCA (107). En otro metaanálisis posterior, Tomasson y cols. evaluaron nueve estudios y encontraron que el incremento en los títulos de los ANCA permitía predecir la aparición de recaída con una sensibilidad y especificidad bajas, 0,56 (95% IC 0,33-0,79) y 0,82 (95% IC 0,75-0,90), respectivamente. Esta sensibilidad y especificidad eran menores, 0,38 (95% IC 0,23-0,52) y 0,78 (95% IC 0,71-0,85), respectivamente, para predecir recaída en los pacientes que mantenían títulos de ANCA persistentemente positivos durante el seguimiento (108). Igualmente, Kemna y cols. observaron que las mediciones longitudinales de ANCA eran parcialmente útiles, pues observaron que el aumento en los títulos de ANCA se correlacionaba con la aparición de recaídas, especialmente en los pacientes que tenían vasculitis con afectación limitada al

riñón (HR: 11,09, 95% IC, 5,01-24,55), siendo esta asociación menos evidente en los pacientes con formas sistémicas de vasculitis (HR, 2,79; 95% IC 1,30-5,98) (109). Sin embargo, a pesar de la mayor probabilidad de presentar recaída con ANCA positivo, menos de la mitad de los pacientes con un título de ANCA creciente en este último estudio experimentaron una recaída durante el seguimiento. En resumen, sabemos que la presencia de ANCA persistentemente positivo o un título de ANCA creciente constituyen factores de riesgo para el desarrollo de una recaída posterior, pero no todos los enfermos con dicha condición recaen, por lo tanto, los cambios en los títulos de ANCA durante el seguimiento resultan un parámetro insuficiente para guiar decisiones en relación a cambios en el tratamiento.

Figura 11. Metanálisis de estudios que analizan la probabilidad pretest positiva y negativa de la elevación del título de ANCA (A) o persistencia de ANCA positivos (B) para predecir la aparición de recaídas en pacientes con VAA (108).



Otros biomarcadores séricos que se han estudiado son los autoanticuerpos contra LAMP-2, el plasminógeno y la calprotectina. En algunos estudios los anti-LAMP-2 se han documentado elevados en el 80 a 90% de los pacientes con AAV, observándose su negativización tras el inicio del tratamiento inmunosupresor (110). Sin embargo, otras series han reportado una menor frecuencia de anti-LAMP-2, en sólo el 21% de los

pacientes con VAA en comparación con el 16% en los controles (111). Además, los ensayos para su detección aún no han sido estandarizados, por lo que de momento su utilidad como biomarcador de actividad es cuestionable (112).

Por otra parte, el plasminógeno es una proteína clave en el sistema de fibrinólisis cuya actividad también se ha vinculado con la actividad vasculítica. En un estudio se encontraron anticuerpos dirigidos contra ella en el 26% de los pacientes con VAA, en comparación con el 2% de los controles sanos (113). La presencia de estos anticuerpos se correlacionó con la prolongación in vitro de la fibrinólisis y con la gravedad de las lesiones glomerulares (114). Un estudio realizado en población asiática con 104 pacientes con VAA observó igualmente anticuerpos anti-plasminógeno en el 18% de los pacientes con enfermedad activa frente a solo el 2% en los que estaban en remisión. Sin embargo, encontraron correlaciones débiles entre el título de anticuerpos y la función renal, parámetros de actividad histológica o parámetros inflamatorios con la velocidad de sedimentación globular (VSG) (114).

La calprotectina es otro biomarcador de actividad de monocitos y neutrófilos cuyos niveles se han documentado elevados en patología inflamatorias (115). Pepper y cols documentaron niveles séricos elevados de calprotectina en una cohorte de pacientes con VAA activa y observaron que las concentraciones decrecían tras el tratamiento inmunosupresor, pero sin llegar a normalizarse, sugiriendo, por tanto, la posible persistencia de una inflamación subclínica en estos pacientes (116). La calprotectina permitía adicionalmente identificar un subgrupo de enfermos con serotipo ANCA-PR3 en los que se observaba una elevación de los niveles séricos al segundo y sexto mes y que presentaban un riesgo incrementado de desarrollar una recaída posterior (117). Sin

embargo, los cambios en los niveles séricos de calprotectina tras alcanzar remisión presentan una gran variabilidad en los estudios y tiene la limitación de ser un biomarcador no específico de afectación renal, pudiéndose elevar en otros procesos inflamatorios sistémicos concomitantes.

En los últimos años se ha mostrado un interés especial en el estudio de posibles biomarcadores urinarios puesto que dichos marcadores constituyen un método fácil de obtención y no invasivo para monitorizar la actividad vasculítica (118). En base a la observación de que la infiltración por macrófagos desempeña un papel importante en la patogénesis de la glomerulonefritis secundaria a VAA, Tam y cols investigaron el papel de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) como posible biomarcador urinario en la vasculitis renal (99). Observaron niveles urinarios más altos de MCP-1 en pacientes con vasculitis renal activa en comparación con controles sanos, pacientes con vasculitis inactiva y pacientes con vasculitis activa sin afectación renal, sin que se observaran diferencias en las concentraciones de MCP-1 sérica entre estos grupos. Documentaron también que la reducción de los niveles de MCP-1 en orina tras el tratamiento precedía a la mejoría de la función renal con un tiempo medio de dos semanas, y en un paciente, el aumento de los niveles urinarios de MCP-1 se asoció con progresión a insuficiencia renal terminal a pesar del tratamiento. Los autores concluyeron que la MCP-1 urinaria podría constituir un biomarcador no invasivo útil en la evaluación de la vasculitis renal y para monitorizar la respuesta al tratamiento.

Más recientemente, O'Reilly y cols observaron que el CD163 soluble urinario (CD163su) podría constituir un biomarcador para monitorizar la actividad vasculítica. El CD163s, como hemos visto previamente, es un marcador de actividad macrocítica. El

grupo de O'Reilly observó que la expresión de CD163 en los glomérulos microdisccionados de pacientes con VAA activa, estaba aumentada tanto en los glomérulos como a nivel intersticial, en comparación con muestras de paciente con. nefritis lúpica, nefropatía diabética, Glomerulonefritis IgA o síndrome nefrótico. Paralelamente en modelos animales, observaron una excelente correlación entre la expresión histológica de CD163 y la eliminación urinaria de esta proteinuria, por lo que decidieron determinar esta proteína en orina. Observaron que los pacientes con vasculitiis ANCA positivo y afectación renal, tenían niveles urinarios de CD163s normalizado por creatinina sérica más elevados que pacientes diagnosticados de vasculitis ANCA positivo sin afectación renal, pacientes con vasculitis ANCA con afectación renal, pero en fase de inactividad, pacientes sépticos o con fracaso renal agudo de una etiología diferente. (119). Estos resultados se confirmaron utilizando cohortes de validación interna y externa. En este estudio los autores sugieren que un punto de corte en 0,3 ng/mmol para las concentraciones de CD163su normalizadas por creatinina urinaria, detectaría vasculitis renal activa con una sensibilidad del 83%, una especificidad del 96%, y una probabilidad positiva pretest de 20,8. En la discusión los autores hipotetizan que este biomarcador urinario podría ser útil para monitorizar la actividad de la enfermedad vasculítica, y por tanto para predecir recaídas, pero el diseño transversal de su estudio no les permitió analizar este punto. Una ventaja adicional que ofrece este biomarcador, es el hecho de que el CD163s es una proteína altamente estable en la orina y que permanece estable durante al menos una semana a temperatura ambiente, lo que la diferencia de la MCP-1 urinaria, que se degrada rápidamente (93).

Posteriormente, Moran y cols analizaron la capacidad del CD163su y la MCP-1 conjuntamente para diagnosticar actividad vasculítica en una cohorte de pacientes con VAA activa con afectación renal, en comparación con pacientes con VAA en remisión (con y sin afectación renal) y pacientes con VAA activa con afectación exclusivamente extrarrenal. A diferencia del estudio anterior, ellos establecieron una concentración de CD163su normalizado por creatinina en orina de 72,9 ng/mmol como punto de corte, con el que obtuvieron una sensibilidad de 79,5 % y una especificidad del 67,3% para la detección de actividad vasculítica renal. En el caso de la MCP-1 urinaria normalizada por creatinina establecieron un punto de corte de 10 pg/mmol. En su estudio proponen un árbol diagnóstico en el que la combinación de los niveles de ambos biomarcadores, CD163su y MCP-1, asociado a los cambios en la proteinuria, permitiría diagnosticar actividad vasculítica renal con una especificidad del 97,9% y un valor positivo pretest de 19,2.

Sin embargo, estos estudios presentan una clara limitación: han analizado cohortes diferentes para cada condición clínica (pacientes con VAA activa, pacientes con VAA en remisión y pacientes con afectación vasculítica extrarrenal), siendo las poblaciones incluidas en los estudios muy heterogéneas entre ellas. Este hecho probablemente justifica las diferencias significativas observadas en los puntos de las concentraciones de CD163su para diagnosticar actividad vasculítica. Lo que resulta indudable es que estos trabajos posicionan el CD163su como un posible biomarcador sensible y específico de actividad vasculítica renal. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que validen dichos resultados, y sobre todo que analicen el papel del CD163su como biomarcador de recaída en el seguimiento longitudinal de estos enfermos. La obtención de un marcador fiable y preciso de recaída renal sería de gran utilidad en la práctica clínica, ya que permitiría

reducir la realización de procedimientos invasivos como la biopsia renal. Además, serviría de ayuda guiar el tratamiento de estos enfermos, permitiendo la anticipación del tratamiento antes de que el daño renal sea severo o irreversible, pero también evitando la administración de inmunosupresión innecesaria en los casos dudosos que finalmente no se corresponden con recaídas.

En resumen, en el daño renal inducido por la VAA resulta clave la intervención de los macrófagos como celular efectoras en el proceso vasculítico. En estudios previos hemos demostrado una estrecha asociación entre la intensidad del infiltrado por macrófagos CD163 en el tejido renal y la severidad y precocidad del daño renal. Algunos estudios han observado que la concentración urinaria de CD163s está aumentada en los pacientes con VAA con afectación renal cuando se compara a pacientes con VAA sin afectación renal, pacientes con VAA en remisión o pacientes con otras glomerulonefritis, y en modelos animales se ha observado un incremento sustancial en las concentraciones de CD163su tras inducir la vasculitis renal mediante la inmunización con anticuerpos anti-MPO. Por tanto, la evidencia actual apunta a que los niveles urinarios de CD163s podrían traducir el grado de actividad inflamatoria en el parénquima renal en pacientes con VAA y comportarse como un marcador específico de la actividad vasculítica renal. El estudio de las variaciones en las concentraciones del CD163s urinario durante el seguimiento de una cohorte de pacientes con vasculitis permitiría analizar su comportamiento como biomarcador de respuesta al tratamiento y actividad vasculítica, así como predictor de recaída renal.

2. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

La vasculitis asociada a ANCA es una enfermedad crónica que cursa con periodos de actividad y remisión y que es causa frecuente de daño renal severo en población adulta. Tras el debut de la enfermedad, hasta un 40-60% de los pacientes presentan una recaída durante el seguimiento, lo que supone un aumento de la morbilidad y mortalidad. En los últimos años numerosos estudios han aportado mayor evidencia a cerca del proceso patogénico que ocurre en la afectación renal de pacientes con vasculitis, implicando a nuevos mecanismos de daño molecular y celular (120). Entre ellos destaca el papel de los macrófagos como células efectoras con un rol primario en el proceso patogénico (94,96,100). Diversos estudios histológicos han mostrado que los macrófagos son el tipo de célula infiltrante predominante en las biopsias de pacientes con vasculitis, sobre todo en sus fases precoces. En este sentido, nuestro grupo demostró que la intensidad del infiltrado de macrófagos CD163 en las biopsias de pacientes con vasculitis se asociaba con mayor severidad de la insuficiencia renal al diagnóstico. Partiendo de la existencia de este infiltrado dominante de macrófagos CD163, en modelos animales de vasculitis renal asociada a ANCA se ha analizado la presencia urinaria del CD163 soluble, demostrando que concentraciones elevadas en orina al mes de la inmunización con ANCA-MPO. Estos hallazgos posicionan al CD163su como un posible biomarcador de actividad vasculítica. Algunos trabajos han demostrado niveles elevados de CD163 en orina en pacientes con VAA activa comparados con pacientes con VAA en remisión y controles sanos. Partiendo de estos resultados, la medición de las concentraciones urinarias de CD163s durante el seguimiento de pacientes con VAA podría ser de utilidad para la monitorización de la

respuesta al tratamiento, la identificación de actividad vasculítica residual y el diagnóstico precoz de recidiva renal de la enfermedad. La obtención de un biomarcador que pueda predecir la aparición de recaídas en estos pacientes sería de gran utilidad ya que permitiría anticipar el tratamiento antes de que el daño renal sea irreversible, pero también evitar la administración de inmunosupresión innecesaria en los casos dudosos que finalmente no se corresponden con brote vasculítico.

3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

En el daño renal inducido por la VAA es fundamental la participación de los macrófagos, sobre todo en sus fases precoces. En estudios previos hemos demostrado una estrecha asociación entre la intensidad del infiltrado por macrófagos CD163 en el tejido renal y la severidad del fallo renal. Otros autores han encontrado que la concentración urinaria de CD163s está aumentada en los pacientes con VAA activa con afectación renal cuando se compara a pacientes con VAA sin afectación renal, pacientes con VAA en remisión o pacientes con otras glomerulonefritis. La evidencia actual apunta a que los niveles urinarios de CD163s podrían traducir el grado de actividad inflamatoria en el parénquima renal en pacientes con VAA. Por lo tanto, los niveles urinarios de CD163s se reducirían-negativizarían cuando el paciente alcanza la remisión y aumentarían en situación de recaída. El estudio de las variaciones en las concentraciones del CD163s urinario durante el seguimiento prospectivo de una cohorte de pacientes con vasculitis permitiría analizar su comportamiento como biomarcador de actividad vasculítica y como predictor de recaída. Dicho análisis proporcionaría un mayor conocimiento acerca del comportamiento de la enfermedad y la respuesta al tratamiento inmunosupresor.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos primarios

- Analizar la capacidad predictiva de la concentración urinaria de CD163s como marcador de recaída renal en el seguimiento de pacientes con VAA.
- Determinar si los niveles de CD163s son marcadores de respuesta al tratamiento y si discriminan entre la fase activa y fase de remisión en pacientes con VAA y afectación renal.
- Estudiar la posible asociación entre la concentración urinaria de CD163s y la actividad vasculítica sistémica.

4.2. Objetivos secundarios

- Estudiar la posible asociación entre las concentraciones urinarias del CD163s y la intensidad del daño renal en el momento del diagnóstico.
- Analizar las diferencias en el comportamiento de los niveles urinarios de CD163s durante el seguimiento en función del esquema inmunosupresor utilizado.
- Estudiar si los niveles de CD163s urinario al diagnóstico, tienen valor pronóstico sobre la supervivencia de los pacientes con vasculitis renal.
- Analizar si los cambios en la concentración urinaria de CD163s se relacionan con las variaciones en los títulos de ANCA durante el seguimiento de los pacientes con vasculitis renal.

5. MATERIAL Y METODOS.

5.1 Pacientes y muestras

En el estudio se incluyeron a 47 pacientes adultos con vasculitis asociada a ANCA con afectación renal, entre los años 2016 y 2018, en alguno de los cuatro centros participantes; el Hospital Virgen De la Salud de Toledo, Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid, Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid y el Hospital Universitario Fundación Alcorcón. Veinticuatro pacientes estaban en situación clínica activa (pacientes incidentes) y veintitrés pacientes estaban en situación de remisión (pacientes prevalentes). Adicionalmente, se incluyeron en el estudio como controles veintitrés sujetos sanos sin patología renal o autoinmune conocida.

El diagnóstico de vasculitis fue confirmado mediante biopsia renal por la presencia de una glomerulonefritis con proliferación extracapilar y necrosis fibrinoide focal y/o vasculitis de pequeño vaso en ausencia de depósitos inmunes glomerulares significativos. Las biopsias fueron evaluadas por los nefropatólogos de cada uno de los centros participantes con experiencia en el diagnóstico de vasculitis renal. En aquellos pacientes que habían sido diagnosticados de previamente de VAA y el brote constituía una recaída, el diagnóstico se asumió con la presencia de un deterioro de novo de la función renal con microhematuria y/o proteinuria y datos inmunológicos (elevación de ANCA) o sistémicos

(síndrome constitucional, fiebre, anemia) sugestivos de un repunte de la actividad vasculítica.

Entre los pacientes incluidos como pacientes prevalentes, “inactivos”, ningún paciente presentaba datos clínicos ni analíticos sugestivos de actividad renal vasculítica en el momento de inclusión en el estudio (hematuria, deterioro de función renal), y tampoco ninguno estaba bajo tratamiento inmunosupresor, ni con tratamiento renal sustitutivo.

