



IV. AVANCES EN DIÁLISIS PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA

Papel regulador de la apoptosis en la celularidad peritoneal

M. P. Catalán, C. Lorz, A. Reyro y A. Ortiz

Servicio de Nefrología. Fundación Jiménez Díaz. Instituto «Reina Sofía» de Investigaciones Nefrológicas. Madrid.

La diálisis peritoneal es una alternativa segura y barata a la hemodiálisis como tratamiento de la insuficiencia renal terminal. No obstante, presenta problemas que pueden dificultar su empleo a largo plazo. Entre éstos los más importantes son las peritonitis y la esclerosis peritoneal¹. En parte estos problemas son atribuibles a una baja biocompatibilidad de los líquidos de diálisis peritoneal², y están relacionados con alteraciones en la celularidad peritoneal. Así, durante las peritonitis se produce un brusco aumento en el número de leucocitos peritoneales, con un descenso igualmente rápido en los días siguientes a un tratamiento apropiado. Tanto de forma aguda durante las peritonitis, como de forma crónica, en el curso de la diálisis peritoneal, el número de células mesoteliales disminuye³. La apoptosis es una forma activa de muerte celular que participa en el aclaramiento de leucocitos en otros sistemas de inflamación, así como en la pérdida de células parenquimatosas en el daño agudo y crónico de otros órganos como el riñón⁴. La muerte celular por apoptosis podría asimismo participar en la regulación de la celularidad peritoneal. Sin embargo, los estudios en este sentido son escasos. Diversos factores liberados durante la inflamación son capaces de inducir muerte celular por apoptosis. La citoquina letal FasL es uno de los mejor estudiados. FasL induce la muerte por apoptosis de leucocitos, fibroblastos y células hepáticas y renales⁵, pero su efecto sobre el mesotelio no había sido previamente estudiado. Por otra parte, las soluciones de diálisis peritoneal que contienen glucosa son poco biocompatibles y se había reportado su capacidad para

inducir muerte de leucocitos^{6,7}. Sin embargo, en estos estudios no siempre se había evaluado la forma de muerte celular.

En este trabajo hemos evaluado la presencia de apoptosis peritoneal durante las peritonitis y el posible papel de la citoquina letal FasL y de las soluciones de diálisis peritoneal en la regulación de la apoptosis peritoneal.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron las células del efluente peritoneal del primer intercambio turbio o del intercambio nocturno de 10 episodios consecutivos de peritonitis tratados en la Fundación Jiménez Díaz, en distintos días de evolución de la peritonitis. En una parte de la muestra se cuantificó el número de células mediante Coulter, y otra se destinó para estudiar la presencia de apoptosis mediante citometría de flujo.

Cultivo de células mesoteliales

Las células mesoteliales se cultivaron a partir del efluente peritoneal de pacientes estables en diálisis peritoneal, siguiendo técnicas previamente descritas⁸. Se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY), 20% suero de ternera fetal (STF), 2% Biogro-2 (Reactiva, Madrid), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina, a 37°C en 5% CO₂. El FasL humano recombinante (Alexis, Läufelfingen, Suiza) fue empleado en presencia de una cantidad 10 veces mayor de anticuerpo no letal con capacidad para agregar FasL. El agregamiento de FasL restaura la actividad biológica del FasL soluble y simula su presencia en la membrana celular⁹.

Correspondencia: Dr. Alberto Ortiz
Unidad de Diálisis
Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos, 2
28040 Madrid

Estudios de muerte celular

Las células mesoteliales humanas se cultivaron en placas de 12 pocillos, en ausencia de suero, y algunos pocillos se estimularon con FasL durante 24 h. Los neutrófilos de sangre periférica fueron aislados de voluntarios sanos por centrifugación diferencial en gradiente de Ficoll (Rafer SL; Zaragoza)¹⁰. A continuación fueron incubados durante 15 min en RPMI 1640 sin STF, o solución de diálisis 1,5% glucosa, pH 5.5 (CAPD-2, Fresenius, Barcelona, España) o 4,25% glucosa, pH 5.5 (CAPD-3, Fresenius). Al cabo de 15 min el medio de cultivo inicial fue diluido al 50% con RPMI 1640 sin STF, la incubación se prolongó durante 24 h, y la muerte celular por apoptosis fue analizada mediante citometría de flujo.

