

Influencia de las membranas de diálisis sobre los factores urémicos inhibidores de la proliferación linfocitaria

M. González, A. L. M. de Francisco, J. G. Cotorruelo, S. Sanz de Castro, E. Canga, E. de Bonis y M. Arias
Servicio de Nefrología. Hospital Nacional Marqués de Valdecilla. Santander.

RESUMEN

La inmunodeficiencia que adquieren los pacientes con insuficiencia renal crónica se ha tratado de explicar por la presencia en el suero de las denominadas toxinas urémicas. El grado de depuración que experimentan estos factores séricos, según el tipo de membrana utilizada en la diálisis, explica, en parte, las diferentes evoluciones clínicas de estos pacientes.

Estudiamos el efecto inmunosupresor del suero urémico mediante cultivos linfocitarios de donantes de sangre estimulados con fitohemaglutinina. Los tipos de suero testados procedían de 10 pacientes en programa de diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y cinco en hemodiálisis, sometidos éstos a tres diálisis consecutivas con cuprofán, polisulfona y AN-69. Mientras el suero de los urémicos en DPCA no mostraba diferencias significativas con el suero control (FCS) en la suplementación de los cultivos linfocitarios, el suero de aquéllos en hemodiálisis inhibía la linfoblastogénesis ($p < 0,001$), sin importar qué tipo de membrana se había utilizado. El suero posdiálisis tenía mayor capacidad supresora que el pre-diálisis, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa. Esta observación apunta a la aparición durante la hemodiálisis de algún factor o potenciación de los ya existentes que se añade a las propias toxinas urémicas, en probable relación con los productos generados por el contacto sangre-membrana (biocompatibilidad), que en este caso concreto no parece verse influido por las diferentes membranas en su empleo agudo, aun siendo más biocompatibles polisulfona y AN-69 que el cuprofán.

Palabras clave: **Factores séricos inmunosupresores. Membranas de hemodiálisis. Diálisis peritoneal continua ambulatoria. Biocompatibilidad.**

THE INFLUENCE OF PERITONEAL AND DIALYSIS MEMBRANES ON THE UREMIC INHIBITORY FACTORS OF LYMPHOCITE PROLIFERATION

SUMMARY

Patients with chronic renal failure develop an immunodeficiency status that has been ascribed to the retention of uremic toxins. According to the membrane used for the dialysis these serum factors are reduced to a varying degree, leading to diverse clinical features.

We have studied the immunosuppressive capacity of uremic serum by culturing lymphocytes from blood donors stimulated with phytohaemagglutinin. We tested

Correspondencia: Dr. M. Arias.
Servicio de Nefrología.
Hospital Nacional Marqués de Valdecilla.
39008 Santander.

serum from 10 patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and 5 on haemodialysis who received 3 consecutive dialysis with cuprophan, polysulphone and AN-69. Serum from patients on CAPD maintained lymphocyte cultures in a similar manner to control serum (FCS). Serum from patients on haemodialysis inhibited lymphoblastogenesis ($p < 0.001$) whatever the membrane used in the dialysis. Postdialysis serum showed higher suppressor capacity than predialysis serum although the difference was not statistically significant. This observation suggests the appearance during the haemodialysis of some factors, or potentiation of previous ones, perhaps in relationship with the products generated by blood-membrane contact (bio-incompatibility). We could not find any acute influence on the results when we used two membranes, polysulphone and AN-69, more biocompatible than cuprophan.

Key words: **Immunosuppressive serum factors. Haemodialysis membranes. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. Biocompatibility.**

Introducción

Asociadas a la insuficiencia renal aparecen una serie de alteraciones inmunitarias, más concretamente déficit, que sitúan a la uremia como una de las causas de inmunodeficiencia adquirida. La primera observación fue la de una mayor supervivencia de los injertos renales en animales urémicos comparados con los controles con función renal normal. La mayor incidencia de neoplasias entre la población ya sometida a un programa de diálisis crónica es otro indicativo de que el sistema inmune mantiene una situación deficitaria en estos pacientes ^{1, 2}.

