

Evolución de las subpoblaciones linfocitarias durante el tratamiento con eritropoyetina en enfermos en hemodiálisis

N. R. Robles, E. Doblare *, F. Caravaca, J. F. Espárrago, C. González *. M. Arrobas, J. L. Pizarro, J. J. Cubero y E. Sánchez Casado

Sección de Nefrología y * Sección de Inmunología. Hospital Regional Infanta Cristina. Badajoz.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio prospectivo para valorar la influencia del tratamiento con eritropoyetina sobre las subpoblaciones linfocitarias.

Completaron el estudio 19 enfermos politransfundidos (sobre 20 inicialmente incluidos), con una edad media de $43,6 \pm 11,6$ años (entre veinte y sesenta y cuatro años); 10 eran hombres y nueve mujeres. La dosis inicial de eritropoyetina fue de 150 UI/kg/semana, administrándose i.v. después de cada diálisis. Se realizó hemograma semanalmente. Se hizo estudio de subpoblaciones linfocitarias mensualmente durante los primeros tres meses y al año de comenzar el tratamiento.

Al final del tercer mes de estudio, Hb y Hcto. habían aumentado significativamente (Hb, $6,7 \pm 0,9$ vs $9,7 \pm 1,4$ g/dl; Hcto., $20,6 \pm 2,6$ vs $28,6 \pm 4,3$, $p < 0,001$). No se detectaron variaciones en los recuentos de CD3, CD4, CD8 y CD19 ni en el índice CD4/CD8, pero el recuento de células «natural-killer» aumentó significativamente después del tercer mes ($15,6 \pm 8,4$ frente a $21,8 \pm 9,6$, $p < 0,05$), para volver a niveles semejantes a los basales al año de tratamiento. Las células CD11* no mostraban aumento significativo los tres primeros meses, pero sí al año del comienzo del estudio ($15,4 \pm 0,9$ frente a $20,9 \pm 1,6$, $p < 0,01$). En los pacientes tratados con calcitriol no se encontró aumento significativo de CD16 a los tres meses. Por el contrario, el incremento de CD11b a los doce meses sólo alcanzó significación estadística en los enfermos tratados con dicho fármaco.

El tratamiento con eritropoyetina parece tener poca influencia sobre las subpoblaciones linfocitarias. La importancia clínica del aumento de células «natural-killer» y monocitos podría merecer estudios posteriores.

Palabras clave: **Eritropoyetina. Subpoblaciones linfocitarias. Hemodiálisis. Inmunidad.**

Recibido: 12-XII-1990.
En versión definitiva: 25-VI-1991.
Aceptado: 25-VII-1991.

Correspondencia: Dr. N. R. Pérez.
Sección de Nefrología.
Hospital Regional Infanta Cristina.
Ctra. de Portugal, s/n.
06080 Badajoz.

EFFECTS OF TREATMENT WITH HUMAN ERYTHROPOIETIN ON LYMPHOCYTIC SUBPOPULATIONS IN CHRONIC HEMODIALYSIS PATIENTS

SUMMARY

This prospective study was conducted to evaluate the influence of human recombinant erythropoietin therapy on lymphocytic subpopulations in 19 patients on chronic hemodialysis (10 male, 9 female). Initial dose was 150 U/Kg/week, administered i.v. after every dialytic treatment. Lymphocytic subpopulations were evaluated monthly during 3 months and 12 months after the beginning of the study. Haematologic values were measured weekly. All patients had been transfused from 2 to 15 times during the year before the study (mean 5.4 ± 3.2 transfusions).

At the third and the twelfth month hemoglobin and hematocrit had increased significantly (Hb 6.7 ± 0.9 vs 9.7 ± 1.4 and 8.5 ± 0.2 g/dl., $p < 0.001$); Hct. 20.2 ± 2.6 vs 28.8 ± 4.3 and 25.4 ± 0.6 ; $p < 0.001$). No change was detected in OKT3, OKT4, OKT8, OKT4/OKT8 ratio and OKIa subsets. Natural killer cell (OKNK) count was significantly increased (15.6 ± 8.4 vs 21.8 ± 9.6 , $p < 0.05$) after the third month, but not at the 12th month. OKM1 cells were not increased at the third month but they had increased after one year of treatment with erythropoietin (15.4 ± 0.9 vs 16.6 ± 2.3 and 20.9 ± 1.6 , $p < 0,01$).

EPO therapy seems to have little influence on lymphocytic subpopulations. The increase in natural killer cell and OKM1 cell counts may deserve further detailed research.

