



El análisis integrado de perfiles proteómicos y metabolómicos circulantes en pacientes con lupus eritematoso sistémico permite identificar firmas moleculares asociadas al riesgo cardiovascular y la nefropatía lúpica

Tomás Cerdó Ráez¹, Laurel Woodridge², Carlos Perez-Sanchez¹, M Ángeles Aguirre-Zamorano¹, Anisur Rahman², Filipa Farinha², Rafaela Ortega Castro¹, Pedro Seguí¹, Ismael Sanchez-Pareja¹, Laura Muñoz-Barrera¹, Sagrario Corrales¹, Christian Merlo¹, Desiree Ruiz-Vilchez¹, M. Carmen Ábalos-Aguilera¹, Pilar Font, Nuria Barbarroja Puerto¹, Clementina López-Medina¹, Alejandro Escudero-Contreras¹, Elizabeth C Jury², Chary Lopez-Pedrerá¹

¹IMIBIC/Hospital Reina Sofía/Universidad de Córdoba

²Centre for Rheumatology Research, Division of Medicine, University College London, Londres, UK,



INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad multisistémica grave, cuyo diagnóstico y tratamiento continúan siendo un reto sustancial debido a su heterogeneidad.

El **objetivo** de este estudio fue caracterizar los perfiles proteómico y metabolómico en suero de pacientes LES, a fin de identificar nuevos biomarcadores asociados a patrones clínicos relevantes.

MÉTODOS

El estudio se ha desarrollado en 100 pacientes con LES y 19 donantes sanos (DS) procedentes del proyecto Precisesads, emparejados por edad y sexo.

Tabla 1. Perfiles clínicos de pacientes LES y donantes sanos incluidos en el estudio

Parámetros clínicos	Pacientes (n=100)	DS (n=19)	p
Mujer/Hombre	94/6	16/3	0.314
Duración de la enfermedad (media ± DS)	14.58 ± 11.16	-	-
Edad, años (media ± DS)	45.97 ± 13.57	46.68 ± 12.32	0.832
SLEDAI (media ± DS)	5.93 ± 6.80	-	-
Fumador, n (%)	24 (24.0)	5 (26.3)	1.000
Diabetes, n (%)	3 (3.0)	0 (0.0)	1.000
Obesidad, n (%)	9 (9.0)	3 (15.8)	0.627
Hipertensión, n (%)	23 (23.0)	1 (5.3)	0.146
Dislipemia, n (%)	37 (37.0)	-	-
Trombosis, n (%)	18 (18.0)	-	-
Nefritis lúpica, n (%)	34 (34.0)	-	-
Biopsia nefritis, n (%)	23 (23.0)	-	-
Análisis anormal orina, n (%)	34 (34.0)	-	-
Proteínas en orina, n (%)	31 (31.0)	-	-
Implicación del SNC, n (%)	13 (13.0)	-	-
Fenómeno de Raynaud, n (%)	47 (47.0)	-	-
Parámetros de laboratorio			
ANTI-DSDNA, n (%)	74 (74.0)	-	-
ANA, n (%)	97 (97.0)	-	-
Creatinina anormal, n (%)	7 (7.0)	-	-
Proteinuria, n (%)	7 (7.0)	-	-
C3 reducido, n (%)	50 (50.0)	-	-
C4 reducido, n (%)	44 (44.0)	-	-
Plaquetas reducidas, n (%)	25 (25.0)	-	-
Globulos blancos reducidos, n (%)	37 (37.0)	-	-
Leucopenia h, n (%)	46 (46.0)	-	-
Linfopenia h, n (%)	59 (59.0)	-	-
Artritis, n (%)	69 (69.0)	-	-
Anormal CRP ESR, n (%)	34 (34.0)	-	-
Complicaciones en el embarazo, n (%)	18 (18.0)	-	-
Tratamientos			
Estatinas, n (%)	12 (12.0)	-	-
Esteroides, n (%)	46 (46.0)	-	-
PDN, n (%)	60 (60.0)	-	-
ASA, n (%)	33 (33.0)	-	-
Inmunosupresores, n (%)	30 (30.0)	-	-
AZA, n (%)	19 (19.0)	-	-
MMF, n (%)	18 (18.0)	-	-
MTX, n (%)	9 (9.0)	-	-
Antimaláricos, n (%)	72 (72.0)	-	-
HC, n (%)	69 (69.0)	-	-
AINES, n (%)	12 (12.0)	-	-