Cuando se discrimina entre inmunidad humoral y celular, es esta última la que aparece más comprometida en el paciente urémico. Así, en lo que se refiere a la inmunidad humoral, se observan respuestas diversas en la producción de anticuerpos, según el antígeno de que se trate. Incluso se ha sugerido que los déficit en las respuestas humorales dependen de alteraciones en los linfocitos T, lo que centra el problema de nuevo en los mecanismos celulares. Una situación clínica muy común es la escasa respuesta en los test dependientes de la hipersensibilidad cutánea retardada: tuberculina, tricoftina, etc. ^{3, 4}

La causa de esta inmunodeficiencia se trata de explicar actualmente mediante la hipótesis de las toxinas urémicas, es decir, por la presencia en el suero urémico de una serie de factores inhibidores. Factores que no sólo han sido retenidos debido a la pérdida de filtrado glomerular, sino que tampoco se ven depurados por las técnicas sustitutivas extrarrenales. Por último, podría tratarse de sustancias que aparecen de novo, en relación a las mencionadas técnicas de diálisis, sustancias derivadas de los materiales con los que se pone en contacto la sangre, o bien de las reacciones biológicas dependientes de ese contacto sangre-membrana (bioincompatibilidad). Como comprobación de la existencia de estos factores séricos tóxicos existen una serie de ensayos *in vitro* en

los que el suero urémico inhibe la respuesta de linfocitos normales a mitógenos o células alogénicas ^{4, 7}.

Fueron Babb y Scribner ⁸ quienes sospecharon la existencia de unos factores séricos distintos a las clásicas toxinas urémicas (urea, creatinina, ácido úrico...) al comprobar que los pacientes en diálisis peritoneal intermitente, a pesar de tener valores más altos de urea-creatinina (los marcadores clásicos de la eficacia dialítica) que los incluidos en un programa de hemodiálisis, presentaban, sin embargo, una menor incidencia de polineuropatía. Así surge la hipótesis de las moléculas medias (MM), sustancias con un peso molecular mayor que la urea y la creatinina (pequeñas moléculas), lo que dificultaría su paso a través de las membranas clásicas de hemodiálisis (cuprofan), a las que, por el contrario, el peritoneo se mostraría permeable. Aunque en un principio se les hizo responsables a las MM de la neuropatía, posteriormente se ha tratado de valorar su papel en otros de los múltiples estigmas urémicos, como la inmunodepresión. Estas fracciones, obtenidas mediante diferentes técnicas de cromatografía, dan lugar *in vitro* a inhibición de la formación de rosetas por los linfocitos, a inhibición en la linfoblastogénesis dependiente de mitógenos o del propio cultivo mixto ⁹.

Por tanto, si las MM corresponden a los factores séricos inhibitorios, o al menos forman parte de los mismos, y, por otro lado, su mayor o menor depuración está en función del tipo de membrana empleada en la diálisis, esperamos encontrar diferencias entre la capacidad inmunodepresora del suero del urémico sometido a hemodiálisis y del incluido en diálisis peritoneal, y en el caso de la hemodiálisis, según el grado de permeabilidad de la membrana.

Material y métodos

En este estudio se pretende evaluar la presencia en el suero urémico de factores inhibitorios para la pro-

liferación linfocitaria, considerando el tipo de membrana utilizada en la diálisis: cuprofán (CU), polisulfona (PS), AN-69 y el propio peritoneo en aquellos pacientes que seguían programa de diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA).

Pacientes

Cinco pacientes en programa de hemodiálisis crónica que fueron sometidos a tres diálisis consecutivas en el plazo de una semana, utilizando en la primera CU, en la segunda PS y en la última AN-69. Las extracciones para la obtención de suero se realizaron inmediatamente antes y después de cada sesión. Durante la misma se recogió ultrafiltrado (UF) mediante transporte convectivo.

Diez pacientes en DPCA, de los que se obtuvo suero y líquido de diálisis al finalizar el intercambio nocturno.

En todos los casos estudiados, la permanencia en sus respectivas técnicas de diálisis era superior a un año, siendo la membrana utilizada en hemodiálisis de forma crónica el CU, pues la PS y el AN-69 sólo se testaron en su efecto agudo.

Cultivos linfocitarios

Tras obtener de cinco donantes sangre heparinizada, se sometió ésta a un proceso de separación de sus elementos celulares mediante gradiente de densidad sobre Ficoll (Böyum, 1968). Posteriormente se depositaron los linfocitos (y monocitos) en placas Microtiter de fondo plano, a una proporción de 100.000 células en 200 lambdas de medio de cultivo por cada pocillo. Cada réplica se realizó por triplicado. El medio de cultivo fue RMP1-1640, suplementado con glutamina y penicilina-estreptomicina. Como mitógeno se utilizó fitohemaglutinina al 1 %.

Se incubaron los linfocitos a 37° C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante tres días, al cabo de los cuales se añadió timidina marcada con tritio. Dieciocho horas después se recogió el cultivo mediante filtros Millipore, midiendo la radiación en un contador beta. Los resultados se expresaron en cuentas por minuto (c.p.m.).

En la suplementación de los cultivos se utilizaron los siguientes tipos de sueros:

- Suero de ternera fetal (FCS) en las réplicas consideradas como basales.
- Suero prediálisis, posdiálisis y UF en los casos en hemodiálisis.

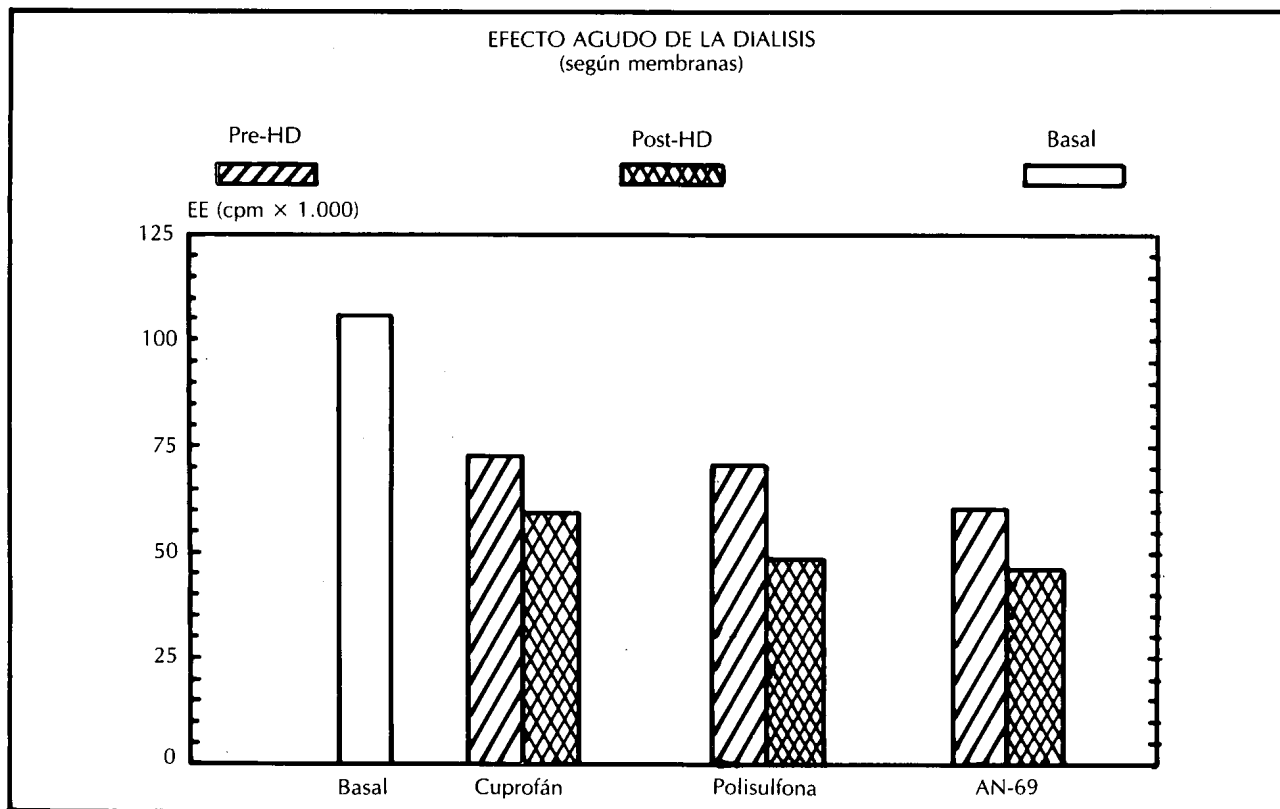


Fig. 1.—EE = X de la estimulación específica.

Tabla I. Efecto del suero sobre la linfoblastogénesis

	Hemodiálisis		
	Prediálisis	Posdiálisis	DPCA
Indice de inhibición	34 %	51 %	15 %
Relación con el cultivo basal (FCS)	p < 0,001	p < 0,001	NS

FCS: suero de ternera fetal.