Key words: **Erythropoietin. Lymphocytic subpopulations. Haemodialysis. Immunity.**

Introducción

La introducción de la eritropoyetina (Epo) entre nuevas posibilidades terapéuticas ha dado lugar a importantes beneficios para el enfermo renal y, como contrapeso, al reconocimiento de una serie de complicaciones asociadas al tratamiento, como por ejemplo la hipertensión arterial¹. Aunque los efectos de la Epo sobre ciertos campos, como la capacidad de esfuerzo, la función cardíaca, la coagulación o el bienestar del enfermo, han rellenado innumerables páginas de las publicaciones médicas^{2,4}, sus hipotéticos efectos sobre el estado inmunitario del sujeto no han recibido tanta atención^{5,6}.

En el enfermo urémico existen diversas alteraciones inmunitarias: linfopenia T y B, disfunción linfocitaria, disminución de células «natural-killer» y anergia en los estudios de hipersensibilidad retardada, entre otras^{7,8}. Simultáneamente, el paciente puede ser sometido a una estimulación antigénica periódica con transfusiones, las cuales, curiosamente, pueden tener un paradójico efecto inductor de tolerancia inmunológica^{9,10}.

Aunque los estudios experimentales previos tanto *in vitro* como *in vivo* en animales de experimentación sugieren escasos efectos intrínsecos de la Epo sobre las células sanguíneas diferentes al eritrocito, la seguridad clínica de su uso exige que sus efectos inmunológicos sean evaluados especialmente con respecto al trasplante renal. En consecuencia, hemos evaluado la evolución de las subpoblaciones linfocitarias en un grupo de pacientes previamente politransfundidos tras iniciar tratamiento con Epo.

Material y métodos

Participaron en el estudio 11 hombres y nueve mujeres entre veinte y sesenta y cuatro años de edad (media, $43,6 \pm 3,7$), sin que hubiese diferencias de edad entre hombres y mujeres. Todos los enfermos recibían tratamiento crónico con hemodiálisis entre dos y noventa y siete meses antes de comenzar el estudio (media, $41,3 \pm 6,6$), habiendo recibido entre cinco y 40 transfusiones en total (media, $18,4 \pm 2,6$) (entre dos y 15 transfusiones en el último año; media, $5,4 \pm 3,2$). La causa de la insuficiencia renal era nefritis intersticial en ocho casos, glomerulonefritis crónica en cuatro casos, poliquistosis renal del adulto en uno, nefroangiosclerosis en uno y desconocida en cinco casos. Diecisiete enfermos eran dializados con membrana de cuprofán y dos con membrana de poliacrilonitrilo. Uno de los enfermos debió abandonar el tratamiento por hipertensión arterial grave rebelde.

Los enfermos fueron tratados con Epo humana recombinante, suministrada siempre por vía endovenosa después de cada sesión de hemodiálisis. La dosis inicial fue 150 U/kg por semana, ajustándose la dosis cada tres semanas según la respuesta, buscando como objetivo terapéutico inicial (tres meses) un hematocrito entre 30 y 35 % y una hemoglobina entre 10 y 12 g/dl; posteriormente se ajustó el hematocrito deseable entre el 25 y el 30 % (a los doce meses). Se excluyeron los enfermos con causas conocidas de resistencia al tratamiento con Epo. La dosis media a los tres meses era de 190 ± 100 U/kg, y al año, de 178 ± 105 U/kg.

Al comienzo del estudio, siete enfermos estaban en tratamiento con calcitriol (Rocaltrol®) y el resto no recibían este fármaco. Las dosis no fueron modificadas a lo largo del estudio y solamente un enfermo inició tratamiento con calcitriol en el período estudiado.

Las subpoblaciones linfocitarias fueron estudiadas al inicio, uno, dos, tres y doce meses de tratamiento. Todas las muestras fueron obtenidas a primera hora de la mañana el primer día de la semana entre la primera y segunda sesión de hemodiálisis. Las células mononucleares se aislaron de sangre periférica mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. A continuación, y una vez convenientemente lavadas y ajustadas a 5 millones por mililitro, se utilizó la técnica de linfocitotoxicidad de Van Vauwe¹¹ con los anticuerpos monoclonales CD3, CD4, CD8, CD11b, CD16 y CD19, todos ellos suministrados por la casa Ortho. Durante los tres primeros meses se realizaron hemogramas semanales y posteriormente mensuales. Todas las muestras se extrajeron antes de comenzar la sesión de diálisis.