1. ANÁLISIS DE CLÚSTER BASADO EN EL PERFIL PROTEICO DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

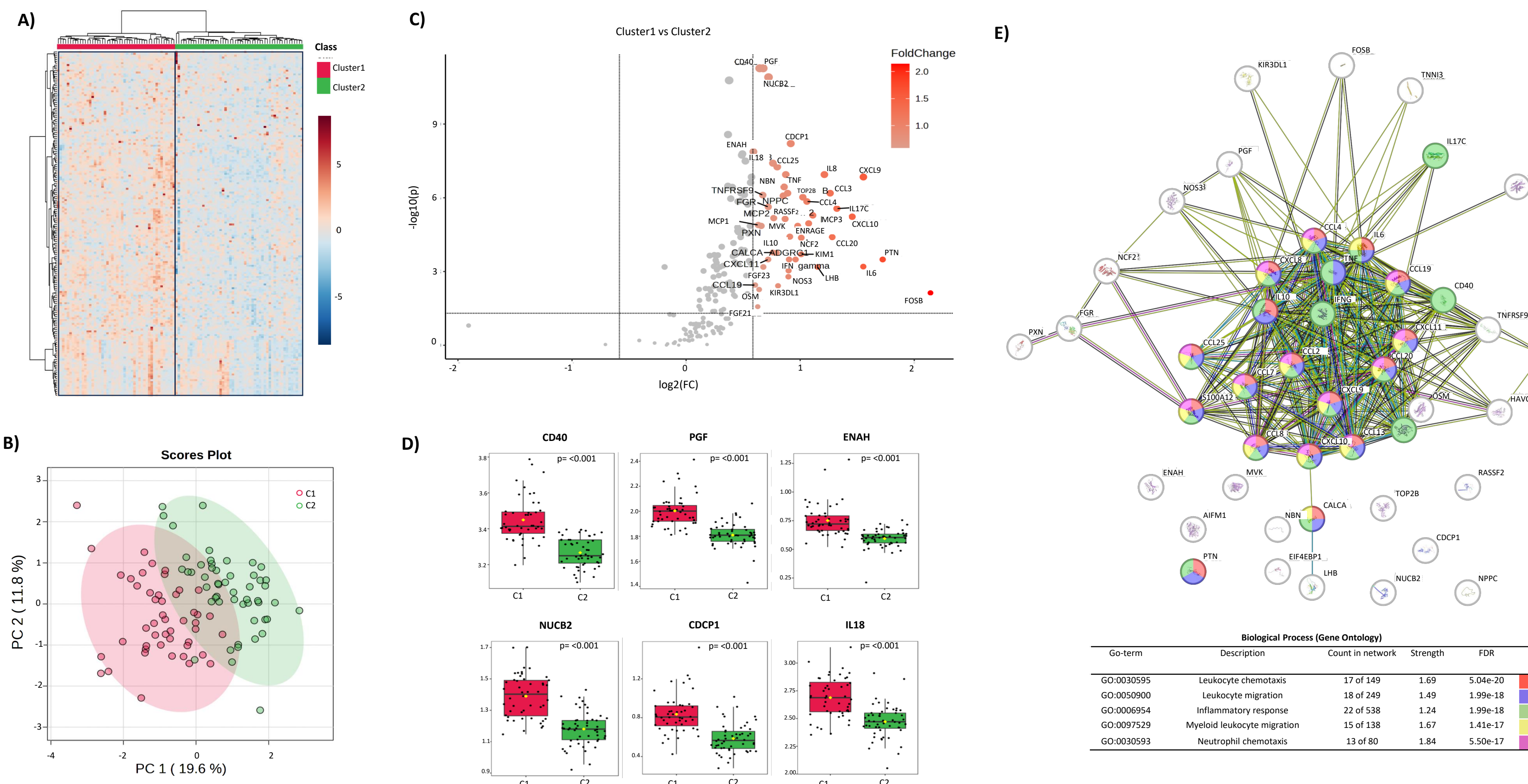


Figura 1. A) El mapa de calor obtenido a partir del agrupamiento jerárquico no supervisado del proteoma reveló la presencia de dos grupos o "clusters" claramente diferenciados en pacientes con LES en base a su perfil proteómico. B) El análisis discriminante PLS-DA explicó, en base a los niveles de proteínas proinflamatorias y de daño orgánico, los dos grupos o "clusters". Además, se obtuvieron los valores de la variable importancia en la proyección (VIP). El gráfico representa la contribución relativa de las proteínas a la varianza entre los 2 grupos; se muestran las 15 proteínas más importantes. C) El volcano plot identificó 49 proteínas significativamente sobreexpresadas en el grupo de pacientes pertenecientes al Cluster 1. D) Top 6 de las proteínas diferencialmente expresadas entre Cluster 1 y Cluster 2. E) Mediante el software STRING se obtuvo la red de interacción proteína-proteína del perfil proteico diferencial entre los clusters 1 y 2, donde se observa cómo las proteínas inflamatorias y las proteínas de daño orgánico se interrelacionan, así como una tabla en la que se indican las principales funciones biológicas en las que se encuentra implicadas dichas proteínas.

2. PERFIL CLÍNICO – ANALITICO DE LOS PACIENTES CLASIFICADOS EN EL ANALISIS DE CLUSTERING PROTEICO

Tabla 1. Perfiles clínicos de pacientes LES identificados en análisis de clustering de proteómica

