

# Biomarcadores proteicos en lupus neuropsiquiátrico

## Protein Biomarkers in Neuropsychiatric Lupus

Nini Johanna Pedroza Díaz<sup>1</sup>, Blanca Lucía Ortiz Reyes<sup>1</sup>, Gloria María Vásquez Duque<sup>1</sup>

### Palabras clave:

Biomarcadores, lupus neuropsiquiátrico, líquido cefalorraquídeo, proteómica.

Recibido:  
26 de julio de 2012

Aceptado:  
5 de septiembre de 2012

### RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad crónica, autoinmune, en la cual factores genéticos, epigenéticos, ambientales, hormonales e inmunológicos han demostrado tener un papel. El lupus eritematoso sistémico afecta prácticamente a todos los órganos con manifestaciones cutáneas, musculoesqueléticas, cardiopulmonares, renales y neuropsiquiátricas, estas últimas agrupadas como lupus neuropsiquiátrico cuya prevalencia varía entre 12-95%. Las manifestaciones neuropsiquiátricas ocupan un lugar importante en la morbilidad y mortalidad de la enfermedad y, por ende, se han asociado a un pobre pronóstico. Hasta la fecha el diagnóstico de lupus neuropsiquiátrico se basa en las características clínicas, utilizando la nomenclatura y descripción de caso del Colegio Americano de Reumatología-1999, sin embargo, la inespecificidad de estos síndromes clínicos hace aún difícil el diagnóstico. Esta dificultad es consecuencia de la etiopatogenia compleja, la gran heterogeneidad de presentaciones clínicas, el curso impredecible de la enfermedad y, adicionalmente, las pruebas de laboratorio y de imagenología médica utilizadas no son contundentes para el diagnóstico. Es por ello que ha sido imperativa la búsqueda de biomarcadores, entre los que se han reportado auto-anticuerpos y otras proteínas. Sin embargo, estos reportes requieren de estudios complementarios para ser validados como prueba diagnóstica y así poder ser utilizados en la práctica clínica. Se presenta, entonces, una revisión de tema acerca de algunos de estos biomarcadores evaluados hasta el momento.

### Key words:

Biomarkers, neuropsychiatric systemic lupus erythematosus, cerebrospinal fluid, proteomics.

### SUMMARY

Systemic lupus erythematosus is a chronic auto-immune disease in which genetic, epigenetic, environmental, hormonal and immunological are involved. Systemic lupus erythematosus affects almost all organs with clinical manifestations such as skin disorders, musculoskeletal, cardiopulmonary, renal and neuropsychiatric compromise, the latter neuropsychiatric lupus, has a prevalence that varies between 12-95%. Neuropsychiatric manifestations have been associated with morbidity and mortality of the disease so these account for a poor prognosis. To date, the diagnosis of neuropsychiatric lupus is performed using the nomenclature and description of case reported by the American College of Rheumatology (ACR) in 1999, however, the use of this nomenclature has not been effective for the diagnosis of neuropsychiatric lupus because the complex pathogenesis, heterogeneity of clinical presentations, an unpredictable course of the disease and the laboratory tests and imaging used are not conclusive. For these reason it is therefore imperative the search of biomarkers, among which are reported auto-antibodies and other proteins. However, these reports require additional studies to be validated and that they can be used in clinical practice. This paper is a review about these biomarkers evaluated until today.

## Introducción

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad crónica, autoinmune, multisistémica, de etiología desconocida que presenta diferentes manifestaciones clínicas, las cuales varían en el tiempo y entre individuos. La

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés al momento de la redacción del manuscrito.

1. Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Colombia.

Correspondencia:  
Nini Johanna Pedroza: joha27@gmail.com

prevalencia de dicha enfermedad varía de 14.6 a 50.8 casos por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos, y la incidencia es de 1.8 a 7.6 casos por 100.000 personas/año<sup>1</sup>. Diferentes estudios epidemiológicos han evidenciado variaciones en la incidencia de acuerdo con las características de la población estudiada ya que el LES, generalmente, es más frecuente en el género femenino, en la raza negra y en la segunda a quinta década de la vida<sup>2,3</sup>.

Aunque la etiología del LES es desconocida, se sabe que diversos factores influyen en su desarrollo, entre ellos los genéticos, epigenéticos, ambientales, hormonales e inmunológicos.

La predisposición genética ha sido propuesta como un paso inicial para el desarrollo de la enfermedad, aunque algunos estudios han indicado que un sólo gen puede ser el implicado, se sabe que ésta es una enfermedad multigénica y que, por lo tanto, diferentes genes se asocian con la aparición de la enfermedad; hasta el momento se han descrito más de 30 *locus* que contienen genes relacionados con la patología<sup>4,5</sup>; entre los *locus* identificados está la región HLA-D correspondiente a un segmento genético dominante para la susceptibilidad del LES, de igual manera han sido identificados algunos genes implicados en la respuesta inmune innata como IRF5, en la adaptativa como NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1 y TYK2, en la señalización de linfocitos T y B como STAT4, TNFSF4 y BLK, otros relacionados con autofagia y apoptosis como ATG5, con la ubiquitinización UBE2L3, TNAIP3, TNIP1 y relacionados con la fagocitosis como ITGAM, FCGR3A y FCGR3B<sup>6</sup>.

Un estudio realizado por Teruel y colaboradores, reportó que el gen de la fosfatasa ácida de células rojas (*red cell acid phosphatase*-ACP1), el cual codifica para una fosfotirosina fosfatasa de bajo peso molecular (LMWPTP) corresponde a un gen de susceptibilidad, este estudio fue realizado en 1546 pacientes con LES clasificados bajo los criterios del Colegio Americano de Reumatología, ACR (por sus siglas en inglés) de 1992. En 1947 individuos sanos de 4 poblaciones caucásicas (España, Alemania, Italia y Argentina), fueron evaluados sobre cuatro polimorfismos de nucleótido simple (SNP) seleccionados del gen ACP1, rs11553742, rs7576247, rs10167992 y rs3828329, los resultados mostraron que el polimorfismo rs11553742\*T constituye un factor genético de riesgo para el desarrollo de LES. Este polimorfismo

es encontrado en el alelo ACP1\*C el cual, se ha demostrado, favorece que se aumente la expresión de isoformas "S" de LMWPTP, lo que implica mayor actividad de la enzima, dicha actividad incrementada en ciertos tipos de células inmunes puede conllevar a sobreactivación y autorreactividad<sup>7</sup>.

En cuanto a la influencia ambiental ha sido demostrado, en diferentes estudios epidemiológicos, que la luz U.V., el cigarrillo, toxinas ambientales y algunos agentes infecciosos como el virus del Epstein-Barr (EBV) pueden desencadenar el proceso autoinmune<sup>4,8,9</sup>.

La regulación epigenética está dada por dos factores importantes: la metilación del DNA y la modificación de histonas (acetilación y metilación), ya que de esto depende el acceso de los factores de transcripción y, por ende, la expresión génica; se ha demostrado que algunos medicamentos instaurados a los pacientes con LES, la luz UV, infecciones virales, contaminantes ambientales y las hormonas tienen efecto sobre la regulación epigenética. Este efecto es, posiblemente, mediado por dos mecanismos básicos, la regulación de la maquinaria transcripcional (RNA polimerasa II, co-activadores y co-represores) y la regulación de enzimas como metil-transferasas y enzimas modificadoras de histonas<sup>10</sup>. Entre los diferentes promotores de genes que se encuentran hipometilados y que tienen importancia en la fisiopatología de la enfermedad están la IL-10, CD40LG, CD70, entre otros<sup>8,11</sup>.