Para estudiar la muerte celular las células hipodiploides (apoptóticas) fueron cuantificadas mediante citometría de flujo de células permeabilizadas y teñidas con yoduro de propidio en presencia de RNAsa A¹¹. Para el estudio de la morfología de apoptosis las células fueron cultivadas sobre portas, fijadas con metanol:acetona (1:1), y teñidas con yoduro de propidio en presencia de RNAsa A¹², o con hematoxilina-eosina.

Citometría de flujo de FasL

Para estudiar la expresión de FasL intracelular se fijaron 5×10^5 células en 2% glutaraldehído/PBS, se lavaron en PBS y permeabilizaron en 0,1% triton X-100, 2% BSA, 1% suero de cabra, en PBS durante 30 min a temperatura ambiente¹³. A continuación se incubaron con 1 μ g/mL anti-FasL policlonal de conejo (dirigido

contra aminoácidos 2-19 de FasL) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) en 0,1% triton X-100, 0,2% BSA, en PBS durante 60 min, seguido de incubación con 1:100 anticuerpo fluoresceinado de cabra frente a IgG de ratón durante 60 min¹³. Las muestras control se tiñeron con IgG de conejo preinmune. Las células fueron analizadas en un citofluorógrafo y los restos celulares fueron excluidos del análisis. Se estudiaron al menos 10.000 eventos de cada muestra y los datos se mostraron en una escala logarítmica de intensidad de fluorescencia. La fluorescencia media fue calculada usando el programa LYSIS II.

RESULTADOS

Apoptosis de células peritoneales durante la diálisis peritoneal

El número de leucocitos peritoneales fue máximo en el efluente del primer intercambio turbio o de los intercambios obtenidos durante las primeras 48 horas de peritonitis, con rápido descenso del número total de células en los días siguientes (fig. 1A). Por el contrario, en los primeros cambios se observó una baja tasa de apoptosis (fig. 1B). La tasa de apoptosis aumentó en los días siguientes, coincidiendo con el descenso del número total de células. El estudio morfológico confirmó la presencia de células apoptóticas en el efluente peritoneal (fig. 2). Estos datos sugieren que la apoptosis es un mecanismo de aclaramiento de los leucocitos peritoneales, pero no aporta información sobre los factores responsables de la muerte de los leucocitos.

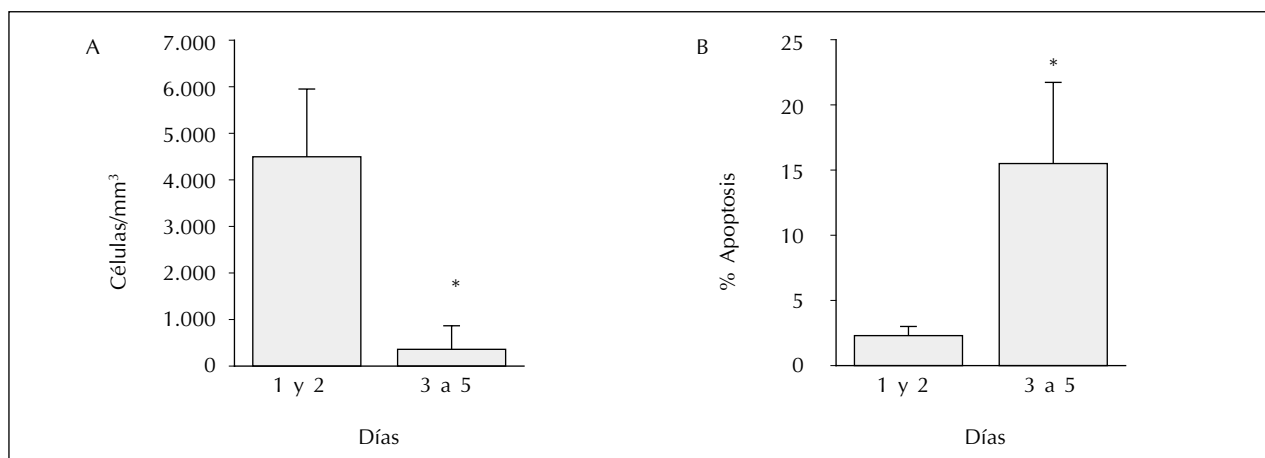


Fig. 1.—A: Cambios en el número de células en el curso de la evolución de las peritonitis. Media \pm ESM de 10 episodios de peritonitis. * $p < 0,05$. B: Cambios en el porcentaje de células apoptóticas en el curso de la evolución de las peritonitis. La apoptosis fue cuantificada mediante citometría de flujo (células hipodiploides). Media \pm ESM de 10 episodios de peritonitis. * $p < 0,05$.

