Análise comparativa de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 em pacientes com fraturas de baixo impacto decorrentes de osteoporose

Comparative Analysis of TNF-alfa, TNF-R1, and TNF-R2 in Patients with Low-trauma Fractures due to Osteoporosis

Abel Oliveira Marques Teixeira[1] Virmondes Rodrigues-Junior[2] Bárbara Rocha Rodrigues[2] Danila Malheiros Souza[1] Leonardo Franco Pinheiro Gaia[1] Denise Bertulucci Rocha Rodrigues[1]

[1] Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil
[2] Disciplina de Imunologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil

Endereço para correspondência Abel Oliveira Marques Teixeira, MD, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade de Uberaba (UNIUBE), Av. Nenê Sabino, 2477, Santos Dumont, Uberaba, MG, 38050-501, Brasil (e-mail: abelomt7@gmail.com).

Rev Bras Ortop 2023;58(3):495–499.

Resumo

Objetivo Analisar os níveis séricos de TNF-alfa e de seus receptores TNF-R1 e TNF-R2 no sangue de pacientes com fraturas de baixo impacto, decorrentes de osteoporose, comparando entre os sexos e com pacientes saudáveis.

Métodos O estudo foi realizado com amostra de sangue de 62 pacientes, divididos em pacientes com osteoporose e pacientes saudáveis. Os resultados foram obtidos através do método de ELISA. As concentrações de citocinas foram determinadas com base nos valores de absorbância obtidos.

Resultados Os níveis séricos de TNF-alfa foram indetectáveis nos pacientes do sexo feminino, enquanto no masculino encontrou-se somente em um paciente, não havendo diferença significativa. Encontrou-se resultados semelhantes nas análises dos níveis de TNF-R1 e TNF-R2, aumento significativo nos níveis dos receptores de TNF-alfa nos grupos de pacientes com osteoporose em comparação com o grupo controle, em ambos os sexos. Não houve diferença significativa entre os sexos na dosagem de ambos os receptores dentro do grupo com osteoporose. Houve ainda correlação positiva e significativa nos níveis de TNF-R1 e TNF-R2 apenas nas mulheres.

Conclusão O aumento significativo nos níveis de TNF-R1 e TNF-R2 em mulheres com osteoporose sugerem que a liberação e expressão destes receptores pode estar contribuindo de maneira distinta no desenvolvimento da osteoporose em homens e mulheres.

Palavras-chave
- osteoporose
- fator de necrose tumoral alfa
- receptores do fator de necrose tumoral

Trabalho realizado no Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.

recebido
28 de Novembro de 2021
aceito
12 de Setembro de 2022

DOI https://doi.org/10.1055/s-0042-1757963.
ISSN 0102-3616.

© 2023. Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. All rights reserved.
This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial-License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

Abstract

Objective To analyze the serum levels of TNF-alpha and its TNF-R1 and TNF-R2 receptors in the blood of patients with low-impact fractures due to osteoporosis, comparing between genders and with healthy patients.

Methods The present study was conducted with a blood sample of 62 patients, divided into patients with osteoporosis and healthy patients. The results were obtained using the ELISA method. Cytokine concentrations were determined based on the absorbance values obtained.

Results Serum TNF-alpha levels were undetectable in female patients, while in males they were found only in one patient, with no significant difference. Similar results were found in the analyses of TNF-R1 and TNF-R2 levels, a significant increase in levels of TNF-alpha receptors in the groups of patients with osteoporosis compared with the control group in both sexes. There was no significant difference between the sexes in the dosage of both receptors within the group with osteoporosis. There was also a positive and significant correlation in the levels of TNF-R1 and TNF-R2 only in women.

Conclusion The significant increase in TNF-R1 and TNF-R2 levels in women with osteoporosis suggest that the release and expression of these receptors may be contributing differently to the development of osteoporosis in men and women.