Como se mencionó anteriormente, las diferencias de sexo del individuo hacen que tenga una mayor o menor predisposición al desarrollo de la patología, esto se debe a dos factores básicos, la presencia del cromosoma X y las hormonas sexuales; en estudios epidemiológicos realizados se ha encontrado que la mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes se presenta en el sexo femenino; en diferentes estudios ha sido reportado que la presencia de dos cromosomas X en un individuo favorece el desarrollo de la patología, lo que pareciera concordante con un efecto de dosis en mujeres, esto ha sido corroborado al evaluar mujeres con síndrome de Turner (monosomía del cromosoma X) en quienes dicha prevalencia disminuye dramáticamente<sup>12</sup> y en hombres con síndrome de Klinefelter (XXY) quienes presentan una prevalencia de la enfermedad similar a la de las mujeres<sup>13</sup>. En compensación del ya mencionado efecto de dosis uno de los cromosomas X de las mujeres es silenciado por un meca-

nismo epigenético, sin embargo, se ha estimado que 10% se escapa de dicho silenciamiento, esto se debe a que la inactivación de este cromosoma depende de la metilación del DNA y de la modificación de histonas que, como se mencionó anteriormente, puede estar alterado en individuos con LES, la activación de genes inmunes presentes en el cromosoma incorrectamente silenciado por la desmetilación, puede contribuir al incremento de LES en mujeres<sup>14</sup>.

Adicionalmente, el cromosoma X contiene el 10% de todos los microRNAs del genoma, estas moléculas están involucradas en la regulación génica postranscripcional, lo cual resulta en represión de la traducción de proteínas y, por ende, en regulación de procesos celulares como la respuesta inmune<sup>12</sup>.

Las hormonas sexuales, estrógenos, progestágenos y andrógenos han sido implicadas en la activación de la patología, sin embargo, el más ampliamente estudiado es el estradiol. Los estrógenos se unen a dos tipos de receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ), dichos receptores se encuentran no sólo a nivel de útero, sino también anclados en linfocitos T y B, células dendríticas, NK, neutrófilos, macrófagos, timo, médula ósea y células endoteliales. La presencia de estos receptores en las células B promueve la proliferación y maduración del linfocito B a célula plasmática y favorece la respuesta inmunológica tipo Th2, lo cual da como resultado el incremento de IL-4, IL-5 e IL-10 y, por ende, el aumento en la producción de anticuerpos los cuales son de gran importancia en la fisiopatología del LES<sup>12</sup>.

El factor inmunológico es de gran importancia en el desarrollo de la enfermedad, con un amplio compromiso, caracterizado por activación policlonal de las células B, con producción de autoanticuerpos, especialmente IgG, contra antígenos nucleares y formación de inmunocomplejos los cuales se depositan a nivel tisular; asociado a una alteración en la depuración de estos últimos y una respuesta inflamatoria multisistémica<sup>8,15</sup>.

El LES afecta prácticamente todos los órganos con manifestaciones clínicas como: alteraciones cutáneas, musculoesqueléticas, cardiopulmonares, renales y neuropsiquiátricas (NP), entre otras. Estas últimas han sido ampliamente relacionadas con la morbilidad y la mortalidad, y por ende dan cuenta de un pronóstico pobre<sup>16,17</sup>. La prevalencia reportada para lupus neuropsiquiátrico (LES-NP) varía entre 12-95% de los casos de LES<sup>18</sup>. Estas manifestaciones

neuropsiquiátricas son altamente diversas, e incluyen síntomas comunes como cefalea, deterioro cognitivo y trastornos del comportamiento y episodios menos frecuentes, como crisis convulsivas, estado confusional agudo, mielopatía y neuropsicosis<sup>18</sup>.

Aunque diferentes investigadores se dedicaron a estudiar las manifestaciones neuropsiquiátricas del LES sobre la década de los 80<sup>19,20</sup> y principios de los 90<sup>21</sup>, sólo hasta 1999 el Colegio Americano de Reumatología, con base en las falencias de clasificación del LES-NP- realizó una descripción estandarizada de las manifestaciones neuropsiquiátricas, clasificándolas en 19 síndromes; además de los criterios diagnósticos, de exclusión y de asociación de cada uno de ellos<sup>22</sup>. En la Tabla 1 se resumen de la nomenclatura y descripción de caso dados por el ACR en 1999.

Como resultado del comité de 1999 se determinó que la nomenclatura establecida podía ser usada para la clasificación de la enfermedad y que con la definición de caso y terminología se había logrado que todos los investigadores en LES-NP hablaran en igualdad de términos, lo cual favorecería la investigación en el área. Sin embargo, al tener un mayor entendimiento de la fisiopatología del LES-NP dicha nomenclatura debía ser actualizada.

Dos años más tarde Ainiala y colaboradores evalúan la nomenclatura del ACR en términos de especificidad, ya que manifestaciones como cefalea, disfunción cognitiva y trastornos del ánimo se pueden presentar en la población general debido a otras enfermedades de base. Para ello realizaron un estudio de tipo transversal en una población del sur de Finlandia, la cual tenía diagnóstico de LES según los criterios establecidos por el ACR en 1992, y cuya edad estaba entre 15-65 años, los 46 pacientes evaluados eran nativos de Finlandia y residentes del área de estudio. La presencia de otra enfermedad autoinmune era un factor excluyente del estudio. Para cada paciente se tuvo un control pareado por edad y sexo. Todas las personas fueron sometidas a un examen clínico, neurológico y a pruebas neuropsicológicas. Los datos arrojados fueron analizados por medio de un método de regresión logística, encontrando que el 91% de los pacientes y el 56% de los controles presentaban al menos una de las manifestaciones clínicas establecidas por el ACR en 1999, y la manifestación con mayor frecuencia fue disfunción cognitiva. De dichos análisis se concluye que la nomenclatura propuesta no permite diferenciar los

Manifestaciones centrales	Manifestaciones periféricas
Meningitis aséptica	Síndrome de Guillain-Barré
Enfermedad cerebrovascular	Neuropatía autonómica
Síndrome desmielinizante	Mononeuropatía
Cefalea	Miastenia gravis
Trastorno del movimiento	Neuropatía craneal
Mielopatía	Plexopatía
Trastornos convulsivos	Polineuropatía
Estado confusional agudo	
Trastorno de ansiedad	
Disfunción cognitiva	
Trastorno del ánimo	
Psicosis	

**Tabla 1.**

Nomenclatura y descripción de caso LES-NP. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum.* 1999 Apr; 42(4):599-608.

controles de los pacientes ni los pacientes con LES-NP de otros pacientes con LES. La observación final del estudio es que la nomenclatura de 1999 parece tener una baja especificidad y tasas de detección muy altas, por lo tanto no debería ser usada clínicamente. Ainala y colaboradores, proponen una modificación de la nomenclatura en la cual se excluyen manifestaciones como ansiedad, cefalea, depresión leve, disfunción cognitiva leve y polineuropatía no confirmada. Estas modificaciones permitieron aumentar la especificidad de la nomenclatura<sup>23</sup>.

En el 2007 se realizó un nuevo Comité *Ad Hoc* específicamente para la evaluación de la función cognitiva en pacientes con LES, para el cual se propuso la combinación de los criterios clásicos dados por el ACR en 1999 y el inventario de síntomas cognitivos (*Cognitive Symptoms Inventory* -CSI) reportados en 2002<sup>24,25</sup>.