Los resultados han sido tratados estadísticamente mediante el programa informático SIGMA, realizándose las comparaciones estadísticas mediante el uso de la prueba *t* de Student para muestras apareadas. Los resultados se expresan en media \pm error estándar de la media.

Resultados

Los valores de los parámetros hematológicos (recuento eritrocitario, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM,

CHCM, recuento plaquetario y leucocitario) han sido recogidos en la tabla I inicialmente y a los tres y doce meses del comienzo del estudio. El hematócrito medio al comienzo del estudio era de $20,2 \pm 0,6$ tanto a los tres meses ($28,8 \pm 1,1$) como al año ($25,4 \pm 0,6$); la diferencia era significativa, con $p < 0,01$. No se encontraron variaciones en el resto de los parámetros hematológicos reflejados en la tabla I, salvo la hemoglobina corpuscular media (HCM, $p < 0,05$). Ningún enfermo requirió ser transfundido a lo largo del período que abarcó el estudio.

Los valores de las subpoblaciones linfocitarias han sido reflejados en la tabla II. Los recuentos de células CD3, CD4 y CD8, así como el cociente CD4/CD8, no sufrieron variaciones significativas a todo lo largo del estudio (figura 1). Por el contrario, el recuento de las células natural killer (CD16) aumentó significativamente ($p < 0,05$) hacia el tercer mes, volviendo posteriormente (doce meses) a niveles semejantes a los basales. Las células B (CD19) mostraron un ligero aumento no significativo hacia el tercer mes, que tampoco persistía al final del estudio. En cuanto a las células CD11b, éstas no mostraban cambios en los tres primeros meses, pero habían aumentado significativamente al final del estudio ($p < 0,01$) (fig. 2).

Cuando se examinan por separado los resultados del grupo que recibía tratamiento con calcitriol y los de aquellos pacientes que no recibían esta medicación se aprecian algunas diferencias de comportamiento respecto a las subpoblaciones linfocitarias (tablas III y IV), aunque la respuesta de los valores eritrocitarios a Epo no parece diferir.

La evolución de las subpoblaciones linfocitarias sí es di-

Tabla I. Recuentos hematológicos, hemoglobina y hematócrito

	Basal	3 meses	12 meses
Hematías ($\bar{x} 10^{12}/ml$)	$2,3 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,3^*$	$2,8 \pm 0,3^*$
Hematócrito (%)	$20,2 \pm 0,6$	$28,8 \pm 1,0^*$	$25,4 \pm 0,6^*$
Hemoglobina (g/dl)	$6,7 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,3^*$	$8,5 \pm 0,8^*$
VCM (fl)	$86,2 \pm 1,6$	$85,4 \pm 1,7$	$82,9 \pm 1,9$
HCM (pg)	$28,8 \pm 0,8$	$28,3 \pm 0,7$	$26,8 \pm 0,6@$
CHCM (g/dl)	$33,2 \pm 0,2$	$33,1 \pm 0,3$	$32,9 \pm 0,3$
Plaquetas ($\bar{x} 10^9/ml$)	$208,1 \pm 19,1$	$208,3 \pm 19,2$	$215,2 \pm 16,2$
Leucocitos ($\bar{x} 10^9/ml$)	$6,6 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,4$

Valores expresados en media \pm SEM. * $p < 0,001$ respecto a basal. @ $p < 0,05$ respecto a basal.

Tabla II. Subpoblaciones linfocitarias

	Basal	3 meses	12 meses
CD3	$51,7 \pm 2,3$	$55,6 \pm 1,8$	$51,7 \pm 2,1$
CD4	$36,1 \pm 2,7$	$37,7 \pm 1,9$	$34,1 \pm 1,9$
CD8	$21,9 \pm 2,0$	$23,3 \pm 1,5$	$19,4 \pm 1,5$
Índice CD4/CD8	$1,9 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$
CD11b	$15,4 \pm 0,9$	$16,6 \pm 2,3$	$20,1 \pm 1,6^*$
CD19	$15,6 \pm 1,9$	$21,8 \pm 2,2$	$17,7 \pm 2,2$
CD16	$12,5 \pm 1,2$	$15,4 \pm 1,8@$	$12,9 \pm 1,6$

Valores expresados como tanto por ciento en media \pm SEM. * $p < 0,01$ respecto a basal. @ $p < 0,05$ respecto a basal.

