

Disminución espontánea de la migración de células polimorfonucleares en pacientes insuficientes renales crónicos y hemodializados

A. Quevedo², H. O. Estráviz², M.^a C. Ilvento³, R. A. Díez³, M.^a E. Estévez y L. Sen

² Instituto de Investigaciones Cardiológicas y Nefrológicas. H. Pombo de Rodríguez. ³ Instituto de Investigaciones Hematológicas. Mariano Castex. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Pacheco de Melo, 3081. 1425 Buenos Aires (Argentina).

Introducción

La susceptibilidad a las infecciones bacterianas es la causa principal de la morbilidad y mortalidad en pacientes con falla renal aguda y crónica (CRF)^{1,2}. A pesar de que el deterioro de la inmunidad humoral y celular observado en pacientes con lesiones renales ha sido atribuido a la uremia^{3,5}, no hay evidencia directa de esto.

Los fagocitos, que constituyen la primera barrera celular en la defensa del huésped, están deteriorados en los pacientes con enfermedades renales. Aunque escasos, los estudios en referencia a las respuestas quimiotácticas de los fagocitos, principalmente los neutrófilos, indican una marcada disminución en pacientes con insuficiencia renal crónica.

Además, la hemodiálisis ha sido considerada el factor que más afecta a la función de los fagocitos, principalmente la quimiotaxis y la formación de metabolitos tóxicos del oxígeno^{6,9}.

La finalidad de este estudio fue establecer, en pacientes con desórdenes renales independientes de la lesión renal, si la hemodiálisis puede contribuir a disfunción neutrófila.

mujeres con edad promedio de 54 años, en rangos desde 32 a 75 años.

Diecinueve pacientes se dializaban, nueve hombres y 10 mujeres, con promedio de edad de 44 años, en rangos desde 22 a 71 años.

El promedio de tiempo en hemodiálisis fue de 5,4 años, con una desviación estándar de 4,5. El diagnóstico renal está ilustrado en la tabla I.

Todos los pacientes que recibían diálisis lo hacían tres veces a la semana, usando membranas de cuprofán. Para el estudio de las células PMN, la sangre de los pacientes hemodializados era obtenida 48 horas después de la última sesión de hemodiálisis, inmediatamente antes de la siguiente sesión.

Ninguno de los pacientes mostró evidencia clínica de infección a lo largo del estudio. El grupo control consistió en 16 dadores de sangre, 12 hombres y cuatro mujeres, con un promedio de edad de 35 años.

Preparación de los granulocitos

Veinte ml de sangre heparinizada eran obtenidos y diluidos a la mitad con solución fisiológica isotónica, segui-

Materiales y métodos

Pacientes y grupo control estudiados

Estudiamos 29 pacientes con enfermedad renal crónica, descartando aquellos que presentaban enfermedad metabólica.

Entre ellos, 10 no se dializaban, ocho hombres y dos

Correspondencia: Academia de Medicina de Buenos Aires. Pacheco de Melo, 3081. 1425 Buenos Aires (Argentina).

Esta investigación recibió aporte financiero del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas CONICET. La Dra. María E. Estévez y Dra. Luisa Sen son miembros de la Carrera de Investigación.

Tabla I. Incremento de la insuficiencia renal crónica, etiología de los pacientes estudiados

Diagnóstico	Insuficiencia renal crónica			
	* Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Hipertensión maligna ..	4	1		5
Riñones poliquísticos ...		2	1	2
Pielonefritis crónica		1		3
Glomerulonefritis crónica				6
Esclerodemia	1			
Indeterminado				3

* Grado I: Clearance de creatinina hasta 50 ml/min. Grado II: Clearance entre 50 y 20 ml/min. Grado III: Clearance entre 20 y 10 ml/min. Grado IV: Clearance de menos de 10 ml/min. Los pacientes en grado IV son tratados con hemodiálisis.

da por gradiente de centrifugación de Ficoll-Hypaque ($d = 1.077$).

Los neutrófilos y las células rojas del gradiente fueron resuspendidos en plasma autólogo diluido a la mitad y sedimentado en solución de Dextrán al 6 % durante 30 minutos a 4° C.

Los granulocitos dispuestos en abundantes capas fueron separados y centrifugados por 10 minutos a $400 \times g$. Las células rojas fueron removidas por lisis hipotónica. Después de lavar las células con solución helada de calcio y magnesio libre (solución salina balanceada de Hanks HBSS), las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 (GIBCO), ajustándolas a una concentración final de 4×10^5 células/ml.