Keywords

- osteoporosis
- tumor necrosis factor-alpha
- receptors, tumor necrosis factor

Introdução

A osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada pela diminuição de massa óssea com deterioração da microarquitetura esquelética, levando à fragilidade do osso e aumentando a propensão a fraturas.[1]

O metabolismo ósseo é ativo durante toda a vida, e a renovação um processo constante, onde o osteoclasto retira o componente mineral e o osteoblasto o repõe.[2] O processo de maturação esquelética normal envolve o acúmulo de massa óssea até cerca de 30 anos de idade. A partir de então, ocorre uma perda fisiológica, de cerca de 0,3% a cada ano, iniciando o processo de osteopenia, com diminuição da densidade mineral óssea, enfraquecimento e aumento das trabeculações ósseas. A osteoporose pode acometer tanto homens quanto mulheres, podendo ocorrer em qualquer região, sendo os principais os ossos da articulação do quadril, do punho, a coluna e as costelas. O enfraquecimento causado pela baixa densidade óssea está relacionado a grande parte das fraturas de baixo impacto em idosos.[3]

Diversos componentes da resposta imune inata e adaptativa tem sido relacionado à modulação da atividade de osteoclastos e osteoblastos, levando, assim, a alterações diretas na matriz óssea.[4] Várias vias de sinalização foram identificadas como contribuintes da interação entre osteoblastos e osteoclastos, incluindo o RANK, ativador do receptor de NF-Kb, e seu ligante (RANK-L).[5–7]

A ligação do RANK-L a seu receptor, RANK, fornece o sinal para conduzir o desenvolvimento de osteoclastos, a partir de células progenitoras hematopoiéticas, além de ativar osteoclastos maduros. A osteoprotegerina, também conhecida como fator inibidor da osteoclastogênese, é a proteína relacionada ao receptor de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alpha, na sigla em inglês) que controla o desenvolvimento e função dos osteoclastos. Ela é responsável pela regulação negativa entre o RANK-L e o seu receptor, portanto, inibe a reabsorção óssea pelos osteoclastos.[8,9]

O TNF-alfa é uma potente citocina, que exerce uma variedade de efeitos biológicos, podendo realizar papel pleiotrófico na resposta imune, na inflamação, além de realizar controle da proliferação celular, diferenciação e apoptose.[10,11] O TNF-alfa atua na osteoclastogênese através de um mecanismo que envolve a ativação do NF-kB.[12,13] Além disso, o TNF-alfa atua estimulando diretamente macrófagos a se diferenciarem em osteoclastos, por um mecanismo independente de RANK-L.[14,15]

Atualmente, sabe-se que o TNF-alfa se liga a 2 receptores de superfície celular, o receptor tipo 1 (TNF-R1), também conhecido como p55, e o receptor tipo 2 (TNF-R2) ou porções do p75, sendo cada receptor responsável por mediar sinais intracelulares distintos.[16]

Tanto o TNF-R1 quanto o TNF-R2 são altamente expressos nos precursores de osteoclastos.[17] Quando ativado pelo TNF-alfa, o receptor do tipo 1 estimula a osteoclastogênese, através da ativação de NF-Kb, e inibe a diferenciação de osteoblastos.[18,19] Em contrapartida, a ativação do receptor tipo 2 mostrou a supressão da osteoclastogênese em experimentos *in vitro*.[17]

O presente estudo visa avaliar os níveis de TNF-alfa e de seus receptores: TNF-R1 e TNF-R2 em pacientes idosos, com fraturas de baixo impacto decorrentes de osteoporose, comparando e analisando os valores entre homens e mulheres e com pacientes do grupo controle.

Materiais e Métodos

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade sob o protocolo (CAAE) de número: 51827515.4.0000.5145 e número do parecer 1.375.317, sendo que todos os participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após esclarecimentos.

Tabela 1 Distribuição por sexo dos grupos do estudo

Grupo	Número	Média de idade (anos)	Erro padrão	*valor-p*
Controle mulher	11	40,9	3,1	0,83
Controle homem	17	42,6	3,2	
Osteoporose mulher	21	80,1	2,1	0,14
Osteoporose homem	13	78,9	2,6	

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 62 pacientes, sendo 21 mulheres e 13 homens com fraturas de baixo impacto decorrentes de osteoporose e 11 mulheres e 17 homens que apresentaram fraturas por trauma de alto impacto, formando os pacientes do grupo controle (►**Tabela 1**).