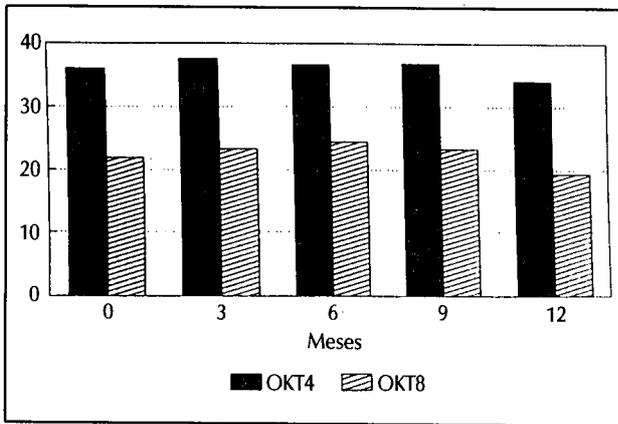


Fig. 1.—Cambios de células T.

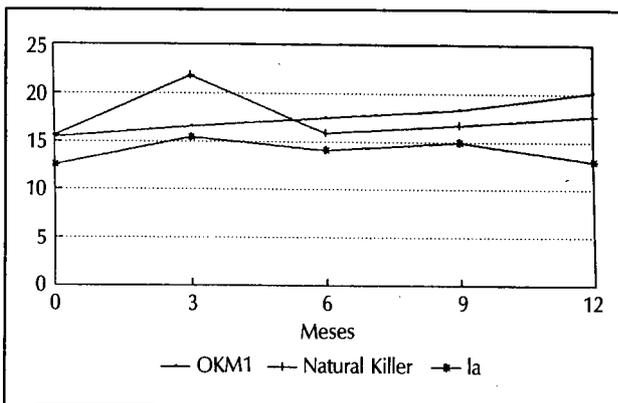


Fig. 2.—Cambios de otras subpoblaciones.

Tabla III. Parámetros eritrocitarios y calcitriol

	Con calcitriol	Sin calcitriol
Hcto. inicial	20,1 ± 0,7	20,3 ± 1,0
3 meses	28,0 ± 1,5*	29,6 ± 1,4*
Final	24,4 ± 1,2@	25,8 ± 0,6§
Hb inicial	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,3
3 meses	9,4 ± 0,4*	9,9 ± 0,5*
Final	8,2 ± 0,3@	8,7 ± 0,2§

* p < 0,001. @ p < 0,01. § p < 0,05.

ferente. De esta forma, no parece haber diferencias significativas respecto a los valores de CD3, CD4, CD8 y cociente CD4/CD8; por el contrario, la serie CD11b muestra un aumento significativo al año en el grupo tratado con calcitriol, pero no en el grupo que no era tratado (p < 0,01). De la misma manera, los valores de las células natural killer (CD16) aumentan a los tres meses en los enfermos tratados con calcitriol, pero no lo hacen en el grupo no tratado (p < 0,01). No parece haber diferencias en

Tabla IV. Subpoblaciones linfocitarias y calcitriol

	Sin calcitriol	Con calcitriol
CD3 inicial	53,2 ± 3,2	49,1 ± 4,2
3 meses	54,6 ± 2,8	57,1 ± 2,8
Final	51,3 ± 2,5	54,2 ± 4,5
CD4 inicial	36,9 ± 4,3	33,7 ± 3,8
3 meses	36,7 ± 2,7	38,1 ± 3,0
Final	32,5 ± 2,2	36,6 ± 4,1
CD8 inicial	21,9 ± 2,5	21,8 ± 4,2
3 meses	24,8 ± 2,3	21,3 ± 2,2
Final	19,0 ± 1,9	20,6 ± 3,1
CD4/CD8 inicial	1,94 ± 0,28	1,82 ± 0,30
3 meses	1,57 ± 0,14	1,50 ± 0,29
Final	1,75 ± 0,18	1,98 ± 0,37
CD11b inicial	15,5 ± 1,2	14,7 ± 1,4
3 meses	19,6 ± 3,6	11,1 ± 1,9
Final	18,9 ± 1,5ø	24,4 ± 3,3*
CD16 inicial	15,1 ± 3,0	15,0 ± 2,4
3 meses	24,1 ± 3,4*	17,7 ± 2,8
Final	17,5 ± 3,4	17,7 ± 3,5
CD19 inicial	14,1 ± 1,7	12,5 ± 2,0
3 meses	13,7 ± 2,1	17,6 ± 3,7
Final	11,0 ± 1,7ø	17,0 ± 1,5

§ p < 0,05 respecto a inicial. ø Casi significativo (p < 0,1) respecto a basal. * p < 0,01 respecto a inicial y tres meses.

el grupo CD19, aunque el descenso en el grupo que no era tratado con calcitriol a los doce meses es casi significativo.