En todos los pacientes incidentes se obtuvieron muestras de orina para la determinación del CD163 su coincidiendo con las analíticas rutinarias de consulta realizadas al diagnóstico, al primer y segundo mes, y posteriormente trimestralmente hasta completar dos años de seguimiento tras el debut de la enfermedad. En los pacientes prevalentes con vasculitis en remisión y los controles sanos se obtuvo una única muestra de orina al momento de la inclusión en el estudio. Una vez recogidas las muestras de orina en cada uno de los centros participantes, fueron trasladadas al Biobanco del Hospital Fundación Alcorcón donde se procesaron y almacenaron de acuerdo a un protocolo previamente aprobado en dicho centro. Las determinaciones de CD163 su en estas muestras de orina fueron realizadas de forma centralizada en el laboratorio de Inmunología de la Universidad Complutense de Madrid mediante técnica de enzimo inmunoensayo (ELISA). Todas las determinaciones se realizaron simultáneamente a la finalización del estudio y de forma ciega a las características clínicas de los pacientes. Se recogieron variables clínicas y analíticas de forma prospectiva a partir las historias clínicas de los pacientes incidentes incluidos en el estudio. El seguimiento clínico se realizó hasta la última visita ambulatoria recogida, muerte o desarrollo de enfermedad renal crónica terminal (ERCT), definida como el inicio de diálisis crónica o trasplante renal. En los pacientes controles en remisión se

recogieron variables clínicas, analíticas e histológicas de forma retrospectiva a partir de las historias clínicas. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Fundación Alcorcón y todos los pacientes al inicio del estudio firmaron el consentimiento informado. Los pacientes recibieron tratamiento de acuerdo a los protocolos de cada centro.

.

5.2 Criterios de inclusión:

Pacientes con edad superior a 18 años y con diagnóstico clínico e histológico de vasculitis asociada a ANCA con afectación renal, definida por la presencia de glomerulonefritis necrotizante focal con proliferación extracapilar y/o vasculitis de pequeño vaso, que accedieron mediante consentimiento informado a la participación en el estudio. Se incluyeron todos los pacientes que fueron diagnosticados de novo de vasculitis renal durante el periodo de tiempo de dos años que comprende el estudio, así como aquellos que presentaron una recaída de una vasculitis diagnosticada previamente y que no estuvieran recibiendo tratamiento inmunosupresor al momento del brote.

Como pacientes prevalentes se incluyeron pacientes con edad superior de 18 años, y con diagnóstico previo de VAA con afectación renal que no estuvieran dependientes de diálisis en el momento de inclusión ni recibiendo tratamiento inmunosupresor, y que presentasen estabilidad clínica sin datos de actividad vasculítica en los seis meses previos a la extracción de la muestra.

Como pacientes control se incluyeron pacientes con edad superior a 18 años y sin antecedente de patología renal o autoinmune conocida.

5.3 Criterios de exclusión

Se excluyeron los pacientes vasculitis secundarias a otros procesos glomerulares, infecciosos, neoplásicos o reumatológicos, aquellos con presencia de Anticuerpos anti-membrana basal glomerular positivos y aquellos con ausencia de confirmación histológica al debut de la enfermedad.

5.4 Variables del estudio:

Se recogieron prospectivamente los siguientes datos de los pacientes incluidos en el estudio:

- **Datos demográficos:** edad, sexo.
- **Datos de laboratorio al diagnóstico y en cada visita:** función renal expresada por la concentración de creatinina sérica (mg/dl) y tasa de filtrado glomerular estimado (ml/min/1.73m²: CKD-EPI), proteinuria expresada en cociente proteína/creatinina urinaria en muestra de orina de primera hora de la mañana (g/g), microhematuria expresada en hematíes por campo de gran aumento en sedimento urinario, determinación de ANCAs: por inmunofluorescencia indirecta (pANCA, cANCA) y titulo de los mismos por enzimoimmunoensayo (anti-MPO, anti-PR3) y concentración de proteína C reactiva (mg/dl), .

- **Datos clínicos al diagnóstico:** órganos afectados por la vasculitis, puntuación en el índice BVAS, necesidad de diálisis y duración de la misma, necesidad de plasmaféresis, número de sesiones e indicación de la misma, tipo de tratamiento inmunosupresor de inducción instaurado, dosis y duración del mismo.

- **Datos clínicos de seguimiento:** obtención o no de remisión y fecha de la remisión. desarrollo o no de recaída y fecha de la misma, tipo de tratamiento inmunosupresor de mantenimiento, dosis y duración del mismo, situación del enfermo al final del seguimiento, exitus si procede y fecha y causa del mismo.

- **Determinación de niveles urinarios de CD163s:** Medición de niveles urinarios de CD163s al inicio del estudio (toma 0) y en los meses 1, 2, 3, 6, 9,12,15,18, 21 y 24 tras el diagnóstico de la vasculitis renal.

- **Variables histológicas:**
 - Número de glomérulos en biopsia renal.
 - Porcentaje de glomérulos esclerosados.
 - Porcentaje de glomérulos normales.
 - Porcentaje de proliferación extracapilar.
 - Presencia o no de necrosis fibrinoide.
 - Presencia o no de vasculitis de arterias.
 - Porcentaje de atrofia tubular.
 - Porcentaje de fibrosis intersticial.

- Gradación semicuantitativa (de 0 a 4) de la captación mediante estudio de inmunofluorescencia de IgG, IgA, IgM, C3c y C1q.
- Clase histológica en la biopsia renal según clasificación de Berden y cols (esclerótica, focal, crescéntica o con semilunas y mixta) (17).

5.5. Definiciones del estudio:

5.5.1. Definiciones clínicas:

Las definiciones utilizadas para los diferentes desenlaces clínicamente relevantes, son las recomendadas por el grupo EULAR/EUVAS y la Sociedad internacional de Nefrología:

Enfermedad activa: La actividad de las VAA representa signos o síntomas atribuibles a la enfermedad activa en cualquier sistema orgánico. Las manifestaciones renales de una glomerulonefritis activa son una disminución progresiva de la función renal, con presencia de actividad en el sedimento urinario con micro hematuria y proteinuria en grado variable.

Respuesta al tratamiento: mejoría o estabilidad de la sintomatología de la vasculitis en los seis primeros meses tras el inicio del tratamiento inmunosupresor, con un descenso del BVAS superior al 50%, y sin aparición de nuevas manifestaciones de la enfermedad,

Remisión de la enfermedad: La remisión se define por la ausencia de manifestaciones de vasculitis y de actividad de la glomerulonefritis. Implica alcanzar un puntaje del score de actividad vasculítica (BVAS) de 0. Para la glomerulonefritis, significa la ausencia de hematuria microscópica y estabilidad o mejoría de la función renal.

Recaída o brote: Se define como la ocurrencia de una actividad incrementada de la enfermedad después de un período de remisión. Puede manifestarse como un empeoramiento de una actividad de la enfermedad previa o como la recurrencia o desarrollo de una glomerulonefritis activa, o nuevos signos o síntomas de vasculitis en cualquier sistema orgánico. Para la glomerulonefritis implica la aparición de nuevo o empeoramiento de la microhematuria y/o deterioro de la función renal no explicable por otra causa.

Recaída menor: empeoramiento de una actividad de la enfermedad previa sin compromiso orgánico ni vital.

Recaída mayor: empeoramiento de una actividad de la enfermedad previa que implica compromiso orgánico o vital.

Enfermedad refractaria o resistente: Se define como la persistencia o la aparición de manifestaciones sistémicas y/o renales de vasculitis, mientras se está recibiendo tratamiento inmunosupresor de intensidad equivalente a la terapia inmunosupresora de inducción. Se trata de una enfermedad progresiva que no responde a la terapia inmunosupresora

convencional. Las manifestaciones renales de resistencia incluyen la persistencia de hematuria el sedimento de orina asociado a un deterioro progresivo de la función renal.

5.5.2. Definiciones histológicas:

Glomérulo normal: Glomérulo con arquitectura conservada y ausencia de lesiones proliferativas, escleróticas o vasculíticas.

Esclerosis: obliteración de la luz capilar por un incremento de la matriz extracelular con o sin hialinosis o células espumosas.

Glomérulo esclerosado: Presencia de cambios escleróticos en >80% del ovillo glomerular.

Proliferación extracapilar: Proliferación celular que ocupa el espacio de Bowman, total o parcialmente, compuesta de elementos celulares en los que predominan las células epiteliales parietales, junto con podocitos, macrófagos, fibroblastos y polimorfonucleares.

Semiluna: Proliferación de células epiteliales parietales que conforman al menos dos hileras celulares.

Celular: semiluna constituida en >50% por células.

Fibrocelular: semiluna que está constituida por menos de un 50% de células y menos de un 90% de matriz extracelular.

Fibrosa: semiluna constituida en >90% por matriz extracelular y fibroblastos.

Necrosis fibrinoide: lesión caracterizada por la fragmentación de los núcleos celulares y/o disrupción de las membranas basales, acompañado de material rico en fibrina que se tiñe intensamente con la hematoxilina-eosina y tinción de PAS.

Pauci-immune: Estudio de inmunofluorescencia directa caracterizado por una intensidad de captación glomerular para c3, IgG, IgM e IgA inferior a 2+ en una escala de 0 a 4.

Infiltrado intersticial: incremento de células inflamatorias en el intersticio cortical.

Fibrosis intersticial: incremento de la matriz extracelular que separa los túbulos renales en el área cortical. El grado de fibrosis intersticial se estableció de acuerdo a los criterios estandarizados para otras patologías renal tales como la nefropatía lúpica y la valoración de fibrosis intersticial del trasplante renal(121,122). Según estos criterios se distinguieron los siguientes grados de fibrosis:

Ausencia: menos del 10% del espacio intersticial cortical afectado.

Leve: afecta menos del 25% del espacio intersticial cortical.

Moderada: afecta entre el 25% y el 50 del espacio intersticial cortical.

Severa: afecta más del 50% del espacio intersticial cortical.

Atrofia tubular: engrosamiento irregular de la membrana basal tubular con disminución del diámetro de los túbulos o dilatación de la luz y aplanamiento del epitelio tubular. El grado de atrofia tubular se estableció de acuerdo a los criterios estandarizados para otras patologías renal tales como la nefropatía lúpica y la valoración de atrofia tubular del trasplante renal (121,122). Según estos criterios se distinguieron los siguientes grados de atrofia tubular:

Ausencia: menos del 10% del compartimento túbulo-intersticial afecto.

Leve: afecta menos del 25% del compartimento túbulo-intersticial cortical.

Moderada: afecta entre el 25% y el 50% del espacio túbulo-intersticial cortical.

Severa: afecta más del 50% del compartimento túbulo-intersticial cortical.

Subtipos histológicos: basados en la clasificación de las glomerulonefritis asociadas a ANCA propuesta por Berden et al (46):

Clase focal: como aquella que presente $\geq 50\%$ de los glomérulos normales.

Clase proliferativa extracapilar o con semilunas: si $\geq 50\%$ de los glomérulos presentan semilunas celulares.

Clase mixta: si $< 50\%$ de los glomérulos son normales, $< 50\%$ de los glomérulos presentan semilunas celulares y $< 50\%$ de los glomérulos están globalmente esclerosados.

Clase esclerótica: si $\geq 50\%$ de los glomérulos están globalmente esclerosados.

5.6. Análisis del CD163s urinario.

La orina obtenida de los pacientes fue recogida en botes estériles, alicuotada y congelada a -80°C en cada centro participante. Posteriormente las muestras fueron trasladadas en hielo seco al Biobanco del Hospital Fundación Alcorcón donde permanecieron almacenadas hasta la realización de los estudios. Las determinaciones de sCD163 en las muestras de orina de los pacientes con vasculitis renal fueron realizados en el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Complutense mediante técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) (R&D Systems, Human sCD163 DuoSet, DY1607). El ensayo del CD163 urinario se realizará de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. Los valores obtenidos se midieron en nanogramos por mililitro (ng/ml) y fueron normalizados con las concentraciones urinarias de creatinina (mmol/ml) que fueron previamente determinadas por la técnica de Jaffe (Caymanchem, Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit, 500701).

5.7. Análisis estadístico

En el análisis descriptivo las variables cuantitativas fueron expresadas como media ($\pm$ desviación estándar) o mediana y rango intercuartil. Las variables categóricas se presentaron en números absolutos y porcentajes absolutos o relativos. Para el análisis univariante, los datos cualitativos fueron analizados con el test Chi cuadrado. Si en al menos un 20% de las casillas, los casos esperados fueron inferiores a 5 se empleó la prueba exacta de Fischer. Los datos cuantitativos fueron comparados con el test de Student para

comparar dos medias. Si las categorías a comparar fueron mayores de 2, se empleó el test de la varianza (ANOVA). Para la aplicación de esta última prueba previamente se estudió la normalidad de las variables con los test antes descritos y la homogeneidad de varianza con el test de Levene (se consideraron homogéneas si $p > 0.005$). Cuando la comparación se realizó entre medianas, el test empleado fue el Kruskal-Wallis. Si las variables no se distribuían de forma normal, se utilizaron métodos no paramétricos. La población de estudio fue dividida en terciles de acuerdo a las concentraciones basales de CD163su. El test de la varianza y el test de Chi-cuadrado fueron empleados para comparar las variables entre los terciles. Las correlaciones entre las concentraciones urinarias de CD163s y el score BVAS fueron analizadas mediante la correlación de Spearman en un análisis estratificado por tiempo. Para estudiar la capacidad del CD163su para discriminar recaída renal se analizaron los cambios relativos en la concentraciones de dicho marcador con respecto a los valores previos y se generaron curvas ROC, analizándose el área bajo la curva (AUC). Los puntos de corte óptimos en las concentraciones CD163su para discriminar recaída se obtuvieron optimizando el índice de Youden (sensibilidad + especificidad - 1), los índices de validez (sensibilidad + especificidad) y los índices de utilidad (valor predictivo positivo y negativo). Se empleó un modelo de efectos mixtos de medidas repetidas para el estudio de los datos longitudinales. Se empleó el test de Bonferroni para las comparaciones múltiples pareadas. Todas las hipótesis se consideraron significativas para un valor de $p \leq 0.05$. Se utilizó el software Stata, version 14.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA) para los cálculos estadísticos.

6. RESULTADOS

6.1. Población incluida en el estudio.

En el estudio se incluyeron veinticuatro pacientes incidentes diagnosticados de vasculitis renal asociada a ANCA mediante biopsia renal. En dieciocho pacientes (75%) el brote de vasculitis renal constituía la primera manifestación de la enfermedad, mientras que en seis pacientes (25%), el brote suponía una recaída de una VAA previamente diagnosticada. Ninguno de los pacientes con diagnóstico previo de VAA estaban recibiendo tratamiento inmunosupresor alguno cuando presentaron el brote. En estos últimos no se realizó biopsia renal confirmatoria y el diagnóstico del brote se asumió por la presencia de insuficiencia renal y microhematuria asociado a elevación del título de ANCAs.

Como controles se incluyeron veintitrés pacientes con diagnóstico de vasculitis renal asociada a ANCA y que se encontraban en remisión, sin terapia renal sustitutiva ni tratamiento inmunosupresor activo, al momento de la realización del estudio. Por último, se incluyeron también como controles veinte sujetos sanos sin patología renal ni autoinmune conocida.

6. 2. Características demográficas, clínicas e histológicas de los pacientes con vasculitis activa.

En los veinticuatro pacientes con vasculitis activa incluidos en el estudio hubo predominio de hombres (54%) y la edad media al debut fue de 71 ± 15 años. La serología

para ANCA fue positiva al diagnóstico en todos los pacientes; diecinueve (79,2%) mostraron un patrón citoplasmático (p-ANCA), con especificidad frente a la MPO, mientras que cinco (20,8%) pacientes mostraron patrón citoplasmático (c-ANCA), con actividad frente a la PR3. La tabla 5 muestra las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

La afectación extrarrenal estuvo presente en el 45,8% de los pacientes, siendo la puntuación media en el BVAS al diagnóstico de $18,1 \pm 3$. La afectación no renal más común fue la pulmonar en forma de hemorragia alveolar, que se documentó en el 21,1% de los casos. Otras afectaciones fueron el compromiso articular en forma de artralgias (8,3%), la afectación de la vía respiratoria superior (8,3%), el sistema nervioso periférico (4,1%) y, por último, un episodio de afectación cardíaca en forma de pericarditis (4,1%). De acuerdo con los criterios de la Conferencia de Consenso de Chapel Hill, 8 (33,3%) de los 24 pacientes fueron clasificados como Poliangeítis microscópica, 3 (12,5%) pacientes cumplían criterios de Granulomatosis con poliangeítis y 13 (54,1%) de los enfermos fueron considerados como vasculitis limitada al riñón. No se documentó ningún caso de Granulomatosis con eosinofilia entre los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 5. Características demográficas y clínicas de 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.

	Total n = 24
Edad media (años) (DS)	70.4 (12,5)
Varón, n (%)	13 (54.2%)
ANCA positivo, n (%)	24 (100%)
MPO, n (%)	19 (79.2%)
PR3, n (%)	5 (20.8%)
Tipo de vasculitis	
PAM, n (%)	8 (33.3%)
GPA, n (%)	3 (12.5%)
VLIR, n (%)	13 (54.1%)
Afectación extrarrenal, n (%)	11 (45.8%)
Puntaje BVAS medio (DS)	18,1 ± 3
Pacientes recaedores, n (%)	6 (25%)
Hemorragia alveolar, n (%)	4 (16,6%)

En relación al compromiso renal, la mediana de creatinina sérica al debut fue de 3,4 mg/dl (RIC, 2,5-3,8) y la mediana de filtrado glomerular estimado (CKD-EPI) fue de 16,3 ml/min/1.73m² (RIC, 8,3–32). Cuatro (16,7%) de los 24 pacientes precisaron diálisis aguda al diagnóstico. Todos los enfermos presentaban microhematuria y la mediana de proteinuria al diagnóstico fue de 0,76 g/g (RIC, 0,5-1,78). En la Tabla 6 se resumen las características renales de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 6. Características renales de los 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.

