

Mesura de la concentració de la lipocalina associada a la gelatinasa dels neutròfils per a l'avaluació de la funció renal

Gemma Solé Enrech
Beatriz Candás Estébanez
Laboratori Clínic
IDIBELL—Hospital Universitari de Bellvitge
L'Hospitalet de Llobregat

Introducció

Aquests últims anys, donada la prevalença de les malalties renals i la gravetat que comporten, han anat sorgint diversos treballs amb la finalitat de trobar una nova magnitud bioquímica que reflecteixi precoçment la lesió renal i així poder detectar la malaltia en etapes menys avançades que les que es detecten amb la mesura de la concentració de creatinina en el plasma¹ o el càlcul del cabal de filtrat glomerular. Un dels marcadors que compleix millor amb aquestes necessitats és una proteïna, aïllada per primer cop l'any 1992, que s'expressa a partir del gen LCN2 (1) denominada lipocalina associada a la gelatinasa dels neutròfils (NGAL), que deu el seu nom al fet que es va aïllar per primer cop de la gelatinasa B (EC 3.4.24.35) dels neutròfils (2), denominada també metal·loproteïnasa 9.

Aquesta revisió té la intenció de recollir els treballs de diversos autors en els quals s'estudia la possible utilitat de la mesura de la concentració de massa de la NGAL en el plasma i en l'orina per a l'avaluació de la funció renal. Tot i que diversos d'aquests estudis han obtingut resultats prou concloents, moltes qüestions romanen encara per resoldre fins a la seva definitiva implantació en el diagnòstic, prevenció i seguiment de les malalties renals.

S'ha demostrat recentment que aquesta proteïna exhibeix un gran nombre de funcions biològiques (3) i que participa en activitats dependents del seu grup sideròfor com a donant i quelant del ferro (4). Una de les seves funcions biològiques és la participació en la formació de la nefrona a l'embrió, així com la seva ràpida i massiva resposta a la lesió renal. A més, s'ha estudiat la seva participació activa en processos de protecció del ronyó (5), desenvolupament del càncer, apoptosi de limfòcits B (6,7), efecte bacteriostàtic (8-10) i inhibició de l'eritropoesi (10).

NGAL: una proteïna aïllada per primer cop als neutròfils

La NGAL pertany a la família de les lipocalines, proteïnes que porten al seu interior lligands hidrofòbics (2). El lligand de la NGAL és un sideròfor, un lligand

no peptídic de petit tamany que uneix Fe(III) i que està implicat en moltes de les funcions biològiques que posseeix la proteïna (3).

Es va trobar per primer cop associada a la gelatinasa B dels neutròfils humans, quan anticossos contra la gelatinasa B reconeixien també aquesta proteïna, que té una massa molar de 25 kg/mol (2). Mitjançant procediments d'immunoprecipitació es va observar que la gelatinasa B tenia 3 isoformes de masses molars 92, 135 i 220 kg/mol i que la NGAL estava formant part de la isoforma de 135 kg/mol, tot i que la forma més freqüentment excitada del neutròfil no està complexada a la gelatinasa B (2).

Aquesta proteïna, denominada inicialment proteïna p25, posseeix una estructura primària que consisteix en un residu de 178 aminoàcids (2) i una glicosilació (2), conté ponts disulfur i forma dímers i trímers. Amb la intenció d'identificar i caracteritzar aquesta proteïna es va revisar la base de dades MIPSX (2) i es va trobar que la seva seqüència era similar a la α_2 -microglobulina de rata i a la proteïna 24p3 de ratolí, que estaven relacionades amb un deteriorament de la funció renal.

Expressió de la NGAL en la malaltia renal i activitat biològica

En el moment de la purificació la seva funció era encara desconeguda. Va ser posteriorment quan es va descobrir el seu paper actiu en la formació de la nefrona a l'etapa embrionària (3,12).

Els monòcits, macròfags, adipòcits i sobretot els neutròfils immadurs expressen la proteïna NGAL, mentre que els madurs, que circulen per la sang, han perdut aquesta capacitat d'expressió (3). Per tant, la implicació de la NGAL en el teixit malmès és impossible de determinar per procediments d'hibridació de mRNA.

Pel que fa a la seva activitat biològica s'ha comprovat que depèn del Fe(III), ja que la seva funció no és la mateixa si està unida al metall o no (3).

Quan la NGAL forma un complex amb Fe(III), la seva activitat biològica està implicada en el desenvolupament de la nefrona, concretament en el pas de cèl·lules mesenquimals a epitelials i en la protecció del ronyó davant d'una lesió (5).

