

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2021624962>

DETECCIÓN DEL RIESGO DE LESIÓN RENAL EN FUMADORES

Detection of Renal Damage Risk in Smokers

Javier TASCÓN; M.ª Teresa HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ; Alfredo G. CASANOVA; Laura VICENTE-VICENTE; Ana I. MORALES; Marta PRIETO*

Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Edificio Departamental. Laboratorios 223-226. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España.

Correo-e: martapv@usal.es*

Grupos colaboradores: Grupo TRECARD de la Universidad de Salamanca, centro de Atención Primaria del Centro de Salud de la Alamedilla de Salamanca y Área de Deshabitación Tabáquica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA).

RESUMEN: La etiología de diversos tipos de cáncer, además de patologías relacionadas con el sistema cardiovascular y respiratorio, reside en el consumo de tabaco. Hoy en día, los nuevos estudios apuntan a que el tabaco produce un daño renal que puede degenerar en insuficiencia renal crónica a largo plazo. No obstante, los parámetros utilizados en clínica para la detección del daño renal, como la creatinina plasmática, no son útiles para evidenciar la disfunción. Por ello, los métodos de diagnóstico más innovadores incluyen los biomarcadores urinarios de daño renal temprano, que permitirían prevenir la evolución de la enfermedad renal. Por otra parte, basándonos en estudios previos de nuestro laboratorio, se ha desarrollado el concepto de predisposición adquirida al daño renal, así como la existencia de biomarcadores urinarios asociados a esta condición. Nuestro objetivo es estudiar si determinados biomarcadores de predisposición son capaces de

detectar entre los pacientes fumadores a aquellos que están predispuestos a sufrir daño renal. Nuestros resultados demuestran que algunos de estos biomarcadores se excretan en orina de un modo significativamente superior en individuos fumadores respecto a no fumadores. La mayor excreción de dichos biomarcadores podría estar relacionada con una predisposición de los individuos fumadores a sufrir disfunción renal, aspecto clave a tener en cuenta en clínica.

Palabras clave: Tabaco; fumadores; daño renal; biomarcadores urinarios; predisposición; diagnóstico.

ABSTRACT: The etiology of various types of cancer, in addition to pathologies related to the cardiovascular and respiratory system, lies in the consumption of tobacco. Today, new studies suggest that tobacco causes kidney damage that can degenerate into chronic long-term kidney failure. However, the parameters used in clinic to detect renal damage, such as plasma creatinine, are not useful to show dysfunction. Therefore, the most innovative diagnostic methods include urinary biomarkers of early renal damage, which would prevent the progression of kidney disease. On the other hand, based on previous studies of our laboratory, the concept of acquired predisposition to kidney damage has been developed, as well as the existence of urinary biomarkers associated with this condition. Our goal is to study whether certain predisposition biomarkers are able to detect among smokers those who are predisposed to suffer renal damage. Our results show that some of these biomarkers are excreted in urine significantly higher in smokers than in non-smokers. The increased excretion of these biomarkers could be related to a predisposition of smoking individuals to suffer renal damage, a key aspect to be considered in clinical practice.

Keywords: Tobacco; smokers; renal damage; urinary biomarkers; predisposition; diagnosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *El tabaco*

El tabaquismo es una enfermedad adictiva, crónica, sistémica y recurrente que origina en España unas 50.000 muertes anuales (Pronefro On line, Sociedad Argentina de Nefrología).

El humo del tabaco desprende alrededor de 7000 sustancias tóxicas. Se ha llegado a la conclusión de que 69 de ellas presentan efectos carcinógenos y 93 han sido caracterizadas por la FDA como peligrosas y potencialmente peligrosas. Entre estas sustancias tóxicas encontramos alquitranes, monóxido de carbono, sustancias irritantes y nicotina entre otras (FDA, 2019) (OMS).

Tras la llegada del tabaco a España en el siglo XVII, su consumo se extiende de forma alarmante entre la población, y no es hasta el siglo XX cuando se empiezan a hacer numerosos estudios con el fin de evaluar y poder asociar el aumento de la morbimortalidad al consumo de esta sustancia. En el siglo XXI, se dictan leyes como la Ley 42/2010, que regula de manera estricta aspectos como la venta, distribución y consumo de tabaco con el fin de disminuir el riesgo de aparición de patologías asociadas al consumo de este producto (BOE, 2010).