Posteriormente, Monov y colaboradores propusieron otra nomenclatura que permitiera la clasificación del LES-NP basados en una modificación y extensión de lo propuesto por el ACR. Para ello conformaron dos grupos, el primero, constituido por convulsiones, neuropsicosis, accidente cerebrovascular, lesión de los nervios craneales, alteraciones motoras y alteraciones de la conciencia; y en el segundo, síntomas como disfunción cognitiva, cefalea, neuropatía periférica, cambios en la imagen de resonancia magnética cerebral, en el electroencefalograma, en la electromiografía y positividad para anticuerpos anti-ribosomales (aRPA)

y anticuerpos antifosfolípidos (aPL). Teniendo en cuenta esta clasificación se determinó que el LES-NP es diagnosticado correctamente cuando un paciente presente uno de los indicadores del primer grupo y dos del segundo<sup>26</sup>.

A pesar de todos los criterios propuestos, el diagnóstico de esta patología es difícil y normalmente no es realizado de la manera correcta, ya que el LES-NP presenta una etiopatogenia compleja, gran heterogeneidad de presentaciones clínicas, un curso impredecible y, como si fuera poco, las pruebas imaginológicas y de laboratorio realizadas no son contundentes, por lo tanto, el diagnóstico dependerá finalmente del juicio clínico y de la exclusión de otras causas que puedan explicar los síntomas neuropsiquiátricos; como la infección<sup>27</sup>, la hipertensión arterial grave, alteraciones metabólicas o el tratamiento con esteroides, las cuales son capaces de causar las mismas manifestaciones NP y no es raro que coexistan en pacientes con LES, lo cual dificulta aún más el diagnóstico<sup>28</sup>.

Es de gran importancia resaltar que cuando estas enfermedades crónicas como el LES se presentan en edades tempranas (segunda década de la vida) como se mencionó anteriormente, se puede afectar la calidad de vida relacionada con la salud, más concretamente, las actividades física, sexual, mental y social, y pueden vulnerarse de manera significativa la autoimagen, los procesos de socialización, de adaptación y en un futuro la vida laboral y profesional<sup>29</sup>.

Adicionalmente, en diversos estudios, han sido reportadas las manifestaciones neuropsiquiátricas como una de las principales causas de daño irreversible en este grupo de pacientes<sup>30-34</sup>. Todas estas razones hacen imperativa la búsqueda de biomarcadores que permitan hacer el diagnóstico del LES-NP de manera más certera, al igual que el seguimiento y monitoreo del tratamiento<sup>35</sup>.

Para la búsqueda de posibles biomarcadores se ha hecho uso de áreas en el estudio de las “ÓMICAS” como la Genómica, Transcriptómica, Metabolómica y Proteómica, entre otras. Esta última ha sido ampliamente investigada en las dos últimas décadas y se define como el área encargada del estudio del conjunto de proteínas expresadas en un sistema (proteoma). En los últimos veinte años se han desarrollado técnicas muy sensibles como espectrometría de masas y electroforesis bidimensional que permiten la caracterización del proteoma a partir de muestras biológicas, tales como células, tejidos y fluidos corporales<sup>36,37</sup> lo que ha llevado al hallazgo de biomarcadores proteicos. Definiendo biomarcadores como moléculas cuyos niveles de expresión o modificaciones en el cuerpo son indicativos de un estado biológico<sup>38</sup>, y por lo tanto, tienen un gran potencial en el diagnóstico de enfermedades, en el monitoreo de la progresión y en la respuesta al tratamiento.

Los biomarcadores pueden ser de diferente naturaleza química, se han detectado marcadores biológicos de tipo genético (DNA y RNA), metabolitos secundarios obtenidos en cascadas de señalización activadas en procesos patológicos, proteínas y otras moléculas orgánicas (glúcidos). Sin embargo, los más estudiados hasta el momento son los de naturaleza génica y proteica. Los biomarcadores proteicos han ganado gran reconocimiento debido a su alta correlación con la actividad biológica celular, dado que las proteínas son directamente responsables de las funciones celulares, por lo tanto encontrar niveles de expresión anormales es una indicación de la alteración celular que se está presentando debido a un proceso patológico<sup>39</sup>.

Como ya se había mencionado, los biomarcadores pueden ser detectados en diferentes muestras biológicas, sin embargo, el suero ha sido la muestra más ampliamente estudiada, ya que es de fácil obtención y está en contacto con todos los tejidos corporales. No obstante, lo ideal dentro de las posibilidades es tener una muestra más específica o localizada del órgano

blanco de la patología, con la cual será mayor la probabilidad de obtener proteínas específicas, las cuales posiblemente estén relacionadas con la actividad de la enfermedad y, por ende, permitan hacer un mejor diagnóstico. Es por ello que el líquido cefalorraquídeo, pudiese ser una buena fuente para el estudio del LES-NP dado que se encuentra directamente en contacto con el sistema nervioso central (SNC), y permite un intercambio de sustancias de donde se absorben compuestos bioquímicos útiles o se eliminan de manera selectiva los diferentes compuestos tóxicos para el SNC, además dicho líquido facilita la regulación del SNC a través de la circulación de neuropéptidos y hormonas, por lo tanto este fluido corporal refleja el estado bioquímico del sistema tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas. Por ello puede ser considerado una excelente fuente para la identificación de biomarcadores de enfermedades con manifestaciones neurológicas<sup>40</sup>.

El LCR es producido en su mayor proporción en el plexo coroideo como un ultrafiltrado plasmático, sin embargo, el drenaje del líquido intersticial del tejido nervioso también contribuye a la formación de éste<sup>40</sup>. El contenido proteico del LCR está dado en un 80% por la filtración del plasma y en un 20% directamente del SNC, el primer porcentaje dependerá, entonces, de la transferencia de las proteínas desde el plasma hacia el LCR, para ello hay que tener en cuenta la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual corresponde a un complejo metabólico activo, constituido por células endoteliales cerebrales, receptores y proteínas transportadoras que permiten el paso de moléculas de manera selectiva. Dichas células endoteliales presentan características anatómicas y funcionales que difieren de las de otros órganos, ya que sus uniones intercelulares son más estrechas, lo que evita el paso transcapilar de moléculas de gran tamaño como las proteínas, esto en condiciones fisiológicas normales. Es por ello que la BHE es la que determina el hecho de que haya una menor expresión de proteínas a nivel del LCR que las presentes en plasma<sup>40</sup>. El otro 20% corresponderá básicamente a las proteínas secretadas por las células gliales y las neuronas.

El contenido proteico del LCR puede verse afectado por diversos factores, entre ellos la tasa de flujo del LCR, el estado de la BHE, la circulación del LCR, el intercambio entre el LCR y las estructuras del SNC

con las que se encuentra en contacto (reclusión de proteínas y péptidos del revestimiento endotelial, membrana plasmática y membranas aracnoideas), el ciclo circadiano y la edad<sup>41,42</sup>. Por lo tanto, todo ello debe tenerse en cuenta para la búsqueda de marcadores biológicos de carácter proteico en patologías como el LES-NP.

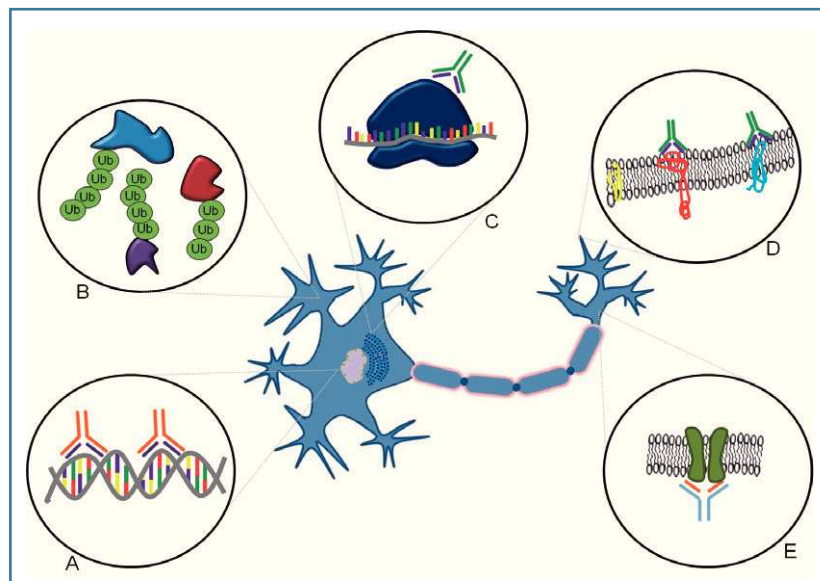
Se presenta, entonces, una revisión de tema acerca de algunos de estos biomarcadores evaluados hasta el momento, para ello se hizo una búsqueda exhaustiva en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information*, teniendo como criterio de selección artículos cuya fecha de publicación se encontrara entre el 2005 a la fecha. O que en su defecto sea la publicación más reciente del biomarcador que se esté mencionando.