A més, és sobreexpressa en cèl·lules epitelials del colon en àrees d'inflamació o neoplàsia (13,14) i participa en processos cancerosos actuant en la mutació del oncogen Ras (15). En canvi, el complex no unit a ferro està implicat en el segrest del Fe(III) de les cèl·lules i aquesta privació participa en el mecanisme d'apoptosi de les cèl·lules B (6,7) i a més en la inhibició del creixement bacterià (8-10) i l'eritropoesi (10).

Donada l'àmplia activitat biològica d'aquesta proteïna, no s'ha trobat un augment de la seva concentració en l'orina de pacients amb malalties renals exclusivament. També és considerada marcador d'activació dels neutròfils, marcador d'inflamació, ja que la NGAL és una proteïna de fase aguda, i s'ha trobat augmentada en l'orina de pacients amb càncer. Actualment, s'està

estudiant la utilitat de la seva mesura en l'orina o en el plasma per a l'avaluació de la funció renal.

Implicació de la NGAL a la lesió renal

La implicació i el paper que juga la NGAL a les primeres etapes de la malaltia renal ha estat descrita per diversos autors amb la finalitat d'esbrinar si la mesura de la seva concentració en el plasma o en l'orina són útils per a l'avaluació de la funció renal i per entendre millor els mecanismes d'aquesta malaltia.

Mori *et al.* (3) van a estudiar la implicació de l'augment de la concentració de NGAL en el plasma i en l'orina per tal de predir un començament del deteriorament de la funció renal, ja que en van trobar augments al cap de 1 o 2 hores de la lesió renal. També van estudiar l'augment de la concentració de NGAL tant en el plasma com en l'orina per detectar un empitjorament de la insuficiència renal crònica o l'evolució de la insuficiència renal aguda.

Segons Mishra *et al.* (13), en els estudis que van realitzar amb diversos models animals utilitzant un microxip d'RNA es va comprovar que l'expressió de la proteïna NGAL en la sang precedeix a l'augment de la concentració de marcadors utilitzats fins al moment com la mesura de la concentració de creatinini en el plasma, i la mesura de quitinasa (EC 3.2.1.14) i la β_2 -microglobulina en l'orina.

Els estudis més reveladors publicats en referència al paper desenvolupat per la NGAL a la lesió renal van ser els proposats per Mishra *et al.* (16) i Wagener *et al.* (17), que descriuen la mesura de la concentració de NGAL en el plasma i en l'orina per a l'avaluació de la funció renal en els humans, donats els diferents avantatges que van observar en la seva recerca.

Al primer d'aquests estudis (16), realitzat en 71 individus de població pediàtrica sotmesa a derivació (*bypass*) cardiopulmonar, es va observar que la concentració de creatinini en el plasma va augmentar entre 1 i 3 dies després de l'operació quan ja s'havia desenvolupat una insuficiència renal. En canvi, una anàlisi univariant realitzada al mateix estudi va mostrar una correlació significativa entre la malaltia renal aguda, la derivació coronària i l'augment de les concentracions de NGAL tant en el plasma com en l'orina a les 2 h de la intervenció. A més, van realitzar una anàlisi multivariant, on es va trobar que la mesura de la concentració de NGAL en l'orina a les 2 h de la derivació, era la millor opció per avaluar la funció renal, ja que presentava una àrea sota la corba ROC de 0,998 amb una sensibilitat diagnòstica de 1,00 i una especificitat diagnòstica de 0,98 per a un valor discriminant de 50 $\mu\text{g/L}$.

Els resultats es van obtenir per un procediment d'enzimoinmunoanàlisi sobre fase sòlida (ELISA) optimitzat per a aquest estudi i van ser contrastats amb transferència de proteïnes (transferència western), obtenint uns resultats amb una diferència inferior al 20%.

A l'altre estudi (17), realitzat en una població adulta també sotmesa a derivació

cardiopulmonar, es confirmen els resultats trobats a l'anterior treball, donant-se especial importància a la possibilitat de discriminar si l'augment és degut a processos inflamatoris generats per la mateixa intervenció o a una malaltia renal originada per l'operació. Tant en el cas de procés inflamatori com de malaltia renal, es produeix una sortida massiva de NGAL de dins de les cèl·lules immediatament després de la intervenció, disminuint a les poques hores en el primer dels casos i mantenint-se elevada en el cas que es tracti d'una lesió renal.

Gràcies als diferents estudis realitzats en pacients hospitalitzats que han patit isquèmia renal degut a algun tòxic administrat o per causa de la cirurgia, s'ha pogut demostrar la rapidesa d'aparició de la NGAL tant en el plasma com en l'orina i que l'augment de la seva concentració precedeix a l'augment de les clàssiques magnituds emprades fins al moment com són les concentracions de creatinina en el plasma, de quitinasa en l'orina i de β_2 -microglobulina en l'orina (13).

