

Capacidad mitogénica del suero del urémico diabético sobre el cultivo de fibroblastos humanos

J. Aubia, M. Nácher, J. Bosch, M. Mir, A. Carrascosa, A. Orfila, I. Llorach, J. Lloveras y J. Masramón

Servei Nefrologia. Hospital L'Esperança. Institut Municipal Investigació Mèdica (IMIM). Dept. Medicina. Universitat Autònoma. Barcelona.

RESUMEN

Las alteraciones en la producción de matriz extracelular son una de las varias teorías propuestas estos últimos años para explicar la patogenia de algunas complicaciones de la diabetes. El cultivo de fibroblastos permite explorar las funciones de las células mesenquimatosas que podrían estar en el origen de aquellas alteraciones. Para examinar la posibilidad de que algunas de las complicaciones específicas del urémico diabético estén relacionadas con estas alteraciones celulares, hemos procedido a estudiar los efectos del suero diabético urémico sobre la proliferación de fibroblastos cutáneos humanos en cultivo in vitro, medida por medio de la captación de timidina marcada con tritio. Se ha estandarizado el método y su medición, expresándose la capacidad de estimulación del suero como índice entre las cpm logradas en el cultivo basal comparadas con las de las cpm después de añadir suero al 20% (Tim. 20/0). Este valor ha sido para los sujetos normales de edades superiores a cincuenta años de $22,81 \pm 8,08$. Este índice para un grupo de 20 sueros de diabéticos urémicos en diálisis fue significativamente más elevado ($35,4 \pm 12,78$, $t = 4,69$, $p < 0,001$). Para un grupo de edad comparable de 25 urémicos no diabéticos, los valores fueron de $27,3 \pm 14$, con diferencias significativas tanto con respecto a los diabéticos ($t = 3,45$, $p < 0,0014$) como con respecto a los normales ($t = 2,89$, $p < 0,05$). Esta actividad del suero no varió por efecto de la hemodiálisis en 20 pacientes estudiados (pre-HD: $30,1 \pm 15$; post-HD: $32,6 \pm 13,9$). Tampoco pudo correlacionarse esta actividad con las concentraciones determinadas por RIA del factor de crecimiento insulina-like (IGF-1; somatomedina-C), ni hubo diferencias de este factor de crecimiento entre urémicos-diabéticos (215 ± 133 ng/ml) y urémicos-no diabéticos (247 ± 83). Se concluye que el suero del diabético urémico presenta una capacidad muy aumentada de inducir la proliferación fibroblástica tanto respecto a los normales como respecto a los urémicos no diabéticos. Esta capacidad aumentada no puede explicarse sólo por la ligera elevación en las concentraciones séricas de IGF-1 y, por tanto, se deben buscar otros factores en el suero del diabético urémico que puedan justificar esta capacidad mitogénica.

Palabras claves: **Cultivo de fibroblastos, diabetes, uremia.**

Recibido: 29-IV-1991.
En versión definitiva: 8-VII-1991.
Aceptado: 8-VII-1991.

Correspondencia: Dr. J. Aubia.
Servei Nefrologia. Hospital de l'Esperança.
S. Josep de la Muntanya, 12.
08034 Barcelona.