## Antecedentes

### Autoanticuerpos

Hasta la fecha han sido reportadas diferentes proteínas presentes en el LCR cuya expresión puede ser usada como marcador biológico de la entidad (Figura 1), se ha encontrado la presencia de IgG, anticuerpos presentes en el LCR, cuya expresión aumentada ha sido evidenciada a través de técnicas de proteómica como la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas<sup>43</sup>. En un estudio realizado por Sidor y colaboradores, se determinó la concentración de

IgG en el LCR de una cepa murina que desarrollaba una patología autoinmune con manifestaciones neuropsiquiátricas similares a las de LES-NP, en la cual se encontraron niveles elevados de IgG en LCR cuando se evaluaban los ratones enfermos MRL/MpJ-Faslpr (MRL-lpr) con respecto al fenotipo control MRL/MpJ (MRL+/+) los cuales desarrollaban una forma menos severa de la enfermedad. La subcepa MRL-Ipr presenta alteraciones en el comportamiento (ansiedad/depresión), atrofia cerebral, retraso en el crecimiento del cerebro e infiltración de células inmunocompetentes en el plexo coroideo y en el parénquima cerebral. En los dos grupos de animales fue determinado el cociente de albúmina ( $Q_{\text{albúmina}} = \text{albúmina del LCR} \cdot 103 / \text{albúmina sérica}$ ), también fue evaluado el cociente IgG cadenas pesadas y livianas en suero y LCR con el fin de valorar si existía producción intratecal de los anticuerpos en el desarrollo de la patología o si éstos estaban ingresando al LCR a través de la BHE; de acuerdo con los resultados obtenidos no se logró determinar si existía producción intratecal de IgG, pero si corroboró una mayor permeabilidad de la BHE (aumento en el  $Q_{\text{albúmina}}$  en los ratones con la alteración autoinmune en comparación con los animales control) y, por lo tanto, el aumento en la concentración de IgG en el LCR puede ser resultante de ello. Adicionalmente, cuando evaluaron el perfil proteico por medio de la técnica de electroforesis bidimensional observaron



**Figura 1.**

Biomarcadores proteicos en lupus neuropsiquiátrico. Proteínas con expresión diferencial en individuos con lupus neuropsiquiátrico han sido reportadas como posibles biomarcadores; entre ellas, A: autoanticuerpos contra DNA de doble cadena, B: Ubiquitina, C: autoanticuerpos dirigidos a proteínas P-ribosomales, D: autoanticuerpos reactivos contra proteínas cerebrales (BRAA) y E: autoanticuerpos contra receptores que unen el neurotransmisor glutamato (NMDA).

que tanto las cadenas pesadas como las livianas de IgG se encontraban sobreexpresadas en el grupo con la enfermedad, pero que además existían varias isoformas (peso molecular similar pero punto isoeléctrico variante) de esta proteína en el perfil de este grupo, por lo cual especularon que posiblemente esto correspondiera a modificaciones postraduccionales que se dieran en la IgG o a cambios de aminoácidos específicos en la región variable de IgG<sup>44</sup>.

Sin embargo, en un estudio realizado posteriormente por Stojanovich y colaboradores, quienes evaluaron las muestras de LCR de 12 pacientes con LES-NP y 12 controles sanos, evidenciaron que el perfil proteico de los individuos con la enfermedad podía presentar o no aumento en los niveles de IgG, esto fue demostrado al encontrar que solo el 50% de los pacientes presentaba aumento de la proteína y que el otro 50% correspondía a niveles similares al de los individuos controles; lo que indica que no necesariamente esta proteína es la causante de las manifestaciones neuropsiquiátricas<sup>45</sup>, sin embargo, dentro del porcentaje de individuos enfermos observaron que los tres pacientes con manifestaciones neuropsiquiátricas más severas presentaban aumento en la expresión de las cadenas pesadas de IgG.

En el 2007 Zandman-Goddard y colaboradores reportaron diferentes moléculas con posible función de biomarcador para esta enfermedad, entre ellos 11 autoanticuerpos (auto-Ac) que reaccionaban contra diferentes componentes del tejido nervioso y 9 sistémicos<sup>46</sup>. Entre los anticuerpos reportados se encuentran los anti-neuronales los cuales se encontraron reaccionando con diferentes partes del tejido neuronal, con una prevalencia de 43% a nivel sérico, y un 74% en LCR, dichos auto-Ac se encontraron predominantemente en el LCR de pacientes con LES-NP en comparación con pacientes con LES sin manifestaciones neurológicas u otras enfermedades autoinmunes<sup>46</sup>. Adicionalmente, al hacer la clasificación clínica de LES-NP, análisis neuropsicológicos y el ensayo para detección de auto-AC antineuronales tipo IgG, se encontró una alta correlación entre la positividad de estos anticuerpos y el deterioro cognitivo de los pacientes con LES-NP; incluso se correlacionaron los títulos de auto-AC antineuronales con la aparición de psicosis lúpica, por lo que se plantea que las manifestaciones neuropsiquiátricas en pacientes con LES pueden obedecer a la interacción

de estos autoanticuerpos con las membranas de las células neuronales y otros antígenos expresados en el citoplasma, induciendo daño neuronal y varios cambios neurológicos y psicológicos<sup>46-48</sup>.

Los autoanticuerpos reactivos contra proteínas cerebrales (BRAA), son clasificados como un subtipo de Auto-AC anti-neuronales, que se encuentran reaccionando con proteínas integrales de membrana, aunque se ha evidenciado que estos presentan reacción cruzada con tejido no neuronal por lo que se les ha clasificado en subtipos de auto-ACs con reacción cruzada y específicos de tejido neuronal. Los dos subtipos se han encontrado en LCR, y se ha reportado su fuerte relación con manifestaciones neuropsiquiátricas, específicamente neuropsicosis. Estos hallazgos han sido evidenciados en diferentes estudios, entre ellos el realizado por Tin y colaboradores, quienes tenían en su diseño experimental muestras de LCR de 100 pacientes con LES de los cuales 10 presentaban LES-NP, de los pacientes con LES-NP el 60% fue positivo para BRAA, dado que reaccionaba con proteínas de membranas neuronales obtenidas de un modelo murino (peso molecular 27.5 y 29.5 kD). El 100% de los individuos positivos para BRAA presentaba neuropsicosis y convulsiones lúpicas, por lo que concluyeron que estos anticuerpos son específicos de dichas manifestaciones. Cabe anotar que ninguno de los controles (pacientes con LES sin neuropsicosis, individuos sanos y pacientes con otras enfermedades autoinmunes) fueron reactivos para BRAA<sup>46,49</sup>.