Variable	Total n = 24
Mediana de creatinina sérica (mg/dl) (RIC)	3,4 (2,5-3,8)
Mediana de FGe (CKD-EPI ml/min) (RIC)	16.3 (8.3-32)
Mediana de proteinuria (RIC)	0,76 (0,5-1,78)
Hematuria media (hem/campo)	15(4-30)
Necesidad de diálisis aguda, n (%)	4 (16,7%)
Necesidad de diálisis crónica, n (%)	2 (8,3%)

En todos los pacientes, excepto aquellos en los que el brote constituía una recaída de una VAA diagnosticada previamente, se realizó biopsia renal al debut que confirmó la presencia de una glomerulonefritis necrotizante focal con proliferación extracapilar. El número promedio de glomérulos por biopsia fue de $15,6 \pm 8,4$. La mediana del porcentaje de glomérulos con esclerosis global por muestra fue del 18% (RIC, 10-33), y la mediana del porcentaje de glomérulos normales fue del 30% (RIC, 16-60). La mediana del porcentaje de glomérulos con proliferación extracapilar fue del 26% (RIC, 16-66). De acuerdo con la clasificación histopatológica de vasculitis renal propuesta por Berden y cols, 7 (23,5%) de 18 biopsias fueron encuadrados en el subtipo focal, 5 (42,3%) biopsias fueron clasificados dentro de la categoría proliferativa extracapilar, y finalmente, 6 (24,7%) de 18 biopsias fueron clasificadas dentro del subtipo mixto. No se identificó ninguna biopsia

renal correspondiente al subtipo esclerótico. En relación al compartimento intersticial, se objetivó fibrosis intersticial en todas biopsias, siendo cuantificada como leve en un 61,1% de las muestras, moderada en un 33,3%, y severa sólo en el 5,5% de los casos. En la Tabla 7 se resumen las características histológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 7. Características histológicas de los 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.

Variable	Total n = 18
Nº medio de glomérulos (DS)	15,6 ± 8,4
Mediana % de semilunas (RIC)	26 (16–66)
Mediana % glomeruloesclerosis, (RIC)	18 (10–33)
Mediana % glomérulos normales (RIC)	30 (16–60)
Subtipo histológico	
Focal, n (%)	7/ (38,8%)
Extracapilar, n (%)	5 (27,7%)
Mixto, n (%)	6 (33,3%)
Esclerótica, n (%)	0
Fibrosis intersticial, n (%)	18 (100%)
Leve, n (%)	11 (61,1%)
Moderada, n (%)	6 (33,3%)
Severa, n (%)	1 (5,5%)

Todos los pacientes recibieron tratamiento inmunosupresor de inducción. Este tratamiento consistió en esteroides asociados a ciclofosfamida en 15 (62,5%) casos, esteroides con rituximab en 7 (29,1%) casos, y esteroides, ciclofosfamida y rituximab en dos pacientes (8,3%). Cinco enfermos (21%) recibieron adicionalmente tratamiento con plasmaféresis. La indicación fue la hemorragia alveolar en la mayoría de los casos (80%) y el número medio de sesiones que recibieron fue de cinco. Veintiún pacientes (87,5%) respondieron al tratamiento inmunosupresor alcanzando remisión de la enfermedad. Los tres pacientes no respondedores debutaron con un fallo renal severo dependiente de diálisis sin respuesta al tratamiento inmunosupresor. Dos quedaron en diálisis crónica y uno falleció como consecuencia de la vasculitis y complicaciones infecciosas derivadas de la inmunosupresión.

Todos los pacientes que alcanzaron remisión recibieron tratamiento inmunosupresor de mantenimiento, que consistió en azatioprina en 66,6% de los casos, y rituximab en los restantes. La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 15 meses (RIC, 9-22,5). Cinco pacientes (20,8%) experimentaron una recaída renal durante el seguimiento. La mediana de tiempo a la recaída fue de 9 meses (RIC, 3-12). Todas las recaídas fueron tratadas con esteroides y rituximab. En la Tabla 8 se resumen los esquemas de tratamiento inmunosupresor empleados y las tasas de respuesta observadas en los pacientes del estudio.

Tabla 8. Tratamiento y evolución de los 24 pacientes incidentes con vasculitis renal asociada a ANCA.

Variable	Total n = 24
Tratamiento inmunosupresor	24 (100%)
Esteroides + CF, n (%)	15 (62,5%)
Esteroides + RTX, n (%)	7 (29,1%)
Esteroides + RTX+CF, n (%)	2 (8,3%)
Plasmaféresis, n (%)	5 (21%)
Respuesta al tratamiento, n (%)	21 (87,5%)
Mediana de seguimiento (RIC)	15 (9 -2,5)
Recaídas durante el seguimiento, n (%)	5 (20,8%)
Mediana tiempo a recaída, (RIC)	9 (3-12)
Muerte, n (%)	1 (4,1%)

6.3. Características demográficas, clínicas e histológicas de los pacientes controles con vasculitis en remisión.

En el grupo control con 23 pacientes con vasculitis en remisión había predominio de hombres (59,6%) y la edad media al diagnóstico fue de $70,4 \pm 12,5$ años. En el momento del diagnóstico, la serología para ANCA fue positiva en el 82,6% de estos pacientes; quince (65,2%) mostraron un patrón citoplasmático (p-ANCA), con especificidad frente a la MPO, mientras que cuatro (17,3%) pacientes mostraron patrón citoplasmático (c-ANCA), con actividad frente a la PR3. La tabla 9 muestra las características demográficas y clínicas de

los pacientes controles con vasculitis incluidos en el estudio. La afectación extrarrenal estuvo presente al debut de la enfermedad en el 56,5% de estos pacientes, siendo la afectación no renal más común la hemorragia alveolar, que se documentó en el 34,8% de los casos. De acuerdo con los criterios de la Conferencia de Consenso de Chapel Hill, 9 (39,1%) de los 23 controles se clasificaban como Poliangeítis microscópica, 3 (13%) pacientes cumplían criterios de Granulomatosis con poliangeítis y 11 (47,5%) pacientes eran vasculitis limitada al riñón. No se incluyó ningún caso de Granulomatosis con eosinofilia entre los pacientes controles.

Tabla 9. Características demográfica y clínicas de los 23 pacientes controles con vasculitis renal asociada a ANCA en remisión.

	Total n = 23
Edad media (años) (DS)	70.4 (12,5)
Varón, n (%)	16 (59,6%)
ANCA positivo, n (%)	19 (82,6%)
MPO, n (%)	15 (65,2%)
PR3, n (%)	4 (17,3%)
Tipo de vasculitis	
PAM, n (%)	9 (39,1%)
GPA, n (%)	3 (13%)
VLR, n (%)	11 (47,5%)
Afectación extrarrenal, n (%)	13 (56,5%)
Hemorragia alveolar, n (%)	8 (34,8%)

Todos los pacientes controles incluidos en el estudio habían sido diagnosticados de vasculitis renal mediante biopsia renal, la cual confirmó la presencia de una glomerulonefritis necrotizante focal con proliferación extracapilar. En la Tabla 10 se resumen las características histológicas de los pacientes controles. El número promedio de glomérulos por biopsia fue de $18,8 \pm 8,3$. La mediana del porcentaje de glomérulos con esclerosis global por muestra fue del 11% (RIC, 6-22), y la mediana del porcentaje de glomérulos normales fue del 16% (RIC, 6-36). El porcentaje medio de glomérulos con proliferación extracapilar fue del 52% (RIC, 42-67). De acuerdo con la clasificación histopatológica de vasculitis renal propuesta por Berden y cols, 3 (13%) de 23 biopsias fueron encuadrados en el subtipo focal, 12 (51,2%) biopsias fueron clasificados dentro de la categoría proliferativa extracapilar, 7 (30,4%) biopsias fueron clasificados dentro del subtipo mixto y finalmente, 1 (4,3%) biopsia fue clasificada dentro del subtipo esclerótico. En relación al compartimento intersticial, se objetivó fibrosis intersticial en todas biopsias, siendo cuantificada como leve ($<25\%$) en un 34,8% de las muestras, moderada en un 52,2%, y severa ($\geq 50\%$) sólo en el 13% de los casos.

Tabla 10. Características histológicas de los 23 pacientes controles con vasculitis renal asociada a ANCA en remisión.

Variable	Total n = 23
Nº medio de glomérulos (DS)	18,8 ± 8,3
Mediana % de semilunas (RIC)	53 (42–67)
Mediana % glomeruloesclerosis, (RIC)	11 (6–22)
Mediana % glomérulos normales (RIC)	16 (6–36)
Subtipo histológico	
Focal, n (%)	3 (13%)
Extracapilar, n (%)	12 (52,2%)
Mixto, n (%)	7 (30,4%)
Esclerótica, n (%)	1 (4,3%)
Fibrosis intersticial, n (%)	
Leve, n (%)	8 (34,8%)
Moderada, n (%)	12 (52,2%)
Severa, n (%)	3 (13%)

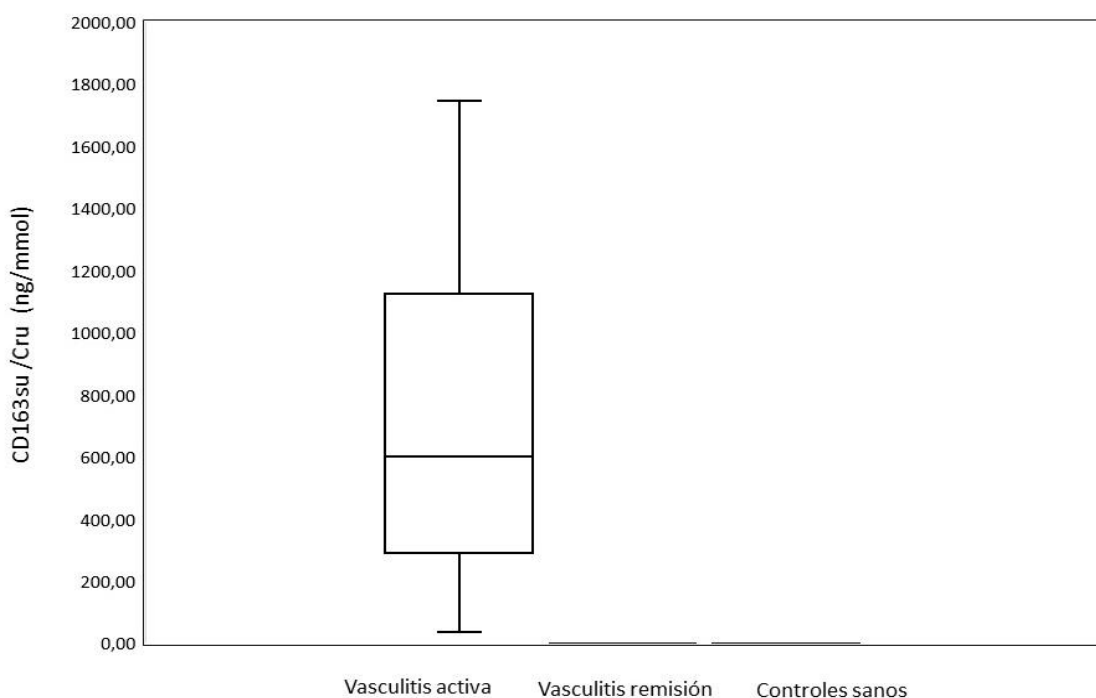
6.4. Características demográficas de los sujetos controles sanos.

En el grupo control con 20 sujetos sanos había predominio de hombres (59,6%) y la edad media al diagnóstico fue de 70,4 ± 12,5 años. Ninguno de los controles padecía ninguna patología renal o autoinmune conocida. El estudio del CD163u se realizó en estos sujetos en situación clínica estable, sin ningún proceso intercurrente.

6.5. Niveles de CD163su en pacientes con vasculitis activa, vasculitis en remisión y controles sanos.

Se documentaron niveles urinarios de CD163s elevados al debut en todos los pacientes incidentes con brote de vasculitis, siendo la mediana de concentración de 601 ng/mmol (RIC, 221-1404 ng/mmol). Por el contrario, los pacientes controles con vasculitis en remisión mostraron niveles indetectables de CD163s en orina. Únicamente un paciente control con vasculitis mostró un valor positivo, pero muy bajo, de CD163s en orina (0,0765 ng/ml). Las concentraciones de CD163s en los controles sanos fueron igualmente indetectables. En la Figura 12 se resumen las concentraciones de CD163su en los tres grupos del estudio.

Figura 12. Concentraciones de CD163su en pacientes con vasculitis renal activa, vasculitis renal en remisión y controles sanos.



6.6. Concentraciones de CD163su al debut en pacientes con vasculitis activa y su correlación clínica.

Como hemos mencionado, la mediana de concentración de CD163su normalizado por creatinina urinaria fue de 601 ng /mmol (RIC, 221-1404 ng/mmol) y no se encontraron diferencias en las concentraciones de CD163su entre los pacientes con vasculitis de novo (522 ng/mmol, RIC 186-1513) y aquellos casos que constituían una recurrencia de una vasculitis conocida (660 ng/mmol, RIC 325-809). Los niveles de CD163su al diagnóstico tampoco difirieron entre los pacientes ANCA-MPO y ANCA-PR3, ni se observaron diferencias en función del fenotipo de afectación vasculítica. En la Tabla 11 se especifican los niveles de CD163su al diagnóstico según el tipo de vasculitis y el serotipo de ANCA.

Tabla 11. Concentraciones urinarias de CD163s normalizado por creatinina en función del subtipo de vasculitis y serotipo de ANCA.

Variable	Median CD163su/Cru (ng/mmol) (RIC)	P valor
Global	601 (221-1404)	0,8
ANCA subtipo		
MPO	425 (199-1494)	
PR3	737 (308-1046)	0,4
Tipo de vasculitis		
MPO	737 (419-1292)	
GPA	308 (33-583)	
VLR	618 (172-1494)	0,6
Vasculitis “de novo”	522 (186-1513)	
Recaedores	660 (325-809)	

Las concentraciones de CD163su normalizado por creatinina mostraron un amplio rango de valores entre los pacientes al debut de la enfermedad. Por este motivo, la población de estudio se subdividió en terciles según las concentraciones basales de CD163su. El tercil 1 (T1) correspondía a pacientes con concentración de CD163su al debut inferior a 321 ng/mmol; el tercil 2 (T2) correspondía a pacientes con concentración basal de CD163su entre 321 y 1057 ng/mmol; y por último el tercil 3 (T3), que correspondía a pacientes con concentraciones de CD163su normalizado superiores a 1057 ng/mmol. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de CD163su en función del título de ANCA o el puntaje basal del BVAS al diagnóstico. En la Tabla 12 se resumen las características serológicas y clínicas de los pacientes según los niveles basales de CD163su normalizado.

Tabla 12. Características clínicas al diagnóstico de los pacientes según los niveles de CD163su normalizado por creatinina agrupados por terciles.

	T1 <321 ng/mmol (n: 8)	T2 321-1057 ng/mmol (n: 8)	T3 >1057 ng/mmol (n: 8)	P valor
Edad media (años) (DS)	70 (67-77)	72 (60-74)	66 (62,5-77,5)	0,57
ANCA positivo, n (%)	8 (100%)	8(100%)	8 (100%)	0,3
MPO, n (%)	7 (87,5%)	5 (62,5%)	7(87,5%)	
PR3, n (%)	1(12,5%)	3(37,5%)	1(12,5%)	
Título de ANCAs (U/L)	91 (63-115)	130 (52-134)	113 (53-137)	0,33
Afectación extrarrenal, n (%)	2 (25%)	5 (62,5%)	4 (50%)	0,31
Puntaje BVAS medio (DS)	15(12-15)	18 (15-19)	15 (14-15)	0,06

En relación a la afectación renal, los pacientes pertenecientes al tercil 3, con niveles más elevados de CD163su al diagnóstico, presentaban una menor tasa de FGe (15 ml/min/1.73m², RIC 8,8-32) en comparación con los pacientes del tercil 1 (32 ml/min/1.73m², RIC 13-39) y tercil 2 (23 ml/min/1.73m², RIC 13-34) (p = 0.04). Además, entre los pacientes con concentraciones más altas de CD163su (tercil 3) se observó una tendencia, aunque no significativa, a presentar mayor grado de hematuria y proteinuria al debut de la enfermedad, así como mayor necesidad de diálisis aguda. En la Tabla 13 se resumen las características renales de los pacientes según los niveles basales de CD163su normalizado.

Tabla 13. Características renales de los pacientes según los niveles de CD163su normalizado por creatinina al diagnóstico agrupados por terciles.