Parámetros clínicos	Cluster 1 (n=48)	Cluster 2 (n=52)	p
Mujer/Hombre	45/3	49/3	1.000
Duración de la enfermedad (media ± DS)	17.58 ± 11.16	12.56 ± 8.18	0.011
Edad, años (media ± DS)	49.94 ± 15.75	42.31 ± 10.02	0.004
Fumador, n (%)	14 (29.2)	10 (19.2)	0.353
Diabetes, n (%)	2 (4.2)	1 (1.9)	0.944
Trombosis, n (%)	11 (22.9)	7 (13.5)	0.333
Biopsia nefritis, n (%)	17 (35.4)	12 (23.1)	0.08
Análisis anormal orina, n (%)	17 (35.4)	17 (32.7)	0.939
Proteínas en orina, n (%)	17 (35.4)	14 (26.9)	0.483
Implicación del SNC, n (%)	8 (16.7)	5 (9.6)	0.453
Fenómeno de Raynaud, n (%)	24 (50.0)	23 (44.2)	0.706
Parámetros de laboratorio			
ANTI-DSDNA, n (%)	38 (79.2)	36 (69.2)	0.366
ANA, n (%)	47 (97.9)	50 (96.2)	1.000
Creatinina anormal, n (%)	6 (12.5)	1 (1.9)	0.093
Proteinuria, n (%)	4 (8.3)	3 (5.8)	0.913
C3 reducido, n (%)	20 (41.7)	30 (57.7)	0.161
C4 reducido, n (%)	23 (47.9)	21 (40.4)	0.578
Plaquetas reducidas, n (%)	12 (25.0)	13 (25.0)	1.000
Globulos blancos reducidos, n (%)	17 (35.4)	20 (38.5)	0.914
Leucopenia h, n (%)	22 (45.8)	24 (46.2)	1.000
Linfopenia h, n (%)	28 (58.3)	31 (59.6)	1.000
Artritis, n (%)	34 (70.8)	35 (67.3)	0.869
Anormal CRP ESR, n (%)	9 (18.8)	9 (17.3)	1.000
Tratamientos			
Esteroides, n (%)	23 (47.9)	23 (44.2)	0.866
PDN, n (%)	28 (58.3)	32 (61.5)	0.902
ASA, n (%)	16 (33.3)	17 (32.7)	1.000
Inmunosupresores, n (%)	14 (29.2)	16 (30.8)	1.000
AZA, n (%)	11 (22.9)	8 (15.4)	0.481
MMF, n (%)	11 (22.9)	7 (13.5)	0.333
MTX, n (%)	3 (6.2)	6 (11.5)	0.566
Antimaláricos, n (%)	33 (68.8)	39 (75.0)	0.637
HC, n (%)	30 (62.5)	39 (75.0)	0.257
AINES, n (%)	5 (10.4)	7 (13.5)	0.873

