

Activación y agregación leuco-plaquetaria durante hemodiálisis: detección mediante citometría de flujo

Aleix Cases, M. Rosa Hernández*, Miguel Lozano*, Jordi Calls, Jordi Bozzo*, Ginés Escolar*, Antonio Ordinas*

Resumen

El contacto de la sangre con superficies artificiales durante la hemodiálisis induce activación celular mediada por diversas proteínas adhesivas. En este estudio hemos estudiado la activación celular y formación de agregados leucoplaquetarios durante la hemodiálisis con una membrana celulósica, utilizando citometría de flujo y anticuerpos monoclonales frente a plaquetas y leucocitos. La expresión basal de los antígenos leucocitarios (CD11b) y plaquetarios (CD41, CD42b, CD62P y CD63) evaluados en los pacientes urémicos fue similar a la de los controles sanos, con la excepción del CD36 (receptor plaquetario para el colágeno) (284 ± 70 vs 105 ± 5 , $p < 0.05$), cuya expresión estaba basalmente aumentada en pacientes urémicos. La expresión leucocitaria de CD11b aumentó significativamente tras 15 minutos en hemodiálisis (116.7 ± 15.1 vs 72.5 ± 6.8 , $p < 0.05$). No se observaron cambios en la expresión de glicoproteínas de membrana plaquetar o antígenos de activación plaquetaria (CD62P, CD63) durante la hemodiálisis. Sin embargo, se observó un aumento significativo de agregados leucoplaquetarios (partículas mostrando doble fluorescencia para antígenos plaquetarios y leucocitarios) tras 15 minutos de hemodiálisis ($28.8 \pm 4.3\%$ vs $15.3 \pm 2.7\%$, $p < 0.05$).

Se concluye que durante la hemodiálisis con membranas celulósicas existe una "up-regulation" del receptor leucocitario CD11b y la formación de agregados leucoplaquetarios que podrían desempeñar un papel importante en la disfunción endotelial y arteriosclerosis acelerada que presentan los pacientes urémicos.

PALABRAS CLAVE: Hemodiálisis - Activación celular - Agregados leucoplaquetarios.

Activation and addition of leucocytes and platelets during haemodialysis: detection by means of flow cytometry.

The contact of blood with artificial surfaces during hemodialysis induces cellular activation mediated through several adhesion molecules. In this study we have studied cellular activation and formation of platelet-leukocyte aggregates during hemodialysis with a cellulose membrane using flow cytometric techniques and monoclonal antibodies against platelets and leukocytes. Basal expression of leukocyte (CD11b) and platelet antigens (CD41, CD42b, CD36, CD62P, CD63) were similar in uremics and controls, except for CD36 (the platelet receptor for collagen) (284 ± 70 vs 105 ± 5 , $p < 0.05$), whose expression was

increased in uremic patients. Leukocyte expression of CD11b increased significantly after 15 minutes of hemodialysis (116.7 ± 15.1 vs 72.5 ± 6.8 , $p < 0.05$). No changes in the expression of platelet glycoproteins of platelet-dependent activation antigens (CD62P, CD63) were observed during hemodialysis. However, there was a significant increase in platelet-leukocyte aggregates (particles showing double fluorescence for platelet and leukocyte antigens) ($28.8 \pm 4.3\%$ vs $15.3 \pm 2.7\%$, $p < 0.05$).

It is concluded that during hemodialysis with cellulose membranes there is an upregulation of the leukocyte receptor CD11b and the formation of platelet-leukocyte aggregates, which may play a role in the endothelial dysfunction and accelerated atherosclerosis reported in uremic patients.

KEY WORDS: Hemodialysis - Cellular activation - Platelet-leukocyte aggregates.

Introducción

Los pacientes hemodializados muestran signos clínicos de una disfunción hemostática [1] y una susceptibilidad aumentada a las infecciones [2]. El contacto de la sangre con membranas celulósicas durante la hemodiálisis induce la activación del complemento, así como de leucocitos y plaquetas, e inicia la respuesta inflamatoria leucocitaria que juega un papel importante en los cambios fisiopatológicos que ocurren durante la hemodiálisis [3]. Asimismo, la activación de leucocitos y plaquetas coincide en el tiempo con la aparición de leucopenia intradiálisis [4]. Es probable que durante la hemodiálisis exista interacción entre leucocitos y plaquetas, la cual facilitaría la interacción de estas células con otros elementos celulares, como el endotelio vascular.

Las moléculas de adhesión, selectinas, integrinas o receptores ligados a inmunoglobulinas están implicados en las interacciones célula-célula [5]. De hecho, varias moléculas de adhesión de estas tres familias se han implicado en el *tethering*, activación y marginación transitoria de los leucocitos durante la hemodiálisis [6].