Procediments de mesura de la concentració de NGAL en el plasma i en l'orina per a l'avaluació de la funció renal

La mesura de la concentració de NGAL en el plasma o en l'orina s'ha dut a terme mitjançant diferents mètodes, majoritàriament immunoquímics, sensibles i incruents (13), utilitzant diverses fases sòlides entre elles minicolumnes, tires reactivas o suports de poliestirè amb un anticòs enllaçat a ells de forma covalent i determinant la concentració espectromètricament (11).

A l'actualitat es comercialitza un equip de reactius per a la mesura de la NGAL en el plasma, el sèrum o l'orina, que permet desenvolupar un procediment de mesura reproduïbles i que és practicable a qualsevol laboratori. Es tracta d'un procediment d'enzimoinmunoanàlisi convencional sobre fase sòlida (27). En aquest procediment, s'utilitza un anticòs contra la NGAL enllaçat covalentment a la fase sòlida. Un cop superada una primera etapa d'incubació, n'hi ha una altra de posterior que consisteix en l'addició d'un anticòs contra la NGAL que està biotinitat. Un cop acabada, s'afegeix peroxidasa de rave silvestre (EC 1.11.1.7) marcada amb estreptavidina. Aquest s'encarregarà de transformar el substrat en un producte que es pugui mesurar espectromètricament.

Tots els components de l'equip de reactius s'emmagatzemen a 4 °C i les incubacions es duen a terme a temperatura ambient. El temps complet de la mesura és inferior a 4 h. L'interval de mesura és (0,02-1,00) µg/L i el límit de detecció de 0,024 µg/L.

Discussió

Amb la finalitat de millorar el pronòstic de la malaltia renal, han estat nombroses les investigacions que han anat sorgint proposant diferents molècules que reflecteixin més aviat el deteriorament de la funció renal variant la seva concentració en el plasma i en l'orina més precoçment.

La concentració de cistatina C en l'orina reflecteix el deteriorament de la funció

renal (18,19) però el seu augment és massa lent, tot i que si es compara amb la concentració de creatinini en el plasma s'observa que no presenta tanta variabilitat interindividual.

Altres molècules han estat estudiades per diversos investigadors per a l'avaluació de la funció renal sense gaire èxit. Aquestes són la α_1 -microglobulina (21), la β_2 -microglobulina i la quitinasa (22), però, en tots els casos, la seva concentració triga en augmentar en l'orina 4 o 5 dies (11).

També s'ha estudiat la proteïna Cyr 61, rica en cisteïna. Se sap que apareix en l'orina entre 3 i 9 h de l'inici de la lesió (11,13,23), però se'n desconeixen les seves concentracions fisiològiques. A més, requereix un mètode de mesura que sigui practicable.

Una altra molècula, la KIM-1 (24,25), va ser trobada a l'orina de rates a les (24-48) h després de la isquèmia provocada (13) i va donar resultats prometedors com a marcador de lesió tubular. També es va trobar aquesta molècula després d'una biòpsia realitzada en pacients que havien patit necrosi tubular (26). Malgrat tot, no es coneix quan triga en augmentar en l'orina dels humans després de la lesió.

L'ús de la concentració de massa de NGAL en el plasma o l'orina com a magnitud per al diagnòstic i seguiment de les malalties renals, té avantatges clars respecte les magnituds que es fan servir en els laboratoris clínics per a aquesta finalitat. Si es compara amb la concentració de creatinini en el plasma, s'observa que aquesta última posseeix una àmplia variabilitat interindividual, ja que depèn de la massa muscular i de la dieta, entre altres factors, i augmenta quan el ronyó ja ha perdut un 50% de la seva funcionalitat (20). Això fa necessari buscar magnituds bioquímiques que reflecteixin el començament del deteriorament de la funció renal a les primeres etapes de la malaltia.

Tot i que els darrers anys han estat sorgint articles i revisions alertant dels problemes que comporta l'ús de la concentració de creatinini en el sèrum o en l'orina per al diagnòstic i seguiment de les lesions renals, aquesta és la principal magnitud sol·licitada al laboratori amb aquesta finalitat. Això i el fet que la concentració de creatinini en el plasma és molt assequible, fa difícil la substitució d'aquesta magnitud per una altra desconeguda fins al moment pels clínics.

Caldrà doncs, informar als metges clínics dels beneficis que els pot aportar aquesta nova magnitud, la qual cosa no ha d'implicar la substitució d'una magnitud per l'altre sinó que permetrà aprofitar els avantatges de cadascuna.