Otro de los autoanticuerpos encontrados en muestras de LCR, de pacientes con LES-NP, son los dirigidos contra receptores que unen el neurotransmisor glutamato (NMDA); dichos receptores se encuentran ubicados en las células neuronales y juegan un papel muy importante en funciones neurológicas de gran importancia como la memoria y el aprendizaje. Los anticuerpos que reaccionan contra este receptor en LCR se han visto implicados en procesos de muerte celular, específicamente apoptosis neuronal tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>50,51</sup>. En estudios realizados con el objetivo de evaluar la relación entre las manifestaciones neuropsiquiátricas y los títulos de Auto-Acs anti-NMDA, se ha encontrado que títulos elevados de estos anticuerpos generan depresión, disminución de la memoria de corto plazo y del aprendizaje<sup>52,53</sup>.

Se ha evidenciado, además, que los auto-Acs de DNA de doble cadena (DNAds) también contribuyen

a la apoptosis neuronal, dado que éstos reconocen el dominio extracelular de la subunidad del receptor NMDA, generando reacción cruzada. Este proceso apoptótico conlleva a la pérdida de función neuronal lo cual puede explicar algunas de las manifestaciones clínicas dadas en LES-NP<sup>54</sup>.

Autoanticuerpos antigangliósidos (AGA) han sido hallados igualmente en pacientes con LES-NP. Los gangliósidos corresponden a glicoesfingolípidos con uno o más ácidos siálicos unidos a una cadena de azúcar hidrofílica que contiene determinantes antigénicos y una ceramida hidrofóbica; estas moléculas se encuentran ubicadas en la membrana plasmática celular, participando activamente en vías de señalización. Los gangliósidos se encuentran, principalmente, en el tejido nervioso en el que constituyen el 6% de los fosfolípidos<sup>55</sup>. Aunque los AGA han sido detectados en pacientes con LES-NP y pueden tener valor predictivo, no constituyen un biomarcador exclusivo de LES-NP ya que se encuentran presentes en el LCR de pacientes con otras neuropatías, como el síndrome de Guillain Barré<sup>46,48,56</sup>. En algunos pacientes con LES-NP se ha encontrado AGA en LCR pero no en suero, lo cual ha sido un indicativo de una posible producción intratecal de dicha proteína, aunque otros pacientes han mostrado tener AGA tipo IgM en suero e IgG en LCR. Algunos estudios realizados en pacientes europeos con LES revelan una fuerte asociación entre AGA tipo IgG y migraña, demencia y neuropatía periférica y Auto-Acs tipo IgM con depresión lúpica, lo que sugiere que la detección de estos autoanticuerpos puede tener un importante valor predictivo en LES-NP<sup>57</sup>.

Los Auto-Acs anti-neuronales (ANFA) han sido encontrados en pacientes con LES pero con títulos mayores en aquellos que presentan manifestaciones neuropsiquiátricas (LES-NP), los autoantígenos más relacionados son las proteínas de 205 y 160 kDa que componen los neurofilamentos, dichas estructuras constituyen el componente principal del citoesqueleto de las neuronas, y proporcionan apoyo para el crecimiento radial del axón. En un estudio realizado con las muestras de LCR de 22 pacientes con LES-NP, 34 con LES sin NP, 78 pacientes con otras enfermedades reumatológicas y 22 controles sanos, se encontró una alta frecuencia de estos autoanticuerpos en los individuos con LES-NP, en la inmunodetección realizada, los auto-Acs ANFA reaccionaban directamente con

las proteínas de las masas moleculares anteriormente mencionadas<sup>46,48</sup>.

Autoanticuerpos contra la proteína 2 asociada a los microtúbulos (MAP-2) han sido detectados en pacientes con LES con manifestaciones NP; esta proteína es específica de las neuronas y es de gran importancia en el control de la integridad del citoesqueleto y otras funciones neuronales. En un estudio realizado en el 2004 por Williams y colaboradores, en el cual se evaluaron las muestras de LCR de pacientes con LES, el 17% de los pacientes con LES-NP mostró títulos elevados de Auto-Acs MAP-2, 4% de los pacientes con afección neurológica (trauma cerebral o accidente cerebrovascular originado por otras causas) y 2% de los controles sanos. Los títulos elevados de estos anticuerpos fueron significativamente asociados con neuropsicosis, convulsiones, neuropatía y encefalitis lúpica. Estos resultados permitieron establecer una fuerte asociación entre estos Auto-Acs MAP-2 y la presencia de manifestaciones neuropsiquiátricas; sin embargo, son necesarios estudios complementarios en los cuales se determine si los Auto-Acs MAP-2 se encuentran presentes en pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas<sup>46,48,58</sup>.

Otro de los autoanticuerpos más relevantes encontrados en muestras biológicas como suero y LCR de pacientes con LES son los Auto-Acs antiribosomales P (Anti-P). Estos anticuerpos reaccionan de manera específica con las proteínas ribosomales p0, p1 y p2, de 35, 19 y 17 kDa, respectivamente<sup>30</sup>. En diversos reportes realizados en los últimos años se ha demostrado una importante correlación entre niveles elevados de estos autoanticuerpos y la presentación de signos y síntomas como neuropsicosis, enfermedad cerebrovascular, convulsiones, depresión y en algunos casos síndrome desmielinizante debido al LES<sup>46,48,59,60</sup>, sin embargo, trabajos publicados indican que no existe tal asociación o que por lo menos no es tan significativa la correlación de estos anti-P con la aparición de las alteraciones neurológicas<sup>61,62</sup>.

Triosa fosfato isomerasa (TPI) es una enzima glicolítica que cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato a D-gliceraldehído 3-fosfato, la cual se encuentra solo a nivel de eritrocitos (glucólisis) y en las células cerebrales. La deficiencia de TPI es asociada con anemia hemolítica y alteraciones neurológicas<sup>63</sup>. Anticuerpos anti-TPI han sido encontrados incrementados en el suero y en LCR de pacientes



con LES-NP comparados con las muestras de individuos con otras enfermedades autoinmunes. En un estudio realizado por Sasajima y colaboradores se encontró que cinco de 12 pacientes con LES-NP presentaban anticuerpos anti-TPI, de igual manera se encontró que la TPI estaba presente en los complejos inmunes detectados en el LCR de dichos individuos. Por otra parte, en estas muestras fueron evaluados también los niveles de la fracción C3d del complemento, cuyos resultados mostraron altos niveles en las muestras de los pacientes con TPI (+) y bajos niveles en los TPI (-). Los investigadores proponen que la formación de inmunocomplejos con los anticuerpos anti-TPI en el LCR de pacientes con LES-NP contribuye a la patogénesis de la enfermedad, posiblemente por la activación de la vía clásica del complemento<sup>64</sup>, en otro estudio realizado por Watanabe y colaboradores, en el 2004, se demostró que la prevalencia de anticuerpos anti-TPI disminuía al instaurar terapia con inmunosupresores, indicando que posiblemente estos anticuerpos estén directamente relacionados con la actividad de la enfermedad, lo que podría permitir su medición para el monitoreo del tratamiento.

Adicionalmente, se propuso como posible mecanismo de anti-TPI la unión de estas moléculas a TPI de la superficie neuronal, causando inhibición de la enzima lo cual finalmente conlleva a la aparición de las manifestaciones NP en pacientes con LES<sup>65</sup>.

Una de las moléculas más ampliamente estudiadas en el contexto del LES-NP debido a su alta relevancia patogénica son los anticuerpos anti-fosfolípidos (aPL), en particular anti-cardiolipinas (aCL), anticuerpos anti-coagulante lúpico (LAC) y anticuerpos contra diferentes proteínas como anti- beta 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI).

Lai y Lan, en el 2000, realizaron un estudio en el cual evalúan la presencia de aCL en el suero y en el LCR de pacientes con LES-NP a través de la técnica de ELISA, el tamizaje fue realizado en 31 pacientes y 8 individuos con otras enfermedades; los resultados mostraron que altos títulos de anticuerpos IgG-aCL fueron detectados en el LCR de los individuos que padecían la enfermedad, sin embargo, los niveles en suero se presentaban en concentraciones reducidas, por lo que sugieren posible síntesis intratecal de dichas moléculas lo cual puede estar implicado en la patogénesis de la enfermedad<sup>66</sup>.