Discusión

El amplio uso clínico de la Epo ha demostrado los numerosos efectos beneficiosos de este fármaco y, como contrapunto habitual en la terapéutica, algunos efectos indeseables generados casi siempre de forma indirecta a través de la corrección del hematocrito¹⁻⁴. Los estudios clínicos han demostrado el escaso efecto sobre las líneas celulares hemáticas diferentes al eritrocito como leucocitos y trombocitos. Sin embargo, es posible preguntarse si, a nivel más específico, este tratamiento podría conllevar alteraciones de los subgrupos linfocitarios. Pocos estudios parecen haberse realizado sobre este tema^{5,6}; nuestros resultados parecen sugerir un aumento transitorio de las células natural killer y, tardíamente, de las células mononucleares.

Sólo hemos encontrado en la literatura dos estudios similares al nuestro. Los resultados de nuestro estudio son muy similares a los publicados por Collart y cols.⁵ en un seguimiento de tres meses con un protocolo de tratamiento similar al nuestro (aumento de células natural killer, descenso de linfocitos B, escasa acción sobre otras series linfocitarias).

Por el contrario, los resultados del estudio de Pfaffl y cols.⁶ y el nuestro parecen contradecirse, puesto que estos autores encuentran disminuciones de células CD3, CD4, CD8 y cociente CD4/CD8 a las dieciocho semanas de tratamiento, sin encontrar variaciones en el recuento de células natural killer. No obstante, tanto la selección de enfermos y el protocolo de administración de Epo como el diseño del estudio ofrecen notorias diferencias, las cuales podrían justificar los diferentes resultados obtenidos.

La causa de la respuesta linfocitaria encontrada no deja de ser oscura. Podría existir una acción directa de la Epo sobre estos subgrupos de linfocitos y, consecuentemente, una modificación primaria de las subpoblaciones. De hecho, se ha demostrado la interacción de la Epo con las interleukinas 4 y 6¹², e incluso se ha sugerido la existencia de efectos estimuladores sobre las células formadoras de colonias leucocitarias. Además, efectos moduladores de los leucocitos T y las interleukinas sobre la eritropoyesis han sido comprobados^{13, 14}.

Una segunda aproximación es considerar la posibilidad de una acción indirecta de la Epo a través de la corrección de la anemia del enfermo urémico. Todos nuestros enfermos estaban politransfundidos antes de comenzar el estudio, manteniendo hematócitos en torno al 20 %. Ninguno de ellos ha requerido transfusiones posteriormente durante el tiempo de seguimiento, aun cuando la respuesta a la Epo haya sido, como es lógico, variable. Las modificaciones de la inmunidad inducidas por las transfusiones sanguíneas han sido, y son todavía, exhaustivamente estudiadas para intentar comprender la acción inmunosupresora observada. Sin embargo, no se ha conseguido aún una hipótesis universalmente aceptada que comprenda los muy diversos resultados obtenidos en las observaciones realizadas. De cualquier manera, parece probable que este efecto sea mediado en buena parte por células T supresoras^{9, 10, 15, 16}, cuya disminución podría conllevar la liberación de sustancias inmunomoduladoras y, consecuentemente, el aumento de otras poblaciones celulares relacionadas con la inmunidad. Es posible sugerir que nuestros resultados podrían ser reactivos al cese del tratamiento transfusional, sin poder confirmarlo por el momento.

No obstante, no deberían dejar de valorarse los cambios en los depósitos de hierro en el organismo ocasionados por el tratamiento con Epo. De hecho, diversos trastornos inmunitarios han sido relacionados con el estatus orgánico del hierro¹⁷. Desgraciadamente, no se han valorado de forma pautada las variaciones de los parámetros ferroquímicos a lo largo del estudio. Pese a todo, los valores corpusculares han sufrido descensos en este período, aun cuando éste sea un parámetro poco específico; además, sólo el descenso de la hemoglobina corpuscular media (HCM) (tabla I) alcanza significación estadística ($p < 0,05$).