Variable	T1: <321 ng/mmol (n: 8)	T2 321-1057 ng/mmol (n: 8)	T3 >1057 ng/mmol (n: 8)	P valor
Mediana de creatinina sérica (mg/dl) (RIC)	1,8 (1,6-4,4)	2,6 (1,7-4,7)	4,3 (1,7-6,3)	0,06
Mediana de FGe (CKD-EPI ml/min) (RIC)	32 (13-39)	23 (13-34)	15 (8,8-32,5)	0,04
Mediana proteinuria, (g/g) (RIC)	0,6 (0,3-1,5)	1,39 (0,85-1,7)	2,2 (1,4-3)	0,16
Hematuria media (hem/campo)	6 (2,5-45)	15 (6-25)	25 (6-52)	0,1
Necesidad de diálisis aguda, n (%)	0	1 (12,5%)	3 (37,5%)	0,08

Con respecto a las lesiones histológicas, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de proliferación extracapilar (semilunas) entre los grupos según las concentraciones basales de CD163su. Sin embargo, se observó un mayor porcentaje de glomeruloesclerosis en los pacientes que debutaron con concentraciones más elevadas de CD163su (tercil 3). En la Tabla 14 se resumen las características histológicas de los pacientes según los niveles basales de CD163su normalizado.

Tabla 14. Características histológicas de los pacientes según los niveles de CD163su normalizado por creatinina al diagnóstico agrupados por terciles.

Variable	T1: <321 ng/mmol (n: 6)	T2 321-1057 ng/mmol (n: 6)	T3 >1057 ng/mmol (n: 6)	P valor
Mediana % de semilunas (RIC)	33.5 (31–72)	19 (16–45)	40 (11-69)	0,8
Mediana % glomeruloesclerosis, (RIC)	18 (10-33)	18 (13,7-21,7)	41 (34-45,7)	0,01
Mediana % glomérulos normales (RIC)	31,5 (15–67)	62 (38–68)	20 (10-26)	0,1
Subtipo histológico				
Focal, n (%)	2 (33,3%)	5 (83,3%)	0	0,1
Extracapilar, n (%)	2 (33,3%)	1 (16,6%)	2 (33,3%)	
Mixto, n (%)	2 (33,3%)	0	4 (66,6%)	
Fibrosis intersticial, n (%)				
Leve, n (%)	3 (27,2%)	5(45,5%)	3(50%)	0,66
Moderada, n (%)	3 (42,8%)	1(14,2%)	2(33,3%)	
Severa, n (%)	0	0	1(16,6%)	

En relación al tratamiento inmunosupresor, existió una tendencia de los pacientes con niveles de CD163su más elevados al diagnóstico a recibir con más frecuencia un esquema inmunosupresor basado en esteroides y ciclofosfamida frente a los otros grupos de tratamiento., Todos los casos que no respondieron a la terapia inmunosupresora pertenecían a los grupos con concentraciones más elevadas de CD163su (tercil 2 y 3). En la Tabla 15 se resumen las pautas de tratamiento, tasas de remisión y de recaída en función de las concentraciones de CD163su.

Tabla 15. Diferencias en el esquema terapéutico, tasa de remisión e incidencia de recaídas entre los pacientes con VAA en función de los niveles al debut de CD163su normalizado.

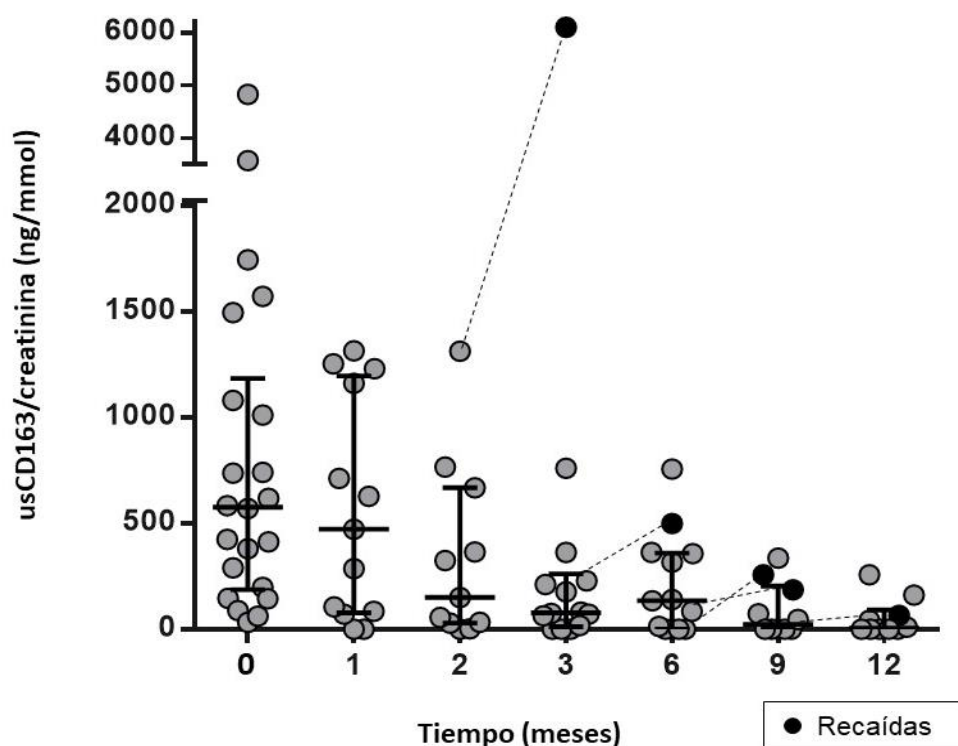
Variable	T1 <321 ng/mmol (n: 8)	T2 321-1057 ng/mmol (n: 8)	T3 >1057 ng/mmol (n: 8)	P valor
Tto inmunosupresor				
Est + CF, n (%)	5 (33%)	3 (20%)	7(47%)	0,06
Est + RTX, n (%)	3(43%)	4 (57%)	0(0%)	
Est +RTX+CF, n (%)	0(0%)	1(50%)	1(50%)	
Plasmaféresis, n (%)	1 (20%)	2(40%)	2(40%)	0,7
Respuesta al tratamiento, n (%)	8(100%)	7(87,5%)	6(75%)	0,1
Mediana de seguimiento (meses)	21 (11-26)	12 (4,5-22)	15(9,8-15)	0,14
Recaídas, n (%)	2(40%)	1(20%)	2(40%)	0,7

6.7. Evolución de CD163su durante el seguimiento de los pacientes con vasculitis renal.

La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 15 meses (9-22,5). A los 15 meses la situación de los pacientes era la siguiente; 16 pacientes se encontraban en remisión, 2 pacientes no habían respondido al tratamiento y precisaban diálisis crónica, 1 paciente falleció debido a una infección y 5 pacientes que habían alcanzado la remisión habían experimentado una recaída posterior.

A excepción de los casos no respondedores, en todos los pacientes se observó una disminución progresiva en los niveles de CD163su tras el tratamiento inmunosupresor. Excluyendo a los pacientes que presentaron recaídas, la mediana de concentración de CD163su al debut fue de 601 ng/mmol (RIC, 221-1404), al primer mes de 71,25 ng/mmol (RIC, 0,9-629), al tercer mes de 41,14 ng/mmol (RIC, 0,8-117) y, finalmente, al doceavo mes de 26,74 ng/mmol (RIC, 0-34,3). La Figura 13 muestra las variaciones de CD163su en los pacientes en los primeros 6 meses. Los pacientes que alcanzaron remisión mostraron la reducción en las concentraciones de CD163su ya en el primer mes tras el inicio del tratamiento, a excepción de cuatro enfermos, todos pertenecientes al grupo tratado con rituximab, que presentaron una elevación transitoria en los niveles de CD163su durante las primeras semanas, para luego realizar un descenso progresivo a partir del segundo mes. Sólo nueve pacientes alcanzaron concentraciones indetectables de CD163su tras el tratamiento inmunosupresor, mientras que los restantes mantuvieron concentraciones urinarias bajas durante el seguimiento. No se observó ninguna diferencia clínica entre los pacientes en función de si negativizaron o no el CD163su tras el tratamiento.

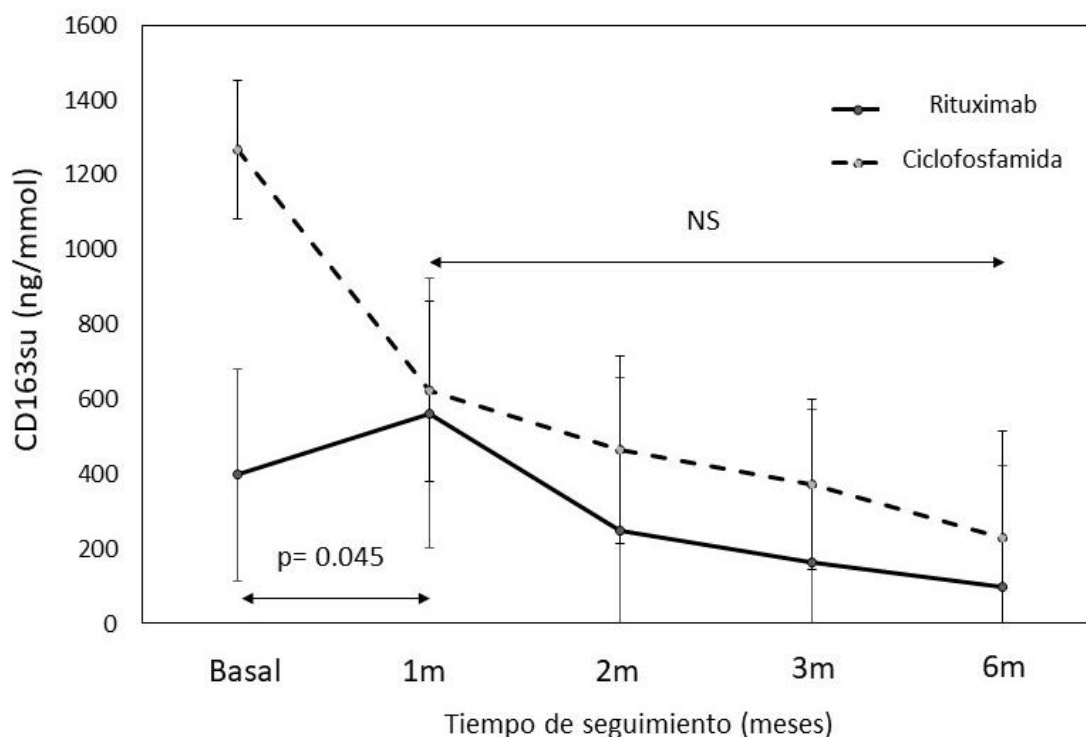
Figura 13. Evolución de los niveles urinarios de CD163s normalizados durante el seguimiento de 24 pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA.



Con respecto a la terapia inmunosupresora, los pacientes con lesiones renales más graves recibieron más frecuentemente tratamiento con ciclofosfamida. Estos pacientes tenían niveles más altos de Crs al debut en comparación con los que recibieron rituximab (3.4 mg/dl, RIC 2.1-5.1 vs 1.9 mg/dl, RIC 1.4-2.8) y proteinuria más alta (1.35 g/g, RIC 0.62-1.62, vs 0.8 g/g, RIC 0.5-2.7). Los pacientes tratados con ciclofosfamida también presentaban niveles más altos de CD163su en comparación con los tratados con rituximab (1011 ng / mmol, RIC 289-1533 versus 412 ng/mmol, RIC 89-737, p; 0.09). Como se

muestra en la Figura 14, los casos tratados con ciclofosfamida mostraron una disminución más pronunciada de las concentraciones de CD163su durante el primer mes en comparación con los pacientes tratados con rituximab ($p = 0.045$). Sin embargo, estas diferencias en la reducción de las concentraciones de CD163su en función del tratamiento inmunosupresor no se mantuvieron posteriormente, ya que a partir del primer mes de seguimiento la pendiente decreciente en los niveles de CD163su fue comparable entre ambos grupos de tratamiento.

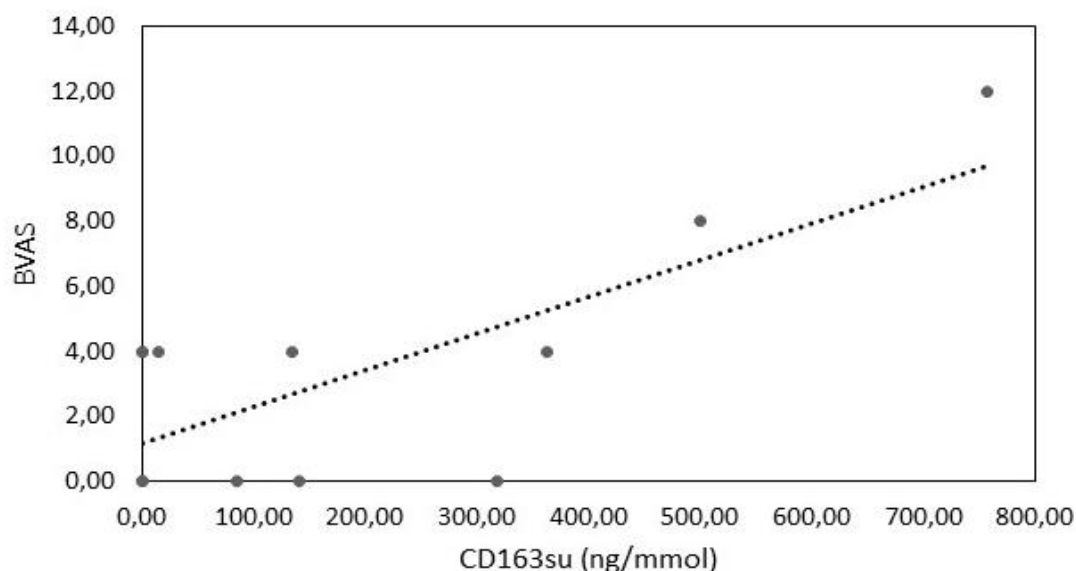
Figura 14. Mediana de niveles de CD163su durante el seguimiento en función del tipo de tratamiento inmunosupresor recibido.



6.8. Correlación de los niveles de CD163su con actividad vasculítica.

Con respecto a la actividad de vasculitis, los niveles de CD163su mostraron una estrecha correlación con el índice BVAS a los 6 meses del seguimiento ($r = 0.737$, $p = 0.006$), tras finalizar el tratamiento inmunosupresor de inducción (Figura 15). Esta correlación se mantuvo posteriormente al noveno mes ($r = 0.714$, $p = 0.031$) y duodécimo mes ($r = 0.804$, $p = 0.005$). No se observó asociación entre las concentraciones de CD163su y los cambios en los niveles de otros marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva o la velocidad de sedimentación. Tampoco existió ninguna correlación entre los cambios de los niveles de CD163su y los cambios en los títulos de ANCA durante el seguimiento.

Figura 15. Correlación entre las concentraciones de CD163su y el score BVAS al sexto mes de seguimiento de pacientes con brote renal de VAA.



6.9. Cambios en el CD163s urinario en los pacientes con recaída renal.

Cinco pacientes experimentaron una recaída renal de la vasculitis durante el seguimiento. La recaída consistió en todos los casos en un deterioro de función renal respecto a valores previos, con aumento de la proteinuria o microhematuria, sin otra causa que lo justificara. Todos los pacientes que presentaron recaída mostraron una elevación de las concentraciones basales de CD163su con respecto a sus valores previos en el momento de la recaída. Por el contrario, sólo dos pacientes que no experimentaron recaída presentaron una pequeña elevación en las concentraciones de CD163su en algún momento del seguimiento. La elevación del CD163su se detectó coincidente con el deterioro de la función renal en todos los casos excepto en uno (paciente 3), en el cual el incremento de la concentración del CD163su ocurrió en la visita correspondiente a los tres meses previos a la recaída vasculítica. Adicionalmente, en dos pacientes en los que el brote constituía una recaída de una vasculitis ya diagnosticada se realizaron determinaciones de CD163su en dos orinas de archivo que los enfermos disponían del año anterior, siendo los niveles de CD163su en estas muestras indetectables en ambos casos. En la Tabla 16 se muestran los cambios en las concentraciones en los pacientes que presentaron recaída renal.

Tabla 16. Evolución de la creatinina sérica, microhematuria, título de ANCAs y concentraciones de CD163su durante el seguimiento de los pacientes que presentaron recaída renal de la vasculitis.

		Debut	1º mes	3º mes	6º mes	9º mes	12º mes
Paciente 1	CrS (mg/dl)	1,69	1,5	1,3	1,2	1,4*	1,5
	Hematuria (hem/c)	60	0	0	0	30	0
	ANCA (U/L)	80	29	26	46	49	18
	CD163su/Cr (ng/mmol)	199,42	0	0	0	258,43	0
Paciente 2	CrS (mg/dl)	1,9	1,3	1,4	0,9	1,28*	2,8
	Hematuria (hem/c)	30	4	4	0	4	30
	ANCA (U/L)	130	63	1,4	0,6	4	134
	CD163su/Cr (ng/mmol)	3580,55	1231,2	177,22	84,77	186,68	1490,56
Paciente 3	CrS (mg/dl)	2,6	3	2,4	2	1,7	2,1*
	Hematuria (hem/c)	10	6	0	0	0	4
	ANCA (U/L)	32	32	0	1	2,5	11
	CD163su/Cr (ng/mmol)	569,82	150,6	71,413	14,78	46,45	67
Paciente 4	CrS (mg/dl)	4,4	1,7	1,3	1,5*	1,3	1,1
	Hematuria (hem/c)	20	8	8	20	4	4
	ANCA (U/L)	134	18	6,2	134	134	66
	CD163su/Cr (ng/mmol)	425,46	-	212,32	500,04	336,23	257,4
Paciente 5	CrS (mg/dl)	6,4	4	6,2*	4	3,4	-
	Hematuria (hem/c)	60	20	60	30	30	-
	ANCA (U/L)	113	15	6,4	3,5	1,8	-
	CD163su/Cr (ng/mmol)	1572,47	1313, 81	6104,16	756,06	-	-

* Recaída que precisó cambio en el tratamiento inmunosupresor.