Posteriormente, Afeltra y colaboradores evaluaron la relación existente entre la presencia de aPL y el LES-NP, encontrando que la prevalencia de LES-NP fue significativamente alta en individuos con síndrome antifosfolípido, reportaron también altos niveles de IgM e IgG aCL en muestras de suero de pacientes con LES-NP en comparación con individuos sin manifestaciones NP, sin embargo, anticuerpos como anti-LAC y anti-  $\beta$ 2GPI no presentaron diferencias significativas entre pacientes e individuos control. La correlación de cada una de las manifestaciones NP específicas con la presencia de los aPL no fue posible debido al reducido tamaño de la muestra<sup>67</sup>.

Sin embargo, en un estudio realizado en el 2008 por Hanly y colaboradores se demostró que existía una correlación significativa entre pacientes cuyas muestras séricas presentaban LAC y la enfermedad cerebrovascular observada en LES-NP<sup>68</sup>.

Finalmente, cabe mencionar los anticuerpos anti-RO los cuales han sido reportados en altos niveles en muestras de suero y LCR de pacientes con LES-NP en comparación con individuos que presentan otras condiciones médicas<sup>69</sup>. En un estudio realizado por Mikdashi y Handwerger cuyo objetivo era identificar factores predictivos de daño NP significativo en LES, se hizo seguimiento de una cohorte de 130 pacientes lúpicos encontrando que la etnicidad caucásica, la actividad de la enfermedad y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y anti-RO constituían factores predictores independientes de daño NP significativo. Adicionalmente se encontró que individuos de sexo femenino con vasculitis y anti-RO presentaban daño NP grave<sup>33</sup>.

## Otras proteínas

Otras proteínas diferentes a los auto-Acs han sido relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad, considerándose como posibles biomarcadores del LES-NP, entre ellas las interleuquinas (ILs).

En un reporte realizado por Frago-Loyo y colaboradores, en el cual se midieron los niveles de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10, así mismo TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  y las quimioquinas MCP-1, RANTES, MIG e IP-10 en el LCR de pacientes con LES-NP, al momento de la hospitalización y seis semanas después (postratamiento), y se compararon con pacientes con LES sin historia de manifestaciones NP y pacientes sin

enfermedades autoinmunes, se encontraron niveles elevados de expresión de IL-6, IL-8, IP-10, RANTES, MCP-1 y MIG en el LCR de pacientes con LES-NP en comparación con los otros dos grupos de estudio, cabe anotar que la IL-6 presentó mayor expresión. En la medición postratamiento (individuos en remisión) se encontró una reducción de los valores de todas las moléculas cuya mayor expresión había sido significativa en la medición inicial, con excepción de RANTES<sup>30,70</sup>. Este estudio no permitió asociar un patrón de citoquinas Th1/Th2 con las manifestaciones NP de los pacientes lúpicos.

Otras citoquinas y factores de la inmunidad humoral como la IL-10, IL-16 y IL-18, moléculas de adhesión solubles (sICAM, sVCAM), proteínas de fase aguda (proteína C reactiva (PCR) y ferritina) han sido reportadas en LES, pero no se les ha relacionado directamente con las alteraciones neurológicas de los pacientes lúpicos<sup>30,35</sup>.

La ubiquitina, fue reportada por Sun y colaboradores en niveles aumentados en LCR de pacientes con LES-NP comparados con muestras de individuos con LES sin manifestaciones NP y pacientes con otras condiciones clínicas, adicionalmente, se observó una disminución de la expresión posterior al uso de los fármacos utilizados en el tratamiento de LES-NP, por lo que se concluye que la ubiquitina podría constituir un biomarcador importante no sólo para el diagnóstico sino también para el seguimiento del tratamiento instaurado. La función principal de la ubiquitina es el marcaje de proteínas para la degradación por medio del sistema del proteasoma. La ubiquitinación participa en diferentes procesos celulares como la respuesta inmune, inflamación, apoptosis y regulación del ciclo celular; procesos que pueden verse alterados en la fisiopatología del LES-NP<sup>71</sup>. Adicionalmente, existen reportes que establecen el aumento en la expresión de la ubiquitina en otras condiciones neurológicas como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob<sup>72</sup>, lo que indica que esta proteína puede jugar un papel importante en la presencia de manifestaciones NP.

En un estudio realizado, en el 2006, por Pavón y colaboradores se evaluaron las diferentes isoformas de haptoglobina en el plasma de 16 pacientes con LES y 15 individuos controles sanos, reportando un incremento en la expresión de esta proteína, específicamente la isoforma Hp $\alpha$ 2, en las muestras de plasma de pacientes con LES vs. individuos sanos.

Esta molécula ha sido asociada con una mayor producción de anticuerpos con conocida importancia en la fisiopatología de la enfermedad, con mayor riesgo cardiovascular y con alteraciones hematológicas como la anemia hemolítica presentada en pacientes con LES, esto debido a que la haptoglobina posee un papel importante en el catabolismo de la hemoglobina<sup>73,74</sup>. Sin embargo, dicha proteína no ha sido directamente vinculada con LES-NP<sup>75</sup>.

Otra de las proteínas reportadas es la S100B, la cual es de bajo peso molecular, unidora de calcio, perteneciente a la superfamilia S100 calmodulina-troponina<sup>76</sup>, expresada principalmente en SNC e implicada en la regulación de procesos intracelulares como la inhibición de fosforilación proteica por kinasas (generando bloqueo), lo que posiblemente conlleva a la disminución en la traducción de señales celulares; adicionalmente la S100B ha sido implicada en la regulación enzimática<sup>77</sup>. En cuanto a los procesos extracelulares afectados por S100B se encuentran la proliferación celular y la apoptosis. Esta proteína ha sido considerada un biomarcador que puede indicar el daño o disfunción del SNC<sup>78</sup>. En un estudio, realizado por Yang y colaboradores, en el que se evaluaron niveles de S100B en el suero y LCR de pacientes con LES-NP, LES sin compromiso NP e individuos sin enfermedades reumáticas, mediante ELISA, se obtuvo como resultado una concentración significativamente alta de la proteína en suero y en LCR al comparar pacientes con LES-NP con síntomas específicos (síndrome orgánico cerebral, convulsiones, accidente cerebrovascular y neuropsicosis) contra las muestras controles, sin embargo no hubo diferencia significativa en la expresión proteica en el suero y el LCR de pacientes con cefalea lúpica y neuropatía<sup>77</sup>.

En la fisiopatología del LES-NP es común encontrar desbalance homeostático entre la coagulación y la fibrinólisis, por lo tanto, es de gran importancia la evaluación de factores fibrinolíticos, es por ello que Kwiecinski y colaboradores evaluaron moléculas fibrinolíticas que incluían activador de plasminógeno urokinasa (uPA), activador de plasminógeno tisular (tPA), dímero D e inhibidor del activador del plasminógeno uno (PAI-1) en LCR de pacientes con LES-NP, LES sin manifestaciones NP e individuos sanos. Adicionalmente, fueron evaluados los niveles de productos de degradación neuronal y astrocítica, como proteína triple de neurofilamentos (NFL) y pro-

teína ácida fibrilar glial (GFAP). Entre los resultados encontrados están una marcada sobreexpresión de PAI-1 y dímero D en LCR de pacientes con LES-NP, en comparación con los otros grupos evaluados; de igual manera la concentración de estas dos moléculas se correlacionó significativamente con los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ ) y con los de marcadores de daño neuronal. Estos hallazgos indican un estado procoagulante en los pacientes con LES-NP demostrando que la inflamación sistémica puede llevar a la supresión de la fibrinólisis teniendo como resultado desbalance de la homeóstasis. Sin embargo, niveles aumentados de PAI-1 han sido detectados en otras enfermedades neurológicas por lo cual no se constituye en un biomarcador específico<sup>79</sup>.