1.2. *Daño renal originado por el tabaco*

El tabaco es responsable de la aparición de diversos tipos de cáncer además de originar patologías del sistema cardiovascular y del sistema respiratorio. En embarazadas aumenta el riesgo de aborto además de elevar la probabilidad de aparición del síndrome de muerte súbita del lactante. Por otra parte, los varones que fuman presentan un riesgo mayor de padecer disfunción eréctil (National Cancer Institute, 2018).

Las nuevas investigaciones relacionan el consumo de tabaco con la aparición de daño renal (Pronefro On line, Sociedad Argentina de Nefrología).

El consumo de tabaco aumenta los niveles de microalbuminuria y provoca hiperfiltración, acelera la progresión de la nefropatía diabética y de la hipertensiva, induce estenosis arterial renal y nefropatía isquémica (Pinto-Sietsma *et al.*, 2000).

También reduce la sobrevida de injertos renales, provoca carcinoma renal y de vías urinarias y aumenta el riesgo cardiovascular de la enfermedad renal crónica, acelera el progreso de esta y aumenta el envejecimiento de las células renales (Pronefro On line, Sociedad Argentina de Nefrología).

1.3. *Diagnóstico del daño renal*

El diagnóstico de la disfunción renal, además de por pruebas de imagen y biopsia, es llevado a cabo mayoritariamente mediante la medición de creatinina plasmática, una determinación indirecta de la filtración glomerular. La creatinina plasmática es un parámetro poco sensible e inespecífico ya que solo se ve aumentada cuando se ha producido una disminución de la funcionalidad del riñón en torno al 50 %. Esto es debido a que la función renal es compensada por mecanismos

fisiológicos, así como por la secreción tubular de creatinina, que enmascaran el daño (Pickering, Endre, 2012).

Otros métodos de diagnóstico más innovadores incluyen los biomarcadores urinarios de daño renal temprano, como son NAG, NGAL, KIM-1... (Sirota *et al.*, 2011; Bonventre *et al.*, 2010). El diagnóstico temprano permite prevenir y frenar la evolución de la enfermedad renal, la cual no se puede revertir, supone una importante pérdida de calidad de vida (pacientes en tratamiento de diálisis) y genera un elevado impacto socioeconómico.

Un nuevo concepto demostrado en estudios previos de nuestro laboratorio es el de predisposición adquirida al daño renal, objeto de este proyecto, así como la existencia de biomarcadores urinarios asociados a esta condición. Es posible que estos biomarcadores puedan identificar a los individuos fumadores susceptibles de padecer daño renal incluso antes de que aparezca dicha patología, pues las sustancias nocivas presentes en el tabaco podrían predisponer al organismo a sufrir disfunción renal.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La *hipótesis* se fundamenta en estudios previos de nuestro laboratorio, los cuales han demostrado que la administración de algunas sustancias nefrotóxicas a dosis subtóxicas predisponen al organismo a padecer disfunción renal.

La hipótesis está basada en que es probable que el consumo de tabaco sea un factor de riesgo que predispone al organismo a sufrir daño renal, de tal forma que, cuando el individuo en un futuro se encuentre expuesto a sustancias nefrotóxicas incluso a dosis subtóxicas, pueda evidenciarse la aparición de la patología. De ser real este hecho, el estudio se centra en que sería viable prevenir el daño renal identificando la susceptibilidad a sufrir la lesión a través de biomarcadores urinarios.

Los *objetivos* del estudio son:

1. Establecer la relación existente entre la excreción de los biomarcadores A*, B*, C* y D* en orina y el hábito tabáquico.
2. Identificar los posibles pacientes predispuestos, por su condición de fumadores, a sufrir daño renal.
3. Determinar si los biomarcadores de predisposición A*, B*, C* y D* permiten realizar un diagnóstico diferencial, en cuanto a susceptibilidad al daño renal se refiere, entre individuos fumadores y no fumadores.