Factor quimiotáctico

Fue usado como factor quimiotáctico la N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) (Sigma, USA). El péptido fue disuelto en etanol y las diluciones fueron hechas en HBSS (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M). La respuesta óptima quimiotáctica de las células polimorfonucleares fue observada con una concentración final de FMLP de 10^{-6} M.

Quimiotáctico probado

Fue usada¹⁰ una cámara de microhemotaxis de fondo 48 (Neuro Probe, Inc, Bethesda, M. D., USA) con membrana de policarbonato; el quimiotáctico probado fue usado de acuerdo a las instrucciones de manufacturación. En el fondo de la cámara fueron adheridos brevemente 25 μ l de quimiotácticos.

Una membrana de policarbonato con orificios de 3 μ l fue colocada en el fondo de la cámara y fueron adicionados 50 μ l de células en suspensión a la superficie de la cámara.

La cámara fue incubada por 45 minutos a 37° C y finalmente el filtro fue removido, las células en la superficie fueron enjuagadas y el filtro fue fijado en metanol, secado con aire y teñido con Giemsa.

Las células atrapadas en 1 mm² del filtro fueron examinadas y contadas con un objetivo de inmersión en aceite.

Resultados

Migración espontánea de las células PMN

Primero comparamos la migración al azar de las células PMN obtenidas de pacientes con IRC, en tratamiento o no de hemodiálisis, con el grupo control normal. La migración al azar media para pacientes con IRC hemodializados fue de 473 ± 84 células/mm² desviación estándar media; para pacientes con IRC sin hemodiálisis, 546 ± 78 células/mm², y para el grupo control normal, 598 ± 108 células/mm². Hubo significativas diferencias entre el grupo de pacientes con IRC que recibían hemodiálisis y los

dos grupos restantes, grupo control normal ($p < 0,1$) y pacientes con IRC sin hemodiálisis ($p < 0,5$). Sin embargo, la migración al azar de las células PMN de los pacientes con IRC sin hemodiálisis no difería de la del grupo control normal.

Sin embargo, no fueron incluidos los pacientes con glomerulonefritis en el grupo de no dializados, debido a que la corticoterapia que recibieron podía influir en esa diferencia de migración al azar. Para excluir esta posibilidad, los datos obtenidos fueron nuevamente analizados, descartando a los pacientes con glomerulonefritis. Igual, bajo estas condiciones, la migración al azar de las células PMN de pacientes hemodializados fue de 498 ± 79 células/mm², significativamente diferente del grupo control normal ($p < 0,02$).

Estos datos sugieren que la hemodiálisis disminuye la migración al azar de las células PMN, pero también otros u otros factores asociados a la enfermedad renal, como la glomerulonefritis, pueden contribuir al deterioro de las células PMN.

Migración directa

Se analizó luego la quimiotaxis de los neutrófilos sensibles a la FMLP. Se demostró que los pacientes con IRC no dializados tenían una quimiotaxis total de 764 ± 117 células PMN por mm, mientras que en los pacientes dializados fue de 663 ± 122 células/mm², ambos resultados significativamente bajos en comparación con el grupo control (1.090 ± 133 células/mm², $p < 0,01$ en ambos casos). Hubo una marcada diferencia del 30 % en los pacientes con IRC no dializados y del 30 % en los pacientes dializados en relación al grupo control normal.

Cuando los pacientes con IRC con y sin hemodiálisis fueron comparados, la quimiotaxis total de las células PMN de los pacientes hemodializados fue significativamente menor ($p < 0,05$). Estos datos sugieren que las enfermedades renales afectan la migración directa de las células PMN y la función de ellas. Para establecer si las diferencias en la respuesta quimiotáctica total de las células PMN está o no asociada a la migración al azar, calculamos el «índice de migración» (MI) restando la migración al azar de la migración directa total y los resultados obtenidos en los diferentes grupos estudiados fueron comparados.

La MI media \pm la desviación estándar de las células PMN de los pacientes hemodializados, los hemodializados y el grupo control fue de 218 ± 74 células/mm².

Ambos grupos de pacientes IRC difieren significativamente del grupo control normal ($p < 0,01$), mientras que el grupo no hemodializado no se diferenció del grupo hemodializados. La tabla II indica un promedio de reducción del 61 % del índice de migración (MI) de las células PMN de pacientes con hemodiálisis y del 55 % de los pacientes con IRC sin hemodiálisis cuando se comparan con el grupo control.

