



## IV. LA DIÁLISIS COMO PROCESO INFLAMATORIO

# *La activación celular y apoptosis como marcadores de la inflamación inducida por la hemodiálisis*

J. Carracedo, R. Ramírez, J. A. Madueño, S. Soriano, A. Rodríguez-Benot, M. Rodríguez, A. Martín-Malo y P. Aljama

Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Los enfermos con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) presentan un deterioro de la respuesta inmune que se refleja en una mayor susceptibilidad a padecer infecciones bacterianas y víricas, enfermedades autoinmunes y neoplasias<sup>1-4</sup>. La alteración inmunológica asociada a la insuficiencia renal crónica o es una inmunodeficiencia habitual y resulta paradójico observar como la respuesta inmune de enfermos con IRC no sólo no mejora con el tratamiento en hemodiálisis, sino que en la mayoría de los casos, el tratamiento de hemodiálisis conlleva una activación de células inmunocompetentes, que es más evidente en células mononucleares, y que puede agravar la inmunodeficiencia de estos enfermos<sup>5-10</sup>. En este sentido, nuestro grupo viene estudiando desde hace 15 años el efecto inmunomodulador inducido por la hemodiálisis.

### **LAS MEMBRANAS CELULÓSICAS INDUCEN ACTIVACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

Desde los primeros estudios, evidenciamos como el grado de afectación inmune se asociaba no sólo con la hemodiálisis *per se*, sino que también dependía de la membrana de diálisis utilizada<sup>1</sup>. Nuestros primeros resultados sugerían que la célula mononuclear reconocía a la membrana de hemodiálisis como un elemento «no propio» y por tanto siguiendo el concepto inmunológico se activaba y producía una respuesta celular específica. Para demostrar esta hipótesis se pusieron en con-

tacto células mononucleares con diferentes membranas de hemodiálisis observando como la interacción con membranas celulósicas producía un incremento en la fosforilación de proteínas celulares<sup>11</sup>, que no se observaba con membranas no celulósicas. Tras inducir la fosforilación, la interacción de las células con las membranas celulósicas indujo un incremento en la expresión de moléculas de adhesión como CD18, CD49 y CD54, un incremento en la expresión de marcadores de activación como el receptor para LPS (CD14) o la formación de agregados celulares<sup>11-13</sup>. Asimismo, el efecto inducido por la membrana celulósica requería de la interacción membrana celular/membrana de diálisis<sup>14</sup>, y la incubación de la membrana de diálisis con albúmina o las propias proteínas de adhesión celular prevenían esta activación, indicando que las posibles «estructuras bioincompatibles» podían sufrir saturación, lo que confirmaba los datos obtenidos por otros grupos<sup>15</sup>. Junto a estos resultados, diferentes grupos han demostrado como la activación inducida por la hemodiálisis está relacionada con la presencia de diferentes factores del complemento<sup>16-20</sup> o por la presencia de endotoxinas bacterianas<sup>16-17</sup>, lo que produce un efecto amplificador en la activación celular.

### **ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA INDUCIDA POR MEMBRANAS CELULÓSICAS**

La activación celular por las membranas de hemodiálisis tiene consecuencias funcionales. La activación de las células mononucleares se caracteriza por ir acompañada de secreción de citoquinas. Después de 24 horas de cultivo las células cultivadas con membranas celulósicas liberaron cito-

**Correspondencia:** Dr. Pedro Aljama  
Servicio de Nefrología  
Hospital Universitario Reina Sofía  
Avda. Menéndez Pidal, s/n.  
14004 Córdoba

quinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  al medio de cultivo. Estos datos confirmaban los resultados evidenciados por otros grupos<sup>5-10</sup>, que han demostrado un incremento en los niveles de estas citoquinas en el suero de enfermos hemodializados.

### **LAS CÉLULAS QUE HAN CONTACTADO CON MEMBRANAS CELULÓSICAS SON MÁS SUSCEPTIBLES A SUFRIR APOPTOSIS ESPONTÁNEA**

La apoptosis celular regula la homeostasis de células inmunocompetentes. Las células que interactuaban con membranas celulósicas presentaban mayor susceptibilidad a morir por apoptosis<sup>13</sup>. También se demostró una mayor susceptibilidad a la apoptosis espontánea en pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis<sup>21-22</sup>. Nuestros experimentos muestran que el grado de apoptosis espontánea está relacionado con el grado de biocompatibilidad de la membrana de hemodiálisis (fig. 1).