PROLIFERATIVE INDUCING CAPACITY OF UREMIC DIABETIC SERA ON HUMAN FIBROBLAST CULTURES

SUMMARY

Derangement in extracellular matrix production is one of the several theories advanced in recent years to explain the pathogenesis of complications of diabetes. Fibroblast cultures allow one to explore some cellular functions of mesenchymal cells that could be the origin of such derangements. To examine the possibility that some specific complications of diabetics, on dialysis might be related to these cellular disfunctions, we have studied the *in vitro* effects of uremic diabetic serum on fibroblast culture. In this report we have measured the replicative capacity through a H_3 -Thymidine method and we express it as an index by dividing c.p.m. in cultures in which we added serum at 20% by c.p.m. under basal conditions (Tim. 20/0). In normal subjects over 50 years old, this value was 22.81 ± 8.08 . In a group of 20 diabetics on hemodialysis, the Tim. 20/0 was significantly higher (35 ± 12.78 , $t = 4.09$, $p < 0,001$). In an age-matched group of 25 non-diabetic dialysis patients the mean value was 27.3 ± 14 , which is significantly different from that of diabetics ($t = 3.45$, $p < 0,0014$) and normals ($t = 2.89$, $p < 0,005$). This proliferative-inducing capacity was not changed by hemodialysis (pre-HD: 30.1 ± 15 , post-HD: 32.6 ± 13). When we attempted to correlate these values with serum concentrations of Insulin-like-Growth Factor-I (IGF-1) measured by RIA, no significant correlation nor differences between diabetics (215 ± 133 ng/ml) and non-diabetic-uremics (247 ± 83 ng/ml) was observed. We conclude that in uremic-diabetic serum there exist an increased capacity to induce fibroblast proliferation. This can not be explained only by the slight increments in IGF-1 serum concentrations so other serum growth factors in uremic diabetic should be investigated.

Key words: **Fibroblast culture, diabetes, uremia.**

Introducción

Los diabéticos urémicos presentan una serie de complicaciones características que los distinguen del resto de los urémicos, empeoran su pronóstico vital y los incapacitan¹: la aceleración de la aterosclerosis, la vasculopatía macro y microangiopática o la osteodistrofia específica² son unos ejemplos clásicos. A menudo estas complicaciones ocurren en tejidos y estructuras ricos en colágena, como el engrosamiento precoz de las membranas basales^{3,4}. Por ello se ha intentado correlacionar la aparición de estas complicaciones con algunas alteraciones en las funciones de las células de origen mesenquimatoso inducidas por la diabetes, a veces relacionadas con alteraciones en factores locales de crecimiento⁵⁻⁷. El estudio de la interrelación de diabetes más uremia sobre estos fenómenos no ha sido abordada, a pesar de que se ha demostrado que también la uremia en sí puede provocar efectos observables sobre algunas funciones de los fibroblastos o de otras células de origen mesenquimatoso. Este trabajo describe los primeros resultados de un proyecto que pretende estudiar esta interrelación, experimentando sobre los efectos que el suero de estos pacientes puede provocar sobre las funciones del fibroblasto humano *in vitro*. En esta primera observación hemos cuantificado el

efecto sobre la proliferación de estas células medida a través de la captación en cultivo de timidina marcada.

Materiales y métodos

Pacientes

Se obtuvieron sueros de 20 urémicos diabéticos en hemodiálisis. Todos ellos habían presentado en la fase de prediálisis una clínica compatible con nefropatía diabética. Todos ellos eran diabéticos con retinopatía proliferativa, insulinotratados desde años antes de su ingreso en diálisis. El grupo control de urémicos-no diabéticos lo constituían 25 pacientes en hemodiálisis afectados de nefropatías diversas (seis glomerulonefritis, cuatro poliquistosis, cinco nefropatías intersticiales, ocho nefroangiosclerosis probable, una amiloidosis y una nefropatía lúpica). Las edades de ambos grupos fueron de $63 \pm 11,08$ años en los diabéticos (de cincuenta a setenta y tres años) y de $65 \pm 8,09$ años (de cincuenta a setenta y ocho) en los no diabéticos. El suero se obtuvo por venopunción de la fístula arteriovenosa (prehemodiálisis), en ayunas y antes de la administración de insulina. Los pacientes habían permanecido en programas de diálisis durante un período

de tiempo entre tres meses y ocho años. En ningún caso estaban recibiendo tratamiento inmunosupresor, vitamina D, ni bloqueantes del calcio. Se dializaban doce horas por semana, en tres sesiones, con dializador de cuprofán. Los sueros de controles sanos se obtuvieron entre los pacientes que acudían al laboratorio para estudios preoperatorios de patología quirúrgica menor. Los sueros se congelaron a -20°C hasta su utilización en los cultivos celulares.