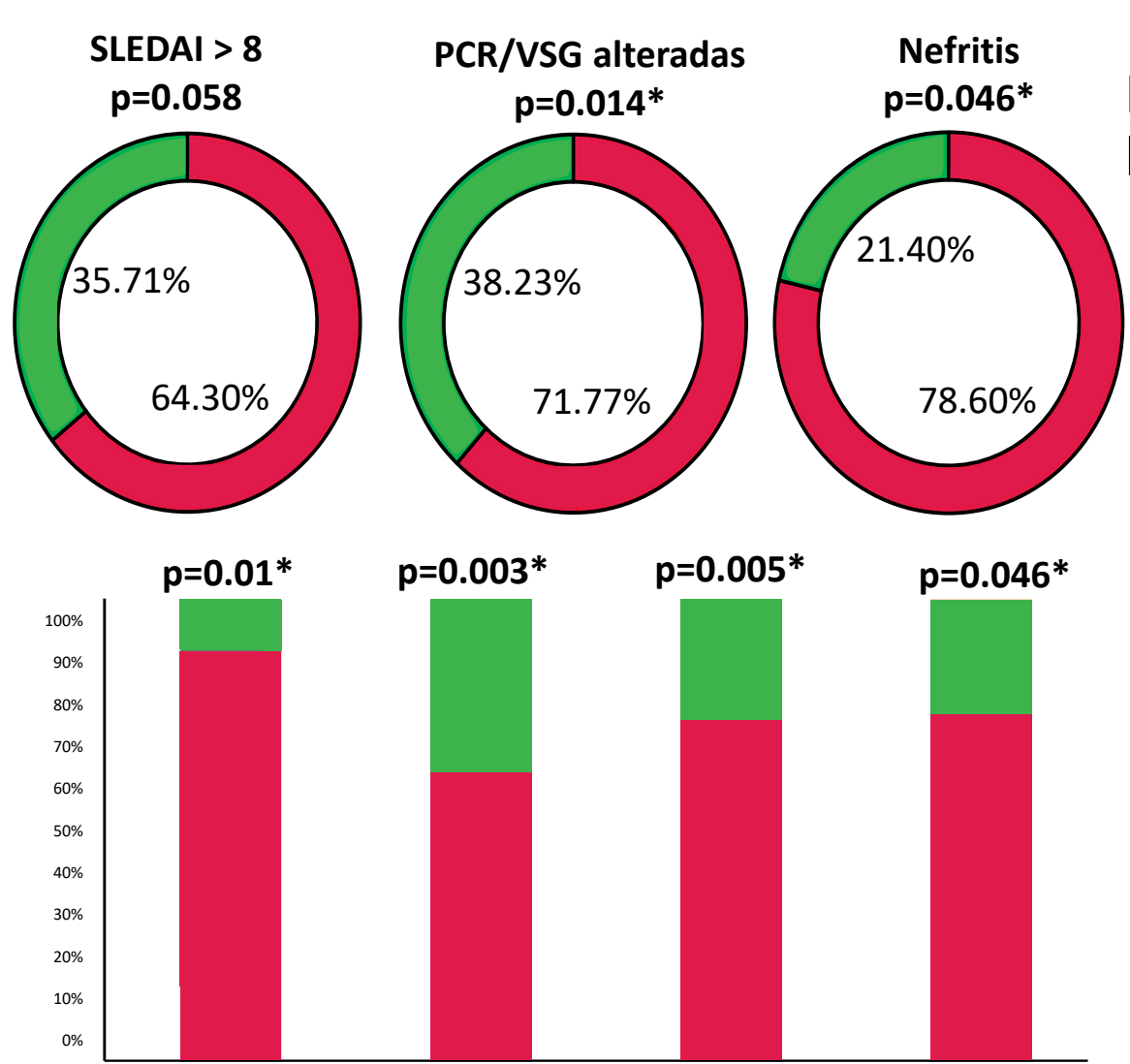


Figura 2. A) Las variables clínicas vinculadas a nefritis (SLEDAI, PCR/VSG alteradas y nefritis) así como a riesgo cardiovascular (Obesidad, dislipemia, hipertensión y estatinas) se encontraron incrementadas en el grupo de pacientes pertenecientes al Cluster 1 respecto al Cluster 2. B) La comparación entre Cluster 1 y grupo de donantes sanos mostró un mayor número de proteínas diferencialmente expresadas en el grupo de pacientes en contraposición con la comparación C) entre Cluster 2 y el grupo de donantes sanos.