Los títulos de ANCA se elevaron en el contexto de la recaída en tres de los cinco pacientes recaedores. Por el contrario, tres pacientes del estudio que no presentaron recaída presentaron una elevación significativa en el título de ANCA en algún momento del seguimiento. En estos últimos, el CD163su no se elevó en ningún caso, permitiendo, por tanto, discriminar la presencia o no de recaída renal en estas circunstancias en que los títulos de los ANCA se elevan. En la Tabla 17 se muestran los cambios en las concentraciones urinarias de CD163s en los pacientes que presentaron elevación del título de ANCA durante el seguimiento.

Tabla 17. Cambios en las concentraciones urinarias de CD163s en los pacientes que presentaron elevación o positivización en el título de ANCA durante el seguimiento.

Variable	Momento del seguimiento	Título ANCA previa elevación	CD163su previo elevación	Título ANCA máximo	CD163su con pico de ANCA	Desarrollo recaída
Paciente 1	Mes 12	48	0	59	0	No
Paciente 2	Mes 6	7,7	0	24	0	No
Paciente 3	Mes 24	2,4	0	24	0	No
Paciente 4	Mes 12	6,2	212,32	134	500,04	Sí
Paciente 5	Mes 6	2,5	46,45	11	67	Si
Paciente 6	Mes 9	0,6	84,7	4	186,6	Si

6.10. Estudio del CD163s urinario como marcador de recaída renal.

Para evaluar la capacidad de los niveles de CD163su para discriminar la presencia de una recaída renal de la vasculitis se calculó el área bajo la curva ROC teniendo en cuenta los cambios intraindividuales en las concentraciones de CD163su con respecto al valor previo. El área bajo la curva considerando cambios absolutos en las concentraciones de CD163su con respecto al valor previo fue de 0.9679 (IC 95% 0.915-1.00; $p = 0.001$) y el área bajo la curva considerando cambios relativos en las concentraciones del CD163su fue de 0.9571 (IC 95% 0.9032- 1.00, $P = 0.001$). En las Figuras 16 y 17 se muestran las curvas ROC para la capacidad de las concentraciones de CD163su para discriminar recaída renal.

Los puntos de corte óptimos para diagnosticar recaída renal que se obtuvieron de las curvas ROC fueron un incremento de 20 ng/mmol para los cambios absolutos de CD163su, y un incremento del 20% para los cambios relativos del CD163su. El uso de estos valores de corte dio como resultado una sensibilidad del 100% para el diagnóstico de recaída renal, similar para el cambio absoluto como relativo de CD163su. Y una especificidad del 87,5% para el incremento absoluto de 20 ng/mmol y del 89,3% para el incremento relativo del 20%. Estos resultados demuestran que la estimación de CD163su en cada visita de los pacientes puede detectar de manera sólida la presencia de una recaída. En la Tabla 18 se muestran la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el diagnóstico de recaída renal considerando los incrementos absolutos y relativos de las concentraciones del CD163su.

Figura 16. Curva ROC para diagnosticar recaída renal considerando los cambios absolutos del CD163su con respecto a su valor previo.

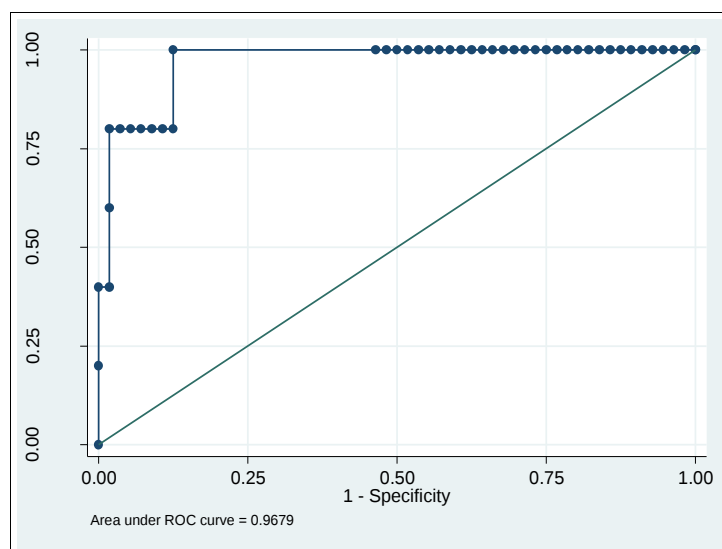


Figura 17. Curva ROC para diagnosticar recaída renal considerando los cambios porcentuales (relativos) del CD163su con respecto a su valor previo.

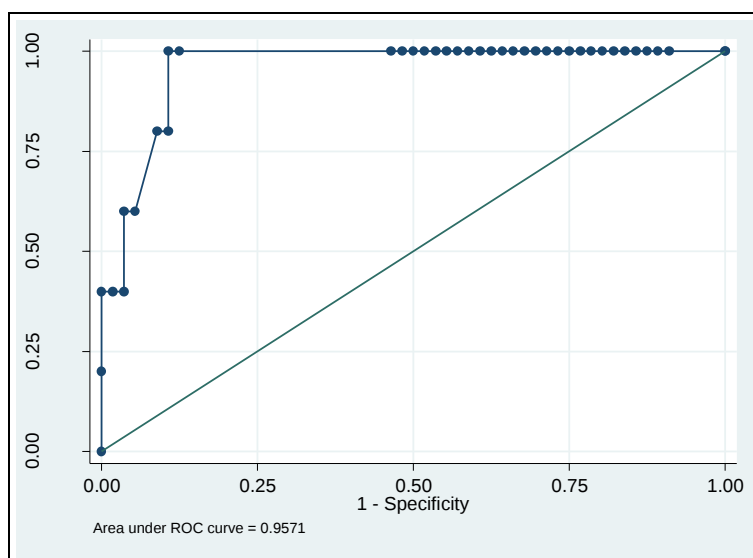


Tabla 18. Área bajo la curva, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el diagnóstico de recaída renal considerando un incremento absoluto de la concentración de CD163su de 20 ng/mmol o un incremento relativo del 20%, con respecto al valor previo.

	AUC (IC 95%)	Punto de Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
Cambio absoluto	0,967 (0,915-1,00)	20 ng/mmol	100% (57-100)	87,5% (76-94)	41,7% (19-68)	100% (92,7-100)
Porcentaje cambio	0,957 (0,903-1,00)	20%	100% (57-100)	89,3% (78-95)	45% (21-72)	100% (93-100)

7. DISCUSIÓN

7. 1. Relevancia del estudio.

La vasculitis asociada a ANCA es una enfermedad autoinmune cuya manifestación renal se caracteriza por una insuficiencia renal rápidamente progresiva, como consecuencia de una glomerulonefritis extracapilar (2). El curso clínico de esta enfermedad se caracteriza por la alternancia de periodos de actividad y remisión. Si bien la respuesta inicial al tratamiento ha ido mejorando en los últimos años con la implementación de nuevas estrategias de inmunosupresión, tras finalizar dicho tratamiento son frecuentes las recurrencias de la enfermedad, las cuales implican un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad, así como el desarrollo de un daño renal irreversible (123). Dada la limitación de los marcadores inflamatorios clásicos y los ANCA para guiar el tratamiento y la práctica clínica en el seguimiento de los pacientes con VAA, en los últimos años diversos estudios han tratado de identificar nuevos biomarcadores que permitan discriminar de forma más fiable y precisa la presencia de actividad vasculítica (124).

El estudio que hemos realizado demuestra que un nuevo parámetro urinario, la forma soluble del CD163, constituye un marcador excelente de actividad vasculítica y permite identificar la aparición de recaída renal en el seguimiento de pacientes con VAA. En este trabajo mostramos cómo los cambios en la concentración del CD163su constituyen un marcador preciso de respuesta al tratamiento inmunosupresor, permitiendo monitorizar la respuesta a dicho tratamiento e identificar precozmente aquellos sujetos refractarios a la inmunosupresión. Además, se muestra como cambios en la concentración de CD163su

permiten la detección de recidivas renales de la vasculitis con una excelente sensibilidad y especificidad. Más aún, el incremento en las concentraciones de CD163^{su} permite discriminar aquellas circunstancias clínicas en las que existen dudas sobre la presencia de un brote renal de la vasculitis, como ocurre cuando existen elevaciones significativas del título de ANCA sin que exista repercusión clínica asociada.

Estos hallazgos resultan de gran utilidad en la práctica clínica ya que abren la puerta al empleo de forma rutinaria de este biomarcador en el seguimiento de pacientes con vasculitis renal. La correcta identificación de recaídas renales mediante la medición del CD163^{su} permitiría iniciar tratamiento inmunosupresor de forma precoz evitando el desarrollo de daño renal irreversible en estos pacientes, pero también reducir la toxicidad, evitando el empleo de inmunosupresión innecesaria en los casos dudosos en los que posteriormente no se confirma la presencia de una recidiva vasculítica.

7.2. Papel de los macrófagos en la patogenia de la vasculitis.

La vasculitis asociada a ANCA constituye una enfermedad autoinmune en la que están implicados diversos elementos, todos ellos necesarios para que se desarrolle el daño vasculítico. En los últimos años numerosos estudios han aportado nuevas evidencias a cerca del proceso patogénico que ocurre en la afectación renal de pacientes con vasculitis, implicando a nuevos mecanismos de daño molecular y celular (120). Entre ellos destaca el papel de los macrófagos como células efectoras, con un rol primario en el proceso patogénico (94,96,100). De forma general, los macrófagos son células cruciales en los procesos de homeostasis, inflamación y reparación tisular, y su papel resulta clave en otras

enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico (101,125,126).

Diversos estudios histológicos han evidenciado la posible implicación de los macrófagos en el proceso vasculítico: en las biopsias renales de pacientes con vasculitis la presencia de infiltrado celular monocitario en el área túbulo-intersticial es una característica constante, especialmente en la proximidad de los glomérulos (96). Más aún, Zhao y cols observaron cómo los macrófagos estaban presentes en estadios precoces de la enfermedad, demostrando la presencia de monocitos tanto en glomérulos aparentemente normales, como en aquellos que presentan lesiones ya establecidas características de la vasculitis (101). La infiltración temprana de estas células en el tejido renal sugería que podrían participar en la generación de la necrosis fibrinoide y el desarrollo de proliferación extracapilar (100). Además, usando técnicas de inmunohistoquímica documentaron una polarización clara en la población de macrófagos que infiltra el tejido renal de pacientes con vasculitis, con una presencia predominante de macrófagos M2 (119).

Nuestro grupo estudió, usando también técnicas de inmunohistoquímica, la presencia de macrófagos en biopsias renales de pacientes con vasculitis, demostrando la presencia de un infiltrado de macrófagos CD163+ tanto a nivel glomerular como intersticial, pero también en los capilares peritubulares. La intensidad del infiltrado de células CD163+ en un compartimento se correlacionó de forma significativa y positiva con el número de macrófagos CD163+ en los otros compartimentos. Este estudio ha sido el primero hasta la fecha que ha analizado el grado de infiltración por células CD163+ en los distintos subtipos histológicos de vasculitis, y hemos podido observar una secuencia evolutiva entre las clases histológicas. De esta forma, la infiltración de células CD163+ a

nivel intersticial es máxima en las formas focales y extracapilares, disminuye de forma significativa en las formas mixtas, y es muy leve en las formas escleróticas. Estos hallazgos son de gran interés ya que, al igual que en el estudio de Zhao y cols, pone de relieve la presencia de un infiltrado macrofágico CD163+ en las fases iniciales de la enfermedad. Y esta infiltración ocurre antes que se haya producido el daño histológico característico de la vasculitis, como pudimos observar que ocurría en las formas focales, que se caracterizan por mostrar la mayor parte de los glomérulos indemnes en la biopsia renal. Hasta la fecha se desconoce si el tipo de clase histológica, es consecuencia de la confluencia de diferentes mecanismos de daño, los cuales podrían ocasionar lesiones más severas (subtipo extracapilar y mixto) o menos severas (subtipo focal), o por el contrario, los mecanismos de daño histológico son comunes en todas las clases histológicas, y simplemente la diferente expresión histológica constituye un reflejo del momento temporal, dentro de una secuencia evolutiva, en el que se diagnostica la enfermedad. Nuestros resultados orientan a esta última hipótesis en la que los subtipos histológicos forman parte de una secuencia evolutiva, de tal forma que inicialmente se produciría una infiltración glomerular e intersticial por los macrófagos CD163, posteriormente la aparición gradual de lesiones ópticas como la proliferación extracapilar y necrosis fibrinoide (inicialmente formas focales que posteriormente evolucionarían al subtipo extracapilar), y, en ausencia de tratamiento, el desarrollo de lesiones crónicas irreversibles (inicialmente subtipo mixto que posteriormente evolucionaría a subtipo esclerótico). Sin embargo, a diferencia del trabajo de Zhao y cols, en nuestro estudio no observamos una mayor presencia de macrófagos CD163 co-localizando en las áreas de necrosis fibrinoide. Pero al igual que ellos comprobamos como

esta infiltración se produce ya en los glomérulos normales de las muestras renales, sobre todo en los capilares intraglomerulares y en el área intersticial periglomerular.

El hallazgo específico de la presencia macrófagos CD163⁺ en las biopsias de los enfermos con vasculitis nos hizo postular a nosotros y otros grupos, que podría existir eliminación de su forma soluble en orina (CD163_{su}), la cual podría traducir indirectamente el grado de inflamación del parénquima, y por tanto la actividad vasculítica del tejido renal. En este sentido, O'Reilly y cols realizaron mediciones de CD163_{su} en ratas a la que se les había inducido una vasculitis, encontrando una excelente correlación entre la expresión histológica de CD163s y la eliminación urinaria de esta proteína. Observaron que las concentraciones urinarias de CD163s se incrementaban de forma progresiva tras la inducción de la vasculitis, alcanzando un máximo de concentración urinaria el día 28 tras la inmunización con los anticuerpos anti-MPO (119). Posteriormente, los niveles de CD163_{su} decrecían paulatinamente hasta alcanzar concentraciones similares a las observadas en ratas control el día 56 post inmunización. Sin embargo, las lesiones histológicas vasculíticas más severas se observaron al día 56 post inmunización, por lo que la expresión urinaria de CD163s parecía preceder la aparición del daño histológico.

De forma interesante, la expresión urinaria de CD163s únicamente refleja la actividad e infiltración de los macrófagos en el tejido renal, ya que, como demostraron O'Reilly y cols, las concentraciones del CD163s en suero son similares entre sujetos con enfermedad vasculítica activa, enfermedad vasculítica en remisión y controles sanos. Por lo tanto, no se puede atribuir la presencia de CD163s en orina a un incremento en los niveles séricos de esta proteína como consecuencia de la actividad vasculítica sistémica. Este hecho confiere al CD163_{su} una particular especificidad para la discriminación de actividad renal

de la vasculitis, hallazgo de gran importancia al tratarse la vasculitis de una enfermedad con un espectro de afectación muy amplio, que puede comprender desde una lesión exclusivamente renal a la presencia de daño multiorgánico.

7.3. CD163s urinario como biomarcador diagnóstico de vasculitis renal.

Nuestro estudio demuestra niveles elevados de CD163su en todos los pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA, a diferencia de sujetos con enfermedad vasculítica en remisión y controles sanos, cuyos niveles fueron indetectables. En paralelo a nuestro trabajo, el grupo de O'Reilly realizaron también estudios de CD163su en pacientes con VAA, observando que los sujetos con afectación renal tenían niveles urinarios de CD163s más elevados que pacientes con VAA sin afectación renal y aquellos con VAA y afectación renal pero en fase de inactividad (119). Estos resultados los confirmaron utilizando dos cohortes de validación que comprendían 155 y 133 pacientes respectivamente. En su estudio, O'Reilly y cols. demostraron que un punto de corte en 0,3 ng/mmol para la concentración de CD163su normalizado por creatinina urinaria, permitía detectar vasculitis renal activa con una sensibilidad del 83%, una especificidad del 96% y una probabilidad positiva pretest de 20, comportándose, por tanto, como un buen biomarcador diagnóstico. A diferencia de nuestro trabajo, observaron una tasa de falsos positivos de 1,5% y 3,4% en las diferentes cohortes de controles con enfermedad vasculítica en remisión. En nuestro caso todos los controles con enfermedad vasculítica en remisión y los controles sanos mostraron niveles indetectables de CD163s urinario, sin que existiese ningún falso positivo en este grupo de pacientes. Es importante resaltar los estudios de CD163su que realizaron O'Reilly y cols. en controles con fracaso renal agudo asociado a sepsis y enfermos con

otras glomerulonefritis. En estos últimos observaron que un 23% de los casos tenían niveles de CD163su por encima del punto de corte que habían establecido para el diagnóstico, sugiriendo que otras glomerulonefritis secundarias en las que también existe una infiltración tisular por macrófagos, pueden igualmente mostrar niveles urinarios elevados de CD163s en un porcentaje significativo de casos. De hecho, otros estudios han observado que en pacientes con nefritis lúpica el CD163su refleja el grado de inflamación glomerular (127). En nuestro estudio no realizamos controles a paciente con otras glomerulonefritis, por lo tanto, no podemos confirmar los resultados obtenidos por O'Reilly y cols. Por otra parte, en el grupo control con sepsis y fracaso renal observaron un 14,7% de casos con niveles elevados de CD163su. Estos hallazgos, y a la espera de nuevos estudios, limitan en cierta medida el papel del CD163su como biomarcador diagnóstico específico de daño renal secundario a VAA, y por tanto, su determinación no puede sustituir hoy en día a la confirmación histológica mediante biopsia renal. No obstante, la medición del CD163su en el contexto de una insuficiencia renal progresiva con presencia de ANCA circulantes podría apoyar el diagnóstico de daño renal secundario a enfermedad vasculítica, y podría, por tanto, tener especial utilidad en los casos de vasculitis renal ANCA negativo o en los casos en los que la biopsia renal, por otras circunstancias como puede ser la coagulopatía o la presencia de quistes renales, no es posible su realización. Sin embargo, estas hipótesis deberían ser estudiadas en distintas cohortes de pacientes en los próximos años.