Per tant, la implantació de la concentració de NGAL en el plasma o en l'orina com a principal magnitud biològica per a la detecció precoç d'un deteriorament de la funció renal s'ha de continuar estudiant, per identificar quins són els mecanismes principals pels que desenvolupa la seva activitat biològica i així esbrinar quina és la seva funció principal i la implicació que té en les malalties renals.

A més, cal aprofundir en l'estudi de les variables que poden modificar la seva concentració en el plasma i en l'orina i conèixer millor la seva estabilitat tant en el plasma com en l'orina.

Seria interessant estudiar la seva utilitat en el cribatge de la lesió renal a la població general, però si tenim en compte que pot estar augmentada en infeccions o processos inflamatoris, seria molt fàcil donar falsos positius donada l'elevada sensibilitat diagnòstica obtinguda (16) per al procediment de mesura utilitzat. D'altra banda, es podria proposar l'ús d'aquesta magnitud en el cribatge de la lesió renal en pacients que tinguin algun factor de risc que els predisposi a patir la lesió perquè en aquest cas és molt important que la sensibilitat diagnòstica sigui molt elevada.

Referències

1. Perco P, Pleban C, Kainz A, Lukas A, Mayer G, Mayer B, Oberbauer R. Protein biomarkers associated with acute renal failure and chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest* 2006;36:753-63.
2. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425-32.
3. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney international* 2007;71:967-70.
4. Li JY, Ram G, Gast K, Chen X, Barasch K, Mori K, Schmidt-Ott, Wang J, Kuo HC, Savage-Dunn C, Garrick MD, Barasch J. Detection of intracellular iron by its regulatory effect. *Am J Physiol Cell* 2004;287:C1547-59.
5. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. Endocytic delivery of lipocalin siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115:610-21.
6. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 2005;123:1293-305.
7. Devireddy LR, Teodoro JG, Richard FA, Green MR. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* 2001;293:829-34.
8. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002;10:1033-43.
9. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodríguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004;432:917-21.
10. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Nagasawa T, Nakamura Y. Lipocalin 2 functions as a negative regulator of red blood cell production in an autocrine fashion. *FASEB J* 2005;19:1881-3.

11. Determination of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Diagnostic Marker for Renal Disorders. WO 2006/066587. <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2006066587&IA=WO2006066587&DISPLAY=DESC>>
12. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromatge H, Tempst P, Strong R, Barasch J. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 2002;10:1045-56.
13. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2534-43.
14. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut* 1996;38:414-20.
15. Hanai J, Mammoto T, Seth P, Mori K, Karumanchi SA, Barasch J, Sukhatme VP. Lipocalin 2 diminishes invasiveness and metastasis of Ras-transformed cells. *J Biol Chem* 2005;280:13641-7.
16. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005;365:1231-8.
17. Wagener G, Gebhard MD, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch J, Sladen R, Lee H, Thomas MD. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 2006;105:485-91.
18. White C, Akbari A, Hussain N, Dinh L, Filler G, Lepage N, Knoll GA. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: a comparison between serum creatinine and cystatin C-based methods. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3763-70.
19. Rule AD, Bergstralh EJ, Slezak JM, Bergert J, Larson TS. Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations. *Kidney Int* 2006;69:399-405.
20. Uttenenthal L. O. NGAL: how useful is the new marker of kidney damage? *Clinical Lab Inter* 2007; <<http://www.clin-online.com/artimg/a20071440222116.pdf>>
21. Penders J, Delanghe JR. Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clin Chim Acta* 2004;346:107-18.
22. Kotanko P, Margreiter R, Pfaller W. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and neopterin aid in the diagnosis of rejection and the acute tubular necrosis in initially nonfunctioning kidney grafts. *Nephron* 2000;84:228-35.
23. Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo SK, Yuen PS, Craig L, Hu X, Star RA. Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61,CCNI) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int* 2002;62:1601-10.
24. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, Sanicola M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998;271:4135-42.

25. Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre JV. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 2002;277:39739-48.
26. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002;62:237-44.
27. Kjeldsen L, Koch C, Arnljots K, Borregaard N. Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1996;198:155-164.

¹En aquest article, el terme "plasma" fa referència indistintament a plasma o sèrum.

Citació recomanada per a aquest document:

Solé Enrech G, Candás Estébanez B. Mesura de la concentració de la lipocalina associada a la gelatinasa dels neutròfils per a l'avaluació de la funció renal. *In vitro veritas* 2007;8, art. 99: <www.acclc.cat/>