RESULTADOS

3. PERFIL METABOLÓMICO DIFERENCIAL ENTRE EL GRUPO DE PACIENTES PERTENECIENTES AL CLUSTER 1 Y CLUSTER 2

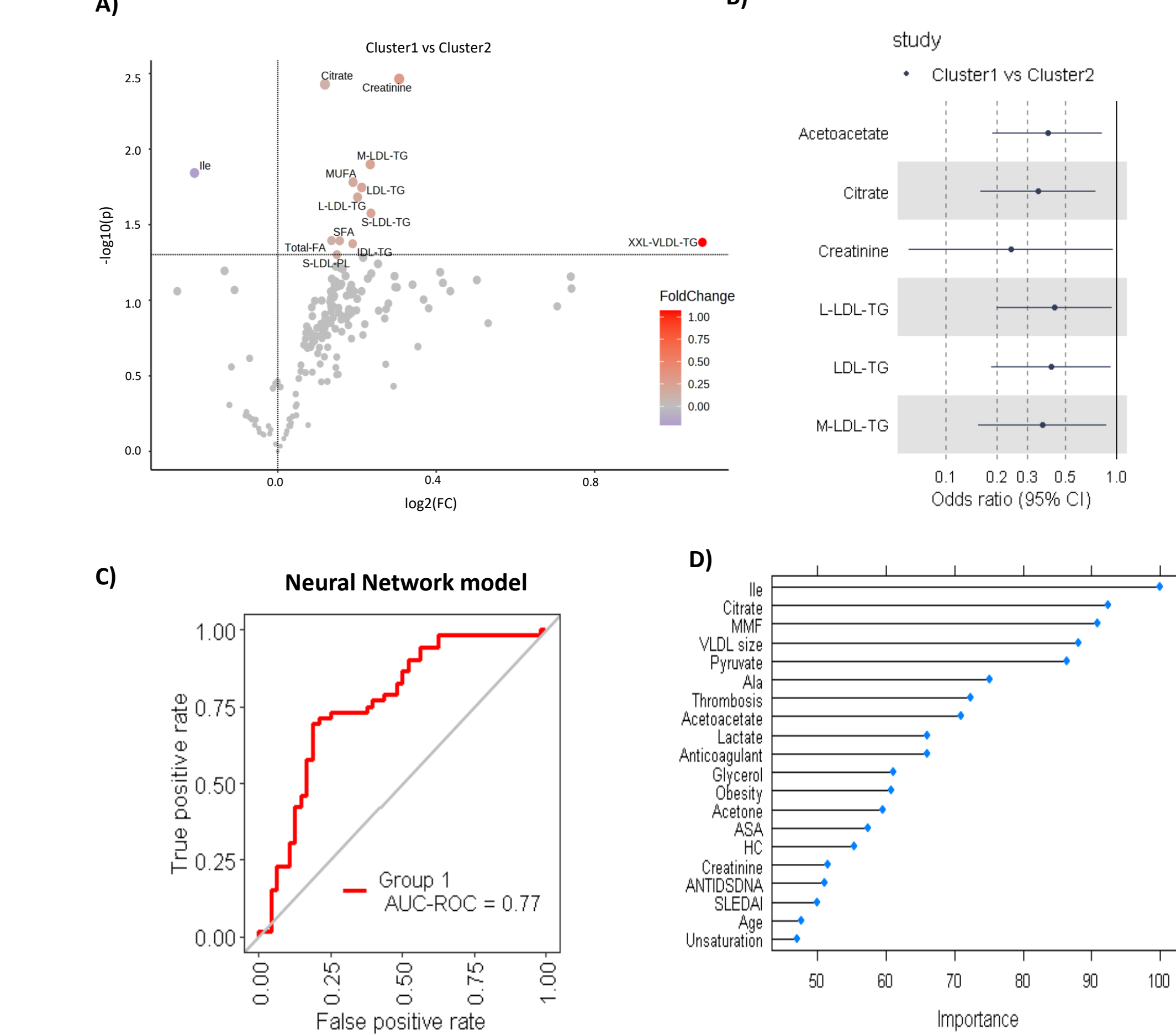


Figura 3. A) El volcano plot muestra 12 metabolitos regulados al alza y 1 metabolito regulado a la baja en C1 frente a C2 (FC1,5 p = <0.05). Los metabolitos elevados incluyen principalmente varios asociados a la aterogénesis y la nefropatía lúpica.