A la vista de estos resultados, el papel más interesante del CD163su reside en la identificación de actividad vasculítica en el contexto de una recaída renal en pacientes que ya han sido previamente diagnosticados de la enfermedad. Recientemente, Moran et cols. han analizado la capacidad del CD163su junto con otro biomarcador, la MCP-1, para

diagnosticar actividad vasculítica en una cohorte de 39 pacientes con VAA activa y afectación renal, en comparación con pacientes con afectación vasculítica en remisión (incluyendo pacientes con y sin afectación renal) y otro grupo de 48 pacientes con vasculitis activa exclusivamente extrarenal (128). A diferencia del estudio anterior, ellos establecieron una concentración de CD163su normalizado por creatinina en orina de 72.9 ng/mmol como punto de corte, con el que obtuvieron una sensibilidad de 79.5 % y una especificidad del 67.3% para el diagnóstico de un brote renal de la vasculitis. Sin embargo, tanto el estudio de O'Reilly et cols. como el de Moran et cols. presentan la limitación de haber incluido poblaciones muy heterogéneas en sus trabajos, analizando cohortes diferentes para cada condición clínica: pacientes con VAA activa, pacientes con VAA en remisión y pacientes con afectación vasculítica solo extrarrenal. Este hecho probablemente justifica las diferencias observadas en los puntos de corte de las concentraciones de CD163su que cada grupo establece para el diagnóstico de brote renal de vasculitis.

En nuestro estudio observamos un rango amplio en las concentraciones urinarias de CD163s al debut de la enfermedad. Esta gran variabilidad en los niveles de CD163u al diagnóstico posiblemente condiciona la dificultad para establecer un valor absoluto como punto de corte que pueda ser reproducible en otras poblaciones para el diagnóstico de vasculitis renal. Sin embargo, el CD162u demostró ser un excelente marcador de actividad vasculítica en nuestro estudio. Los pacientes con niveles más elevados de CD163su al diagnóstico presentaron una mayor pérdida de función renal al debut, así como una tendencia a tener mayor proteinuria y microhematuria en nuestro estudio. Por tanto, las concentraciones de CD163su se asociaron con una mayor severidad del daño renal al diagnóstico. Este hecho resulta de gran interés puesto que la concentración de CD163su

podría identificar un subgrupo de pacientes con un curso más agresivo de la vasculitis en los que se podrían implementar medidas terapéuticas específicas.

7.4. CD163s urinario como biomarcador de respuesta al tratamiento y remisión.

En nuestro estudio todos los pacientes que alcanzaron remisión tras el tratamiento experimentaron un descenso significativo en las concentraciones de CD163su. Por el contrario, los dos pacientes que no respondieron al tratamiento inmunosupresor mantuvieron niveles elevados, o incluso presentaron un aumento, de las concentraciones de CD163su. En los pacientes respondedores el descenso en las concentraciones de CD163su se produjo en todos los casos en los tres primeros meses tras el inicio del tratamiento inmunosupresor. Algunos pacientes respondedores alcanzaron títulos indetectables de CD163su en los primeros seis meses tras el tratamiento, frente a otros pacientes que, a pesar de experimentar una reducción significativa, mantuvieron bajas concentraciones de CD163su de forma persistente tras el tratamiento. Sin embargo, no encontramos ninguna asociación clínica con la negativización del título de CD163su, y la persistencia de títulos positivos mantenido en el tiempo tampoco se asoció con diferente pronóstico.

Por lo tanto, el presente estudio demuestra que el CD163su podría servir como biomarcador para monitorizar la respuesta al tratamiento en los pacientes con vasculitis. La ausencia de descenso en los niveles de CD163su tras tres meses de tratamiento sería indicativo de refractariedad al tratamiento. En estos pacientes que presentan títulos elevados o que muestran incremento en los niveles de CD163su en los primeros tres meses tras el diagnóstico se podría plantear un cambio en el esquema inmunosupresor con objeto

de controlar mejor la enfermedad. Por otra parte, los títulos de CD163su también ayudarían a tomar decisiones terapéuticas en los pacientes con vasculitis renal que debutan con fallo renal severo dependiente de diálisis y que presentan un pobre pronóstico renal. En este subgrupo de enfermos no está claramente definido cuando se debe suspender el tratamiento inmunosupresor, y muchos autores recomiendan no prolongarlo más allá de tres meses si no existe ninguna evidencia de recuperación de funcionalidad renal, dado que un tratamiento más prolongado resulta fútil e implica un aumento de la morbilidad y de las complicaciones infecciosas (129,130). En estos pacientes la ausencia de una reducción en las concentraciones de CD163su en los primeros tres meses apoyaría la decisión de suspender precozmente el tratamiento inmunosupresor, evitando toxicidad innecesaria. Por el contrario, en aquellos casos que sí mostrasen un descenso progresivo en los niveles de CD163su, a pesar de estar dependientes de diálisis, se podría plantear, tras individualizar el riesgo-beneficio en cada paciente, mantener la terapia inmunosupresora durante un tiempo más prolongado.

En relación al tipo de tratamiento inmunosupresor, los pacientes con mayor deterioro función renal al diagnóstico fueron tratados en el estudio con más frecuencia con un esquema basado en ciclofosfamida. Por lo tanto, resulta difícil extraer datos sobre la respuesta al tratamiento en función del esquema inmunosupresor empleado. Sin embargo, se observó un patrón diferente en el descenso de los niveles de CD163su entre los pacientes tratados con ciclofosfamida y aquellos que recibieron rituximab. Los pacientes con ciclofosfamida presentaron un descenso más rápido y pronunciado de los niveles de CD163su. Este descenso se produjo en el primer mes tras inicio del tratamiento en todos los casos. Por el contrario, en los pacientes tratados con rituximab el descenso en las

concentraciones de CD163su se produjo de forma más lenta y progresiva. De hecho, un subgrupo de pacientes tratados con rituximab experimentaron una elevación transitoria de los niveles de CD163su durante el primer mes tras el diagnóstico, mostrando posteriormente un descenso gradual de las concentraciones, sin que esto implicase una ausencia de respuesta al tratamiento ni un pronóstico renal distinto. Estas diferencias en los cambios de CD163su en los tres primeros meses según el esquema terapéutico empleado podrían tener su justificación en los diferentes mecanismos de acción de los inmunosupresores. Mientras que el rituximab es un anticuerpo monoclonal selectivo contra el CD20, que inhibe exclusivamente la formación y respuesta inmune de los linfocitos B, la ciclofosfamida es un agente alquilante que no sólo afecta a la proliferación linfocitaria, sino que entre otros efectos inhibe también la actividad de los macrófagos (123,131,132). Por tanto, este mecanismo de modulación directa de la acción de los macrófagos por parte de la ciclofosfamida podría justificar el rápido descenso en los niveles urinarios de CD163su que experimentan los pacientes tratados con dicho fármaco en comparación con los tratados con rituximab. Aunque tendría que ser confirmado mediante estudios histológicos, es posible que la ciclofosfamida reduzca el infiltrado de macrófagos en los pacientes con vasculitis. Por el contrario, el rituximab, que inhibe el daño vasculítico mediante la supresión de los linfocitos B, no tendría a priori un efecto directo sobre el infiltrado inflamatorio establecido. Estos hallazgos dan sustento fisiopatológico a las nuevas estrategias de inmunosupresión planteadas en los ensayos clínicos y que están basadas en la pauta de tratamiento habitual con rituximab a la que se asocia algunos pulsos de ciclofosfamida a dosis bajas sólo los primeros meses, obteniendo excelentes tasas de remisión en los estudios clínicos. Un ejemplo de ello es el reciente ensayo clínico "CYCLOWVAS" en el

que McAdoo y cols plantean un tratamiento basado en la pauta convencional de rituximab a la que asocian pulsos quincenales de 500 mg iv de ciclofosfamida hasta completar tres meses y una reducción rápida y suspensión precoz del tratamiento esteroideo (133). Con este esquema terapéutico obtienen tasas de remisión del 96% a los 6 meses, demostrando una reducción significativa del riesgo de recaída y progresión a ERCT en comparación con una cohorte histórica del grupo EUVAS tratada con un esquema basado en corticoides y ciclofosfamida. Igualmente, Pepper y cols han analizado recientemente este mismo esquema inmunosupresor basado en rituximab y dosis bajas de ciclofosfamida quincenal en una cohorte que incluía pacientes con fallo renal severo secundario a la vasculitis, obteniendo tasas de remisión excelentes, similares al estudio anterior, y reportando una baja incidencia de efectos adversos asociados al tratamiento (134).

7.5. CD163s urinario como biomarcador de recaída renal de vasculitis.

Hasta la fecha este es el primer trabajo longitudinal y prospectivo que tiene por objeto analizar el papel de CD163su como biomarcador de actividad y recaída. En el presente estudio hemos demostrado que el CD163su constituye un marcador fiable y preciso de recidiva renal en los pacientes con vasculitis. Todos los pacientes que presentaron una recaída de la enfermedad vasculítica durante el seguimiento experimentaron, coincidiendo con la recaída, una elevación significativa en la concentración del CD163su con respecto a sus valores previos. Un incremento absoluto de 20 ng/mmol o un incremento relativo del 20% con respecto a los valores previos de CD163su fue diagnóstico de recidiva renal con una sensibilidad y una especificidad del

100% y el 89,3%, respectivamente, para los cambios absolutos, y del 100% y del 87,5%, respectivamente, para los cambios relativos. En una enfermedad dinámica como ésta, parece razonable pensar que son las variaciones respecto a valores previos, los que mejor reflejan los cambios en la actividad de la enfermedad, más que umbrales estáticos. Este hecho constituye un cambio en el enfoque del estudio del CD163su como parámetro de actividad vasculítica, donde cada enfermo constituye su propio control y sólo una valoración dinámica de los cambios en las concentraciones urinarias aporta información relevante y fiable para diagnosticar actividad renal de la vasculitis. Algo parecido ocurre con los ANCA, cuya titulación aislada no supone ningún valor añadido en el seguimiento de los pacientes con VAA, sino que son los cambios que se producen con respecto a los valores previos, como la positivización cuando son previamente negativos, o el aumento progresivo de los títulos, los que pueden tener trascendencia clínica.

De manera interesante, en uno de los pacientes con recidiva, la elevación del CD163su se produjo tres meses antes de que objetivase la microhematuria o el deterioro de la función renal, y precediendo, por tanto, al síndrome clínico. Este hecho es concordante con los estudios realizados en los modelos animales, anteriormente mencionados, donde observaron que la concentración urinaria máxima del CD163su se producía al mes tras la inmunización con los anticuerpos MPO, y mucho antes de que se demostrasen las lesiones histológicas características en la biopsia renal (119). Por lo tanto, es posible que el CD163su sea además un biomarcador precoz del daño vasculítico renal. Este hecho resulta de gran interés ya que permitiría la realización de un seguimiento más estrecho, incluso anticipar tratamiento, en aquellos enfermos en los que se produjesen cambios significativos en las concentraciones urinarias de CD163su y que todavía no hubiesen desarrollado el

síndrome renal. Sin embargo, el diseño de nuestro estudio, dónde las determinaciones de CD163su se realizaron trimestralmente, no ha permitido demostrar esta elevación precoz del CD163su en todos los pacientes, y posiblemente en la práctica clínica habitual, donde el seguimiento de los pacientes es más errático, sea igualmente dificultoso realizar un diagnóstico precoz del brote.

7.6. Comparación del CD163s con otros biomarcadores de actividad vasculítica.

Dada la limitación de los marcadores inflamatorios clásicos, como la proteína C reactiva o la velocidad de sedimentación glomerular, en los últimos años numerosos estudios han tratado de identificar nuevos biomarcadores que permitan monitorizar la actividad vasculítica en los pacientes con afectación renal. Los ANCA son útiles para el diagnóstico de la VAA, cuando se combinan con datos clínicos y patológicos compatibles (105). Sin embargo, son menos útiles cuando se evalúa la actividad de la enfermedad en pacientes con un diagnóstico de vasculitis ya establecido o como predictores de recaídas (106). Además, hay que tener en cuenta que hasta un 15-20% las vasculitis con afectación renal son ANCA negativo. Los metanálisis que han analizado el papel de los ANCA como biomarcador han demostrado únicamente que la elevación de los títulos durante el seguimiento o su positividad se asocia, de manera débil, con el desarrollo posterior de una recaída (108,109,135). Tomasson y cols observaron una probabilidad positiva pretest para el desarrollo futuro de una recaída vasculítica de 2,84 (95%; IC 1,65-4,90) en los sujetos que experimentaban un incremento en el título de ANCA, siendo esta menor en los pacientes que mantienen ANCA persistentemente positivos. (probabilidad positiva pretest

de 1.93 (95%; IC: 1.41-2.66) (108). Y no siempre que existe una recaída renal, esta se acompaña de una positivización en los ANCA. Actualmente el tratamiento inmunosupresor con rituximab es el que ha demostrado mejores resultados como terapia de mantenimiento de pacientes vasculitis renal, y es en estos casos, posiblemente condicionado por el efecto directo del fármaco sobre la producción de anticuerpos, donde más frecuentemente se ha observado la presencia de recaídas renales sin positivización de ANCA. Un ejemplo de ello lo constituye el reciente ensayo clínico "MAINRITSAN2", que analiza una terapia de mantenimiento basada en la administración de rituximab semestral, donde observaron una tasa de recaídas del 13,7%, y de ellas, el 50%, se produjeron con títulos de ANCA indetectables (136).

Por lo tanto, los ANCA constituyen un parámetro insuficiente para guiar decisiones en relación a cambios en el tratamiento en los pacientes con vasculitis renal. En líneas generales, los biomarcadores que hasta la fecha han demostrado mayor precisión y correlación con la actividad vasculítica son fundamentalmente moléculas implicadas en el proceso de activación de los macrófagos, como la calprotectina, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y el CD163 (128). Esto pone nuevamente de relieve la importancia del papel patogénico de estas células como efectoras en el proceso vasculítico. La MCP-1 es producida por las células renales y leucocitos en respuesta a estímulos inflamatorios actuando como factor quimiotáctico de los monocitos. y la calprotectina es expresada en los macrófagos indiferenciados y desarrolla un papel proinflamatorio en el endotelio y los fagocitos a través del receptor toll-like tipo 4. Por lo tanto, todas estas moléculas traducen, a diferente nivel, la activación y diferenciación de los macrófagos que ocurre durante el brote vasculítico.

La proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), , ha mostrado niveles elevados en orina en pacientes con vasculitis renal activa en comparación con controles sanos, vasculitis inactiva y pacientes con vasculitis activa sin afectación renal (99,128). Al igual que el CD163su, en los estudios del MCP-1 no observaron diferencias en las concentraciones séricas de esta proteína, indicando, por tanto, que su expresión urinaria depende exclusivamente del grado de infiltración y activación de los macrófagos en el tejido renal, y no de otros factores sistémicos relacionados con el proceso vasculítico. En estos trabajos el MCP-1 demostró ser capaz de discriminar vasculitis renal activa con una sensibilidad y especificidad elevadas (89% y 94% respectivamente), similares a las observadas en los estudios del CD163su. Por lo tanto, CD163su y MCP-1 constituyen hasta la fecha los únicos biomarcadores específicos de actividad renal, y de ahí su relevancia en la monitorización de los pacientes con VAA y afectación renal secundaria. En uno de los pacientes del estudio de Tam y cols. el aumento de los niveles urinarios de MCP-1 se asoció con progresión a insuficiencia renal terminal a pesar del tratamiento inmunosupresor (25). Esta ausencia de descenso en las concentraciones tras el tratamiento en los pacientes no respondedores fue observada igualmente con el CD163u en nuestro estudio. Por lo tanto, MCP1 y CD163su muestran un comportamiento similar tras el tratamiento. Sin embargo, a diferencia del CD163su, todavía ningún trabajo ha analizado el papel de la MCP-1 como biomarcador de recaída en el seguimiento de los pacientes con vasculitis renal. Por otra parte, la MCP-1 tiene la limitación de ser una proteína con poca estabilidad y que se degrada muy rápidamente. Esto supone que variaciones en los tiempos de extracción y procesamiento de las muestras podrían condicionar cambios en la determinación de este biomarcador. A diferencia de la MCP-1, el CD163su es una proteína

muy estable que puede permanecer invariable durante una semana en plasma a 4° C de temperatura o en orina a temperatura ambiente (22). Esta mayor estabilidad supone una ventaja adicional en el posicionamiento del CD163su como biomarcador de actividad vasculítica.