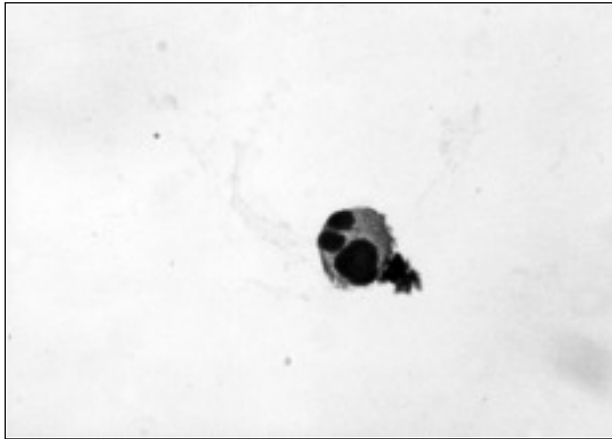


Fig. 2.—Célula apoptótica en el efluente peritoneal en un caso de peritonitis. Tinción con H&E, aumento original $\times 1.000$.

Expresión de FasL en el peritoneo

Una vez comprobado que durante las peritonitis se producen cambios en la tasa de apoptosis de las células del efluente peritoneal, buscamos factores que pudieran justificar estos cambios. FasL es una citoquina letal que es expresada por diversos tipos de leucocitos y por células parenquimatosas¹⁴. Mediante citometría de flujo observamos que las células del efluente peritoneal expresan FasL durante las peritonitis (fig. 3).

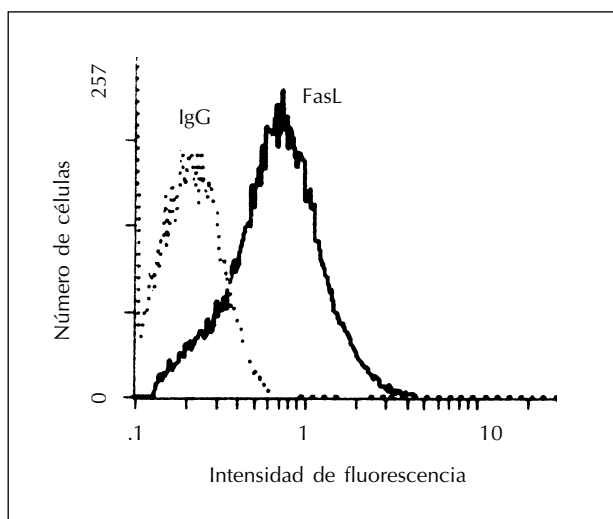


Fig. 3.—Expresión de FasL por leucocitos del efluente peritoneal en un caso de peritonitis. Citometría de flujo.

La citoquina letal FasL induce apoptosis de células mesoteliales humanas

A continuación abordamos la posible repercusión funcional de la presencia de FasL en el peritoneo durante las peritonitis. En particular nos preguntamos si FasL podría ser uno de los factores responsables de la pérdida del mesotelio que se asocia a la inflamación peritoneal. En efecto, observamos que las células mesoteliales cultivadas son relativamente resistentes a la acción letal de FasL, pero concentraciones elevadas de esta citoquina inducen apoptosis mesotelial (fig. 4).