Es un hecho conocido que la integrina leucocitaria CD11b aumenta su expresión (up-regulation) en fases tempranas del proceso inflamatorio, facilitando la forma-

Servicios de Nefrología y Hemoterapia y Hemostasia*
Hospital Clínic i Provincial
Barcelona

ción de agregados leucocitarios, pero este receptor también puede ligarse con diversos ligandos, incluyendo fragmentos del complemento (C3bi) o fibrinógeno [7]. Asimismo, la adherencia leucocitaria a células endoteliales no estimuladas están mediadas por el receptor Mac-1 (CD11b) [8]. Finalmente, se ha demostrado que existe una up-regulation de este receptor durante la hemodiálisis [9].

En el presente estudio hemos analizado los cambios en la expresión de diversas moléculas de adhesión en leucocitos y plaquetas durante la hemodiálisis con membranas celulósicas mediante citometría de flujo y anticuerpos monoclonales específicos frente a estas moléculas. Asimismo, se ha evaluado la formación de agregados leucoplaquetarios.

Pacientes y métodos

1. Pacientes

En este estudio se incluyeron diez pacientes afectados de insuficiencia renal crónica terminal en programa de hemodiálisis (6 hombres y 4 mujeres, con una edad mediana de 66 años, intervalo 50-79 años). Las causas de insuficiencia renal eran: nefroangiosclerosis (3), pielonefritis crónica (2), síndrome hemolítico urémico (1), diabetes mellitus (1), y desconocida (3). Los pacientes se dializaban durante 4 horas tres veces por semana con monitores de ultrafiltración controlada y baño de bicarbonato. Ninguno de los pacientes había recibido ninguna medicación que afectara el funcionalismo plaquetario, con la excepción de eritropoyetina, durante las dos semanas previas al estudio. La dosis de eritropoyetina, que oscilaba entre las 6000 y 9000 UI a la semana, se había

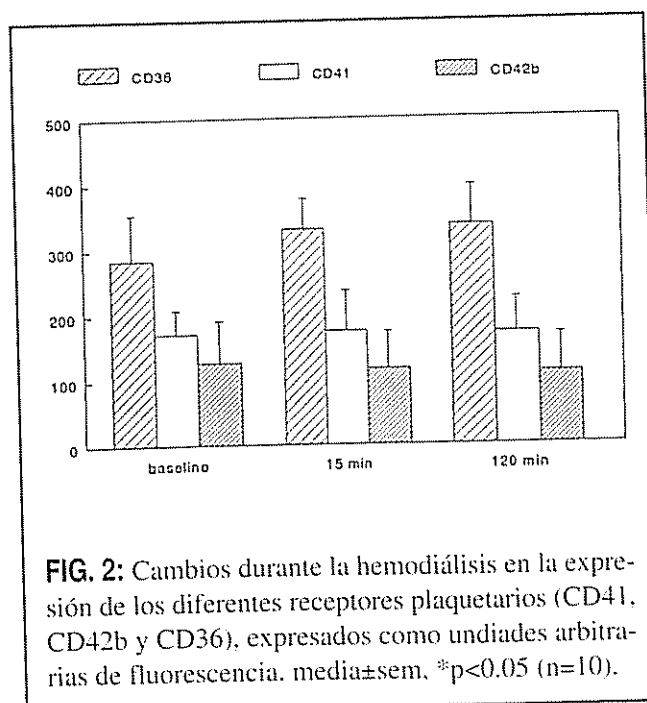
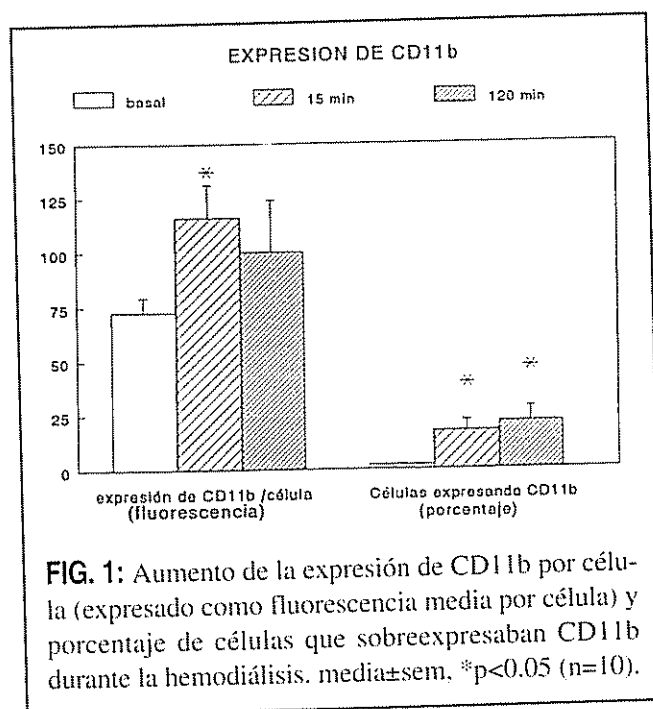
mantenido estable en los dos meses previos al estudio. Asimismo se incluyeron diez sujetos sanos voluntarios del Banco de Sangre como controles normales. El estudio fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos del centro y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes.