### **SEÑALES INTRACELULARES MODULADAS POR EL CONTACTO CON MEMBRANAS CELULÓSICAS**

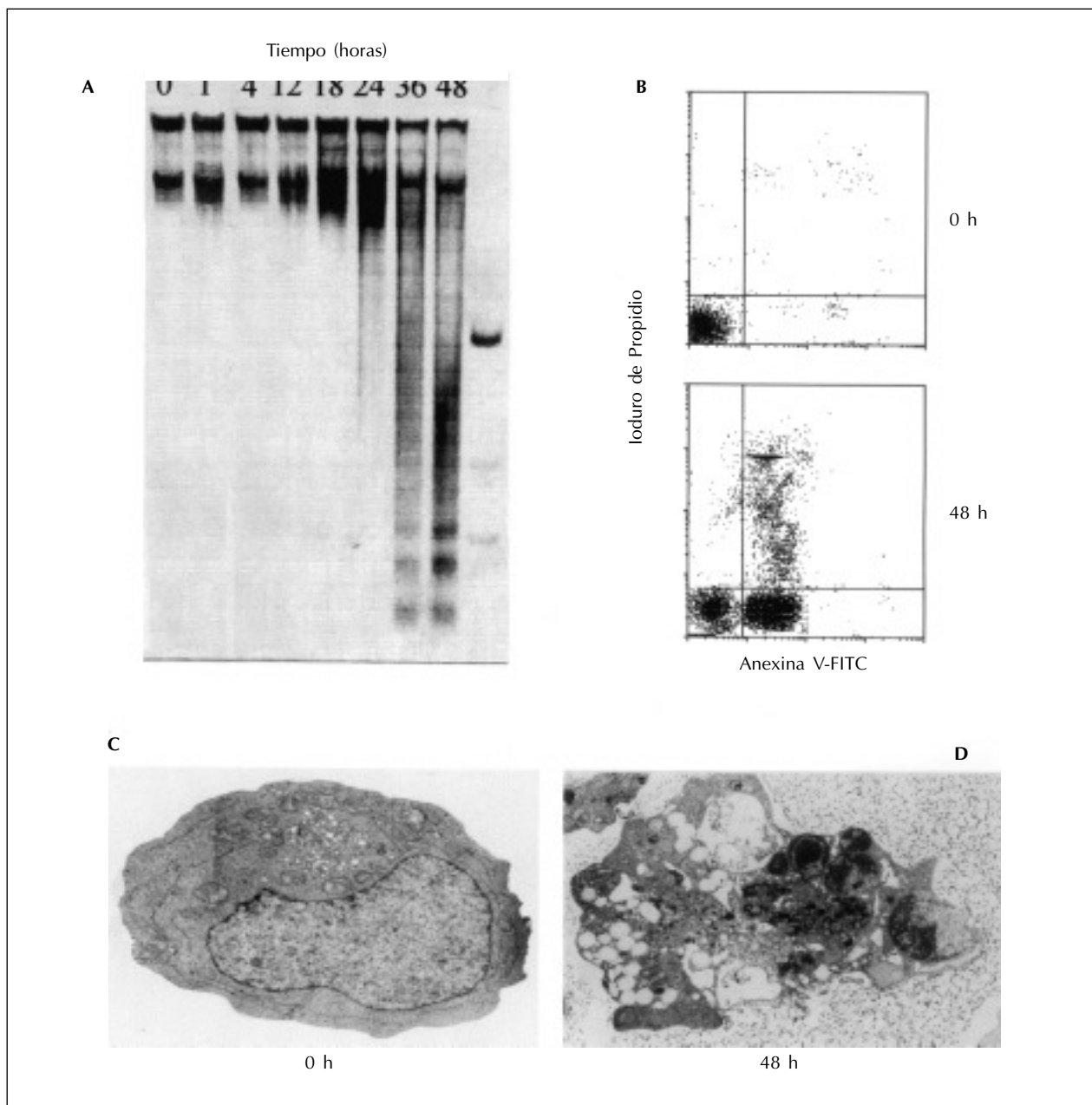
Tras la interacción con las «estructuras bioincompatibles», las moléculas de superficie de las células mononucleares transducen al interior de la célula las señales de activación. La ruta bioquímica dependiente de actividad Proteín Kinasa C (PKC) es probablemente el principal mediador celular implicado en la activación y diferenciación de células inmunocompetentes. Tanto la activación celular como la apoptosis inducida por membranas celulósicas se incrementaron por el coestímulo de agentes inductores de PKC, y se inhibieron cuando se bloqueó esta ruta bioquímica<sup>13</sup>. Además, existe una familia de proteínas intracelulares (proteínas G) que regula gran parte de las señales bioquímicas transmitidas al interior de la célula a través de las moléculas de superficie<sup>23-25</sup>. Para comprobar si las proteínas G están implicadas en la transmisión de señales por las membranas celulósicas, utilizamos diferentes toxinas bacterianas con actividad moduladora sobre proteínas G. La toxina pertussis (PTX), una toxina con capacidad para inhibir señales dependientes de proteínas G, inhibió la apoptosis inducida por membranas celulósicas, confirmando la hipótesis de que las células mononucleares reconocen e interactúan con las