Cuando los pacientes con glomerulonefritis fueron ex-

Tabla II. Índice de migración (migración directa total-migración al azar) de células polimorfonucleares en pacientes con insuficiencia renal crónica y grupo normal de control

Grupo	n	Índice de migración (células PMN/mm)	Promedio de reducción. Porcentaje
Insuficiencia renal crónica	10	218 ± 74	55
Insuficiencia renal crónica hemodiálisis	19	189 ± 73	61
Grupo normal de control	16	490 ± 99	—

cluidos del grupo de hemodializados, la comparación de MI de los pacientes con IRC, tanto hemodializados o no, con el grupo control resultó significativamente menor ($p < 0,1$), mientras que el índice de migración no difería entre los grupos de IRC.

No encontramos correlación entre las migraciones de las células PMN y la duración de la hemodiálisis, la uremia o el número de transfusiones recibidas previamente.

Estos datos sugieren que la respuesta deficiente de la quimiotaxis de las células PMN en los pacientes con IRC está principalmente asociada al deterioro de la función renal y que la defectuosa migración al azar de las células PMN contribuye además a la baja respuesta del factor quimiotáctico.

Discusión

Este estudio demuestra que las células PMN de los pacientes con enfermedad renal tienen deficiente sensibilidad quimiotáctica al FMLP, el cual está asociado a la enfermedad renal y la hemodiálisis. La migración al azar de las células PMN está principalmente afectada por la hemodiálisis. Las alteraciones inmunológicas en los pacientes con enfermedad renal crónica han sido descritas por muchos autores^{3, 5, 16, 17} y está aceptado que la hemodiálisis crónica afecta a las defensas del huésped. Las alteraciones de las células PMN en pacientes renales que se hemodializan han sido documentadas.

Los pacientes con IRC no hemodializados pueden presentar granulocitosis¹¹ con sitomorfologías alteradas, por ejemplo hipersegmentación neutrófila e incremento de los gránulos y vacuolas intracelulares^{12, 13}. Además, la hemodiálisis produce una aguda y grave neutropenia^{14, 15}. En concordancia con nuestros descubrimientos, una deficiente respuesta quimiotáctica directa de las células PMN en pacientes renales crónicos ha sido estudiada previamente^{7, 9}. Sin embargo, el deterioro de la migración al azar no fue detectada por otros autores^{7, 9}. Las discrepancias con nuestros resultados pueden ser atribuidas a las diferentes membranas usadas en el experimento y los criterios de evaluación. Para explicar este desacuerdo se pue-

de postular que la sensibilidad deficiente al FMLP se debe a la reducción de la expresión de los receptores para el factor quimiotáctico o que el quimiotáctico induce a la desactivación de las células ya activadas. Lewis y cols.⁷ encontraron que el número de receptores para el FMLP de las células PMN de pacientes con IRC, independientemente del tipo de diálisis recibida, fue similar a las células normales, descartando la primera hipótesis. Estudios previos hechos por Norman y Miller^{6, 19} indicaron que el suero de pacientes con glomerulonefritis y síndrome nefrótico tenía disminuida la actividad quimiotáctica espontánea en contraste con el suero control normal.

La adición de inmunocomplejos al suero de los pacientes no genera incremento de la actividad quimiotáctica sobre el nivel espontáneo del suero de los pacientes con PMN normales. También las células PMN de los pacientes renales responden deficientemente a los factores quimiotácticos generados por el suero del grupo control. Estas observaciones sugieren que, a consecuencia de las lesiones renales, varios factores pueden generar células PMN principalmente en una situación funcional de activaciones *in vivo* seguida por desactivación o desensibilización de los granulocitos, haciéndolos refractarios a los subsiguientes estímulos. A pesar de que la mayoría de los pacientes renales estudiados por Norman y Miller^{6, 19} tenían patología inmunológica, ellos mencionaron como inesperado el hecho de que las células PMN y el suero de pacientes con enfermedad renal de origen no inmunológico, como un síndrome nefrótico e idiopático, tiene un comportamiento quimiotáctico alterado. Para la mayoría de nuestros pacientes (hipertensión maligna, riñones poliquísticos, pielonefritis crónica), la IRC no tenía origen metabólico ni inmunológico, excepto seis casos con glomerulonefritis crónica que pertenecían al grupo hemodializado y demostraron la migración al azar más baja. Sin embargo, la exclusión de estos casos no modificó la alteración de la migración al azar de los PMN del grupo hemodializado. A pesar de que muchos factores presentes en la IRC (como el incremento de los niveles séricos de urea nitrogenada o la creatinina) pueden alterar la inmunidad celular^{3, 11, 16}, la asociación de estos factores con la fagocitosis disminuida no ha sido demostrada. En relación con estos estudios no se encontró asociación en nuestros pacientes entre la migración de las células PMN y el tiempo de tratamiento dialítico, la uremia o el número de unidades de sangre recibidas. La disminución de la migración directa de las células PMN fue ya observada por otros investigadores.