*Biomarcadores encriptados por posible patentabilidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Descripción de pacientes y muestras analizadas*

Como sujetos de la investigación, se reclutaron voluntarios anónimos que acudieron a la consulta de Atención Primaria del Centro de Salud de la Alamedilla (Salamanca) y al Área de Deshabitación Tabáquica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA).

Los criterios de inclusión recogían que tenían que ser voluntarios sanos, mayores de 18 años. En cuanto a las causas de exclusión se encontraban la presentación de algún tipo de estado patológico, pacientes con insuficiencia renal previa, diabetes mellitus, hipertensión arterial y aquellos pacientes en tratamiento con fármacos potencialmente nefrotóxicos.

Los voluntarios se dividieron en dos grupos. Un grupo estaba formado por voluntarios no fumadores y el otro por voluntarios fumadores, es decir, aquellos que consumían tabaco de una manera habitual o habían dejado de fumar en los últimos 6 meses (OMS).

Se tomaron muestras de orina siguiendo el pertinente protocolo de recogida de muestras y una vez obtenido el documento de información y consentimiento informado al paciente, aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica. Los datos de creatinina plasmática fueron recogidos del historial clínico del individuo y los datos antropométricos en el momento de la inclusión en el estudio.

3.2. *Determinación de biomarcadores urinarios por Western Blot*

La técnica Western Blot es un método semicuantitativo empleado para identificar, y en menor medida cuantificar, proteínas específicas, en este caso, biomarcadores urinarios, utilizando anticuerpos específicos para tal fin.

Con esta técnica se analizaron los biomarcadores A, B y C en las muestras de orina de los individuos.

3.3. *Determinación de biomarcadores urinarios por ELISA*

El biomarcador D presente en la muestra se une a un anticuerpo anti-biomarcador D que ha sido adsorbido en la superficie de los pocillos de la placa.

Después de llevarse a cabo esta unión, las proteínas no unidas se eliminan mediante lavados y se agrega un anticuerpo de detección biotinilado a los pocillos para unirse al biomarcador D.

Se agrega la enzima HRP conjugada con estreptavidina, la cual es reconocida por la biotina catalizando la enzima una reacción colorimétrica con el sustrato

cromogénico TMB. La reacción colorimétrica genera un producto azul, que se vuelve amarillo cuando la reacción finaliza con la adición de ácido sulfúrico diluido. La absorbancia medida a 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de biomarcador D en la muestra.

Esta técnica colorimétrica detecta un antígeno específico, en nuestro caso el biomarcador D, mediante anticuerpos que de forma indirecta producen un compuesto coloreado. Las concentraciones de biomarcador D en las muestras se obtienen mediante la ecuación obtenida a partir de la recta patrón. Teniendo en cuenta las diluciones realizadas, obtenemos la concentración de biomarcador D excretado.

3.4. *Determinación de la concentración de creatinina urinaria por técnicas colorimétricas*

Determinar el valor de la concentración de la creatinina urinaria en la muestra permite corregir los valores de las concentraciones de proteínas presentes en la orina, eliminando sesgos como la variabilidad en el volumen de orina excretado por cada voluntario en el momento de la toma de muestra entre otros factores. La determinación y cuantificación de creatinina urinaria en orina se realizó siguiendo una técnica colorimétrica la cual se basa en la *reacción de Jaffé* (Ramón *et al.*, 2016).

3.5. *Tratamiento de datos y estadística*

Los datos del paciente, como edad, sexo, peso, altura, índice de masa corporal, el grupo al que pertenecen (fumadores o no fumadores) y las concentraciones de biomarcadores excretados en orina, fueron recopilados en una base de datos.

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS®. Se calcularon la media, la mediana, la desviación estándar y el error relativo de los valores obtenidos dentro de cada grupo de datos y se aplicó la prueba de Grubbs con el fin de eliminar *outliers*.

Para dilucidar si los datos seguían una distribución normal, es decir, eran datos paramétricos, o no normal, en este caso datos no paramétricos, se realizó el test de Kolmogorov-Smirnow. Si los datos seguían una distribución normal ($p > 0,05$), se aplicó la prueba T de Student y se compararon medias. Por el contrario, cuando la distribución fue no normal se aplicó la prueba U de Mann-Whitney y se compararon medianas. Del mismo modo, se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Tamaño muestral y características de los individuos*

Se analizaron 142 muestras de orina, 71 de ellas pertenecían a individuos fumadores y las otras 71 a no fumadores.

TABLA 1. Características de los individuos del estudio.
Los datos se encuentran expresados como la media \pm desviación estándar de la media

Grupo	Creatinina plasmática (mg/dL)	Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (Kg/m ²)
No fumadores	0,80 \pm 0,16	55,00 \pm 14,76	69,21 \pm 13,30	165,14 \pm 9,83	25,29 \pm 3,83
Fumadores	0,78 \pm 0,17	49,73 \pm 10,31	72,66 \pm 15,26	166,41 \pm 9,85	26,14 \pm 4,52

Prueba T de Student: p-valor creatinina plasmática: 0,240; p-valor peso: 0,222; p-valor talla: 0,891.
Prueba U de Mann-Whitney: p-valor edad: 0,001; p-valor IMC: 0,160

Ambos grupos son estadísticamente similares, es decir, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, exceptuando la edad. Los valores de creatinina plasmática en ambos grupos presentaron valores dentro de los rangos establecidos de normalidad en el organismo (0,6-1,3 mg/dL) (Martín *et al.*, 2017).

4.2. *Biomarcadores de predisposición de daño renal*

- Biomarcador A

Tras el análisis, los pacientes fumadores excretaron mayor cantidad de esta proteína en orina que los pacientes no fumadores como se observa en las representaciones gráficas (Figura 1). Esta diferencia significativa en la excreción del biomarcador A puede estar relacionada con el hábito tabáquico.

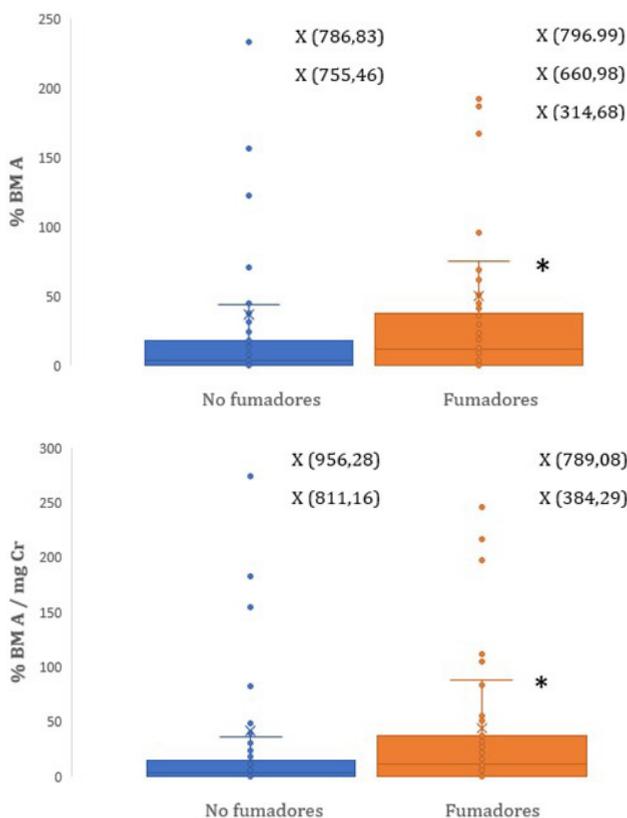


Figura 1. En la parte superior, representación gráfica en diagrama box-plot de la concentración de BM A en muestras de orina de pacientes fumadores y no fumadores. En la parte inferior, representación de la concentración de biomarcador A corregida por el valor de creatinina urinaria. Entre paréntesis se encuentran valores *outliers*, los cuales impedían la correcta visualización de la representación gráfica.

*p-valor (BM A): 0,022 (Prueba U de Mann-Whitney).

*p-valor % BM A/mg Cr: 0,024 (Prueba U de Mann-Whitney).

- Biomarcador B

Los individuos fumadores excretan mayor cantidad de esta proteína en orina que los no fumadores y, tras realizar el análisis estadístico, se comprobó que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, pudiendo decir que la excreción del biomarcador B parece estar relacionada con el tabaquismo.

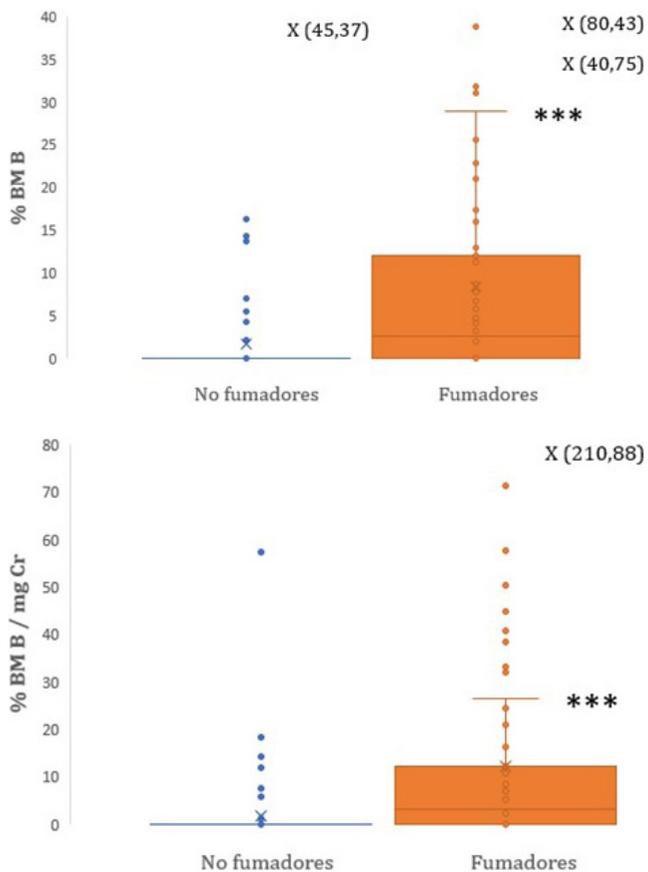


Figura 2. En la parte superior, representación gráfica en diagrama box-plot de la concentración de BM B en muestras de orina de pacientes fumadores y no fumadores. En la parte inferior, representación de la concentración de biomarcador B corregida por el valor de creatinina urinaria.

***p-valor % BM B: 0,0000008 (Prueba U de Mann-Whitney).

***p-valor % BM B/mg Cr: 0,0000003 (Prueba U de Mann-Whitney).

- Biomarcador C

Únicamente se detectó la presencia de este biomarcador en dos muestras de orina, no pudiendo de este modo relacionar la excreción de dicha proteína con el consumo de tabaco. La banda de localización del BM C se encuentra a la altura de 47 kDa teniendo en cuenta el marcador de pesos moleculares.

- Biomarcador D

Tras el análisis se obtuvieron resultados indicativos de la mayor excreción de este biomarcador en la orina de individuos fumadores, la cual fue estadísticamente significativa.