Tabla II. Indice de inhibición del suero urémico sobre cultivos linfocitarios de donantes. Relación con el tipo de membrana

	Cuprofán	Polisulfona	AN-69
Prediálisis	31 %	33 %	38 %
Posdiálisis	41 %	53 %	54 %
Ultrafiltrado (*)	16 %	11 %	4 %

(*) Son las únicas réplicas cuya relación con el basal fue NS (test t de Student).

— Suero urémico y líquido de diálisis en aquellos en DPCA. Las réplicas con líquido de diálisis o con UF eran suplementadas también con FCS.

Moléculas medias

Se determinaron en el suero y UF de los pacientes en hemodiálisis y en el suero y líquido de diálisis de cinco de los incluidos en DPCA. La técnica fue la cromatografía de gel (Sephadex G-15). Los UF se habían sometido, asimismo, a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ¹⁰.

Métodos estadísticos

La comparación entre medias se realizó con el test t de Student.

Resultados

Hemodiálisis

1. El suero urémico tiene capacidad inhibitoria sobre la blastogénesis linfocitaria (tabla I).
2. El suero posdiálisis tiene mayor carácter supresor que el prediálisis, sin valor estadísticamente significativo, pero presente en todos los casos (15 diálisis en total) tabla II).
3. No existen diferencias según el tipo de membrana utilizada en cada sesión (fig. 1).
4. El ultrafiltrado en ningún caso demostró carácter inhibitorio. La determinación de MM en estas muestras no mostraba diferencias según la membrana utilizada ¹⁰.

DPCA

No se observa efecto inhibitorio debido al suero urémico en los pacientes en DPCA (tabla I).

El líquido de diálisis tampoco ejerce efecto supresor sobre el crecimiento celular (índice de inhibición = 5 %).

Se determinaron mediante cromatografía de gel las MM del suero y del líquido de diálisis de cinco de estos pacientes, siendo los perfiles superponibles en-

tre sí y en relación a los obtenidos con suero de pacientes en hemodiálisis.

Discusión

En los estudios realizados acerca del efecto agudo de la diálisis sobre los factores séricos inhibidores de la linfoblastogénesis se han obtenido resultados muy diversos. Para Touraine ⁴, estos factores no son dializables; lo son parcialmente según Kamata ¹¹ o incluso, y de acuerdo con los trabajos de Mezzano ⁵, se dializan totalmente, perdiendo el suero urémico su poder inhibitorio tras la diálisis. Todos los ensayos anteriores fueron realizados con un único tipo de membrana: cuprofán, y en los dos últimos la diálisis se realizaba *in vitro* tras la obtención del suero urémico, es decir, evitando la aparición de los supuestos factores derivados de las reacciones biológicas que tienen lugar durante la sesión, precisamente en los dos casos en que se le atribuye a ésta capacidad depuradora para los factores tóxicos.

En nuestro estudio, la capacidad supresora del suero urémico se ve incrementada al final de cada hemodiálisis, aunque sin alcanzar valores estadísticamente significativos con relación al efecto del suero prediálisis. En un trabajo similar ¹² realizado con cuprofán, el efecto inhibitorio del suero posdiálisis sí ofrece diferencias con valor estadístico con respecto a la muestra prediálisis. Sin que sepamos de qué se trata, asistimos a un empeoramiento del efecto inmunosupresor del suero urémico tras la hemodiálisis. No podemos invocar a una falta de dialiancia de las toxinas urémicas o a una «concentración» de las mismas como causa de este fenómeno, pues hemos de recordar el mínimo efecto inmunosupresor del suero procedente de los urémicos en DPCA, así como del UF y del líquido de los intercambios peritoneales, a pesar de la presencia en éstos de MM. Se sugiere si esa mayor capacidad inhibitoria sérica de los pacientes en hemodiálisis depende de la aparición o liberación de nuevos factores durante la diálisis, pudiendo ser alguno de los múltiples mediadores que forman parte de las cascadas puestas en marcha por el con-

tacto sangre-membrana, es decir, los fenómenos atribuidos a la no biocompatibilidad, que se inician por la activación del complemento (al menos según lo aceptado hasta el momento actual) y van a dar lugar a la síntesis y/o liberación de diversas inmunohormonas: interleukina-1, interleukina-2, prostaglandinas (PGs)...; del balance entre las diversas acciones de éstas se derivará el efecto final obtenido. Debemos recordar que entre las mencionadas sustancias reguladoras de los mecanismos inmunes se encontraban las PGs, entre las que destaca la PGE2 como uno de los factores implicados en los fenómenos de inmunodeficiencia en la uremia (ensayos *in vitro*)^{13, 14}.