A coleta foi realizada no centro de ortopedia da nossa instituição. Foram excluídos pacientes com doenças ósseas, fraturas não relacionadas à osteoporose, pacientes imunossuprimidos, pacientes com neoplasias malignas e os que não concordaram em participar do estudo.

ELISA Para Medição de Citocinas Séricas

O TNF-alfa, os receptores do fator de necrose tumoral tipos 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2) foram avaliados por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Placas de 96 poços de ligação de alta afinidade (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina investigada (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) sob as condições recomendadas pelo fabricante em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.5) e foram incubados durante a noite a 4°C. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e as placas foram bloqueadas com 200 µL por poço de tampão fosfato contendo 2% de solução salina tamponada com fosfato/albumina sérica bovina (PBS-BSA) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante 4 horas à temperatura ambiente. O PBS-BSA foi então descartado e as linhas 1 a 10 foram preenchidas com amostras de soro diluídas 1:2 em 1% de PBS-BSA para um volume total de 100 µL por poço. Diluições em série de citocinas recombinantes foram usadas para elaborar a curva padrão. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C e, em seguida, enxaguadas 4 vezes com solução de PBS contendo Tween a 0,05% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A seguir, anticorpos conjugados com biotina (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) específicos para cada citocina investigada foram adicionados aos poços diluídos com PBS-BSA a 1% na concentração indicada pelo fabricante para um total de 100 µL por poço. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C, enxaguadas com 0,05% de PBS Tween, tratadas com 100 µL por poço de estreptavidina conjugada com peroxidase e, em seguida, incubadas por 3 horas a 37°C. Por último, as placas foram enxaguadas com 0,05% de PBS-Tween. Um total de 100 µL de tampão de desenvolvimento com tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado por poço ao abrigo da luz e à temperatura ambiente; a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico. Os resultados foram obtidos medindo a absorbância a 450 nm usando um leitor automático ELISA (Enspire, Perkin Elmer, EUA). As concentrações de citocinas foram determinadas com base na regressão linear utilizando os valores de absorbância obtidos a partir das curvas de citocinas recombinantes e são expressas em pg/ml. A sensibilidade do método variou de 10 a 18 pg/ml.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada nos programas GraphPad Prism 7.0 e Statview (Abaccus, EUA). A normalidade das variáveis quantitativas foi investigada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. O teste t de Student foi usado para analisar parâmetros clínicos como idade. Os níveis de citocinas foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) em todos os testes quantitativos.

Resultados

Os níveis séricos de TNF-alfa foram indetectáveis em todos os pacientes do sexo feminino. No grupo do sexo masculino, foi detectado em apenas um paciente. A mediana foi de zero nos 2 grupos, não havendo diferença significativa (Mann-Whitney; $p = 0,38$) (dados não mostrados).

Os níveis séricos de TNF-R1 variaram de 1.209 a 4.918 pg/ml (mediana de 2.720 pg/ml) no grupo de mulheres com osteoporose. Nos homens com osteoporose, os níveis variaram de 1.257 a 4.273 pg/ml (mediana de 2.680 pg/ml). Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes com osteoporose, quando analisados pelo sexo (Mann-Whitney; $p = 0,74$). No grupo controle, os níveis séricos de TNF-R1 variaram de 369 a 2.000 pg/ml (mediana de 689 pg/ml) no grupo de mulheres. Nos homens, os níveis variaram de 198 a 2.417 pg/ml (mediana de 608 pg/ml). Os níveis de TNF-R1 mostraram significativamente aumento no grupo com osteoporose, em comparação com o grupo controle, em ambos os sexos ($p < 0,0001$) (►**Fig. 1**).

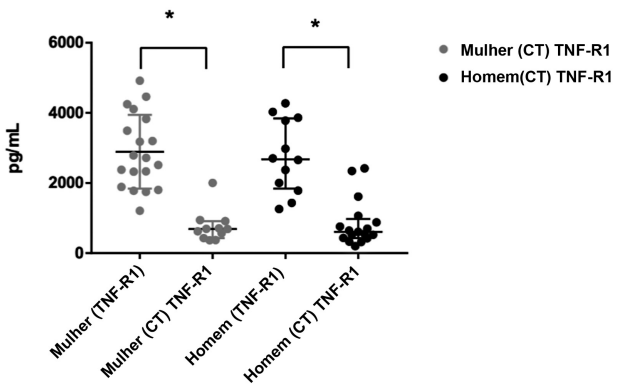

Fig. 1 Comparação dos níveis séricos de TNF-R1 entre os grupos do estudo em pacientes de ambos os sexos.

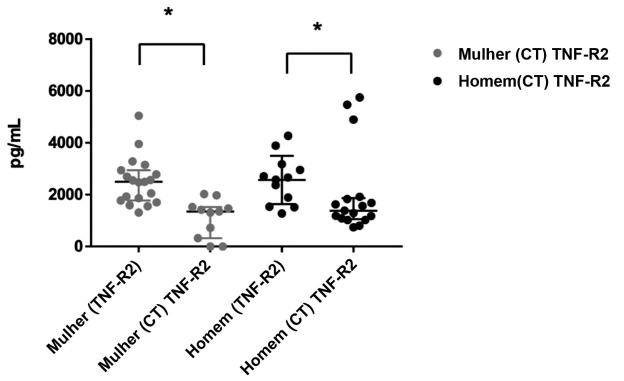

Fig. 2 Comparação dos níveis séricos de TNF-R2 entre os grupos do estudo em pacientes de ambos os sexos.

Os níveis séricos de TNF-R2 tiveram resultados semelhantes. Variaram de 1.313 a 5.042 pg/ml (mediana de 2.495 pg/ml) no grupo de mulheres com osteoporose. Nos homens com osteoporose os níveis variaram de 1.276 a 4.271 pg/ml (mediana de 2.618 pg/ml). Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes com osteoporose quando analisados pelo sexo (Mann-Whitney; $p = 0{,}85$). No grupo controle, os níveis séricos de TNF-R2 variaram de indetectável a 2.023 pg/ml (mediana de 1.350 pg/ml) no grupo de mulheres. Nos homens, os níveis variaram de 744 a 5.753 pg/ml (mediana de 1.380 pg/ml). Os níveis de TNF-R2 mostraram significativamente um aumento no grupo com osteoporose, em comparação com o grupo controle, em ambos os sexos ($p < 0{,}0001$ e 0,033 respectivamente) (►**Fig. 2**).

Como foi observado um aumento significativo de TNF-R1 e TNF-R2 em homens e mulheres com osteoporose, testamos se haveria uma correlação entre os níveis séricos de TNF-R1 e TNF-R2 na osteoporose, tanto no sexo masculino como feminino. Os resultados apresentados nas ►**Figs. 3** e **4** mostram que há uma correlação positiva e significativa apenas no sexo feminino (Spearman; $p = 0{,}049$).

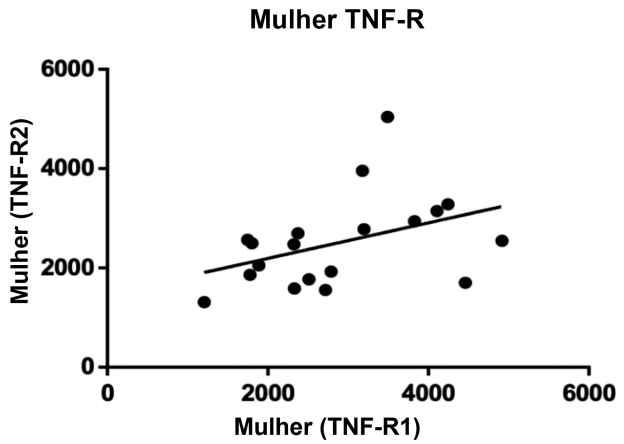

Fig. 3 Correlação entre os níveis séricos de TNF-R1 e TNF-R2 em mulheres com osteoporose.