2. Diseño del estudio

Los pacientes incluidos se estaban dializando durante al menos los últimos 8 meses con filtros con membranas de acetato de celulosa (MN-140, Althin Medical, Miami Lakes, FL) esterilizados con óxido de etileno. La heparinización se realizó con heparina standard (Rovi, Madrid) mediante administración de un bolus inicial seguido de una infusión continua durante la sesión de hemodiálisis. Se obtuvieron muestras antes del inicio de hemodiálisis, así como de la línea venosa a los 15 minutos y dos horas después de iniciada la sesión de hemodiálisis. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de polipropileno que contenían citrato como anticoagulante (3.8%, peso:volumen).

3. Preparación de las muestras

El marcado de los leucocitos y plaquetas con anticuerpos monoclonales se realizó en sangre total utilizando el análisis de doble color [10]. Brevemente, tras la recolección de la muestra se hicieron alícuotas de sangre en tubos de polipropileno precargados con 25 μ l de tampón PBS (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las muestras se incubaron primero con concentraciones saturantes de anticuerpos anti CD45 o anti CD41 marcados con ficoeritrina durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido por la adición de anticuerpos monoclonales anti CD11b marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante otros 15 minutos. Las muestras se diluye-



ron posteriormente con 1 ml de tampón PBS y analizados en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, Ca) a una onda de excitación de 488 nm. La fluorescencia y las señales de dispersión se calibraron con cuentas de calibración de 2 µm (Becton Dickinson). La fluorescencia del FITC y PE se detectó a 530/30- y 575/26-nm, respectivamente; y se corrigió la superposición en el espectro de emisión de FITC y PE. Las muestras de sangre se diluyeron con el fin de que el flujo de sangre a través del haz de láser fuera inferior a 3000 eventos por segundo. Los leucocitos y las plaquetas se diferenciaron por su inmunofluorescencia de membrana específica. Los histogramas se compusieron a partir de los datos de fluorescencia obtenidos de forma logarítmica. Se analizaron 5000 células en cada muestra. Para analizar la "up-regulation" de CD11b por los leucocitos durante la hemodiálisis se definió en el canal de fluorescencia verde un nivel que definiera el 2% de leucocitos con mayor nivel de fluorescencia en situación basal y se expresó como leucocitos positivos para CD11b. Este marcador se utilizó como umbral para determinar la proporción de células que exhibían una inmunofluorescencia superior a este nivel en las muestras subsiguientes. La up-regulation de receptores plaquetarios CD36, CD41, CD42b; así como la expresión de los receptores de activación plaquetaria CD62P y CD63 se expresan como fluorescencia media por célula. La presencia de agregados leucoplaquetarios se determinó considerando las partículas que presentaran simultáneamente fluorescencia roja (CD41 de plaquetas) y verde (CD11b de leucocitos) y se expresa como porcentaje de agregados que muestran doble fluorescencia.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media±esm. Para el análisis estadístico entre pacientes y controles se utilizó el test de la t de Student para datos independientes, mientras que para analizar los cambios durante la hemodiálisis se utilizó un análisis de la varianza. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

Resultados

La expresión basal de CD11b por los leucocitos y de los marcadores plaquetarios (CD41 y CD42b) analizados era similar a lo observado en leucocitos y plaquetas de

TABLA 1

EXPRESION DE CD11b Y RECEPTORES PLAQUETARIOS (CD36, CD41 Y CD42b) EN CONTROLES Y PACIENTES UREMICOS

	CD11b	CD36	CD41	CD42b
Controles	226±30	105±5	165±8	86±13
Uremicos	232±56	284±70*	183±42	107±3

La expresión de los distintos marcadores se expresa como fluorescencia (en unidades arbitrarias) ± esm (n=10).

voluntarios sanos, con la excepción de la expresión de CD36, cuya expresión era superior en los pacientes urémicos respecto a los controles sanos ($p < 0.05$). