

Fracciones solubles circulantes de los receptores del TNF-alfa y sus correlaciones morfofuncionales en pacientes con diabetes mellitus tipo II con función renal normal

Mauri JM, Fernández-Real JM, Ricart W, Vallés M, Bernardó L y Bronsoms JM.
Premio General Lab

Resumen

Los estudios sobre el TNF-alfa libre circulante han aportado resultados controvertidos como consecuencia de su escasa vida media y de su biorritmo. Por el contrario, los valores de las fracciones solubles circulantes se han visto muy estables y reflejo preciso de la actividad TNF-alfa inmediatamente previa. Recientemente se ha descrito por vez primera la correlación entre TNF-alfa y nefropatía en pacientes con diabetes (DM) tipo 1 (DM1), no existiendo información respecto de las posibles correlaciones entre los niveles de fracciones solubles de receptores y aspectos morfofuncionales propios de la nefropatía diabética (ND) en la DM tipo 2 (DM2).

A fin de investigar estas posibles asociaciones se han estudiado 25 pacientes, 16 varones, afectados de DM2 con edades entre 32 y 64 años (x de 56 a). En 22 de estos pacientes se valoraron los cambios morfológicos glomerulares e intersticiales mediante histomorfometría óptica.

Se observó existencia de correlación de sTNFR1 con las fracciones mesangial ($p=0.004$) e intersticial ($p=0.005$), así como con la edad ($p<0.001$). Tras controlar por la edad sólo la correlación para la fracción mesangial persistió significativa ($p=0.02$).

El sTNFR2 únicamente se correlacionó con la edad.

Tras de corregir por el filtrado glomerular (GFR) los niveles de microalbuminuria (MAO) se correlacionaron únicamente con el sTNFR1 ($p=0.03$).

Estos datos permiten sugerir la posible intervención del TNF-alfa en el establecimiento y ulterior progresión de la nefropatía diabética en los pacientes DM2.

Abstract

sTNF receptors and renal morphofunctional correlations in type 2 diabetic patients.

Different cytokines have found to be involved in the development of experimental diabetic nephropathy. Circulating levels of the soluble fraction of the tumor necrosis factor receptors (sTNFR) are thought to reflect prevailing TNF-alpha action. We aimed to study plasma sTNFRs in relation to histological kidney changes in type 2 diabetes mellitus.

Materials and methods. Twenty-two patients (16 males) were prospectively studied (mean age 56 years, and range 32-64), mean diabetes duration 13 years, with range 1-29, body mass index of 26.9Kg/m² with range 23.1-32.9, and HbA1c of 7.7% with range of 5.4-12.6). Functional and renal optic morphometric studies were performed.

Results. The results disclosed a mean isotopical glomerular filtration rate of 126cc/min (85-177), urinary albumin excretion of 39mg/day (14-154), mesangial expansion of 0.20% (0.10-0.30) and interstitial fraction of 16.6% (6.5-32.5). Plasma sTNFR1 concentration correlated with mesangial expansion ($r=0.59$, $p=0.004$) and with the interstitial fraction ($r=0.58$, $p=0.005$). After controlling for age only the correlation with the mesangial expression persisted significant ($r=0.46$, $p=0.038$). Plasma sTNFR2 levels were not associated with histological changes.

Conclusions. These results suggest that TNF-alpha might be involved in the pathogenesis and progression of the diabetic nephropathy.

Introducción

La ND constituye una causa mayor de morbimortalidad (1) y de muerte renal en el diabético (2). Su patogenia, originada en el estado hiperglicémico, es multifactorial con fuerte componente genético. El TNF-alfa, por otra parte, interviene en la patogenia lesional y en las alteraciones funcionales de la DM a través de la activación de sus receptores p55 (TNFR1) y p75 (TNFR2) (3,4). La activación, en particular, del p55 se asocia a resistencia insulínica (5) que, a su vez, constituye un factor de riesgo de nefropatía.

Es pues razonable suponer una intervención del TNF-alfa en la génesis de la ND, y más considerando los incrementos de expresión mRNA-TNF-alta descritos en las células mesangiales del riñón diabético (6).

El TNF-alfa libre circulante constituye una parte Del TNF-alfa plasmático total dado que su mayor proporción se halla ligada a proteínas. Las técnicas para su cuantificación (sandwich enzyme immunoassay, EIA) identifican buena parte pero no la total citokina circulante (7). Este aspecto, así como su escasa vida media y variabilidad circadiana pueden explicar la disparidad de los datos comunicados (8-10).

La acción del TNF-alfa está mediada por receptores siendo los más activos e importantes el TNFR1 (p55) y el TNFR2 (p75). Estos receptores se relacionan directamente con la acción apoptótica y de resistencia insulínica como también con la activación de las proteínas kappa-B provocadas por el TNF-alfa vía activación del p55 y del p75 respectivamente (11), habiéndose descrito que la inducción de deficiencia genética de TNF-alfaR1 conllevaba nefroprotección respecto del desarrollo de DM frente a los animales estreptoquin tratados y TNF-alfaR1-receptor competentes (3).

De ambos receptores existen fracciones solubles circulantes, sTNF-alfaR1 y sTNF-alfaR2, resultado de la normal actividad proteolítica. Estas fracciones ofrecen una vida media prolongada en el tiempo y proporcional a la dosis de TNF-alfa administrada por lo que se han estimado como método válido para estimar el nivel previo de la actividad TNF-alfa en clínica (12).

Existe un único estudio realizado sobre pacientes con DM1 en el que valorando estas fracciones solubles se detecta su asociación con la nefropatía diabética (13), pero no existe nada similar descrito para el caso de la DM2.

En este estudio se pretende establecer la existencia de asociación entre la MAO, los cambios histológicos valorados mediante morfometría óptica y las fracciones sTNFR1 y sTNFR2 circulantes.

Material y método

Tras obtener la aprobación del CEIC local para la realización de un estudio prospectivo, aleatorizado, de efectividad farmacológica de nefroprotección estimada mediante biopsia renal repetida, se procedió en su día a la inclusión de un grupo de pacientes DM2 con función renal normal y normo o microalbuminúricos. De todos ellos se disponía de tejido renal y de alícuotas de plasma congeladas a -30°C . Todos ellos habían sido objeto de un completo examen en el que se obtuvieron la edad, sexo, tensión arterial (TA) niveles de HbA1c (medida por HPLC) y en los que se había evaluado el GFR mediante ^{125}I -iodotalamato y la MAO mediante inmunoturbidimetría.

El valor basal para la MAO y HbA1c fue la media de al menos dos mediciones realizadas en el intervalo mínimo de dos meses. El valor basal de TA correspondió a las cifras tensionales apreciadas en la primera consulta y obtenidas tras 5 min. de reposo en posición sentada con un tensiómetro oscilométrico automático validado.

Las determinaciones de las fracciones sTNFR1 y sTNFR2 se realizaron mediante inmunoensayo enzimático de alta sensibilidad (EASIA) con placas de fase sólida MEDGENIXsTNFR1 y sTNFR2 EASIA (Biosource Europe S.A. Zoning Industriel B6220, Fleunes, Bélgica). La concentración mínima detectable se estableció en 0.1ng/ml que define la concentración de sTNFR1 o de sTNFR2 correspondiente al promedio de desviación óptica hallado tras 20 ciclos replicativos del cero estándar más 2 desviaciones estándar (D S). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron $<7\%$ y $<9\%$ respectivamente, no existiendo reacciones cruzadas entre ambas fracciones solubles, como tampoco con el TNF plasmático.

Las biopsias renales fueron procesadas para inclusión en parafina según procedimiento habitual. Se realizaron secciones de 2-4 micrones de espesor que se tiñeron por técnicas de PAS (Schiff) y tricrómico de Masson. Los cortes basales fueron los de máxima representación de tejido.

Las valoraciones de glomérulo se realizaron mediante muestreo al azar. Se utilizó una rejilla Weibel de 42 puntos simétricos, realizándose la observación a 500 diámetros de aumento.

El área imaginaria definitiva de la superficie del flóculo se precisó como la correspondiente al polígono convexo imaginario de menor número de lados configurado por la unión de los puntos prominentes de las asas capilares periféricas (14).

Se identificaron como mesangio las áreas glomerulares PAS positivas de estructura granulofibrilar, así como los núcleos enteramente rodeados por este material. Los glomérulos esclerosados o artefactados se excluyeron de la

valoración. La fracción mesangial (Vv mes/glom) es el resultado porcentual de dividir la media de tres lecturas de mesangio y de tres lecturas de flóculo, todas realizadas aleatoriamente sobre cualquiera de los ocho ejes simétricos. Del círculo (45°) y sobre un mínimo de 10 flóculos y un máximo de 24.

Las lecturas de intersticio se obtuvieron a 350 diámetros de aumento y también mediante rejilla Weibel de 42 puntos simétricos homogéneamente distribuidos.

La primera lectura se obtuvo en todos los casos situando la rejilla sobre el límite superior izquierdo de la preparación. Las lecturas siguientes se realizaron sobre un mínimo de 10 y un máximo de 30 campos siguiendo el orden aleatorio del zigzag. De estas áreas se leyeron la superficie total de tejido y la superficie de intersticio, entendiendo por tal el área exenta de túbulos (membrana basal incluida), glomerulos o vasos con calibre igual o superior al calibre medio tubular (15).

Se realizaron dos lecturas correspondientes a los ejes horizontal y vertical de la rejilla, tanto para cortical total como para intersticio, calculando la fracción intersticial (Vv Int/Tot) como la expresión porcentual resultante de dividir la media de las lecturas de intersticio por las correspondientes de cortical total. Solamente se excluyeron de valoración aquellos campos con disrupciones u otros artefactos afectando 20 ó más puntos.

Método estadístico

Los resultados descriptivos de variables continuas se expresarán en términos de media +/-DS.

Los parámetros de distribución normal (MAO, sTNFR1, sTNFR2, Vv mes/glom y

Vv Int/Tot) sufrieron una transformación logarítmica.

El chi-2 se utilizó para comparar proporciones.

Las comparaciones de variables entre grupos o entre sujetos se realizaron mediante la t de Student.

La significación estadística se situó en $p < 0.05$.

El estudio estadístico se realizó mediante el paquete estadístico BMPD (BMPD

Statistical Software, Cork Technology Park, Model Farm, Cork, Ireland).

Resultados

Se han analizado los resultados obtenidos en los primeros 22 casos aleatoriamente introducidos en el estudio prospectivo.

La edad media fue de 56 años (32-64), el tiempo medio de duración de la enfermedad diabética fue de 13 años (10-29), el índice de masa corporal, IMC, medio fue de 26,9Kg/m² (23,1-32,9), la media de la HbA1c fue de 7,7%

TABLE 1

Comparison of anthropometrical and biochemical variables between subjects, arbitrarily divided into two groups, according to the median of glomerular expansion.

Variable	Vv (mes/glem) (%)	Vv (mes/glom) (0/o)	P
	<20.5	>20.5	
N	11	11	-
Sex (male/female)	9/2	7/4	-
Age (years)	50.9±6.8	56.5±9.6	NS
BMI (kg/m ²)	27.3±3.9	27.4±3.1	NS
Diabetes duration (years)	10.7±6.8	14.4±8.6	NS
Insulin use (yes/no)	3/8	4/7	NS
SBP (mm Hg)	132.7±17.3	146.4±15.8	NS (0.067)
DBP (mm Hg)	83.3±10	80.6±9.5	NS
HbA1c (%)	7.03±1.08	8.5±1.65	0.022
Albumin excretion rate (mg/day)	52±46	40±19	NS
Glomerular filtration rate (mlmin ⁻¹ 1.73 m ²⁻¹)	135.8±33	130.2±27.1	NS
Effective renal plasma flow (mlmin ⁻¹ 1.73 m ²⁻¹)	584±226.6	603.4±160	NS
Filtration fraction (%)	19±6.7	22.1±3.8	NS

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

(5.4-12.6%) y la media de la expresión mesangial ine de 20.5%.

Arbitrariamente se establecieron dos grupos de pacientes según que su fracción mesangial fuese igual-superior o inferior a 20.5%. En cada grupo se incluyeron 11 pacientes que resultaron homogéneos para la totalidad de parámetros incluidos (edad, IMC, tiempo de DM, requerimiento de insulina, TAS, TAD, MAO, GFRi, ERPFi y fracción de filtración) salvo para la HbA1c (tabla 1), por lo que en los estudios estadísticos subsiguientes hubo que contemplar la corrección para este factor.

Tras la citada corrección se halló que la fracción sTNFR1 se asoció a la edad ($r=0.65$, $p<0.001$), a la fracción mesangial ($r=0.59$, $p=0.004$) y a la fracción intersticial ($r=0.58$, $p=0.005$). Tras una nueva corrección, ésta para la edad, se constató la persistente asociación entre la fracción sTNFR1 y la fracción mesangial ($r=0.49$, $p=0.02$).

Toda vez que las fracciones sTNFR1 y sTNFR2 sufren eliminación renal se consideró pertinente estimar la posible asociación entre ellas y el GFR al efecto de establecer la necesidad de corrección y aunque, satisfecho el estudio, la asociación observada para sTNFR1 ($r=0.37$, $p=0.07$) y sTNFR2 ($r=0.39$, $p=0.06$) no alcanzó significación se analizó de nuevo corrigiendo para el GFR. Tras esta definitiva corrección la correlación entre sTNFR1 y la fracción mesangial (Vv mes/glom.) se mantuvo significativa ($r=0.48$, $p=0.04$).

La MAO se correlacionó también significativamente con la fracción sTNFR1 tras corregir para el GFR ($r=0.47$, $p=0.03$).

La HbA1c se asoció con la fracción intersticial (Vv Int/Tot) pero no con la fracción mesangial u otros parámetros funcionales.

Discusión

El TNF-alfa ejerce, a través de la activación de sus receptores, efectos apoptóticos sobre las células mesangiales glomerulares (11). En un orden inverso, se ha documentado como la supresión-reducción del efecto TNF-alfa lograda mediante la administración de antisero anti-TNF-alfa permite reducir e incluso -si concomitantemente administrado con un inhibidor de la actividad proteásica- prevenir la lesión renal provocada por la administración de suero antirriñón (16).

El TNF interviene en la patogenia lesional del islote pancreático (4) y en la inducción de insulín-resistencia (5), pero también, establecida la situación disglucémica, la propia hiperglicemia es causa del incremento en la expresión mRNA-TNF-alfa en las células mesangiales del animal

intacto (6) o en las células mononucleadas periféricas humanas (17).

Además, y de modo similar a lo observado en caso de la nefritis de Masugi, el bloqueo de los receptores p55 y p75, especialmente del p55, o la constitución de animales diabéticos genéticamente deficientes en p55, comporta protección del islote pancreático de la agresión TNF-alfa inducida por células t-CD4+, macrófagos o células dendríticas (3).

En el paciente DM1 y DM2 se ha podido comprobar la sobreexpresión del mRNA-TNF-alfa tisular así como cierta correspondencia entre esta expresión y la presencia de complicaciones micro (13,18) y macroangiopáticas (19). Ello permitiría suponer la presencia en el paciente DM de niveles elevados de TNF-alfa plasmático y, también, sus posibles asociaciones con las complicaciones angiopáticas. Los datos disponibles al efecto son, no obstante, contradictorios (8-10) debido probablemente a las limitaciones del EIA para apreciar la totalidad del TNF-alfa (7), así como la reducida vida media de éste.

El hallazgo de las fracciones circulantes del p55 y del p75, la confirmación de su estabilidad, de su aclaramiento renal y de su correlación con las dosis de TNF-alfa administrada hace que estas fracciones se consideren los marcadores idóneos para reconocer la actividad TNF-alfa preexistente (12).

Son escasos los estudios experimentales en donde las fracciones sTNFR1 y sTNFR2 se hayan correlacionado con las complicaciones diabéticas pero sus aportaciones, aunque necesitadas de mayor confirmación, sugieren su capacidad para valorar la actividad TNF-alfa en su relación con las complicaciones micro y macroangiopáticas.

Únicamente se han documentado dos estudios, ambos realizados en pacientes con DM1, en los que se confirma la presencia de correlación positiva entre los niveles circulantes de sTNFR1 y de sTNFR2, y la presencia y la severidad de las complicaciones microangiopáticas retinianas y glomerulares (13,18).

Conocemos un único estudio en que se establece correlación entre la expresión tisular para el TNF -estimada por inmunohistoquímica a nivel macrovascular- y la macrovasculopatía de la DM2, diferenciándola de la vasculopatía arteriosclerótica (19).

Esta es, por tanto, la primera descripción de las correlaciones existentes entre estas fracciones solubles y la ND en la DM2.

En este estudio, a diferencia del previamente citado, conducido en DM1 (13), solamente se mantiene la correlación entre la fracción sTNFR1 y los cambios mesangiopáticos reflejados por la fracción mesangial.

Estos datos podrían indicar una intervención del TNF- α en la patogenia y, eventualmente, en la progresión de la ND de los pacientes con DM2, así como que la ejecución predominante de tal efecto podría acontecer a través de la activación de receptor p55 (TNFR1).

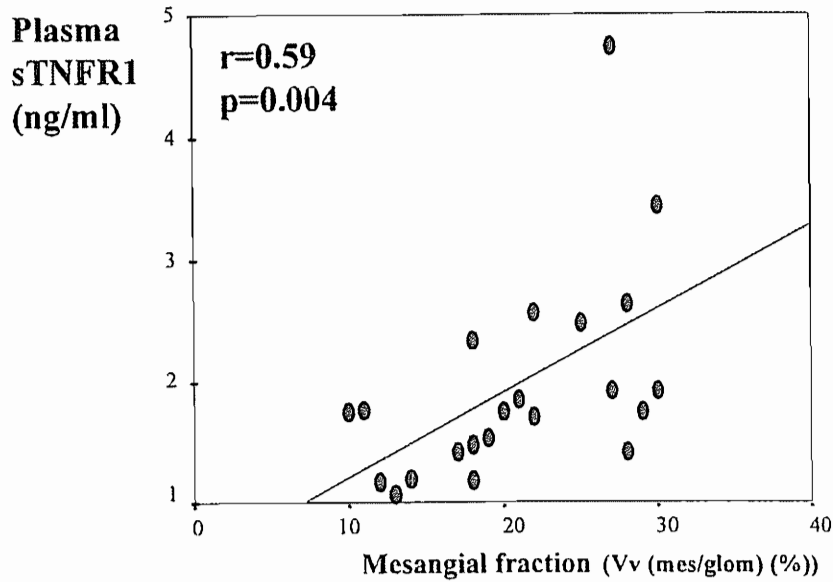


Figure 1.

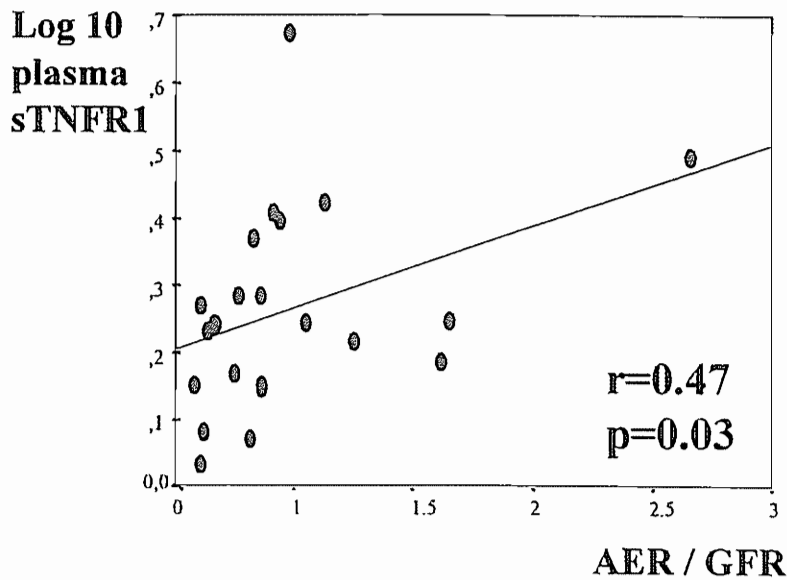


Figure 2.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Linear correlation of plasma sTNFR1 levels with mesangial expansion.