B) El Forest plot muestra los odds ratios (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95 % de los metabolitos de los lípidos séricos entre los pacientes de C1 en comparación con los pacientes de C2 mediante análisis de regresión logística ajustados por duración de la enfermedad, edad, SLEDAI, género, tabaquismo, diabetes y dislipemia, obesidad, anti-dsDNA, hipertensión, trombosis, nefritis lúpica, y los diversos tratamientos administrados a los pacientes.

C y D) La aplicación de un modelo de aprendizaje automático de redes neuronales identificó una firma clínico-molecular que mostró una alta precisión para clasificar a los pacientes del Cluster 1 respecto a los del Cluster 2 (área bajo la curva/AUC = 0.77). D) Las principales características que contribuyeron a separar el subgrupo de pacientes del Cluster 1 respecto al Cluster 2 incluyeron niveles de diversos metabolitos vinculados a la nefropatía lúpica y el desarrollo de trombosis, así como la administración de fármacos relacionados con ambas patologías.

4. INTEGRACIÓN DE PERFILES -ÓMICOS EN BASE AL PERFIL CLÍNICO DE LOS PACIENTES Y VALIDACIÓN EN NUEVAS COHORTES

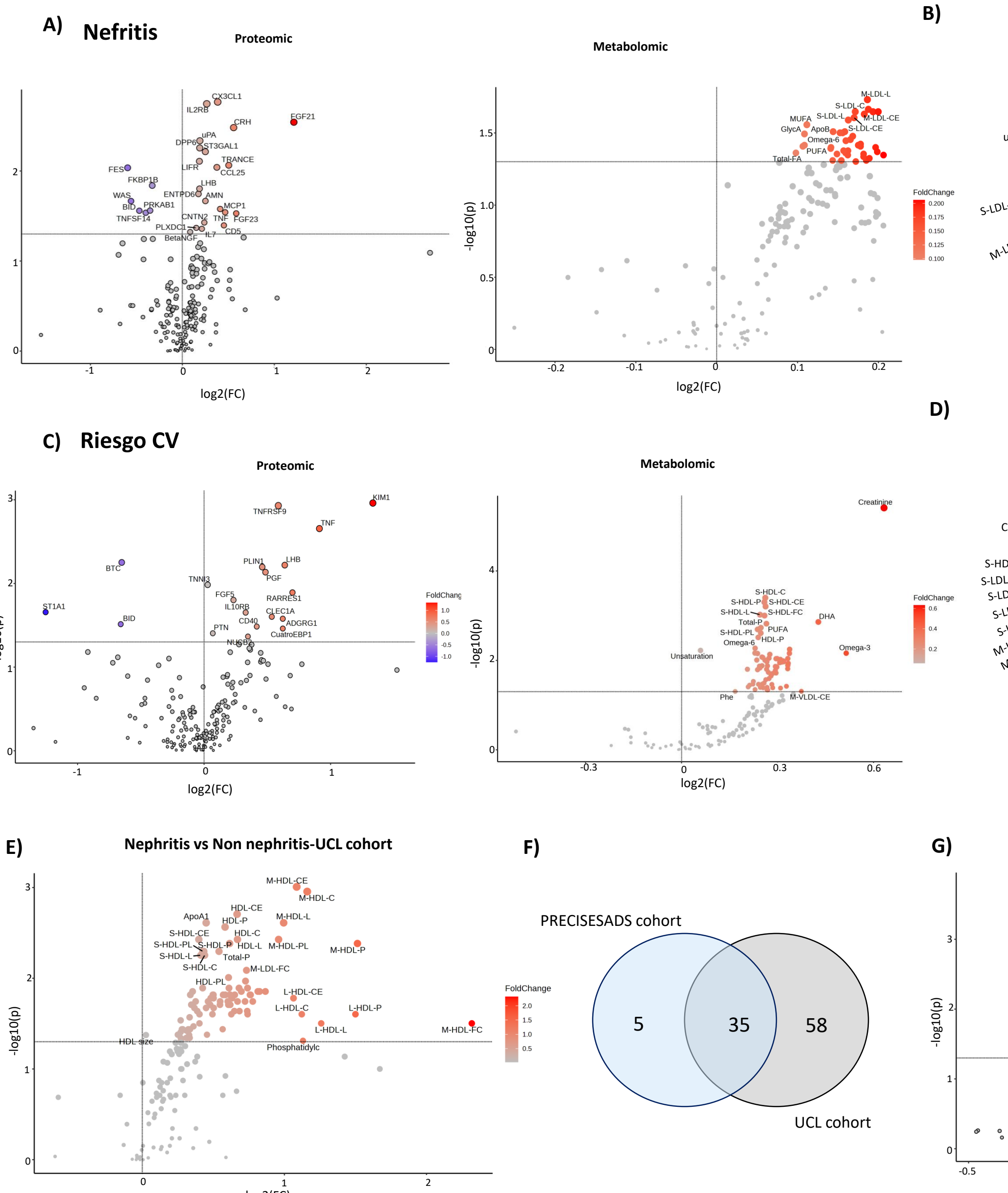


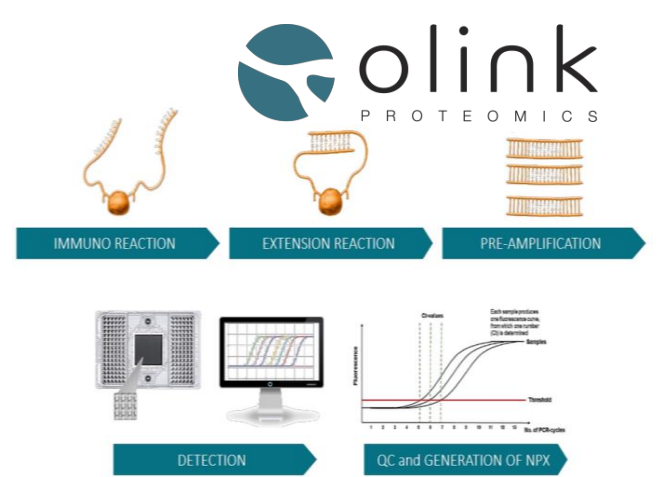
Figura 4. A) y C) Proteínas y metabolitos diferencialmente expresados entre pacientes con y sin nefritis lúpica (NL), así como entre pacientes con y sin riesgo cardiovascular.

B) y D) Correlaciones entre las proteínas y metabolitos diferencialmente expresados entre los pacientes con y sin NL, así como entre pacientes con y sin riesgo CV, respectivamente.

