

Efecto de la eritropoyetina humana recombinante sobre las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes en hemodiálisis

A. Oliet*, E. Hernández Martínez** y M. Llanos***

* Sección de Nefrología. Hospital Severo Ochoa. Leganés (Madrid). ** Servicio de Nefrología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

*** Hematología.

RESUMEN

Con objeto de evaluar si el tratamiento con eritropoyetina humana recombinante influye sobre la población linfocitaria, realizamos un estudio de recuento y subpoblaciones linfocitarias de 15 pacientes en hemodiálisis tratados con eritropoyetina durante al menos seis meses ($7,4 \pm 1,2$), comparando los resultados obtenidos con los de un grupo similar de 19 pacientes no tratados con dicha droga y con los de un grupo control formado por 37 voluntarios sanos.

Entre los grupos no existían diferencias significativas en edad. El tiempo de estancia en hemodiálisis y el hematócrito eran similares en los pacientes de los dos primeros. Las muestras fueron extraídas a las nueve horas. Las subpoblaciones linfocitarias se determinaron por marcaje con anticuerpos monoclonales, siendo posteriormente separadas por un citómetro de flujo. Las comparaciones estadísticas se realizaron con el test de Mann-Whitney.

El grupo tratado con eritropoyetina presentó un descenso significativo en el número absoluto de linfocitos, linfocitos T (CD_2), linfocitos T Helper (CD_4) y linfocitos T supresores (CD_8) respecto al resto. La cifra de linfocitos B (CD_{19}) fue menor que en el grupo control, pero similar a la de los pacientes en hemodiálisis no tratados con eritropoyetina. El número absoluto de leucocitos y el cociente CD_4/CD_8 no representaron cambios. El significado de estos datos es desconocido, pero sugiere que el tratamiento con eritropoyetina, a pesar de mantener estable el número de leucocitos, no restablece los valores absolutos normales de linfocitos ni de las distintas subpoblaciones linfocitarias.

Palabras clave: **Eritropoyetina, Subpoblaciones linfocitarias.**

EFFECT OF HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN ON LYMPHOCYTE SUBSETS IN HEMODIALYSIS PATIENTS

SUMMARY

Abnormal values of Lymphocyte subsets has been found in hemodialysis patients. To evaluate the effect of human recombinant erythropoietin treatment on lymphocyte subsets in hemodialysis patients, blood samples of 15 patients in hemodialysis treated with erythropoietin (Group A) and 19 patients in hemodialysis without this treatment (Group B) were analyzed and were compared with a control group of 37 healthy volunteers (Group C). Patients were matched for age. Hematocrit and time on hemodialysis were similar for groups A and B. Samples were drawn at 9 AM in all patients, before de hemodialysis session in Groups A and B. Peripheral lymphocyte subpopulations were measur-

Correspondencia: Dra. Aniana Oliet Palá.
Sección de Nefrología.
Hospital Severo Ochoa.
Avda. de Orellana, s/n.
28911 Leganés (Madrid).

ed by immunofluorescent staining with monoclonal antibodies. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney-test.

In the Group A, the absolute number of lymphocytes, T-cells (T-CD₂), T-CD₄ cells and T-CD₈ cells was significantly reduced with respect to Group B and C. The absolute number of B cells (T-CD₁₉) was lower in Groups A and B than in Group C total count of white blood cells and CD₄ cells/CD₈ cells ratio were unchanged.

In our experience, the treatment with human recombinant Erythropoietin doesn't seem to have influence in the restore of the values of lymphocytes and their subsets.

Key words: **Erythropoietin, Lymphocyte subsets.**

Introducción

La respuesta inmune está reducida en la uremia¹. Este deterioro inmunitario ha sido implicado en el mayor desarrollo de complicaciones infecciosas² y neoplásicas³, así como en la reducción de reacciones de hipersensibilidad retardada frente a antígenos comunes⁴ y en la prolongada supervivencia de los injertos⁵. No se conoce bien el mecanismo responsable de esta inmunosupresión, pero es probable que jueguen un papel la linfopenia y las alteraciones encontradas en las subpoblaciones linfocitarias^{6,7}.