La calprotectina en suero se había postulado como un firme candidato para la monitorización la actividad vasculítica en pacientes con VAA (116). Al igual que ocurre con el CD163su, Pepper y cols demostraron que se produce un descenso significativo de los niveles séricos de calprotectina en los primeros seis meses tras el tratamiento inmunosupresor. Sin embargo, este descenso en las concentraciones fue menor entre los pacientes que presentaron una recaída posterior y aquellos que no la desarrollaron. De tal forma que los niveles séricos de calprotectina permitían identificar un subgrupo de enfermos ANCA-PR3 que presentaban una mayor susceptibilidad para el desarrollo de recaída posterior; aquellos pacientes que mostraban un incremento en las concentraciones de calprotectina al sexto mes con respecto a las concentraciones basales, asociaban mayor probabilidad de presenta recaída al mes 18 (HR; 1.76 (IC 1.1–2.83; p: 0,009). Sin embargo, estos hallazgos sólo los pudieron corroborar en la población de pacientes tratados con rituximab, sin que se observasen cambios significativos en las concentraciones de calprotectina en los pacientes que presentaban una recaída bajo tratamiento con ciclofosfamida y azatioprina. Y si bien los niveles del calprotectina sérica al debut se asociaban con el puntaje del score BVAS, esta correlación entre el biomarcador y la actividad vasculítica se perdía durante el seguimiento. Por otra parte, un estudio reciente ha observado que aquellos pacientes que presentan concentraciones urinarias más elevados de calprotectina al debut de la enfermedad asocian peor función renal, más hematuria y

presencia persistente de títulos elevados de ANCA durante el seguimiento, sugiriendo que esta proteína pueda ser un marcador de actividad subclínica vasculítica. Sin embargo, en este estudio no se observaron concentraciones más elevadas de calprotectina urinaria entre los pacientes que presentaban una recaída vasculítica, quedando, por tanto, limitado el papel de esta molécula como biomarcador de recaída renal, y hasta la fecha no se han podido definir puntos de corte precisos que permitan identificar actividad vasculítica subyacente.

7.7. Limitaciones y fortalezas del estudio.

La principal limitación del estudio es el número de pacientes incluidos en el mismo. Al tratarse de un estudio prospectivo, longitudinal y ser la vasculitis renal una patología de escasa prevalencia, resulta difícil conseguir un número elevado de pacientes, a pesar de tratarse de un estudio multicéntrico. Adicionalmente la tasa de recaídas en nuestra serie fue baja, inferior a lo descrito a la literatura, posiblemente condicionada por la alta prevalencia de vasculitis limitada al riñón en nuestro medio y la ausencia de un seguimiento prolongado tras finalizar la inmunosupresión de mantenimiento en muchos de los pacientes. Como se ha mencionado previamente, los pacientes incluidos en el estudio pertenecen a cuatro centros diferentes en los que, si bien las pautas de tratamiento son similares, dichos tratamientos no se encuentran estandarizados.

Sin embargo, el estudio también cuenta con importantes fortalezas. Su diseño prospectivo ha permitido estudiar la evolución longitudinal de los niveles de CD163su en una cohorte de pacientes con vasculitis, siendo el primer estudio de estas características.

Todos los enfermos incluidos en el estudio cuentan con un diagnóstico histológico de la vasculitis y un seguimiento clínico y analítico estrecho cada tres meses que incluye determinaciones de ANCA y otros marcadores inflamatorios. Por otra parte, el hecho de haber empleado variables relevantes (remisión, desarrollo de recaída, progresión a enfermedad renal crónica terminal) como objetivo del estudio contribuye, sin duda, a la solidez del mismo.

En resumen, el presente estudio demuestra que el CD163su es un excelente biomarcador de actividad vasculítica, respuesta al tratamiento y recaída renal en pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA. Los pacientes con brote renal de vasculitis incluidos en el estudio mostraron al diagnóstico unos niveles elevados de CD163su, y estos decrecieron progresivamente tras el tratamiento en todos los pacientes que alcanzaron remisión, mientras que permanecieron elevados a pesar del tratamiento cuando no existió respuesta al mismo. En todos los pacientes que presentaron recaída renal se produjo una elevación significativa de las concentraciones de CD163su con respecto a los valores previos. Un incremento absoluto de 20 ng/mmol o un incremento relativo del 20% con respecto a las concentraciones previas de CD163su permitió discriminar la presencia de recaída renal de la vasculitis con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 89,3% y 87,5%, respectivamente. El AUC del cambio absoluto y relativo de las concentraciones de CD163u con respecto al valor previo para discriminar una recaída renal fue de 0.9679 (95% IC: 0.915-1.00; $p=0.001$) y 0.9571 (95%; IC 0.9032-1.00, $p=0.001$), respectivamente. Las concentraciones urinarias de CD163su se correlacionaron con el valor del score BVAS al sexto mes ($r=0.737$, $p=0.006$) y al doceavo mes ($r=0.804$, $p=0.005$), demostrando la capacidad del CD163su para monitorizar actividad vasculítica. Estos hallazgos posicionan

al CD163su como un biomarcador fiable y preciso para monitorizar la respuesta al tratamiento, identificar actividad vasculítica residual y diagnosticar la presencia de recaídas renales durante el seguimiento de pacientes con VAA, abriendo la puerta su empleo de forma rutinaria en la práctica clínica.

8. CONCLUSIONES

- Los pacientes con un brote de VAA con afectación renal presentan un incremento significativo en la concentración urinaria de CD163s con respecto a controles sanos y pacientes con VAA en remisión.
- Aquellos pacientes con niveles de CD163su más elevados al diagnóstico de la vasculitis asocian una mayor severidad del daño renal, consistente en menor filtrado glomerular y mayor proteinuria y microhematuria, sin que ello se traduzca en un peor pronóstico renal.
- Los pacientes con VAA que alcanzan remisión tras el tratamiento inmunosupresor presentan una reducción progresiva en las concentraciones de CD163su en los primeros seis meses tras el tratamiento.
- Aquellos pacientes con vasculitis renal que no responden al tratamiento no muestran descenso en las concentraciones de CD163su en los tres primeros meses tras el debut de la enfermedad.
- Los pacientes que desarrollan una recaída renal de la vasculitis experimentan un incremento significativo en las concentraciones de CD163su. Un incremento absoluto de 20 ng/mmol o un incremento relativo del 20% con respecto a los valores previos de CD163su fue diagnóstico de recidiva renal con una sensibilidad del 100%, y una especificidad del 89,3% para los cambios absolutos y del 87,5% para los cambios relativos.

- Las concentraciones urinarias de CD163s se correlacionaron con la puntuación del score BVAS durante el primer año de seguimiento de los pacientes con VAA y afectación renal, demostrando la capacidad del CD163su para monitorizar actividad vasculítica.

9. Bibliografía

1. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* febrero de 1994;37(2):187-92.
2. Jennette JC, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *N Engl J Med.* 20 de noviembre de 1997;337(21):1512-23.
3. Jennette JC. Overview of the 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Clin Exp Nephrol.* octubre de 2013;17(5):603-6.
4. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* enero de 2013;65(1):1-11.
5. Villiger PM, Guillevin L. Microscopic polyangiitis: Clinical presentation. *Autoimmun Rev.* octubre de 2010;9(12):812-9.
6. Berti A, Dejaco C. Update on the epidemiology, risk factors, and outcomes of systemic vasculitides. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018;32(2):271-94.
7. Karras A. Microscopic Polyangiitis: New Insights into Pathogenesis, Clinical Features and Therapy. *Semin Respir Crit Care Med.* 2018;39(4):459-64.
8. Nasser M, Cottin V. Alveolar Hemorrhage in Vasculitis (Primary and Secondary). *Semin Respir Crit Care Med.* 2018;39(4):482-93.
9. Nasser M, Cottin V. The Respiratory System in Autoimmune Vascular Diseases. *Respiration.* 2018;96(1):12-28.
10. Frumholtz L, Laurent-Roussel S, Aumaître O, Maurier F, Le Guenno G, Carlotti A, et al. Clinical and pathological significance of cutaneous manifestations in ANCA-associated vasculitides. *Autoimmun Rev.* noviembre de 2017;16(11):1138-46.
11. Anderson E, Gakhar N, Stull C, Caplan L. Gastrointestinal and Hepatic Disease in Vasculitis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2018;44(1):1-14.
12. Magnus T, Melms A, Kötter I, Holle JU. [Neurological manifestations of vasculitis and primary central nervous system vasculitis]. *Z Rheumatol.* septiembre de 2012;71(7):551-63.
13. Holle JU, Gross WL, Latza U, Nölle B, Ambrosch P, Heller M, et al. Improved outcome in 445 patients with Wegener's granulomatosis in a German vasculitis center over four decades. *Arthritis Rheum.* enero de 2011;63(1):257-66.

14. Trimarchi M, Sinico RA, Teggi R, Bussi M, Specks U, Meroni PL. Otorhinolaryngological manifestations in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Autoimmun Rev.* febrero de 2013;12(4):501-5.
15. Beltrán Rodríguez-Cabo O, Reyes E, Rojas-Serrano J, Flores-Suárez LF. Increased histopathological yield for granulomatosis with polyangiitis based on nasal endoscopy of suspected active lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* febrero de 2018;275(2):425-9.
16. Comarmond C, Cacoub P. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): clinical aspects and treatment. *Autoimmun Rev.* noviembre de 2014;13(11):1121-5.
17. Haller H, Eichhorn J, Pieper K, Göbel U, Luft FC. Circulating leukocyte integrin expression in Wegener's granulomatosis. *J Am Soc Nephrol.* enero de 1996;7(1):40-8.
18. Cocho L, Gonzalez-Gonzalez LA, Molina-Prat N, Doctor P, Sainz-de-la-Maza M, Foster CS. Scleritis in patients with granulomatosis with polyangiitis (Wegener). *Br J Ophthalmol.* agosto de 2016;100(8):1062-5.
19. Kubaisi B, Abu Samra K, Foster CS. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's disease): An updated review of ocular disease manifestations. *Intractable Rare Dis Res.* mayo de 2016;5(2):61-9.
20. Greco A, Marinelli C, Fusconi M, Macri GF, Gallo A, De Virgilio A, et al. Clinic manifestations in granulomatosis with polyangiitis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* junio de 2016;29(2):151-9.
21. Chen Z, Miao Y, Wu H, Wang R, Zhou Z, Zhang S, et al. Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Negative Central Nervous System Granulomatosis With Polyangiitis and Its Clinical Characteristics. *J Craniofac Surg.* marzo de 2018;29(2):449-51.
22. Zheng Y, Zhang Y, Cai M, Lai N, Chen Z, Ding M. Central Nervous System Involvement in ANCA-Associated Vasculitis: What Neurologists Need to Know. *Front Neurol.* 2018;9:1166.
23. Lionaki S, Blyth ER, Hogan SL, Hu Y, Senior BA, Jennette CE, et al. Classification of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitides: the role of antineutrophil cytoplasmic autoantibody specificity for myeloperoxidase or proteinase 3 in disease recognition and prognosis. *Arthritis Rheum.* octubre de 2012;64(10):3452-62.
24. Mouthon L, Dunogue B, Guillevin L. Diagnosis and classification of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (formerly named Churg-Strauss syndrome). *J Autoimmun.* marzo de 2014;48-49:99-103.
25. Nguyen Y, Guillevin L. Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis (Churg-Strauss). *Semin Respir Crit Care Med.* 2018;39(4):471-81.

26. Hokama A, Kishimoto K, Ihama Y, Kobashigawa C, Nakamoto M, Hirata T, et al. Endoscopic and radiographic features of gastrointestinal involvement in vasculitis. *World J Gastrointest Endosc.* 16 de marzo de 2012;4(3):50-6.
27. Zekić T. Cardiac involvement in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatol Int.* 2018;38(4):705-6.
28. Reynolds TD, Armstrong C, Ramanan AV. Cardiac involvement as a presenting feature of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis in childhood. *Clin Exp Rheumatol.* abril de 2017;35 Suppl 103(1):225.
29. Watts RA, Robson J. Introduction, epidemiology and classification of vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018;32(1):3-20.
30. Diaz-Crespo F, Villacorta J, Acevedo M, Caverio T, Guerrero C, García Díaz E, et al. The predictive value of kidney biopsy in renal vasculitis: a multicenter cohort study. *Hum Pathol.* 2016;52:119-27.
31. Jennette JC, Nachman PH. ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 6 de octubre de 2017;12(10):1680-91.
32. de Joode AAE, Sanders JSF, Stegeman CA. Renal survival in proteinase 3 and myeloperoxidase ANCA-associated systemic vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol.* octubre de 2013;8(10):1709-17.
33. Göçeroğlu A, Berden AE, Fiocco M, Floßmann O, Westman KW, Ferrario F, et al. ANCA-Associated Glomerulonephritis: Risk Factors for Renal Relapse. *PLoS ONE.* 2016;11(12):e0165402.
34. Geetha D, Jin Q, Scott J, Hruskova Z, Hanouneh M, Little MA, et al. Comparisons of Guidelines and Recommendations on Managing Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Kidney Int Rep.* septiembre de 2018;3(5):1039-49.
35. Yates M, Watts RA, Bajema IM, Cid MC, Crestani B, Hauser T, et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* septiembre de 2016;75(9):1583-94.
36. Pagnoux C, Hogan SL, Chin H, Jennette JC, Falk RJ, Guillevin L, et al. Predictors of treatment resistance and relapse in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis: comparison of two independent cohorts. *Arthritis Rheum.* septiembre de 2008;58(9):2908-18.
37. Hogan SL, Falk RJ, Chin H, Cai J, Jennette CE, Jennette JC, et al. Predictors of relapse and treatment resistance in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis. *Ann Intern Med.* 1 de noviembre de 2005;143(9):621-31.

38. Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, Holle JU, Watts RA, Jayne DRW, et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*. 19 de julio de 2012;367(3):214-23.
39. Xie G, Roshandel D, Sherva R, Monach PA, Lu EY, Kung T, et al. Association of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) with HLA-DPB1*04 and SEMA6A gene variants: evidence from genome-wide analysis. *Arthritis Rheum*. septiembre de 2013;65(9):2457-68.
40. Rahmattulla C, Mooyaart AL, van Hooven D, Schoones JW, Bruijn JA, Dekkers OM, et al. Genetic variants in ANCA-associated vasculitis: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. septiembre de 2016;75(9):1687-92.
41. Kawasaki A, Hasebe N, Hidaka M, Hirano F, Sada K-E, Kobayashi S, et al. Protective Role of HLA-DRB1*13:02 against Microscopic Polyangiitis and MPO-ANCA-Positive Vasculitides in a Japanese Population: A Case-Control Study. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0154393.
42. Pearce FA, Craven A, Merkel PA, Luqmani RA, Watts RA. Global ethnic and geographic differences in the clinical presentations of anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 01 de 2017;56(11):1962-9.
43. Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DRW, Scott DGI, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatology (Oxford)*. octubre de 2011;50(10):1916-20.
44. Watts RA, Scott DGI. ANCA vasculitis: to lump or split? Why we should study MPA and GPA separately. *Rheumatology (Oxford)*. diciembre de 2012;51(12):2115-7.
45. Cao Y, Yang J, Colby K, Hogan SL, Hu Y, Jennette CE, et al. High basal activity of the PTPN22 gain-of-function variant blunts leukocyte responsiveness negatively affecting IL-10 production in ANCA vasculitis. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e42783.
46. Relle M, Föhr B, Fasola F, Schwarting A. Genetics and pathophysiology of granulomatosis with polyangiitis (GPA) and its main autoantigen proteinase 3. *Mol Cell Probes*. 2016;30(6):366-73.
47. Gómez-Puerta JA, Gedmintas L, Costenbader KH. The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev*. octubre de 2013;12(12):1129-35.
48. Yashiro M, Muso E, Itoh-Ihara T, Oyama A, Hashimoto K, Kawamura T, et al. Significantly high regional morbidity of MPO-ANCA-related angitis and/or nephritis with respiratory tract involvement after the 1995 great earthquake in Kobe (Japan). *Am J Kidney Dis*. mayo de 2000;35(5):889-95.

49. Takeuchi Y, Saito A, Ojima Y, Kagaya S, Fukami H, Sato H, et al. The influence of the Great East Japan earthquake on microscopic polyangiitis: A retrospective observational study. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0177482.
50. Farquhar HJ, McGettigan B, Chapman PT, O'Donnell JL, Frampton C, Stamp LK. Incidence of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis before and after the February 2011 Christchurch Earthquake. *Intern Med J*. enero de 2017;47(1):57-61.
51. Popa ER, Stegeman CA, Abdulahad WH, van der Meer B, Arends J, Manson WM, et al. Staphylococcal toxic-shock-syndrome-toxin-1 as a risk factor for disease relapse in Wegener's granulomatosis. *Rheumatology (Oxford)*. junio de 2007;46(6):1029-33.
52. Xu P-C, Cui Z, Chen M, Hellmark T, Zhao M-H. Comparison of characteristics of natural autoantibodies against myeloperoxidase and anti-myeloperoxidase autoantibodies from patients with microscopic polyangiitis. *Rheumatology (Oxford)*. julio de 2011;50(7):1236-43.
53. New insights that link microbes with the generation of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: the theory of autoantigen complementarity. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 17 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=New+insights+that+link+microbes+with+the+generation+of+antineutrophil+cytoplasmic+autoantibodies%3A+the+theory+of+autoantigen+complementarity>.
54. Roth AJ, Ooi JD, Hess JJ, van Timmeren MM, Berg EA, Poulton CE, et al. Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *J Clin Invest*. abril de 2013;123(4):1773-83.
55. Olson SW, Owshalimpur D, Yuan CM, Arbogast C, Baker TP, Oliver D, et al. Relation between asymptomatic proteinase 3 antibodies and future granulomatosis with polyangiitis. *Clin J Am Soc Nephrol*. agosto de 2013;8(8):1312-8.
56. Little MA, Smyth CL, Yadav R, Ambrose L, Cook HT, Nourshargh S, et al. Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo. *Blood*. 15 de septiembre de 2005;106(6):2050-8.
57. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest*. 1 de octubre de 2002;110(7):955-63.
58. Huugen D, Xiao H, van Esch A, Falk RJ, Peutz-Kootstra CJ, Buurman WA, et al. Aggravation of anti-myeloperoxidase antibody-induced glomerulonephritis by bacterial lipopolysaccharide: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol*. julio de 2005;167(1):47-58.