## Conclusiones

A pesar de los múltiples estudios que muestran posibles marcadores biológicos para el diagnóstico,

actividad y recidivas del LES-NP, estos presentan diversas falencias, tales como: presencia de estas proteínas en las muestras biológicas de pacientes con otras enfermedades autoinmunes, hallazgos contradictorios que indican que no hay niveles constantes durante el desarrollo del LES ni durante la presencia de las manifestaciones NP, es decir, su expresión varía en el tiempo, por último pero no de menor importancia el comportamiento de la enfermedad es diferente entre individuos lo que hace difícil establecer una sola proteína como biomarcador; por todo esto se hace imperativa la búsqueda de un panel de proteínas que permitan hacer seguimiento del LES-NP en el tiempo, ya sea con fines diagnósticos o pronósticos, y que permitan hacer clasificación de grupos de LES-NP, correlacionando las manifestaciones clínicas con la expresión diferencial de proteínas en la muestra biológica del individuo.

## Referencias

- Hess E. Lupus the clinical Entity. In Kammer G. Lupus Molecular and Celular Pathogenesis. 1st ed. New Jersey: Humana Press Inc; 1999. p 1-12.
- Cervera R, Espinosa G. Lupus around the world. *Acta Reumatol Port.* 2007; 32(2):99-101.
- Anaya J, Tobón GJ, Pineda T. R, Font J, Cervera R, Lupus Eritematoso Sistémico. En Anaya J, Shoenfeld Y, Correa P, García C. M, Cervera R. Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune. 1st ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas CIB; 2005. p 256-269.
- Gualtierotti R, Biggioggero M, Penatti AE, Meroni PL. Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2010; 10(1):3-7.
- Wang S, Adrianto I, Wiley GB, Lessard CJ, Kelly JA, Adler AJ, *et al.* A functional haplotype of UBE2L3 confers risk for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2012; 13 (5): 380-7.
- Cunninghame G. DS, Morris DL, Bhangale TR, Criswell LA, Syvanen AC, Ronnblom L, *et al.* Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* 2011; 7(10).
- Teruel M, Martín JE, Ortego-Centeno N, Jiménez-Alonso J, Sánchez-Roman J, de Ramón E, *et al.* Novel association of acid phosphatase locus 1\* $C$  allele with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2012; 73(1):107-10.
- Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2011; 365(22):2110-21.
- Crispin JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT, *et al.* Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med.* 2010; 16(2):47-57.
- Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med.* 2011; 12(67):535-45.
- Lin SY, Hsieh SC, Lin YC, Lee CN, Tsai MH, Lai LC, *et al.* A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. *Genes Immun.* 2012; 13(3):214-20.
- Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun.* 2012; 38(2-3): 82-91.
- Sawalha AH, Wang L, Nadig A, Somers EC, McCune WJ, Cohort ML, *et al.* Sex-specific differences in the relationship between genetic susceptibility, T cell DNA demethylation and lupus flare severity. *J Autoimmun.* 2012; 38(2-3): 216-J22.
- Strickland FM, Hewagama A, Lu Q, Wu A, Hinderer R, Webb R, *et al.* Environmental exposure, estrogen and two X chromosomes are required for disease development in an epigenetic model of lupus. *J Autoimmun.* 2012; 38(2-3):J135-43.
- Guarnizo P. VG. polimorfismos de citoquinas en lupus eritematoso sistémico revista colombiana de reumatología. 2004; 11 (3):209-16.

16. Kwiecinski J, Klak M, Trysberg E, Blennow K, Tarkowski A, Jin T. Relationship between elevated cerebrospinal fluid levels of plasminogen activator inhibitor 1 and neuronal destruction in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(7):2094-101.
17. Popescu A, Kao AH. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Curr Neuropharmacol.* 2011; 9(3):449-57.
18. Bertsias GK, Boumpas DT. Pathogenesis, diagnosis and management of neuropsychiatric SLE manifestations. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6(6):358-67.
19. Carbotte RM, Denburg SD, Denburg JA. Prevalence of cognitive impairment in systemic lupus erythematosus. *J Nerv Ment Dis.* 1986; 174(6):357-64.
20. Denburg SD, Carbotte RM, Denburg JA. Cognitive impairment in systemic lupus erythematosus: a neuropsychological study of individual and group deficits. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1987; 9(4):323-39.
21. Singer J, Denburg JA. Diagnostic criteria for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: the results of a consensus meeting. The Ad Hoc Neuropsychiatric Lupus Workshop Group. *J Rheumatol.* 1990; 17(10):1397-402.
22. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(4):599-608.
23. Ainiala H, Hietaharju A, Loukkola J, Peltola J, Korpela M, Metsanoja R, *et al.* Validity of the new American College of Rheumatology criteria for neuropsychiatric lupus syndromes: a population-based evaluation. *Arthritis Rheum.* 2001; 45(5):419-23.
24. Alarcón GS, Cianfrini L, Bradley LA, Sánchez ML, Brooks K, Friedman AW, *et al.* Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. X. Measuring cognitive impairment with the cognitive symptoms inventory. *Arthritis Rheum.* 2002; 47(3):310-9.
25. Mikdashi JA, Esdaile JM, Alarcón GS, Crofford L, Fessler BJ, Shanberg L, *et al.* Proposed response criteria for neurocognitive impairment in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Lupus.* 2007; 16(6):418-25.
26. Monov S, Monova D. Classification criteria for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: do they need a discussion? *Hippokratia.* 2008; 12(2):103-7.
27. Bertsias GK, Ioannidis JP, Aringer M, Bollen E, Bombardieri S, Bruce IN, *et al.* EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(12):2074-82.
28. Hanly JG, McCurdy G, Fougere L, Douglas JA, Thompson K. Neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus: attribution and clinical significance. *J Rheumatol.* 2004; 31(11):2156-62.
29. Moorthy LN, Peterson MG, Harrison MJ, Onel KB, Lehman TJ. Quality of life in children with systemic lupus erythematosus: a review. *Lupus.* 2007; 16(8):663-9.
30. Fragosio-Loyo HE, Sánchez-Guerrero J. Effect of severe neuropsychiatric manifestations on short-term damage in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2007; 34(1):76-80.
31. Jonsen A, Bengtsson AA, Nived O, Ryberg B, Sturfelt G. Outcome of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus within a defined Swedish population: increased morbidity but low mortality. *Rheumatology (Oxford).* 2002; 41(11):1308-12.
32. Karassa FB, Ioannidis JP, Boki KA, Touloumi G, Argyropoulou MI, Strigaris KA, *et al.* Predictors of clinical outcome and radiologic progression in patients with neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 2000; 109(8):628-34.
33. Mikdashi J, Handwerker B. Predictors of neuropsychiatric damage in systemic lupus erythematosus: data from the Maryland lupus cohort. *Rheumatology (Oxford).* 2004; 43(12):1555-60.
34. Sibley JT, Olszynski WP, Decoteau WE, Sundaram MB. The incidence and prognosis of central nervous system disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1992; 19(1):47-52.
35. Liu CC, Ahearn JM. The search for lupus biomarkers. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2009; 23(4):507-23.
36. Fang X, Zhang WW. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *J Proteomics.* 2008; 71(3):284-303.
37. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 2003; 33 Suppl:311-23.
38. Goo YA, Goodlett DR. Advances in proteomic prostate cancer biomarker discovery. *J Proteomics.* 2010; 73(10):1839-50.
39. Xiao Z, Prieto D, Conrads TP, Veenstra TD, Issaq HJ. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 230(1-2):95-106.
40. Wright BL, Lai JT, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol.* 2012; 259(8):1530-45.
41. Ballok DA. Neuroimmunopathology in a murine model of neuropsychiatric lupus. *Brain Res Rev.* 2007; 54(1):67-79.
42. Kroksveen AC, Opsahl JA, Aye TT, Ulvik RJ, Berven FS. Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics. *J Proteomics.* 2011; 74(4):371-88.
43. Albrethsen J. The first decade of MALDI protein profiling: a lesson in translational biomarker research. *J Proteomics.* 2011; 74(6):765-73.
44. Sidor MM, Sakic B, Malinowski PM, Ballok DA, Oleschuk CJ, Macri J. Elevated immunoglobulin levels in the cerebrospinal fluid from lupus-prone mice. *J Neuroimmunol.* 2005; 165(1-2):104-13.
45. Stojanovich L, Smiljanich-Miljkovich D, Omdal R, Sakic B. Neuropsychiatric lupus and association with cerebrospinal fluid immunoglobulins: a pilot study. *Isr Med Assoc J.* 2009; 11(6):359-62.
46. Zandman-Goddard G, Chapman J, Shoenfeld Y. Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid

- syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 2007; 36(5):297-315.
47. Bruyn GA. Controversies in lupus: nervous system involvement. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54(3):159-67.
  48. Colasanti T, Delunardo F, Margutti P, Vacirca D, Piro E, Siracusano A, *et al.* Autoantibodies involved in neuropsychiatric manifestations associated with systemic lupus erythematosus. *J Neuroimmunol.* 2009; 212(1-2):3-9.
  49. Tin SK, Xu Q, Thumboo J, Lee LY, Tse C, Fong KY. Novel brain reactive autoantibodies: prevalence in systemic lupus erythematosus and association with psychoses and seizures. *J Neuroimmunol.* 2005; 169(1-2):153-60.
  50. Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, Koldingsnes W, Jonsson R, Mellgren SI. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. *Eur J Neurol.* 2005; 12(5):392-8.
  51. Kowal C, DeGiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, *et al.* Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(52):19854-9.
  52. Frago-Loyo H, Cabiedes J, Orozco-Narváez A, Dávila-Maldonado L, Atisha-Fregoso Y, Diamond B, *et al.* Serum and cerebrospinal fluid autoantibodies in patients with neuropsychiatric lupus erythematosus. Implications for diagnosis and pathogenesis. *PLoS One.* 2008; 3(10):e3347.
  53. Lauvsnes MB, Omdal R. Systemic lupus erythematosus, the brain, and anti-NR2 antibodies. *J Neurol.* 2012; 259(4):622-9.
  54. DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med.* 2001; 7(11):1189-93.
  55. Yu RK, Tsai YT, Ariga T. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. *Neurochem Res.* 2012; 37(6):1230-44.
  56. Labrador-Horrillo M, Martínez-Valle F, Gallardo E, Rojas-García R, Ordi-Ros J, Vilardell M. Anti-ganglioside antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and neurological manifestations. *Lupus.* 2012; 21(6):611-5.
  57. Galeazzi M, Annunziata P, Sebastiani GD, Bellisai F, Campanella V, Ferrara GB, *et al.* Anti-ganglioside antibodies in a large cohort of European patients with systemic lupus erythematosus: clinical, serological, and HLA class II gene associations. *European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. J Rheumatol.* 2000; 27(1):135-41.
  58. Williams RC, Sugiura K, Tan EM. Antibodies to microtubule-associated protein 2 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(4):1239-47.
  59. Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, Toffanin E, Zampieri S, Ruggero S, *et al.* Neurolupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: an inception cohort study. *J Autoimmun.* 2009; 32(2):79-84.
  60. Toubi E, Shoenfeld Y. Clinical and biological aspects of anti-P-ribosomal protein autoantibodies. *Autoimmun Rev.* 2007; 6(3):119-25.
  61. Nery FG, Borba EF, Viana VS, Hatch JP, Soares JC, Bonfa E, *et al.* Prevalence of depressive and anxiety disorders in systemic lupus erythematosus and their association with anti-ribosomal P antibodies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(3):695-700.
  62. Karassa FB, Afeltra A, Ambrozic A, Chang DM, De Keyser F, Doria A, *et al.* Accuracy of anti-ribosomal P protein antibody testing for the diagnosis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: an international meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(1):312-24.
  63. Orosz F, Wagner G, Liliom K, Kovacs J, Baroti K, Horanyi M, *et al.* Enhanced association of mutant triosephosphate isomerase to red cell membranes and to brain microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(3):1026-31.
  64. Sasajima T, Watanabe H, Sato S, Sato Y, Ohira H. Anti-triosephosphate isomerase antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric lupus. *J Neuroimmunol.* 2006; 181(1-2):150-6.
  65. Watanabe H, Seino T, Sato Y. Antibodies to triosephosphate isomerase in patients with neuropsychiatric lupus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 321(4):949-53.
  66. Lai NS, Lan JL. Evaluation of cerebrospinal anticardiolipin antibodies in lupus patients with neuropsychiatric manifestations. *Lupus.* 2000; 9(5):353-7.
  67. Afeltra A, Garzia P, Mitterhofer AP, Vadacca M, Galluzzo S, Del Porto F, *et al.* Neuropsychiatric lupus syndromes: relationship with antiphospholipid antibodies. *Neurology.* 2003; 61(1):108-10.
  68. Hanly JG, Urowitz MB, Siannis F, Farewell V, Gordon C, Bae SC, *et al.* Autoantibodies and neuropsychiatric events at the time of systemic lupus erythematosus diagnosis: results from an international inception cohort study. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(3):843-53.
  69. Borowoy AM, Pope JE, Silverman E, Fortin PR, Pineau C, Smith CD, *et al.* Neuropsychiatric Lupus: The Prevalence and Autoantibody Associations Depend on the Definition: Results from the 1000 Faces of Lupus Cohort. *Semin Arthritis Rheum.* 2012; 42(2):179-85.
  70. Okamoto H, Kobayashi A, Yamanaka H. Cytokines and chemokines in neuropsychiatric syndromes of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:268436.
  71. Sun L, Chen H, Hu C, Wang P, Li Y, Xie J, *et al.* Identify biomarkers of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry combined with weak cation magnetic beads. *J Rheumatol.* 2011; 38(3):454-61.
  72. Steinacker P, Rist W, Swiatek-de-Lange M, Lehnert S, Jesse S, Pabst A, *et al.* Ubiquitin as potential cerebrospinal fluid marker of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics.* 2010; 10(1):81-9.
  73. Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121 Suppl:S97-104.
  74. Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab.* 2000; 46(11-12):547-52.

75. Pavón EJ, Muñoz P, Lario A, Longobardo V, Carrascal M, Abian J, *et al.* Proteomic analysis of plasma from patients with systemic lupus erythematosus: increased presence of haptoglobin alpha2 polypeptide chains over the alpha1 isoforms. *Proteomics*. 2006; 6 Suppl 1:S282-92.
76. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*. 1995; 37(4):417-29.
77. Yang XY, Lin J, Lu XY, Zhao XY. Expression of S100B protein levels in serum and cerebrospinal fluid with different forms of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008; 27(3):353-7.
78. Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res*. 2007; 85(7):1373-80.
79. Akenami FO, Koskiniemi M, Farkkila M, Vaheiri A. Cerebrospinal fluid plasminogen activator inhibitor-1 in patients with neurological disease. *J Clin Pathol*. 1997; 50(2):157-60.