Desde que se inició el tratamiento con eritropoyetina humana recombinante (HrEPO) para la corrección de la anemia de los pacientes urémicos, hemos asistido a una mejoría de su calidad de vida que podría ser explicada, además de por lo anterior, y al menos hipotéticamente, a través de la modificación de las alteraciones inmunitarias.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar los cambios inducidos por el tratamiento con HrEPO sobre los linfocitos y las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes en hemodiálisis (HD).

Material y métodos

1. Grupos de estudio

Estudiaremos los linfocitos y subpoblaciones linfocitarias de 71 sujetos clasificados en tres grupos:

- 1) Grupo A: Integrado por 15 pacientes en HD, tratados con HrEPO durante al menos seis meses (7,4 ± 1,2).
- 2) Grupo B: Integrado por 19 pacientes en HD que no re-

cibían HrEPO. 3) Grupo C: Integrado por 37 controles sanos.

Las características de los grupos se detallan en la tabla I. No existían diferencias significativas en edad y el tiempo de estancia en HD era superponible para los grupos A y B. Existía una diferencia llamativa en la composición de sexos entre los dos primeros grupos. Ninguno de los pacientes había sido transfundido en los seis últimos meses.

Los pacientes del grupo A habían sido tratados con HrEPO, administrada por vía intravenosa tras cada sesión de hemodiálisis. La dosis inicial fue de 120 U/kg por semana, ajustándose la misma cada dos semanas según la respuesta, buscando como objetivo un hematócrito (Hto) alrededor del 30%. La dosis de mantenimiento se había fijado en la mínima capaz de mantener este Hto estable. Ningún paciente había abandonado el tratamiento. En siete de ellos había sido necesario aumentar el número y/o dosis de antihipertensivos.

Los pacientes del grupo B, por mantener Htos estables, alrededor de 30, no habían sido incluidos en este protocolo terapéutico.

2. Extracción de las muestras

La sangre fue extraída mediante cuidadosa venopunción, inmediatamente antes de comenzar la primera sesión de hemodiálisis de la semana. Se utilizó la sal tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la concentración del 7,3% como anticoagulante.

3. Tipaje y recuento

El marcaje de las distintas subpoblaciones linfocitarias estudiadas: CD₂, CD₄, CD₈ y CD₁₉ se realizó en sangre to-

Tabla I. Características de los grupos de estudio

	Grupo A (HDH[+EPO])	Grupo B (HDH[-EPO])	Grupo C (control)
N.....	15	19	37
Edad.....	51,9 ± 17,3	57 ± 10,3	57 ± 10
Sexo.....	7 ♀ 8 ♂	3 ♀ 16 ♂ *	20 ♀ 17 ♂
T estancia HDH (meses).....	56 69	63 59	—
Membrana.....	CU 12 PAN 3	CU 15 PAN 4	—

Tabla II. Parámetros hematológicos

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Hematócrito	28,7 ± 4,3	27,7 ± 5,3	39 ± 6,2
Leucocitos.....	4.640 ± 583	7.872 ± 600	7.274 ± 532
Plaquetas.....	21 P. 6.466 ± 92.000	215.000 ± 79.000	221.000 ± 54.000

tal, mediante enzoinmunoanálisis homogéneo indirecto, según el método descrito por Kim y cols.⁸. Utilizamos un kit comercial (Technicon Diagnostics, Tarrgtown, New York) para cada una de ellas. Todas las muestras, junto con los controles negativos, se analizaron por duplicado dentro de las primeras doce horas de la extracción. La lectura se realizó por citometría directa en el canal de peroxidasa del citómetro de flujo adaptado al contador celular Hg (Technicon Instruments Corporation, Tarrgtown, New York). El cálculo corregido de los resultados se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

El estudio estadístico se realizó con el test de Mann-Whitney para variables cuantitativas, y la prueba de la χ^2 para comparación de variables cualitativas.

Resultados

Los valores de los parámetros hematológicos están recogidos en la tabla II. No se objetivaron diferencias significativas en el Hto de los dos grupos de pacientes en HD. Las cifras de leucocitos y plaquetas eran similares en los tres grupos de estudio.