Sin embargo, es importante enfatizar que ambos, tanto hemodiálisis como las enfermedades renales, se muestran responsables de la respuesta baja de los quimiotácticos de las células PMN.

La disminución de la respuesta quimiotáctica de los granulocitos en IRC es probablemente debida a los efectos de una combinación multifactorial, incluyendo transfusiones de sangre, presencia de autoanticuerpos, activación de los componentes del complemento, uremia, hemodiá-

lisis y tal vez otros factores aún no identificados, haciendo dificultoso dilucidar el grado de influencia de cada factor en la situación clínica. Concluimos que la migración al azar de las células PMN está principalmente afectada por la hemodiálisis, mientras que la migración directa de las células PMN al FMLP es influenciada por el deterioro de la función renal por sí misma, así como también por la hemodiálisis. Amplios estudios, con un gran grupo de pacientes en buenas condiciones para las características de la IRC y sujeto a multivariados análisis pudieron proveer comprensión de las bases de los defectos quimiotácticos de las células PMN en la IRC.

Bibliografía

1. Monteomerie JZ, Kalmanson GM y Guze LB: Insuficiencia renal e infección. *Medicina*, 47:1-32, 1968.
2. Keane WF, Shapiro FL y Raij L: Incidence and type of infections occurring in 455 chronic hemodialysis patients. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 23:41-46, 1977.
3. Manca F, Perfumo F, Kunkla, Constantini M y Gusmano R: Evidencia in vitro. *Acta Pediátrica*, 78:597-600, 1989.
4. Lawrence HS: Uremia e inmunosupresión natural. *Medicina Interna*, 62:166-170, 1965.
5. Selroos O, Pasternack A y Virolainen M: Skin test sensitivity and antigen induced lymphocyte transformation in uremia. *Clin Exp Immunol*, 14:365-370, 1973.
6. Norman ME y Miller ME: Spontaneous chemotaxis in acute glomerulonephritis: Demonstration of a positive correlation with disease activity. *J Pediatr*, 85:20-24, 1974.
7. Lewis SL, Van Epps DE y Chenowieth DE: Alterations in chemotactic factor-induced responses of neutrophils and monocytes from chronic dialysis patients. *Clin Nephrol*, 30:63-72, 1988.
8. Salant DJ, Glover AM, Anderson R, Meyers AM, Rabkin R, Myburg JA y Rabson AR: Depressed neutrophil chemotaxis in patients with chronic renal failure and after renal transplantation. *J Lab Clin Med*, 88:536-545, 1976.
9. Greene WH, Ray C, Mauer SM y Quie PG: The effect of hemodialysis on neutrophil chemotactic responsiveness. *J Lab Clin Med*, 88:971-974, 1976.
10. Harvath L, Falk W y Leonard EJ: Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J Immunol Meth*, 37:39-45, 1980.
11. Goldblum SE y Reed WP: Alteraciones de la defensa y alteraciones inmunológicas asociadas con hemodiálisis crónica. *Medicina Interna*, 93:597-613, 1980.
12. Jensson O: Observations on the leukocyte blood picture in acute uraemia. *Br J Haematol*, 4:422-427, 1958.
13. Guckian JC, Karrh LR, Copeland JL y McCoy J: Phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes in patients with renal failure on chronic hemodialysis. *Tex Rep Biol Med*, 29:193-198, 1971.
14. Kaplow LS y Goffinet JA: Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. *JAMA*, 203:133-135, 1968.
15. Cohens MS, Elliott DM, Chaplinski T, Pike MM y Nieldel JE: A defect in the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes that remain in circulation early in hemodialysis. *Blood*, 60:1283-1289, 1982.
16. Kurz P, Kohler M, Meuer S, Hutteroth T y Meyer zum Buschenfelde KH: Impaired cellular immune responses in chronic renal failure: evidence for a T cell defect. *Kidney Int*, 29:1209-1214, 1986.
17. Cappel R, Van Beers D, Liesnard C y Draua M: Impaired humoral and cell-mediated immune responses in dialyzed patients after influenza vaccination. *Nephron*, 33:21-25, 1983.
18. Henderson LW, Miller ME, Hamilton RW, Norman ME: Hemodialysis leukopenia and polymorph random motility: a possible correlation. *J Lab Clin Med*, 85:191-197, 1975.
19. Norman ME y Miller ME: Quimiotaxis espontánea en pacientes, con glomerulonefritis y síndrome nefrótico. *J Pediátrica*, 83:390-398, 1973.