Cultivos de fibroblastos

Los fibroblastos son obtenidos a partir de biopsias de piel humana de adultos sin desórdenes metabólicos. Las muestras de piel se cortan en explantes de 1 ó 2 mm aproximadamente y se transfieren a frascos de cultivo de 50 ml (Cell Cut). Se incuban en medio MEM con penicilina y estreptomycinina (100 UI/ml y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente) y suplementado con un 10 % de suero de ternera fetal (Biological Industries, Beth Haemek, Israel). Los frascos son mantenidos a 37°C en atmósfera húmeda con un 5 % de CO_2 , y se dejan incubar durante dos o tres semanas, cambiando el medio de cultivo dos veces por semana, hasta que los fibroblastos han migrado a partir del tejido y el frasco es confluyente. Se realizan sucesivos subcultivos de las células en proporción 1:4. Para los experimentos se han utilizado fibroblastos entre los pases 4-10.

Captación de timidina marcada

Se ha realizado de acuerdo con el método de Madsen y cols., con algunas modificaciones propias. Se tripsinizan (Difco Laboratories, Detroit, MI) los fibroblastos y se distribuyen en placas, para cultivo de células, de 96 pocillos (Nunc, Copenhagen) a una densidad de 10.000 células/pocillo, y se incuban con medio MEM suplementado con un 10 % de suero de ternera fetal y con penicilina y estreptomycinina durante cuarenta y ocho horas. Se cambia el medio de cultivo y se añade medio MEM sin suero y se incuba cuarenta y ocho horas más. Se aspira el medio y se añade medio frasco con cuadruplicados de las diferentes concentraciones de los sueros a estudio, así como unos pocillos con medio sin suero. Se incuban durante cuarenta y ocho horas, añadiéndose durante las últimas veinticuatro horas 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de timidina tritiada (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra, 44 Ci/mmol). Se aspira el medio de cultivo y gracias a un Cell Harvester se lavan las células con ácido acético al 2,5 % y se tratan con Tritón X-100, tras lo cual se recogen en filtros de fibra de vidrio que se depositan en viales de centelleo y se cuentan en un contador de centelleo sólido como cpm/pocillo. El cociente entre la media de los cpm de los pocillos con suero problema y los cpm del basal se expresan como índice Tim. 20/0.

Determinación de IGF-1

La concentración sérica de IGF-1 en los sueros a estudio se ha determinado mediante un radioinmunoensayo

específico (IRMA-mat IGF-1 de Byk Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Alemania). El límite de detección del ensayo es de 25 ng/ml. Las normalidades fueron obtenidas en nuestro laboratorio (rango: 64-275 ng/ml).

Los valores se expresan en $\bar{x} \pm 1$ desviación estándar; para los cálculos estadísticos se ha utilizado el programa Statview, cuyos resultados de significación para la prueba de «t» de Student son los expresados en el texto.

Resultados

La capacidad del suero de inducir proliferación en los cultivos de fibroblastos fue cuantificada a través de la captación de timidina marcada y se expresa como Tim. 20/0.

Los resultados de la experimentación de los 35 sueros de sujetos normales fueron de $26,97 \pm 10,03$. Cuando se distribuyeron los 35 sujetos por edades inferiores o superiores a cincuenta años, se ha observado que el grupo más joven (edad $\bar{x} = 37$) tenía unos valores ($31,1 \pm 12,9$) significativamente superiores ($t = -3,85$, $p < 0,001$) a los de la población con edades por encima de cincuenta años ($22,81 \pm 8,08$). Así pues, la capacidad de inducir proliferación es dependiente de la edad y por tanto, las comparaciones subsiguientes se refieren a valores «normales para el grupo de edad correspondiente». Puesto que tanto los pacientes diabéticos como los urémicos no diabéticos tenían edades superiores a cincuenta años, la normalidad utilizada ha sido de Tim. 20/0 = $22,81 \pm 8,08$.

El grupo de 20 pacientes diabéticos en diálisis presentó un índice Tim. 20/0 de $35,4 \pm 12,78$, que se ha demostrado como significativamente superior a la normalidad ($t = 4,69$, $p < 0,0001$). Asimismo, el grupo de 25 pacientes urémicos no diabéticos también presentó unos valores superiores a la normalidad: $27,3 \pm 14$ ($t = 2,89$, $p = 0,05$), pero a su vez significativamente inferiores a los de los diabéticos en diálisis ($t = -3,452$, $p = 0,0014$). En la figura 1 viene descrita la situación de las tres poblaciones y sus comparaciones. En conclusión, los diabéticos urémicos han presentado una capacidad mitogénica aumentada para los fibroblastos humanos, capacidad que es superior a la de los urémicos no diabéticos, que a su vez la tienen aumentada respecto a los sujetos normales.

En un subgrupo de estos pacientes (en seis diabéticos y cinco no diabéticos) se pudo determinar la concentración del factor de crecimiento insulina-like, IGF-1 (somatomedina-C). Los resultados expuestos en la figura 2 muestran, que a pesar de que se han observado concentraciones de IGF-1 algo elevadas en los dos grupos de pacientes, no se pudieron demostrar diferencias significativas entre ambos grupos (diabéticos, 215 ± 133 ng/ml, y no diabéticos, 247 ± 53 , $p = \text{NS}$). Por tanto, la aumentada capacidad proliferativa no parece que pueda atribuirse a la acción de la IGF-1. Obviamente, tampoco se pudo comprobar ninguna correlación entre los valores de IGF-1 y el índice Tim. 20/0, ni en el grupo global ni en cada uno de los subgrupos de urémicos diabéticos y no diabéticos.

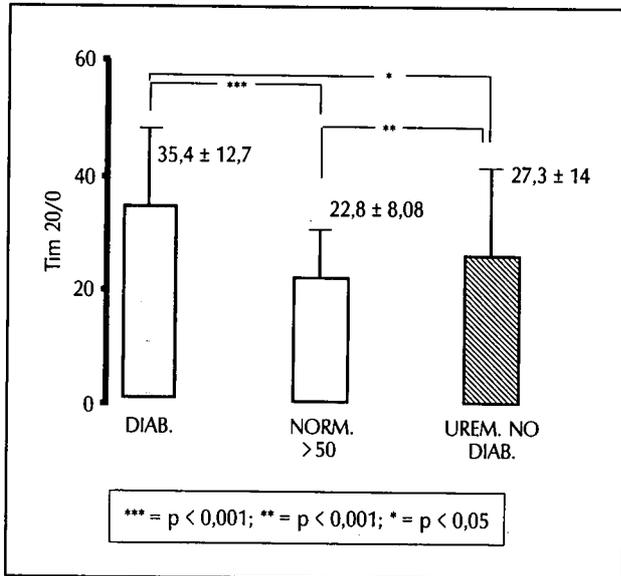


Fig. 1.— H_3 -timidina (Incrementos de cpm al añadir 20% suero).

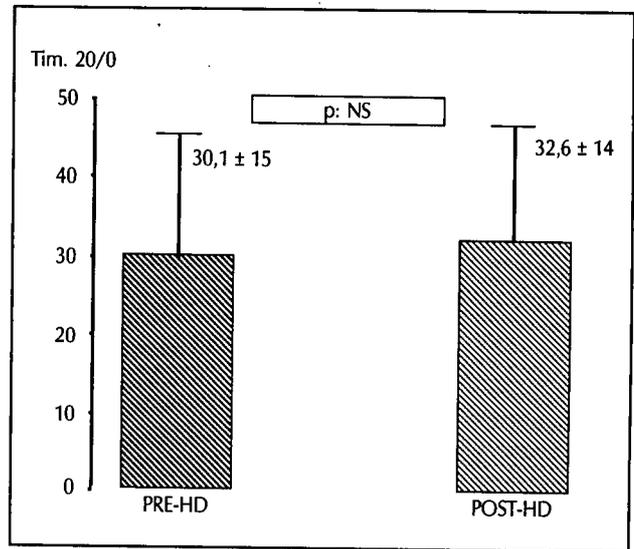


Fig. 3.—Captación de timidina H_3 pre y posthemodiálisis.