Ajustándonos a los linfocitos y subpoblación linfocitaria (tabla III), objetivamos que no existían diferencias entre el grupo control y el grupo no tratado con HrEPO en: número absoluto de linfocitos, linfocitos T (T-CD₂), linfocitos T Helper (T-CD₄) y linfocitos T supresores (T-CD₈), existiendo únicamente diferencia en cuanto al número de linfocitos B (B-CD₁₉), que estaban claramente disminuidos en los pacientes urémicos (grupos A y B). Sorprendentemente, los pacientes tratados con HrEPO presentaron un número significativamente inferior de linfocitos y subpoblaciones T que los urémicos no tratados con esta droga. La cifra de linfocitos B fue similar en ambos grupos. Por

último, y a pesar del descenso en el grupo A de las subpoblaciones CD₄ y CD₈, el cociente CD₄/CD₈ no se modificó significativamente, ya que el descenso fue muy parecido para ambas.

Discusión

Existen pocas publicaciones que muestren las modificaciones de las subpoblaciones linfocitarias inducidas por el tratamiento con HrEPO en pacientes con hemodiálisis⁹⁻¹¹. Todas ellas analizan la evolución a lo largo de un período de seguimiento. En nuestra serie sólo contamos con una determinación realizada a tres grupos de pacientes, comparables los dos primeros en edad, tiempo en hemodiálisis y Hto. Si asumimos que nuestro grupo A correspondería al evolutivo de las series publicadas y el B al período basal de las mismas, podríamos construir la tabla IV, en la que objetivamos que, aunque con algunas diferencias, los resultados son bastante superponibles.

En nuestra serie, el grupo no tratado con HrEPO incluía una proporción superior de hombres, mientras que el grupo tratado en nuestra experiencia y en todas las revisadas muestra una distribución de sexos similar. Esto vendría a apoyar el teórico efecto de los andrógenos, ya que la EPO se indicó en pacientes que estaban originalmente más anémicos. En cuanto a los leucocitos, éstos se mantienen constantes de forma homogénea, no objetivándose tampoco leucopenia en relación con los controles. Los linfocitos B, que basalmente están descendidos en la insuficiencia renal crónica¹², no muestran tampoco modificaciones con este tratamiento.

Por el contrario, los linfocitos T, así como las subpoblaciones CD₄, disminuyen en todas las series, aunque la disminución relativa de cada una de ellas varía, lo que da lugar a que el cociente se mantenga constante¹¹ o, por el contrario, aumente⁹.

En resumen, la HrEPO podría ejercer un efecto selectivo sobre los linfocitos T y las subpoblaciones CD₄ y CD₈.

La causa de esta respuesta linfocitaria aún no está aclarada. En primer lugar, podría existir una acción directa de la HrEPO sobre las subpoblaciones linfocitarias. En segundo lugar, esta droga podría ejercer un efecto indirecto a través de la anulación de la necesidad transfusional; las transfusiones tienen una acción inmunosupresora conocida cuya inhibición podría justificar las alteraciones encontradas¹³. Al comparar los datos objetivados en estos pacientes con los obtenidos en otros pacientes urémicos

Tabla III. Subpoblaciones linfocitarias

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Linfocitos.....	1.432	2.019 ^a	2.012 ^c
Linfocitos B	123	125	193 ^{b,c}
Linfocitos T.....	1.096	1.551 ^a	1.415 ^b
Linfocitos T-CD4.....	537	895 ^a	853 ^b
Linfocitos T-CD8.....	369	456 ^a	465 ^b
CD4/CD8.....	1,65	2,25	1,96

^a p < 0,05, A vs B; ^b p < 0,05, A vs C; ^c p < 0,05, B vs C.