«estructuras bioincompatibles» de las membranas celulósicas<sup>11</sup>.

La fase de ejecución de la apoptosis está mediada por una familia de proteasas con residuos cisteína denominada caspasas. La actividad dependiente de caspasa-3 participa de forma fundamental en la regulación de la apoptosis espontánea de monocitos en sujetos sanos<sup>26</sup>. Las membranas celulósicas inducen actividad caspasa-3 en células mononucleares, y esta actividad media la apoptosis espontánea de estas células<sup>27</sup>.

### **¿ES LA APOPTOSIS INDUCIDA POR MEMBRANAS CELULÓSICAS UN PROCESO IRREVERSIBLE?**

Los resultados obtenidos evidenciaban que las células mononucleares recibían una «señal de muerte» tras interactuar con la membrana celulósica. Pero estos datos no nos permitían afirmar si la apoptosis espontánea que se observa en estas células es consecuencia de una señal específica o de la activación de la apoptosis fisiológica. Para explorar estas dos posibilidades utilizamos una característica inherente a la célula mononuclear, y es que esta célula prolonga su supervivencia cuando es estimulada por citoquinas proinflamatorias o proteínas bacterianas como LPS<sup>28-29</sup>. Tanto la apoptosis espontánea observada en células de pacientes dializados con membranas celulósicas como la inducida *in vitro* en células de sujetos sanos tras el contacto con estas membranas, se previene cuando las células son estimuladas por IL-1 o LPS, lo que resulta contradictorio con la hipótesis de una señal de muerte específica. Recientemente existen estudios que han demostrado que las células somáticas sometidas a una activación reiterada sufren un proceso de senescencia acelerada<sup>30</sup>. Los resultados descritos en otros modelos eran compatibles con la hipótesis de que las células mononucleares estuviesen sufriendo una activación repetida que indujese la producción de niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, citoquinas que a su vez actuarían prolongando la supervivencia de estas células en sangre periférica<sup>29</sup>. Esta hipótesis implicaría que las células de estos enfermos son células envejecidas y por tanto más susceptibles a morir por apoptosis cuando se aíslan del ambiente proinflamatorio en el que se encuentran. En la actualidad estamos desarrollando los estudios necesarios para confirmar esta hipótesis, aunque ya hemos comprobado que las células mononucleares de sujetos dializados con membranas celulósicas presentan un incremento en la expresión de las mo-