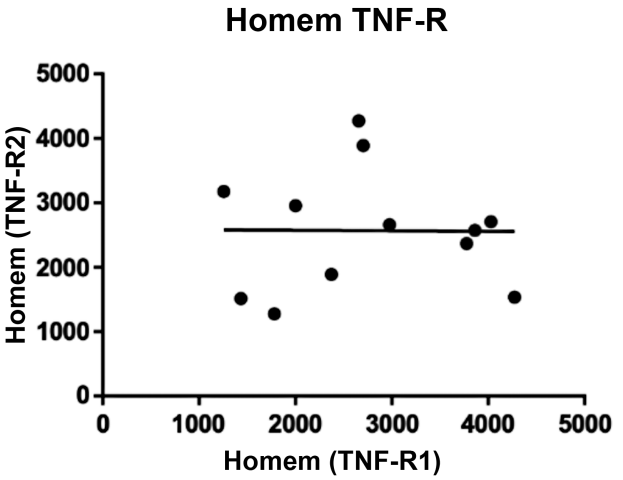

Fig. 4 Correlação entre os níveis séricos de TNF-R1 e TNF-R2 em homens com osteoporose.

Discussão

A osteoporose se desenvolve a partir de um desequilíbrio na remodelação óssea, o qual decorre tanto de alterações hormonais como de fatores imunológicos. No presente estudo, foram analisadas a presença de TNF-alfa, uma potente citocina no papel inflamatório, e de seus receptores, TNF-R1 e TNF-R2, em pacientes com osteoporose e no grupo controle, comparando ainda entre os gêneros.

Os resultados mostraram diferenças significativas na quantidade de receptores de TNF-R1 e TNF-R2. Mulheres com osteoporose apresentam níveis elevados dos receptores TNF-R1 e TNF-R2 ao serem comparadas com mulheres do grupo controle. Da mesma forma, homens com osteoporose apresentam níveis elevados dos receptores TNF-R1 e TNF-R2 ao serem comparados com homens do grupo controle.

Estudos mostram que o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-alfa, pode estar diretamente relacionado ao envelhecimento, sendo que a produção inapropriada desta citocina, ou a ativação sustentada de suas vias de sinalização, são fatores relacionados ao desenvolvimento de osteoporose.[20,21] Entretanto, assim como o presente estudo, outros autores demonstraram não haver associação entre alterações nos níveis de TNF-alfa entre mulheres e homens normais e nos que apresentam osteoporose.[22,23]

No presente estudo, avaliamos ainda os níveis séricos dos receptores do TNF-alfa. A avaliação das formas solúveis dos receptores de TNF-alfa deve ser avaliada,[24] uma vez que a dosagem dos níveis circulantes de TNF-alfa baseada no status de massa óssea são inconsistentes e controversas.[22,23] Estudos evidenciam que a ativação de TNF-R1 leva ao aumento da osteoclastogênese e diminuição da diferenciação de osteoblastos.[22]

Neste estudo, foram analisados os níveis séricos dos receptores do TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2. Encontramos um aumento significativo ao compararmos os níveis de TNF-R1 em mulheres e homens com osteoporose com os do grupo controle, corroborando que há relação entre a fisiopatogênese da osteoporose e os efeitos da ativação do TNF-R1. Da

mesma forma, evidenciamos aumento significativo dos níveis séricos de TNF-R2 em pacientes com osteoporose, tanto no grupo masculino quanto no feminino. A ativação do TNF-R2 foi descrita como supressora da osteoclastogênese.[25] Nossos dados mostram que o TNF-alfa não foi detectado no soro de pacientes com osteoporose e que os níveis séricos dos seus receptores TNF-R1 e TNF-R2 estão aumentados, quando comparados como os do grupo controle. A sinalização destes receptores está associada à modulação da osteogênese e, se estimulada de forma inadequada, poderá resultar em desequilíbrio da homeostase óssea. Como demonstrado em estudos que observaram desequilíbrio na deposição óssea, na ocorrência de diferenciações debilitadas de osteoblastos e adipócitos.[26]

Um achado interessante foi o fato de haver uma correlação positiva e significativa entre os níveis de TNF-R1 e TNF-R2 apenas em mulheres, sugerindo que apenas no sexo feminino os dois receptores são liberados de forma homogênea.