El papel del calcitriol merece comentario aparte. Por un lado, parece tener un efecto estimulante sobre las células

CD11b (monocitos); por otro, parece inhibir la proliferación de células natural killer (CD16). Ambos efectos pueden conciliarse con las acciones inmunomoduladoras ya conocidas de esta hormona: estimulación de la serie monocito-macrófago e inhibición de las células linfoides (aun cuando la naturaleza exacta de las células natural killer permanezca sin determinar)¹⁸.

A modo de resumen, el tratamiento con Epo parece ocasionar escasas modificaciones sobre las subpoblaciones linfocitarias, cuyo mecanismo no hemos podido establecer. La importancia que estos cambios puedan inducir a la larga en la supervivencia del enfermo renal o en los resultados del trasplante permanecen por estudiar.

Bibliografía

1. Lamperi S: Erythropoietin in the treatment of uremic anemia. *Nefrología*, 10:223-233, 1990.
2. Lundin AP: Human recombinant erythropoietin: Is it the missing ingredient in the full rehabilitation of dialysis patients? *Nefrología*, 10:44-46, 1990.
3. Grutzmacher P, Scheuermann E, Low I, Bergmann M, Rauber K, Baum R, Heuser J y Schoeppe W: Correction of renal anaemia by recombinant human erythropoietin: Effects on myocardial function. *Contrib Nephrol*, 66:176-184, 1988.
4. Van Geet C, Hauglustaine D, Verresen L, Vanrusselt M y Vermeylen J: Haemostatic effects of recombinant human erythropoietin in chronic haemodialysis patients. *Thromb Haemost*, 61:117-121, 1989.
5. Collart FE, Dratwa M, Wittek M y Wens R: Effects of recombinant human erythropoietin on T lymphocyte subsets in hemodialysis patients. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 36:M219-M223, 1990.
6. Pfaffl W, Gross HJ, Neumeier D, Natterman U, Samtleben W y Gurland HJ: Lymphocyte subsets and delayed cutaneous hypersensitivity in haemodialysis patients receiving recombinant human erythropoietin. *Contrib Nephrol*, 66:195-204, 1988.
7. Lawrence H: Uremia nature's immunosuppressive device. *Ann Intern Med*, 62:166-170, 1965.
8. Goldblum SE y Reed WP: host defenses and immunologic alterations associated with chronic hemodialysis. *Ann Intern Med*, 93:597-613, 1980.
9. Vandekerckhove BAE, Datema G, Zantvoort F y Claas FHJ: An increase of donor-specific T helper precursors resulting from blood transfusions. *Transplantation*, 49:987-991, 1990.
10. Knulst AC, Bazuin C y B Benner R: Blood transfusion-induced suppression of delayed-type hypersensitivity to allogeneic histocompatibility antigens. *Transplantation*, 48:829-833, 1989.
11. Van Waave JP y Goosen JC: Monoclonal anti-human lymphocyte antibodies: enumeration and characterization of T cell subsets. *Immunology*, 42:157-164, 1981.
12. Rennick D, Jackson J, Yang G, Wideman J, Lee F y Hudak S: Interleukin interacts with interleukin 4 and other hematopoietic growth factors to selectively enhance the growth of megakaryocytic, erythroid, myeloid and multipotential progenitor cells. *Blood*, 73:1828-1835, 1989.
13. Hamburger AW: Enhancement of human erythroid progenitor cell growth conditioned by a human t-lymphocyte line. *Blood*, 56:633-639, 1980.
14. Hangoc G, Williams DE, Falkenburg JHF y Broxmeyer HE: Influence of IL-1 α and -1 β on the survival of human bone marrow cells responding to hematopoietic colony-stimulating factors. *J Immunol*, 142:4329-4334, 1989.
15. Wood ML, Okazaki H y Monaco AP: The effect of blood transfusions on the immune response. *Transplant Proc*, 20:1200-1203, 1988.
16. Haisa M, Sakagami K, Matsumoto T, Kawamura T, Uchida S, Fuji-

N. R. ROBLES y cols.

- wara T, Shiozaki S, Inagaki M y Orita K: Donor-specific transfusion (DST) with intermittent administration of azathioprine induces suppressor T cells and MRL-inhibiting factors without sensitization. *Transplant Proc*, 21:1814-1817, 1989.
17. Goodill JJ y Abuelo JG: Mucormycosis. A new risk of deferoxamine therapy in dialysis patients with aluminum or iron overload. *N Engl J Med*, 317:54, 1987.
18. Zarrabeitia Cimiano MT, Riancho Moral JA y González Macías J: La vitamina D como factor inmunomodulador. *Rev Clín Esp*, 186:53-55, 1990.