Tabla IV. Resultados comparativos de las series publicadas

	B	A
Leucocitos:		
1.....	7.872 ± 600	6.464 ± 583
2.....	6.400 ± 1.500	5.900 ± 100
3.....	6.600 ± 600	7.000 ± 400
Linfocitos:		
1.....	2.019 ± 300	1.432 ± 285*
2 (%).....	26,5 ± 5,5	25,8 ± 8,5
3.....	—	—
Linfocitos B:		
1.....	125 ± 30	123 ± 40
2.....	169 ± 99	208 ± 175
3 (%).....	156 ± 1,2	12,9 ± 1,6
Linfocitos T:		
1.....	1.551 ± 182	1.096 ± 285*
2.....	1.271 ± 423	1.024 ± 470*
3.....	—	—
CD4:		
1.....	895 ± 300	587 ± 250*
2.....	941 ± 363	751 ± 595*
3 (%).....	36,1 ± 2,7	34,1 ± 1,9
CD8:		
1.....	456 ± 180	269 ± 170*
2.....	491 ± 203	315 ± 159*
3 (%).....	21,9 ± 2	19,4 ± 1,5
CD-4/CD-8:		
1.....	2,25	1,65
2.....	2	2,8*
3.....	1,9	1,9

1: nuestra serie; 2: Pfall y cols.⁹; 3: Robles y cols.¹¹.
* p < 0,05.

con Hto estable, no transfundidos (grupo B), hemos querido excluir este factor.

Otros teóricos factores etiopatogénicos, como el estado de los depósitos de hierro o el tratamiento con calciotriol, no fueron valorados en nuestro estudio.

Aunque indudablemente se precisan estudios prospec-

tivos de mayor duración y número de pacientes que los descritos, los datos publicados hasta el momento apoyarían la hipótesis de que la HrEPO induce cambios en las subpoblaciones linfocitarias, sobre todo en la población de linfocitos T. El significado clínico de lo anterior tampoco se conoce.

Bibliografía

1. Lawrence HS: Uremia, Nature's immunosuppressive device. *Ann Intern Med*, 2:166-168, 1965.
2. Dobbstein M: Immune system in uremia. *Nephron*, 17:409-414, 1979.
3. Lindner A, Farewell VT y Sherrard DJ: High incidence of neoplasia in uremic patients receiving long-term dialysis. *Nephron*, 27:292-296, 1981.
4. Wilson WEC, Kirkpatrick CM y Taimage DW: Supresion of immunologic responsiveness in uremic patients. *Ann Intern Med*, 62:1-14, 1965.
5. Dammin GJ, Gouch NP y Murray JE: Prolonged survival of skin homografts in uremic patients. *Ann NY Acad Sci*, 64:967-976, 1957.
6. Marimoto CE, Reinherz E, Steinberg A y cols.: Alterations in immunoregulatory T cell subsets in active SLE. *J Clin Invest*, 66:1171-1174, 1980.
7. Reinherz EL, Cooper MD, Schossman SF y Rosen SF: Abnormalities of T cell maturation and regulation in human beings with immunodeficiency disorders. *J Clin Invest*, 68:699-705, 1981.
8. Kim JR, Martin G, Paseltiner L, Ansley H, Ornstein L y Kanter RJ: Subtyping lymphocytes in peripheral blood by immunoperoxidase labeling and light scatter/absorption flowcytometry. *Clin Chem*, 31:1481-1486, 1985.
9. Pfaffl W, Gross HJ, Neumeier D, Natterman V, Samtleben W y Gurland HJ: Lymphocyte subsets and delayed cutaneous hypersensitivity in haemodialysis patients receiving recombinant human erythropoietin. *Contrib Nephrol*, 66:193-204 (pp. 509 Nephrol), 1988.
10. Collart FE, Datwa 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.
11. Robles NR, Doblare E, Caravaca F, Espárrago JF, González C, Arrobas M, Pizarro JL, Cubero JJ y Sánchez Losado E: Evolución de las subpoblaciones linfocitarias durante el tratamiento con eritropoyetina en pacientes en hemodiálisis. *Nefrología*, XI(6):505-510, 1991.
12. Traeger J, Touraine JL, Navarro J, Freyra J y Contreras P: Immunodeficiency in chronic renal insufficiency. *Proc EDTA*, 17:375, 1980.
13. Wood ML, Okazak H y Monaco AP: The effect of blood transfusions on the immune response. *Transplant Proc*, 20:1203, 1988.