Conclusão

O presente estudo demonstra um aumento significativo dos receptores do TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2, em pacientes com osteoporose em homens e mulheres. No sexo feminino, os níveis séricos destes receptores apresentam uma correlação significativa e positiva, enquanto esta correlação não foi observada no sexo masculino. Estes dados sugerem que a expressão e a liberação destes receptores podem estar contribuindo de maneira diferente no desenvolvimento da osteoporose em homens e mulheres.

Conflito de Interesses
Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

Suporte Financeiro
O presente estudo não recebeu nenhum tipo de suporte financeiro de fontes públicas, comerciais, ou sem fins lucrativos.

Referências

1 NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA 2001;285(06):785–795
2 Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci 2006;1092:385–396
3 Gali JC. Osteoporose. Acta Ortop Bras 2001;9(02):53–62
4 Michaud M, Balardy L, Moulis G, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. J Am Med Dir Assoc 2013;14(12): 877–882
5 Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of emaphoring 4D. Nat Med 2011;17(11):1473–1480
6 Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H. Osteoprotection by emaphoring 3A. Nature 2012; 485(7396):69–74
7 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998;93(02):165–176
8 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997;89(02):309–319
9 Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med 2006;12(01):17–25
10 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998;281(5381):1305–1308
11 Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. Annu Rev Immunol 1999;17:331–367
12 Abu-Amer Y, Ross FP, Edwards J, Teitelbaum SL. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. J Clin Invest 1997;100(06):1557–1565
13 Abu-Amer Y, Ross FP, McHugh KP, Livolsi A, Peyron JF, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor-alpha activation of nuclear transcription factor-kappaB in marrow macrophages is mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of Ikappa Balpha. J Biol Chem 1998;273 (45):29417–29423
14 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med 2000;191 (02):275–286
15 Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. J Biol Chem 2000;275(07):4858–4864
16 Goeddel DV. Signal transduction by tumor necrosis factor: the Parker B. Francis Lectureship. Chest 1999;116(1, Suppl)69S–73S
17 Abu-Amer Y, Erdmann J, Alexopoulou L, Kollias G, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. J Biol Chem 2000;275 (35):27307–27310
18 Gilbert LC, Rubin J, Nanes MS. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005;288(05):E1011–E1018
19 Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. Trends Cell Biol 1995;5(10):392–399
20 Gardner EM, Murasko DM. Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. Biogerontology 2002;3(05):271–290
21 Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 2002;296(5573):1634–1635
22 Sahin G, Ozturk C, Bagis S, Cimen OB, Erdogan C. Correlation of serum cytokine levels with axial bone mineral density. Singapore Med J 2002;43(11):576–578
23 Ozmen B, Kirmaz C, Aydin K, Kafesciler SO, Guclu F, Hekimsoy Z. Influence of the selective oestrogen receptor modulator (raloxifene hydrochloride) on IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and bone turnover markers in the treatment of postmenopausal osteoporosis. Eur Cytokine Netw 2007;18(03):148–153
24 Kim JG, Ku SY, Kim H, Chun SW, Suh CS, Choi YM. Relationship between circulating tumor necrosis factor system and bone mass before and after estrogen plus progestogen therapy. Menopause 2009;16(03):534–538
25 Mullin BH, Prince RL, Dick IM, et al. Bone structural effects of variation in the TNFRSF1B gene encoding the tumor necrosis factor receptor 2. Osteoporos Int 2008;19(07):961–968
26 Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-β signaling in bone remodeling. J Clin Invest 2014;124(02):466–472