Para avanzar en el conocimiento de las características del factor o factores séricos causantes de este fenómeno, hemos procedido a determinar esta capacidad del suero en un grupo de 20 pacientes, antes y después de una hemodiálisis normal, para observar si se trataba de un factor dializable. Como puede verse en la figura 3, no hubo diferencias significativas pre y posdiálisis ($\bar{x} = 30,1 \pm 15$ pre-diálisis, $32,6 \pm 13,9$ posdiálisis, $t = 0,79$, $p = NS$). Se debe concluir que estos factores no parece que sean dializables de forma significativa.

Discusión

Las alteraciones de las células de estirpe mesenquimatosas en los diabéticos han sido propuestas como una explicación fisiopatológica de muchas de las complicaciones que presentan estos pacientes. Los fibroblastos son las células mesenquimatosas más fácilmente cultivables y, por tanto, se han utilizado como modelo experimental *in vitro*, muy práctico para estudiar los efectos de los factores séricos sobre las células mesenquimales, entre ellas las células óseas. La capacidad mitogénica del suero del diabético sobre los fibroblastos *in vitro* ha sido un tema ampliamente experimentado y a la vez profundamente debatido. Para algunos autores⁸⁻¹⁰, existe una respuesta proliferativa aumentada en los diabéticos debido al efecto propio de la hormona del crecimiento (GH) y de otros factores de crecimiento. Otros autores, sin embargo, no encuentran que el suero diabético tenga ningún efecto mitogénico sobre los fibroblastos y, en cambio, sí que lo tiene frente a otras estirpes celulares¹¹. Koschinsky y cols.¹² han sido capaces de determinar en sueros de diabéticos tipo II mal regulados un factor de crecimiento de origen plaquetar y, por tanto, de origen similar a otros factores de crecimiento mejor caracterizados, como el PDGF, el EGF o FGF. Estos autores lo han llamado DSGF (Diabetic Serum Growth Factor). Este factor tendría unos niveles séricos más elevados en estos pacientes que en los sujetos normales; y su acción, que requiere de la presencia de PDGF, pero no de insulina ni de los IGF, es aditiva a la de los otros factores de crecimiento. De hecho, el estudio sérico de los factores de crecimiento de los diabéticos ha venido estimulado por una sugerida relación patogénica entre la proliferación celular endotelial o me-

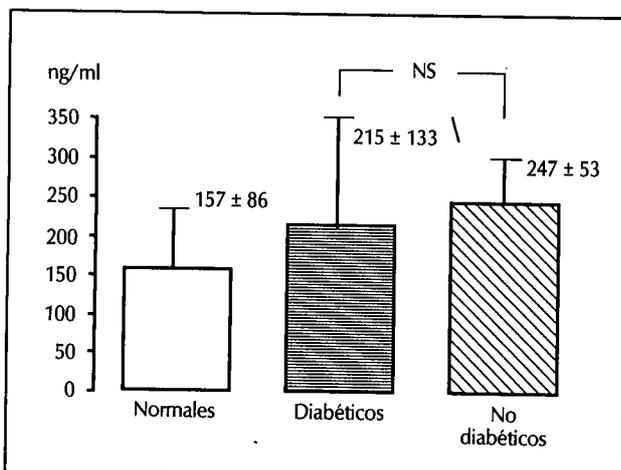


Fig. 2.—IGF-1 en suero.

sangial y la macro-microangiopatía y con la retinopatía⁷. Muy poca atención ha recibido, en cambio, el estudio de la posible relación entre nefropatía diabética y la actividad proliferativa sérica sobre las células mesenquimatosas.