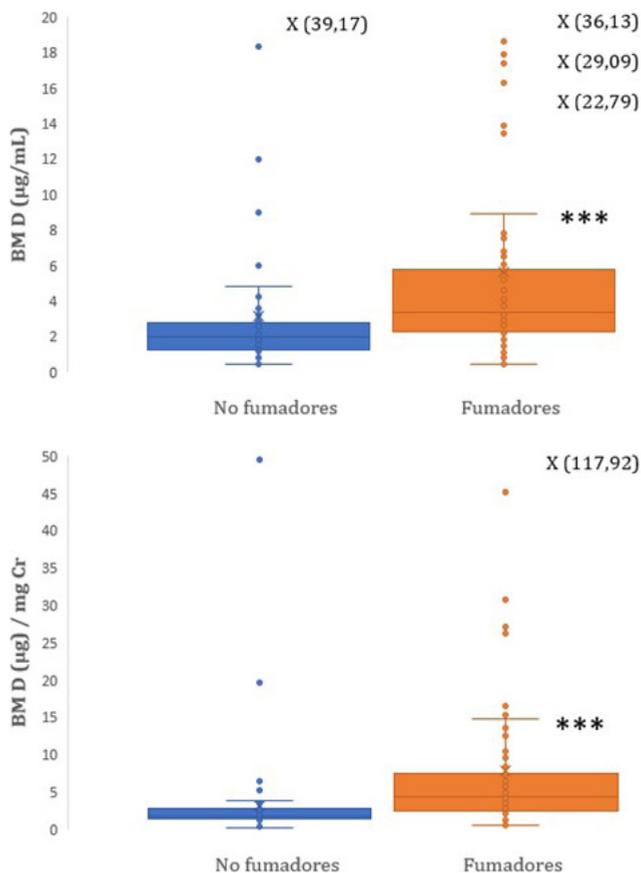


Figura 3. En la parte superior, representación gráfica en diagrama box-plot de la dispersión de los valores de BM D. En la parte inferior, representación de la concentración de biomarcador D corregida por el valor de creatinina urinaria.

***p-valor BM D (µg/ml): 0,00008 (Prueba U de Mann-Whitney).

***p-valor BM D (µg)/mg Cr: 0,000007 (Prueba U de Mann-Whitney).

5. DISCUSIÓN

Los biomarcadores de predisposición A, B y D presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, resultando el hábito tabáquico la única característica diferenciadora y alcanzándose niveles superiores de concentración de biomarcadores en los pacientes fumadores, por lo que podemos intuir, con base en otros estudios previos del laboratorio, que estos pacientes pueden estar predispuestos y, debido a esta condición, es posible que desarrollen daño renal en un futuro si son expuestos a sustancias nefrotóxicas incluso a dosis subtóxicas.

El estudio y análisis de estas proteínas nos permitió conocer a los posibles pacientes predispuestos a sufrir el daño incluso antes de llevar a cabo la corrección de la concentración de biomarcadores por la creatinina urinaria. Esto presenta como ventaja la sencillez a la hora de llevar a cabo la aplicación clínica.

Por el contrario, el biomarcador C no parece estar relacionado con la predisposición adquirida debido al hábito tabáquico ya que no se ha encontrado una mayor excreción de este biomarcador en pacientes fumadores.

Las características individuales (peso, sexo, talla, IMC) eran estadísticamente similares en ambos grupos por lo que no podemos atribuir a ninguna de ellas las diferencias encontradas en la excreción de los marcadores estudiados; luego la variación en la excreción asumimos que se debe a lo único que diferencia ambos grupos, fumar o no.

El valor del peso corporal excede la normalidad en ambos grupos, esto podría dar a entender que el sobrepeso puede también ser el causante de una mayor excreción de los marcadores, sin embargo, no es así ya que, en no fumadores con peso por encima de lo normal, no se ha producido ese aumento en la excreción.

El daño renal aún no se ha producido y no ha sido detectado mediante la alteración de los valores de creatinina plasmática, la cual se utiliza en clínica para diagnosticar la citada patología.

Aún queda corroborar si estos pacientes fumadores desarrollarán el daño en un futuro al exponerse a sustancias nefrotóxicas incluso a dosis subtóxicas o al propio tabaco, demostrando así que estos biomarcadores han sido excretados por la predisposición adquirida al daño renal por el consumo de tabaco.

La finalidad reside en detectar a los pacientes predispuestos a sufrir el daño, pudiendo llevar a cabo un diagnóstico diferencial y clasificando a los individuos en función del grado de susceptibilidad que presenten, con el fin último de prevenir el riesgo, incitando al paciente a abandonar el hábito tabáquico.

En el ámbito clínico, conocer si un individuo está predispuesto o no a sufrir disfunción renal permitiría desarrollar estrategias personalizadas de tratamiento que consigan disminuir el grado de daño que pueda originarse. Es decir, los

biomarcadores de predisposición en este contexto se convertirían en “herramientas preventivas”.