Las soluciones glucosadas de diálisis peritoneal inducen apoptosis de neutrófilos

Existen datos que indican que las soluciones glucosadas de diálisis peritoneal actualmente en uso son deletéreas para la defensa peritoneal. De hecho, algunas publicaciones hacen referencia a su capacidad para inducir muerte de leucocitos^{6,7}. Hemos observado que la exposición de neutrófilos de sangre periférica a soluciones de diálisis peritoneal glucosadas aumenta la tasa espontánea de apoptosis a las 24 h, medida como porcentaje de células hipodiploides (fig. 5). Este efecto letal es más marcado cuando se cultivan en soluciones con una elevada

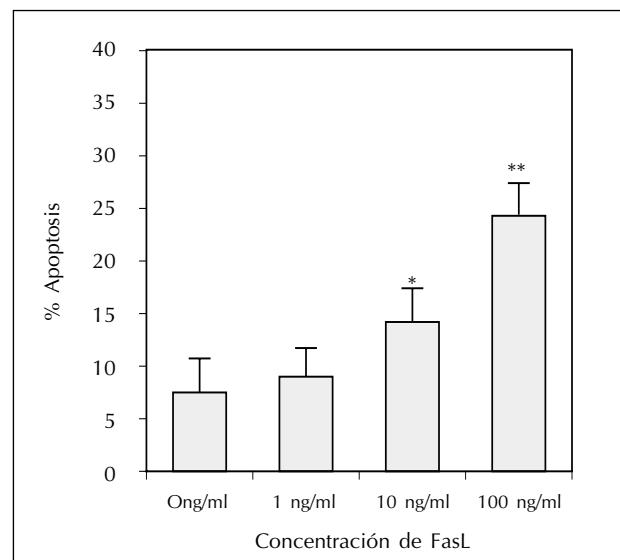


Fig. 4.—Efecto letal de concentraciones crecientes de FasL sobre células mesoteliales humanas cultivadas durante 24 h en ausencia de factores de supervivencia. La apoptosis fue cuantificada mediante citometría de flujo (células hipodiploides). Media \pm ESM. * $p < 0,05$.