En la uremia se había descrito, por el contrario, una disminución de la captación de la timidina-H₃ marcada, por parte de los fibroblastos cultivados con suero urémico pre-dialísis y su posterior mejoría con la diálisis^{13,14}. Esta acción depresora se había atribuido a la presencia de moléculas medianas con acción tóxica sobre la cicatrización. No conocemos, sin embargo, ninguna publicación que haya estudiado la proliferación fibroblástica *in vitro* en condiciones como las nuestras, y tampoco hay en la literatura revisada ningún trabajo que determine esta capacidad mitogénica en los diabéticos que son a su vez urémicos como en nuestra serie. Sí que ha habido publicaciones sobre las determinaciones de los niveles de algunos factores de crecimiento en el suero de los pacientes urémicos; incluso ha existido en la literatura una larga polémica sobre la existencia de alteraciones en los niveles de IGF-1 e IGF-2 en la uremia¹⁵⁻¹⁷. Los niveles medidos por bioensayo resultaron estar disminuidos, pero los niveles séricos medidos con los primeros RIA resultaron normales o incluso altos, y por ello se había sugerido la posible existencia en el suero urémico de péptidos circulantes inhibidores de las somatomedinas¹⁸ y alteraciones en las proteínas transportadoras y, por consiguiente, inhibidoras¹⁹. En trabajos recientes, los niveles séricos de IGF-1 se han encontrado elevados en urémicos con lesiones óseas de hiperparatiroidismo intenso²⁰, aunque en la mayor parte de los pacientes los niveles estaban dentro de los límites altos de la normalidad, como es el caso en nuestra corta serie. Otros factores de crecimiento, como el EGF (Epidermal Growth Factor), que es un factor intensamente mitogénico para los fibroblastos, se halla elevado en el curso de la insuficiencia renal crónica²¹ y podría ser un factor activo que justificase estos ligeros incrementos de la capacidad proliferativa sobre los fibroblastos observada por nosotros en los sueros de los urémicos.

Recientemente se ha publicado un trabajo²² que cuantifica el efecto del plasma urémico sobre el cultivo de fibroblastos obtenidos de la médula ósea, con la hipótesis —que no corroboraron los resultados— de que la PTH podría ser un factor mitogénico para este tipo de fibroblastos. En este trabajo, el efecto de los sueros urémicos añadido al cultivo en concentraciones similares a las nuestras provoca una estimulación proliferativa mucho menor a la obtenida con nuestro modelo y es incluso inferior a la estimulación obtenida con suero normal. Esta discrepancia se debe atribuir a diferencias de metodología o a diferencias de comportamiento de los fibroblastos, dependiendo del origen celular.

A priori era difícil predecir cuál iba a ser el efecto combinado de la uremia y la diabetes sobre la proliferación fibroblástica. En esta serie demostramos que el suero tiene una capacidad aumentada de inducir proliferación.

En resumen, de nuestros primeros resultados —que

pueden encontrar respaldo, aunque no unánime, en otros datos de la literatura— se puede concluir que el diabético urémico presenta una capacidad muy aumentada de inducir la proliferación fibroblástica tanto respecto a la normalidad como respecto a los urémicos no diabéticos. Esta capacidad aumentada no puede explicarse sólo por la ligera elevación en las concentraciones séricas de IGF-1 y, por tanto, se deben buscar otros factores en el suero del diabético urémico que puedan justificar esta mitogenicidad.

Agradecimientos

Este trabajo ha gozado de financiación a través del FISS (núm. 90/0617), de cuya Institución uno de los autores, MN, es becario. También de la ayuda del Institut Municipal d'Investigació Mèdica —IMIM— (programa 65-195-01).