6. CONCLUSIONES

- Los biomarcadores A, B y D se excretaron en orina de un modo significativamente superior en individuos fumadores respecto a no fumadores.
- La mayor excreción de estos biomarcadores podría estar relacionada con una predisposición de los individuos fumadores a sufrir disfunción renal.
- La aplicación de estos biomarcadores en la clínica origina un punto clave en el desarrollo tanto de técnicas preventivas en el contexto del individuo fumador, que predigan si el paciente es susceptible de desarrollar daño renal, como de tratamientos personalizados con el fin de mejorar el pronóstico, salvaguardar la salud del paciente y disminuir costes.
- Estos biomarcadores permiten tener conocimiento de la susceptibilidad al daño renal, haciendo al paciente fumador conocedor de los problemas que origina el tabaco e incitándole a abandonar su consumo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BOE.es - Documento consolidado BOE-A-2010-20138 [Internet]. [citado 17 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2010-20138>.
- Bonventre JV, Vaidya VS, Schmouder R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat Biotechnol.* mayo de 2010; 28(5):436-440.
- Examen de creatinina en la sangre: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [citado 26 de junio de 2019]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003475.htm>.
- OMS | Tabaquismo [Internet]. WHO. [citado 20 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/tobacco/es/>.
- Perjuicios por fumar cigarrillos y beneficios para la salud al dejar el hábito [Internet]. National Cancer Institute; 2018. [citado 17 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/tabaco/hoja-informativa-dejar-de-fumar>.
- Pickering JW, Endre ZH. The Metamorphosis of Acute Renal Failure to Acute Kidney Injury. *Basic Nephrology and Acute Kidney Injury* [Internet]. 2 de marzo de 2012. [citado 20 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/basic-nephrology-and-acute-kidney-injury/the-metamorphosis-of-acute-renal-failure-to-acute-kidney-injury>.
- Pinto-Sietsma SJ, Mulder J, Janssen WM, Hillege HL, de Zeeuw D, de Jong PE. Smoking is related to albuminuria and abnormal renal function in nondiabetic persons. *Ann Intern Med.* 17 de octubre de 2000; 133(8):585-591.

- Products C for T. Harmful and Potentially Harmful Constituents (HPHCs). FDA [Internet]. 23 de abril de 2019. [citado 20 de mayo de 2019]. Disponible en: /tobacco-products/products-ingredients-components/harmful-and-potentially-harmful-constituents-hphcs.
- Products C for T. Tobacco Products [Internet]. FDA. 2019. [citado 20 de mayo de 2019]. Disponible en: /tobacco-products.
- pronefro_3_clase10.pdf [Internet]. [citado 20 de mayo de 2019]. Disponible en: http://san.org.ar/pronefro_3/mod_I/clase_X/pronefro_3_clase10.pdf.
- PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO. DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA BASADO EN LA REACCIÓN CINÉTICA DE JAFFE.pdf [Internet]. [citado 18 de junio de 2019]. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5030/PUESTA%20A%20PUNTO%20DE%20UN%20METODO%20ANALITICO.%20DETERMINACION%20DE%20CREATININA%20EN%20ORINA%20BASADO%20EN%20LA%20REACCION%20CINETICA%20DE%20JAFJE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sirota JC, Klawitter J, Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. J Toxicol. 2011; 2011:1-10.

ANEXO

Abreviaturas

- Ac: Anticuerpo.
- Ac1º: Anticuerpo primario
- Ac2º: Anticuerpo secundario
- Ag: Antígeno.
- BM: Biomarcador.
- BSA: Albúmina Sérica Bovina.
- Cr: Creatinina.
- C+: Control positivo.
- ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay.
- ERC: Enfermedad renal crónica.
- FDA: Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos.
- GFR: Tasa de filtración glomerular.
- HRP: Peroxidasa de rábano picante.
- IMC: Índice de masa corporal.
- IRC: Insuficiencia renal crónica.
- KIM-1: Kidney Injure Molecule-1.
- MK: Marcador de pesos moleculares.
- NAG: N-Acetil-β-D-Glucosamidasas.

- NGAL: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PVDF: Polifluoruro de Vinilideno.
- TMB: 3,3', 5,5' tetrametilbencidina.
- WB: Western Blot.