Figure 2. Linear correlation between plasma sTNFR1 levels and albumin excretion rate after controlling for glomerular filtration rate.

BIBLIOGRAFÍA

1. Unchanged incidence of diabetic nephropathy in IDDM patients. Rossing P, Rossing K, Jacobsen P et als. *Diabetes*. 44: 739-743; 1995.
2. A prospective study of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in insulin dependent diabetics with diabetic nephropathy. Parving HH, Smidt UM, Friisberg B et als. *Diabetologia* 20: 457-461:1981
3. TNF receptor I- dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes. Kagi D, Ho A, Odermatt B et als. *J. Immunol.* 162:4598-4605:1999.
4. In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. Pakala SV, Chivetta M, Kelly CB et al. *J.Exp.Med.* 189:1053-1062:1999.
5. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha mediated insulin resistance in genetic obesity. Uysal KT, Wiesbrock SM and Hotamisligil GS. *Endocrinology* 139: 4832-4838:1998.
6. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I et als. *Diabetes* 42: 450-456:1993.
7. Measurement of serum cytokines. Barnes A. *Lancet*. 352:324-325:1998.
8. Serum levels of tumor necrosis factor and II-1-alpha and II-1-beta in diabetic patients. Mooradian AD, Reed RL, Meredith KD et al. *Diabetes Care* 14:63-65:1991.
9. Circulating tumor necrosis factor alpha is elevated in male but not in female patients with type II diabetes mellitus. Pfeiffer A, Janott J, Mohlig M et als. *Hornt.Metab. Res.* 29:111-114:1997.
10. Urinary protein excretion and serum tumor necrosis factor in diabetic patients with advanced renal failure: effects of pentoxifyline administration. Navarro JF, Mora C, Rivero A et als. *Am. J. Kidney Dis.* 33: 458-463:1999.
11. Activation and attenuation of transcription factor NF-KB in mouse glomerular mesangial cells in response to tumor necrosis factor-alpha, immunoglobulin G, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. Evidence for involvement of reactive oxygen species. Satriano J and Schlondorff). *J. Clin. Invest.* 94: 1629-1636:1994.
12. Stabilization of the bioactivity of the tumor necrosis factor by its soluble receptors. Aderka D, Engelmann H, Maor Y et als. *J.Exp.Med.* 175: 323-329:1992.
13. Soluble tumor necrosis factor receptors in sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relations to duration and complications of disease. Kulseng B, Vatten L and Espevik T. *Acta Diabetol.* 36: 99-105:1999.
14. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN et als. *J.Clin. Invest.* 74: 1143-1155:1984.
15. Renal interstitial expansion in insulin dependent diabetes mellitus. Lane PH, Steffes MW, Fioretto P, et als. *Kidney Int.* 43: 661-667: 1993.
16. Antiserum against tumor necrosis factor-alpha and a protease inhibitor reduce immune glomerular injury. Hruby ZW, Shirota K, Jothy S et al. *Kidney Int.* 40: 43-51: 1991.
17. The effect of glucose and advanced glycosilation end products on II -6 production by human monocytes. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I et al. *Ann. NY Acad. Sci.* 748. 562-570: 1995.
18. Evidence for control of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) activity by TNF receptors in patients with proliferative diabetic retinopathy. Limb GA, Soomro H, Janikoun S et als. *Clin.Exp.Immunol.* 115: 409-414: 1999.
19. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha in diabetic macrovasculopathy. Clausell N, Kalil P, Biolo A et als. *Cardiovasc. pathol.* 8: 145-151: 1999.