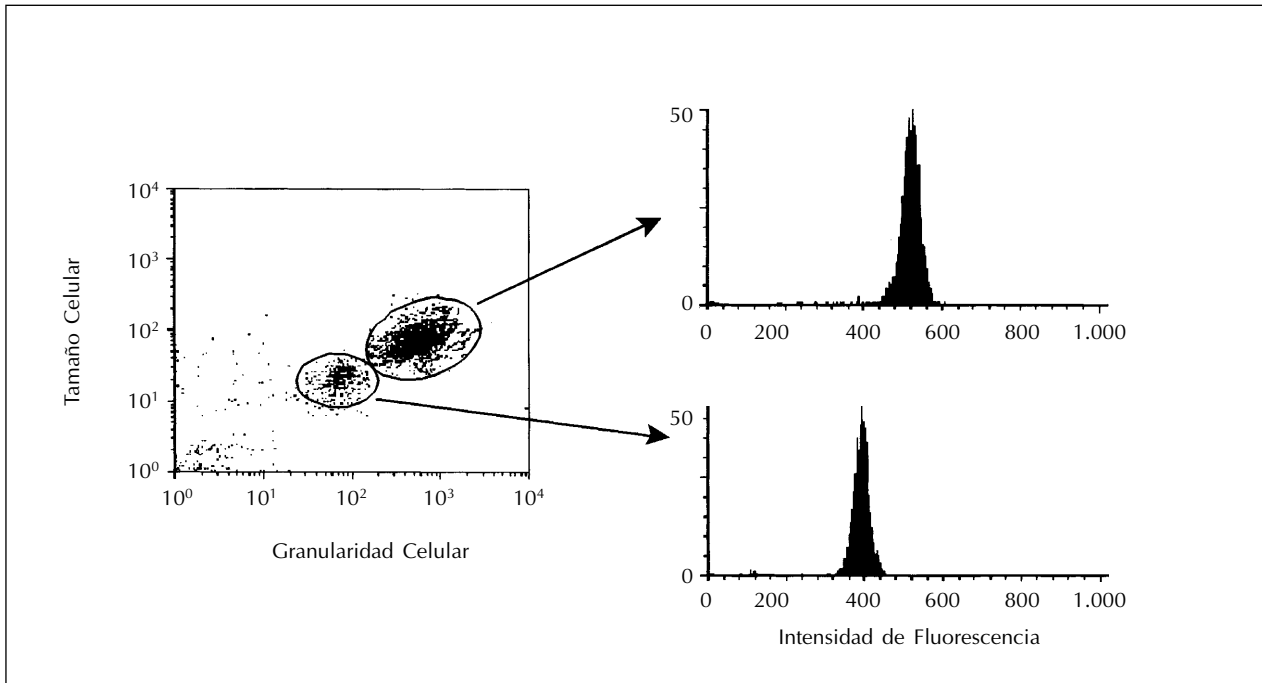


**Fig. 1.**—Las células mononucleares de sangre periférica que interaccionan con membranas celulósicas presentan una mayor susceptibilidad a morir por apoptosis cuando permanecen en cultivo durante 48 horas. (A) Análisis de la apoptosis por fragmentación del ADN. Electroforesis en gel de agarosa del ADN obtenido durante 48 horas de cultivo de las células mononucleares que han interaccionado con membranas celulósicas. (B) Determinación de apoptosis por citometría de flujo (método de anexina-V/Ioduro de Propidio). Se consideraron células apoptóticas las que se marcaron con anexina V-FITC (eje X) y excluyeron Ioduro de Propidio (eje Y). (C) Fotografías de microscopía electrónica de la apoptosis inducida en células mononucleares por membranas celulósicas. Después de 48 horas de cultivo se pueden observar imágenes características de apoptosis como condensación de la cromatina nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.

léculas CD14 y CD32 (fenotipo característico de monocitos senescentes). Este fenotipo se acompaña de un telómero acortado definitorio de senescencia celular (fig. 2)<sup>29,31</sup>.