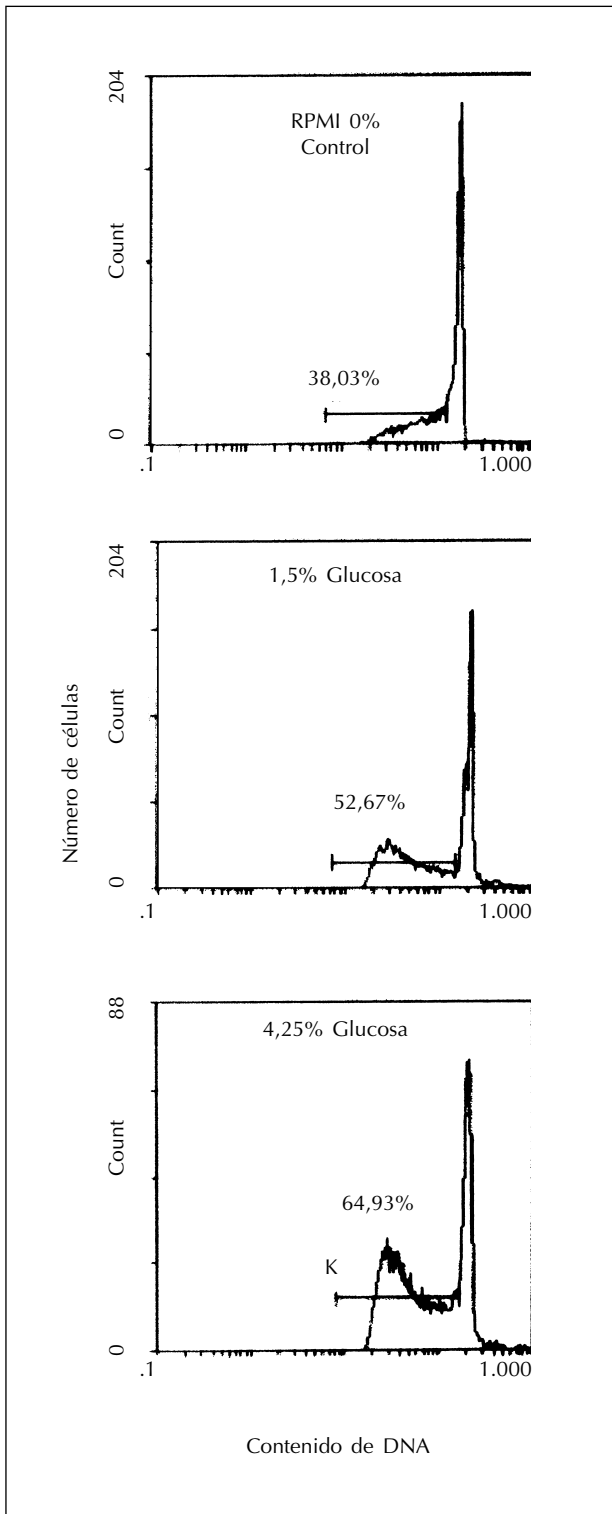


Fig. 5.—Efecto letal de las soluciones de diálisis peritoneal sobre neutrófilos cultivados durante 24 h. Diagramas de citometría de flujo. La barra K indica las células apoptóticas (células hipodiploides).

concentración de glucosa (4,25% glucosa) (fig. 5). El examen de los neutrófilos así tratados mediante microscopía mostró la morfología típica de la apoptosis (disminución del tamaño celular y nuclear, con condensación y fragmentación del núcleo) (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este trabajo son que durante las complicaciones agudas de la diálisis peritoneal existe muerte celular por apoptosis *in vivo*, que en estas circunstancias se expresan localmente citoquinas letales como FasL, y que tanto FasL como las soluciones de diálisis peritoneal que contienen glucosa son capaces de inducir muerte celular por apoptosis en células peritoneales. En conjunto estos datos sugieren que la apoptosis participa en la regulación de la celularidad peritoneal, aunque es necesario profundizar en el conocimiento de sus mecanismos moleculares, a fin de poder manipularla con fines terapéuticos. Es preciso también delimitar el papel de la apoptosis de cada tipo celular y en cada etapa de las complicaciones de la diálisis peritoneal. La apoptosis puede ser beneficiosa o perjudicial para el peritoneo dependiendo de estos factores. Así, por ejemplo, la pérdida por apoptosis del mesotelio puede resultar lesivo, y, por el contrario, la pérdida por apoptosis de fibroblastos y neovasos puede colaborar a la resolución de la lesión peritoneal.

Durante las peritonitis se produce un rápido aflujo de leucocitos a la cavidad peritoneal. Sin embargo, tras un tratamiento apropiado, la celularidad peritoneal disminuye también rápidamente, hasta volver a los niveles basales. Sin duda, un cese de la quimiotaxis colabora a este fenómeno. Nuestros datos indican que, además, el exceso de leucocitos es eliminado por muerte celular por apoptosis. Si bien son necesarios más estudios para determinar qué factores son responsables de la apoptosis de leucocitos peritoneales, hemos demostrado que durante las peritonitis se expresa la citoquina letal FasL. Los neutrófilos podrían ser la fuente de FasL en estas circunstancias¹⁵. FasL activa el receptor de membrana Fas e induce apoptosis en una variedad de tipos celulares que incluyen neutrófilos, monocitos, linfocitos y fibroblastos⁵. La muerte por apoptosis de estos tipos celulares limita los fenómenos inmunes e inflamatorios. Además, FasL podría también contribuir a la pérdida de células mesoteliales que se observa durante la peritonitis¹⁶. Hemos abordado directamente esta hipótesis y hemos comprobado que altas concentraciones de FasL inducen apoptosis de

células mesoteliales humanas en cultivo. Esta observación abre la posibilidad de interferir terapéuticamente con el daño de las células mesoteliales mediante estrategias que antagonicen la letalidad de FasL. Recientemente se han descrito acciones adicionales de FasL, como favorecer la neovascularización y la quimiotaxis de neutrófilos^{17,18}. Dada las múltiples acciones de FasL sobre diversas estirpes celulares tan sólo un abordaje terapéutico experimental directo podrá definir si el antagonismo de FasL es beneficioso al proteger el mesotelio y evitar la neovascularización y fibrosis o perjudicial al favorecer la persistencia de la inflamación.

Por otra parte, hemos confirmado que las soluciones de diálisis peritoneal inducen apoptosis de neutrófilos, lo cual podría disminuir su eficacia en la defensa peritoneal. Es preciso definir los mecanismos moleculares de la apoptosis inducida por soluciones de diálisis. Las posibles acciones proapoptóticas de estas soluciones incluyen la activación de caspasas y la modulación de la expresión de genes letales y protectores pertenecientes a la familia de Bcl2^{19,20}. En este sentido, el exceso de glucosa en el microambiente celular aumenta la expresión del gen letal bax y disminuye la de los genes protectores bcl2 y bclxL en células tubulares proximales renales cultivadas, favoreciendo la apoptosis²⁰.

En conclusión, nuestros datos sugieren que la apoptosis regula la celularidad peritoneal. Es necesario comprender los mecanismos celulares y moleculares de este fenómeno a fin de poder diseñar estrategias terapéuticas que maximicen la eficacia anti-infecciosa de los leucocitos, minimizando el daño mesotelial, la neovascularización y la fibrosis.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por becas FISS 98/0637, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 97/0071), Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas y Fresenius, SA. MC está becada por la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz y CL por el Ministerio de Educación y Ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Selgas R, Bajo MA, Paiva A, Del Peso G, Díaz C, Aguilera A, Hevia C: Stability of the peritoneal membrane in long-term peritoneal dialysis patients. *Adv Ren Replace Ther* 5: 168-178, 1998.
2. Breborowicz A, Oreopoulos DG: Biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. *Am J Kidney Dis* 27: 738-743, 1996.
3. Ho-Dac-Pannekeet MM, Hiralall JK, Strujik DG, Krediet RT: Longitudinal follow-up of CA125 in peritoneal effluent. *Kidney Int* 51: 888-893, 1997.
4. Ortiz A, González Cuadrado S, Lorz C, Egido J: Apoptosis in renal diseases. *Front Biosci* 1: D30-D47, 1996.
5. Ortiz A, Lorz C, Egido J: New kids in the block: the role of FasL and Fas in kidney damage. *J Nephrol* 12: 150-158, 1999.
6. Cendoroglo M, Sundaram S, Groves C, Ucci AA, Jaber BL, Pereira BJ: Necrosis and apoptosis of polymorphonuclear cells exposed to peritoneal dialysis fluids *in vitro*. *Kidney Int* 52: 1626-1634, 1997.
7. Plum J, Lordnejad MR, Grabensee B: Effect of alternative peritoneal dialysis solutions on cell viability, apoptosis/necrosis and cytokine expression in human monocytes. *Kidney Int* 54: 224-235, 1998.
8. Díaz C, Selgas R, Castro MA, Bajo MA, Fernández de Castro M, Molina S, Jiménez C, Ortiz A, Vara F: Ex-vivo proliferation of mesothelial cells directly obtained from peritoneal effluent. Its relationship with peritoneal antecedents and functional parameters. *Adv Perit Dial* 14: 19-24, 1998.
9. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J: Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187: 1205-1213, 1998.
10. Henson PM, Johnson HB, Spielgelberg HL: The release of granule enzymes from human neutrophils stimulated by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. *J Immunol* 109: 1182-1188, 1972.
11. Lorz C, Ortiz A, Justo P, González-Cuadrado S, Duque N, Gómez-Guerrero C, Egido J: Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli. *J Am Soc Nephrol* (accepted for publication).
12. Ortiz A, Lorz C, Catalán MP, Danoff TM, Yamasaki Y, Egido J, Neilson EG: Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int* (accepted for publication).
13. Ortiz A, González-Cuadrado S, Lorz C, García del Moral R, O'Valle F, Egido J: Cytokines and Fas regulate apoptosis in murine renal interstitial fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 8: 1845-1854, 1997.
14. Ortiz A, Lorz C, Egido J: The Fas ligand/Fas system in renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1831-1834, 1999.
15. Lles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ: Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 184: 429-440, 1996.
16. Verger C, Luger C, Moore HL, Nolph KL: Acute changes in peritoneal morphology and transport properties with infectious peritonitis and mechanical injury. *Kidney Int* 23: 823-831, 1983.
17. Biancone L, Martino AD, Orlandi V, Conaldi PG, Toniolo A, Camussi G: Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas in vivo. *J Exp Med* 186: 147-152, 1997.
18. Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa A, Fukao K, Yagita H, Okumura K: Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol* 161:4484-4488, 1998.
19. Ortiz A, Lorz C, Catalán MP, Ortiz A, Coca S, Egido J: Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: role of caspases. *Kidney Int* 68 (Supl.): S25-S29, 1998.
20. Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG: Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Invest Med* 45: 50-56, 1997.