Bibliografía

- Ritz E, Strumpf C, Katz F, Wing AJ y Quellhorst E: Hypertension and cardiovascular risk factors in hemodialyzed diabetic patients. *Hypertension*, 7(s1):118-124, 1985.
- Aubia J, Serrano S, Mariñosos MLI, Hojman L, Díez A, Lloveras J y Masramón J: Osteodystrophy of diabetics in Chronic Dialysis: A histomorphometric study. *Calcif Tissue Int*, 42:297-301, 1988.
- Cohen MP, Dasmahapatra A y Wu UY: Deposition of basement membrane *in vitro*. *Nephron*, 27:146-151, 1981.
- Cohen MP y Surma ML: Effect of diabetes on *in vivo* metabolism of (35S)-labeled glomerular basement membrane. *Diabetes*, 33:8-12, 1984.
- Rowe DW, Starman BJ, Fujimoto WY y Williams RH: Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblastic cultures from patients with diabetes mellitus. *Diabetes*, 26:284-290, 1977.
- Kjellström T: Influence of glucose on collagen and protein production in cultured human skin fibroblasts from diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Res*, 3:77-82, 1986.
- Merimee TJ, Zapz J y Froesch ER: Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med*, 309:527-530, 1983.
- Koschinsky T, Bunting CE, Schwippert B y Gries FA: Increased growth stimulation of fibroblasts from diabetics by diabetic serum factor of low molecular weight. *Atherosclerosis*, 37:311-315, 1980.
- Koschinsky T, Bunting CE, Schwippert B y Gries FA: Regulation of diabetic serum growth factors for human vascular cells by the metabolic control of diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 39:313-319, 1981.
- Umeda F, Halle JP, Abarca J, Leuny S, Franks DJ y Hamet P: Effect of diabetic serum and platelets on growth of cultured vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Diabetes*, 29(s2):57A, 1980.
- Petty RG, Pearson JD, Morgan DM y Mahler RF: Stimulation of endothelial cell growth by sera from diabetic patients with retinopathy. *Lancet*, i:208-211, 1988.
- Koschinsky T, Bunting CE, Rutter R y Gries FA: Vascular growth factors and the development of macrovascular disease in diabetes mellitus. *Diabetes Metab*, 13:318-325, 1987.
- Delaporte C, Gros F, Jonsson C y Bergström J: *In vitro* cytotoxic properties of plasma fractions from uremic patients. *Artif Organs*, 4(S):68-70, 1981.
- Ehrlich K, Holland F, Tumham T y Klein E: Osmotic concentration of polypeptides from hemofiltrate of uremic patients. *Clin Nephrol*, 14:31-35, 1980.
- Phillips LS, Pnnisi AJ, Belosky DC, Uittenbogaart C, Ettenger RB, Ma-

J. AUBIA y cols.

- lekzadeh MH y Fine RN: Somatomedin activity and inorganic sulfate in children undergoing dialysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 46:165-169, 1978.
16. Phillips LS y Kopple JD: Circulating Somatomedin activity and sulfate levels in adults with normal and impaired kidney function. *Metabolism*, 30:1091-1095, 1981.
 17. Goldberg AC, Trivedi B, Delmez JA, Harter HR y Daughaday WH: Uremia reduces serum insulin-like growth factor I increases insulin-like growth factor II, and modifies their serum protein binding. *J Clin Endocrinol Metab*, 55:1040-1045, 1982.
 18. Phillips LS, Fusco AC, Unterman TG y Del Greco F: Somatomedin inhibitor in uremia. *J Clin Endocrinol Metab*, 59:764-772, 1984.
 19. Liu F, Powell DR y Hintz RL: Characterization of insulin-like growth factors-binding protein in human serum from patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 70:620-628, 1990.
 20. Andress DL, Pandian-MR, Endres DB y Kopp JB: Plasma insulin-like growth factors and bone formation in uremic hyperparathyroidism. *Kidney Int*, 36:471-477, 1989.
 21. Lev-Ran A, Hwang DL, Ahmad B y Bixby H: Immunoreactive epidermal growth factor in serum plasma, platelets and urine in patients in chronic dialysis. *Nephron*, 57:164-166, 1991.
 22. Meytes D, Schaked N, Blum M y Ramot B: Effect of excess of parathyroid hormone on human marrow fibroblasts. *Nephron*, 55:6-9, 1990.