59. Arimura Y, Minoshima S, Kamiya Y, Tanaka U, Nakabayashi K, Kitamoto K, et al. Serum myeloperoxidase and serum cytokines in anti-myeloperoxidase antibody-associated glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* noviembre de 1993;40(5):256-64.
60. Berger SP, Seelen MA, Hiemstra PS, Gerritsma JS, Heemskerk E, van der Woude FJ, et al. Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol.* mayo de 1996;7(5):694-701.
61. Mulder AH, Heeringa P, Brouwer E, Limburg PC, Kallenberg CG. Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a Fc gamma RII-dependent process. *Clin Exp Immunol.* noviembre de 1994;98(2):270-8.
62. Brouwer E, Huitema MG, Mulder AH, Heeringa P, van Goor H, Tervaert JW, et al. Neutrophil activation in vitro and in vivo in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* abril de 1994;45(4):1120-31.
63. Dolman KM, Stegeman CA, van de Wiel BA, Hack CE, von dem Borne AE, Kallenberg CG, et al. Relevance of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (C-ANCA)-mediated inhibition of proteinase 3-alpha 1-antitrypsin complexation to disease activity in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol.* septiembre de 1993;93(3):405-10.
64. Ewert BH, Jennette JC, Falk RJ. Anti-myeloperoxidase antibodies stimulate neutrophils to damage human endothelial cells. *Kidney Int.* febrero de 1992;41(2):375-83.
65. Grayson PC, Kaplan MJ. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* febrero de 2016;99(2):253-64.
66. Hurtado PR, Jeffs L, Nitschke J, Patel M, Sarvestani G, Cassidy J, et al. CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. *BMC Immunol.* 14 de julio de 2008;9:34.
67. Söderberg D, Segelmark M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front Immunol* [Internet]. 30 de junio de 2016 [citado 19 de febrero de 2019];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928371/>
68. Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, et al. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* noviembre de 2012;64(11):3779-87.
69. Wada N, Mukai M, Kohno M, Notoya A, Ito T, Yoshioka N. Prevalence of serum anti-myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) in patients with

- Graves' disease treated with propylthiouracil and thiamazole. *Endocr J.* junio de 2002;49(3):329-34.
70. Lee E, Hirouchi M, Hosokawa M, Sayo H, Kohno M, Kariya K. Inactivation of peroxidases of rat bone marrow by repeated administration of propylthiouracil is accompanied by a change in the heme structure. *Biochem Pharmacol.* 1 de junio de 1988;37(11):2151-3.
 71. Flint SM, McKinney EF, Smith KGC. Emerging concepts in the pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Curr Opin Rheumatol.* marzo de 2015;27(2):197-203.
 72. Abdulahad WH, Lamprecht P, Kallenberg CGM. T-helper cells as new players in ANCA-associated vasculitides. *Arthritis Res Ther.* 23 de agosto de 2011;13(4):236.
 73. Chavele K-M, Shukla D, Ketepe-Arachi T, Seidel JA, Fuchs D, Pusey CD, et al. Regulation of myeloperoxidase-specific T cell responses during disease remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: the role of Treg cells and tryptophan degradation. *Arthritis Rheum.* mayo de 2010;62(5):1539-48.
 74. Lamprecht P. Off balance: T-cells in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. *Clin Exp Immunol.* agosto de 2005;141(2):201-10.
 75. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-58.
 76. Müller A, Trabandt A, Gloeckner-Hofmann K, Seitzer U, Csernok E, Schönermarck U, et al. Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression. *J Pathol.* septiembre de 2000;192(1):113-20.
 77. Balding CE, Howie AJ, Drake-Lee AB, Savage CO. Th2 dominance in nasal mucosa in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol.* agosto de 2001;125(2):332-9.
 78. Lintermans LL, Stegeman CA, Heeringa P, Abdulahad WH. T cells in vascular inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2014;5:504.
 79. Kallenberg CGM, Heeringa P. Complement is crucial in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int.* enero de 2013;83(1):16-8.
 80. Salama AD, Little MA. Animal models of ANCA associated vasculitis. *Curr Opin Rheumatol.* enero de 2012;24(1):1-7.
 81. Chen M, Jayne DRW, Zhao M-H. Complement in ANCA-associated vasculitis: mechanisms and implications for management. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(6):359-67.

82. Camous L, Roumenina L, Bigot S, Brachemi S, Frémeaux-Bacchi V, Lesavre P, et al. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood*. 27 de enero de 2011;117(4):1340-9.
83. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. febrero de 2009;20(2):289-98.
84. Coughlan AM, Freeley SJ, Robson MG. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol*. septiembre de 2012;169(3):229-37.
85. Tesar V, Hruskova Z. Avacopan in the treatment of ANCA-associated vasculitis. *Expert Opin Investig Drugs*. mayo de 2018;27(5):491-6.
86. Jayne DRW, Bruchfeld AN, Harper L, Schaier M, Venning MC, Hamilton P, et al. Randomized Trial of C5a Receptor Inhibitor Avacopan in ANCA-Associated Vasculitis. *J Am Soc Nephrol*. septiembre de 2017;28(9):2756-67.
87. Villacorta J, Diaz-Crespo F, Acevedo M, Caverio T, Guerrero C, Praga M, et al. Circulating C3 levels predict renal and global outcome in patients with renal vasculitis. *Clin Rheumatol*. noviembre de 2016;35(11):2733-40.
88. Molad Y, Tovar A, Ofer-Shiber S. Association of low serum complement C3 with reduced patient and renal survival in antimyeloperoxidase-associated small-vessel vasculitis. *Nephron Clin Pract*. 2014;126(1):67-74.
89. Manenti L, Vaglio A, Gnappi E, Maggiore U, Allegri L, Allinovi M, et al. Association of Serum C3 Concentration and Histologic Signs of Thrombotic Microangiopathy with Outcomes among Patients with ANCA-Associated Renal Vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 7 de diciembre de 2015;10(12):2143-51.
90. Villacorta J, Diaz-Crespo F, Acevedo M, Guerrero C, Campos-Martin Y, García-Díaz E, et al. Glomerular C3d as a novel prognostic marker for renal vasculitis. *Hum Pathol*. 2016;56:31-9.
91. Cheng L, Gou S-J, Qiu H-Y, Ma L, Fu P. Complement regulatory proteins in kidneys of patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol*. 2018;191(1):116-24.
92. Gou S-J, Yuan J, Wang C, Zhao M-H, Chen M. Alternative complement pathway activation products in urine and kidneys of patients with ANCA-associated GN. *Clin J Am Soc Nephrol*. noviembre de 2013;8(11):1884-91.
93. Ohlsson S, Bakoush O, Tencer J, Torffvit O, Segelmark M. Monocyte chemoattractant protein 1 is a prognostic marker in ANCA-associated small vessel vasculitis. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:584916.

94. Popat RJ, Hakki S, Thakker A, Coughlan AM, Watson J, Little MA, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies attenuate the monocyte response to LPS and shape macrophage development. JCI Insight [Internet]. [citado 19 de febrero de 2019];2(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256146/>
95. O'Brien EC, Abdulahad WH, Rutgers A, Huitema MG, O'Reilly VP, Coughlan AM, et al. Intermediate monocytes in ANCA vasculitis: increased surface expression of ANCA autoantigens and IL-1 β secretion in response to anti-MPO antibodies. Sci Rep. 7 de julio de 2015;5:11888.
96. Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW. Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis. Ann Rheum Dis. abril de 1999;58(4):237-45.
97. Wikman A, Fagergren A, Gunnar O, Johansson S, Lundahl J, Jacobson SH. Monocyte activation and relationship to anti-proteinase 3 in acute vasculitis. Nephrol Dial Transplant. septiembre de 2003;18(9):1792-9.
98. Wikman A, Lundahl J, Jacobson SH. Sustained monocyte activation in clinical remission of systemic vasculitis. Inflammation. diciembre de 2008;31(6):384-90.
99. Tam FWK, Sanders J-S, George A, Hammad T, Miller C, Dougan T, et al. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a marker of active renal vasculitis. Nephrol Dial Transplant. noviembre de 2004;19(11):2761-8.
100. Zhao L, David MZ, Hyjek E, Chang A, Meehan SM. M2 macrophage infiltrates in the early stages of ANCA-associated pauci-immune necrotizing GN. Clin J Am Soc Nephrol. 7 de enero de 2015;10(1):54-62.
101. Ferrario F, Rastaldi MP. Necrotizing-crescentic glomerulonephritis in ANCA-associated vasculitis: the role of monocytes. Nephrol Dial Transplant. julio de 1999;14(7):1627-31.
102. Villacorta J, Diaz-Crespo F, Gimenez Moyano S, Velasquez Villarroel M, Acevedo M, Garcia Bermejo L, et al. FP083DIFFERENCES IN CD163 MACROPHAGE INFILTRATION AMONG HISTOLOGICAL SUBCLASSES IN ANCA ASSOCIATED RENAL VASCULITIS AND ITS CLINICAL CORRELATION. Nephrology Dialysis Transplantation [Internet]. 13 de junio de 2019 [citado 20 de junio de 2019];34(Supplement_1). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz106.FP083>
103. Monach PA. Biomarkers in vasculitis. Curr Opin Rheumatol. enero de 2014;26(1):24-30.
104. Magrey MN, Villa-Forte A, Koenig CL, Myles JL, Hoffman GS. Persistent hematuria after induction of remission in Wegener granulomatosis: a therapeutic dilemma. Medicine (Baltimore). noviembre de 2009;88(6):315-21.

105. Finkielman JD, Lee AS, Hummel AM, Viss MA, Jacob GL, Homburger HA, et al. ANCA are detectable in nearly all patients with active severe Wegener's granulomatosis. *Am J Med.* julio de 2007;120(7):643.e9-14.
106. Rutgers A, Heeringa P, Damoiseaux JG, Tervaert JW. ANCA and anti-GBM antibodies in diagnosis and follow-up of vasculitic disease. *Eur J Intern Med.* agosto de 2003;14(5):287-95.
107. Birck R, Schmitt WH, Kaelsch IA, van der Woude FJ. Serial ANCA determinations for monitoring disease activity in patients with ANCA-associated vasculitis: systematic review. *Am J Kidney Dis.* enero de 2006;47(1):15-23.
108. Tomasson G, Grayson PC, Mahr AD, Lavalley M, Merkel PA. Value of ANCA measurements during remission to predict a relapse of ANCA-associated vasculitis--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford).* enero de 2012;51(1):100-9.
109. Kemna MJ, Damoiseaux J, Austen J, Winkens B, Peters J, van Paassen P, et al. ANCA as a predictor of relapse: useful in patients with renal involvement but not in patients with nonrenal disease. *J Am Soc Nephrol.* marzo de 2015;26(3):537-42.
110. Kain R, Matsui K, Exner M, Binder S, Schaffner G, Sommer EM, et al. A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *J Exp Med.* 1 de febrero de 1995;181(2):585-97.
111. Kain R, Tadema H, McKinney EF, Benharkou A, Brandes R, Peschel A, et al. High prevalence of autoantibodies to hLAMP-2 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol.* marzo de 2012;23(3):556-66.
112. Kain R, Rees AJ. What is the evidence for antibodies to LAMP-2 in the pathogenesis of ANCA associated small vessel vasculitis? *Curr Opin Rheumatol.* enero de 2013;25(1):26-34.
113. Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, Jayne DR, Jennette JC, Joh K, et al. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* octubre de 2010;21(10):1628-36.
114. Hao J, Wang C, Gou S-J, Zhao M-H, Chen M. The association between anti-plasminogen antibodies and disease activity in ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* febrero de 2014;53(2):300-6.
115. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 20 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Calprotectin+in+patients+with+systemic>

+lupus+erythematosus%3A+relation+to+clinical+and+laboratory+parameters+of+dise
ase+activity.+Lupus+1993%3B+2%3A+47%E2%80%93350.

116. Pepper RJ, Wang H-H, Rajakaruna GK, Papakrivopoulou E, Vogl T, Pusey CD, et al. S100A8/A9 (calprotectin) is critical for development of glomerulonephritis and promotes inflammatory leukocyte-renal cell interactions. *Am J Pathol.* mayo de 2015;185(5):1264-74.
117. Pepper RJ, Draibe JB, Caplin B, Fervenza FC, Hoffman GS, Kallenberg CGM, et al. Association of Serum Calprotectin (S100A8/A9) Level With Disease Relapse in Proteinase 3-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis & Rheumatology* (Hoboken, NJ). 2017;69(1):185-93.
118. Lieberthal JG, Cuthbertson D, Carette S, Hoffman GS, Khalidi NA, Koenig CL, et al. urinary biomarkers in relapsing antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *J Rheumatol.* mayo de 2013;40(5):674-83.
119. O'Reilly VP, Wong L, Kennedy C, Elliot LA, O'Meachair S, Coughlan AM, et al. Urinary Soluble CD163 in Active Renal Vasculitis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(9):2906-16.
120. Chen M, Kallenberg CGM. New advances in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol.* febrero de 2009;27(1 Suppl 52):S108-114.
121. Leatherwood C, Speyer CB, Feldman CH, D'Silva K, Gómez-Puerta JA, Hoover PJ, et al. Clinical characteristics and renal prognosis associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) and vascular injury in lupus nephritis biopsies. *Semin Arthritis Rheum.* 11 de junio de 2019;
122. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant.* 2018;18(2):293-307.
123. McClure M, Gopaluni S, Jayne D, Jones R. B cell therapy in ANCA-associated vasculitis: current and emerging treatment options. *Nat Rev Rheumatol.* octubre de 2018;14(10):580-91.
124. Draibe JB, Fulladosa X, Cruzado JM, Torras J, Salama AD. Current and novel biomarkers in anti-neutrophil cytoplasm-associated vasculitis. *Clin Kidney J.* agosto de 2016;9(4):547-51.
125. Herrada AA, Escobedo N, Iruretagoyena M, Valenzuela RA, Burgos PI, Cuitino L, et al. Innate Immune Cells' Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2019;10:772.

126. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 26 de abril de 2019;37:439-56.
127. Endo N, Tsuboi N, Furuhashi K, Shi Y, Du Q, Abe T, et al. Urinary soluble CD163 level reflects glomerular inflammation in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(12):2023-33.
128. Moran SM, Monach PA, Zgaga L, Cuthbertson D, Carette S, Khalidi NA, et al. Urinary soluble CD163 and monocyte chemoattractant protein-1 in the identification of subtle renal flare in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 31 de octubre de 2018;
129. Villacorta J, Diaz-Crespo F, Acevedo M, Caverio T, Guerrero C, Praga M, et al. Renal vasculitis presenting with acute kidney injury. *Rheumatol Int.* junio de 2017;37(6):1035-41.
130. Menez S, Hruskova Z, Scott J, Cormican S, Chen M, Salama AD, et al. Predictors of Renal Outcomes in Sclerotic Class Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody Glomerulonephritis. *Am J Nephrol.* 2018;48(6):465-71.
131. Furuta S, Jayne D. Emerging therapies in antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Curr Opin Rheumatol.* enero de 2014;26(1):1-6.
132. Clarkson AR, Robson JS. The effect of drugs on immunological renal disease. *Prog Biochem Pharmacol.* 1972;7:427-51.
133. McAdoo SP, Medjeral-Thomas N, Gopaluni S, Tanna A, Mansfield N, Galliford J, et al. Long-term follow-up of a combined rituximab and cyclophosphamide regimen in renal anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 1 de enero de 2019;34(1):63-73.
134. Pepper RJ, McAdoo SP, Moran SM, Kelly D, Scott J, Hamour S, et al. A novel glucocorticoid-free maintenance regimen for anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 1 de febrero de 2019;58(2):373.
135. Han WK, Choi HK, Roth RM, McCluskey RT, Niles JL. Serial ANCA titers: useful tool for prevention of relapses in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int.* marzo de 2003;63(3):1079-85.
136. Charles P, Terrier B, Perrodeau É, Cohen P, Faguer S, Huart A, et al. Comparison of individually tailored versus fixed-schedule rituximab regimen to maintain ANCA-associated vasculitis remission: results of a multicentre, randomised controlled, phase III trial (MAINRITSAN2). *Ann Rheum Dis.* agosto de 2018;77(8):1143-9.
137. Møller HJ, Tesar V, Little MA. Urine sCD163: a window onto glomerular inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(12):1970-2.