E) y G) Patrón metabolómico diferencial entre pacientes con y sin NL, así como con y sin riesgo CV, respectivamente, procedentes de la cohorte externa de validación de University College London (UCL).

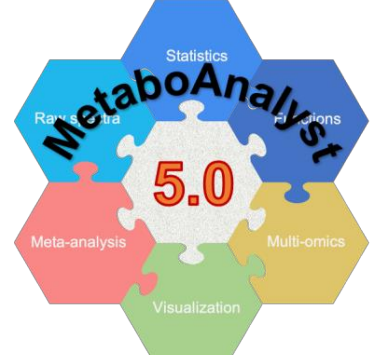
F) y H) El diagrama de Venn muestra un total de 35 metabolitos en el caso de NL y de 52 metabolitos, en el caso de riesgo CV, coincidentes entre la cohorte de estudio PRECISESADS y la cohorte de validación de la UCL.

1. La expresión de 184 proteínas asociadas con daño orgánico e inflamación se evaluó en suero utilizando la tecnología de "ensayo de extensión de proximidad".



2. Se midieron 168 metabolitos séricos (concentraciones absolutas, mmol/L), mediante resonancia magnética nuclear (RMN) utilizando la plataforma de Nightingale.

3. Para evaluar la contribución de los perfiles de proteínas y metabolitos identificados a la gravedad de la enfermedad, se realizó un análisis de agrupamiento no supervisado utilizando el software de aprendizaje automático "Metaboanalyst".



4. Los análisis de machine learning fueron realizados utilizando la versión 4.3.2 del software R con múltiples paquetes analíticos (Caret, ROCR, MLeval).



5. Los análisis ontológicos y de interrelación entre proteínas se realizaron utilizando el software String.



CONCLUSIONES

El presente estudio revela la presencia de una firma molecular distintiva asociada con subgrupos de LES definidos por una alta actividad de la enfermedad, un riesgo CV elevado y una alta incidencia de NL. Este enfoque integrador podría mejorar la caracterización molecular de nuevos endotipos de pacientes LES y revelar nuevos biomarcadores de enfermedad, ofreciendo nuevas perspectivas terapéuticas.