## CONCLUSIÓN

Parece evidente que como consecuencia de la interacción con la membrana de hemodiálisis las célu-

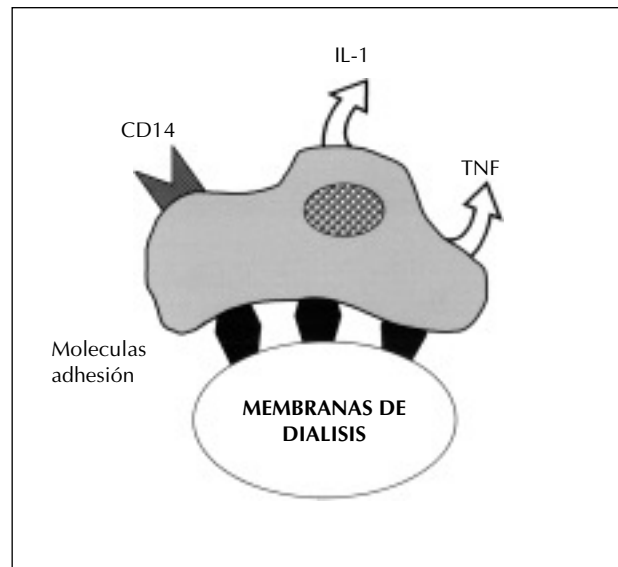


**Fig. 2.**—Longitud de telómero en células mononucleares de un paciente dializado con membranas celulósicas. Las células se marcaron con una sonda PNA-telómero-FITC y se analizaron en un citómetro de flujo. Tras 48 horas de cultivo se observó una subpoblación con el telómero acortado.

las mononucleares sufren un proceso de activación cíclico. Además, otros factores como fracciones del complemento o la contaminación por endotoxinas pueden amplificar este proceso. Para el sistema inmune, el resultado final es una agresión frente a la cual se induce una respuesta inflamatoria. Como consecuencia de la misma, las células mononucleares activadas producen citocinas proinflamatorias, que de forma autocrina, actúan sobre las propias células prolongando su supervivencia en sangre periférica, aunque son más susceptibles a morir por apoptosis cuando se aíslan del medio inflamatorio (fig. 3). Estas células «senescentes», acaban alterando su producción de citocinas y generan una respuesta alterada frente a situaciones de stress agudo, lo que podría explicar las alteraciones inmunes del enfermo en diálisis.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 98/0423, 00/0788, 00/0701), Junta de Andalucía (112/99 y 179/99), Sociedad Española de Nefrología y Fundación Renal «Íñigo Álvarez de Toledo».



**Fig. 3.**—Las células mononucleares de sangre periférica sufren un proceso de activación cíclico como consecuencia de la interacción con la membrana de hemodiálisis, produciendo citocinas proinflamatorias, incremento en la expresión de moléculas de adhesión como CD18, CD49 y CD54 y de marcadores de activación como el receptor para LPS (CD14).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aljama P, Martín-Malo A, Garin JM, Torres A, Castillo D, Fuentes M, Gómez JM: Granulocyte adherence changes: An index of biocompatibility. *Kidney Int* 33: S68-S72, 1988.
2. Cheung AK, Parker CJ, Janatova J, Brynda E: Modulation of complement activation on hemodialysis membranes by immobilized heparin. *J Am Soc Nephrol* 2: 1328-1337, 1992.
3. Hakim RM: Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility. *Kidney Int* 44: 484-494, 1993.
4. Martín-Malo A, Velasco F, Rojas R, Castillo D, Rodríguez M, Torres A, Aljama P: Fibrinolytic activity during hemodialysis: A biocompatibility-related phenomenon. *Kidney Int* 41: S213-6, 1993.
5. Lonemann G, Haubitz M, Schindler R: Hemodialysis-associated induction of cytokines. *Blood Purif* 8: 214-222, 1990.
6. Haeffner-Cavaillon N, Jahns G, Poignet JL, Kazatchkine MD: Induction of interleukin-1 during hemodialysis. *Kidney Int* 43: S139-S143, 1993.
7. Dinarello CA: Cytokines: agents provocateurs in hemodialysis? *Kidney Int* 41: 683-694, 1992.
8. Herbelin A, Nguyen AT, Zingraff J, Ureña P, Descamps-Latscha B: Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Kidney Int* 37: 116-125, 1990.
9. Lonemann G, Bingel M, Floege J, Koch KM, Shaldon S, Dinarello CA: Detection of endotoxin like interleukin-1-inducing activity during *in vitro* dialysis. *Kidney Int* 33: 29-35, 1988.
10. Laude-Sharp M, Caroff M, Simard L, Pusineri C, Kazatchkine MD, Haeffner-Cavaillon N: Induction of IL-1 during hemodialysis: transmembrane passage of intact endotoxins (LPS). *Kidney Int* 38: 1089-1094, 1990.
11. Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Aljama P: Apoptosis induced in monocytes by hemodialysis membrane is inhibited by pertussis toxin. *J Am Soc Nephrol* 9: 46-53, 1998.
12. Tielemans CL, Delville JPC, Husson CP, Madhoun P, Lambrechts AM, Goldman M, Venherweghem JL: Adhesion molecules and leukocyte common antigens on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Clin Nephrol* 39: 158-165, 1993.
13. Carracedo J, Ramírez R, Pintado O, Gómez-Villamandos JC, Martín-Malo A, Rodríguez M, Aljama P: Cell aggregation and apoptosis induced by hemodialysis membranes. *J Am Soc Nephrol* 6: 1586-1591, 1995.
14. Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Madoño JA, Aljama P: The role of adhesion molecules in mononuclear cell apoptosis induced by cuprophane hemodialysis membrane. *Nephrol* (en prensa).
15. Vallar L, Rivat C: Regenerated cellulose-based hemodialyzers with immobilized proteins as potential devices for extracorporeal immunoabsorption procedures: an assessment of protein coupling capacity and *in vitro* dialysis performances. *Artif Organs* 1989; 36: 257-265.
16. Craddock PR, Fehr J, Dalmsø AP, Brigham KL, Jacob HS: Hemodialysis leukopenia: Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest* 59: 879-888, 1977.
17. Cheung AK, Henderson LW: Effects of complement activation by dialysis membranes. *Am J Nephrol* 6: 81-91, 1986.
18. Cheung AK, Parker CJ, Wilcox LA, Janatova J: Activation of complement by hemodialysis membranes: Polyacrylonitrile binds more C3a than cuprophane. *Kidney Int* 37: 1055-1059, 1990.
19. Bingel M, Lonemann G, Shaldon S, Koch KM, Dinarello CA: Human Interleukin-1 production during hemodialysis. *Nephron* 43: 161-163, 1986.
20. Shindler R, Lonemann G, Shaldon S, Koch KM, Dinarello CH: Transcription, not synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by complement. *Kidney Int* 37: 85-93, 1990.
21. Heidenreich S, Schmidt M, Bachmann J, Harrach B: Apoptosis of monocytes cultured from long-term hemodialysis patients. *Kidney Int* 49: 792-799, 1996.
22. Martín-Malo A, Carracedo J, Ramírez R, Rodríguez-Benot A, Soriano S, Rodríguez M, Aljama P: Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 11: 936-942, 2000.
23. Freissmuth M, Casey PJ, Gilman AG: G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB* 3: 2125, 1989.
24. Ramírez R, Carracedo J, Zamzami N, Castedo M, Kroemer G: Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes. *J Exp Med* 180: 1147-1152, 1994.
25. Carracedo J, Ramírez R, Marchetti P, Pintado O, Baixeras E, Martínez-Alonso C, Kroemer G: Pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins regulate activation-induced apoptotic cell death of human natural killer cells. *Eur J Immunol* 25: 3094-3099, 1995.
26. Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD: Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. *J Immunol* 163: 1755-1762, 1999.
27. Carracedo J, Ramírez R, Soriano S, Martín-Malo A, Rodríguez M, Aljama P: Spontaneous apoptosis of human mononuclear cells from hemophan dialyzed patients is mediated by a caspase-3-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* 11: 259A, 2000.
28. Heidenreich S, Schmidt M, August C, Cullen P, Rademaekers A, Pauels HG: Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule. *J Immunol* 159: 3178-3188, 1997.
29. Heidenreich S: Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *J Leukoc Biol* 65: 737-743, 1999.
30. Pawelec G, Effros RB, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R: T cells and aging (update february 1999). *Front Biosci* 13: 69-77, 1997.
31. Mangan DF, Wahl SM: Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 147: 3408-3412, 1991.