En conclusión, podemos afirmar que entre hemodiálisis y DPCA, además de las ya clásicas diferencias en incidencia de neuropatía y control de la anemia y de la hipertensión arterial, existen también resultados dispares en el efecto inmunosupresor del suero urémico, al igual que en los casos anteriores favorables para la diálisis por el peritoneo.

En cuanto a la hemodiálisis, el hecho de utilizar membranas más permeables y biocompatibles no supone ninguna modificación en la capacidad inmunosupresora sérica *in vitro*, a pesar de que la diálisis con membranas biocompatibles no activa el complemento o al menos no en la cuantía que lo hace el cuprofán y, por tanto, no existiría esta vía para la puesta en marcha de las cascadas inmunomoduladoras que se interrelacionan con la del complemento. Serían necesarios estudios sobre el efecto de estas nuevas membranas en tratamientos a largo plazo.

Bibliografía

1. Lindner A, Farewell VT y Sherrard DJ: High incidence of neoplasia in uremic patients receiving long-term dialysis. *Nephron* 27:292-296, 1981.
2. Matas AJ, Simmons RL, Kjellstrand CM, Buselmeier TJ y Najarian JS: Increased incidence of malignancy during chronic renal failure. *Lancet* 1:883-886, 1975.
3. Anaya F, Pérez García R, Jofre R, Torreadella P y Valderrábano F: Hipersensibilidad cutánea retardada en la insuficiencia renal crónica. Su valor pronóstico en el trasplante renal e inducción de anergia por las transfusiones. *Nefrología* 4:103-109, 1984.
4. Touraine JL, Touraine F, Revillard JP, Brochier J y Traeger: T-Lymphocytes and serum inhibitors of cell-mediated immunity in renal insufficiency. *Nephron* 14:195-208, 1975.
5. Mezzano S, Pesce AJ, Pollak VE y Michael JG: Analysis of humoral and cellular factors that contribute to impaired immune responsiveness in experimental uremia. *Nephron* 36:15-19, 1984.
6. Raska K, Morrison AB y Raskova J: Humoral inhibitors of the immune response in uremia. III. The immunosuppressive factor of uremic rat serum is a very low density lipoprotein. *Lab Invest* 42:636-642, 1980.
7. Raskova J y Raska K: Humoral inhibitors of the immune response in uremia. IV. Effects of serum and of isolated serum very low density lipoprotein from uremic rats on cellular immune reactions *in vitro*. *Lab Invest* 45:410-417, 1981.
8. Babb AL, Farrell PC, Uvelli DA y Scribner BH: Hemodialyzer evaluation by examination of solute molecular spectra. *Trans Am Soc Artif Internal Organs* 18:88-105, 1972.
9. Navarro J, Grossetete MC, Defrasne A, Touraine JL y Traeger: Isolation of an immunosuppressive fraction in ultrafiltrate from uremic sera. *Nephron* 40:396-400, 1985.
10. M. de Francisco AL, Gordillo J, González Cotruello J, Ruiz L, González M, Morales P y Arias M: Influence of dialysis membranes on the convective transport of middle molecules. *Int J Artif Organs* 9:401-426, 1986.
11. Kamata K, Okubo M y Sada M: Immunosuppressive factors in uremic sera are composed of both dialysable and non-dialysable components. *Clin Exp Immunol* 33:102-106, 1978.
12. Holdsworth SR, Fitzgerald MG, Hosking CS y Atkins RC: The effect of maintenance dialysis on lymphocyte function. I. Haemodialysis. *Clin Exp Immunol* 33:95-101, 1978.
13. Goodwin JS, Bankhurst AD y Messner RP: Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. *J Exp Med* 146:1719-1734, 1977.
14. Fischer A, Le Deist F, Durandy A y Griscelli C: Separation of a population of human T lymphocytes that bind prostaglandin E2 and exert a suppressor activity. *J Immunol* 134:815-819, 1985.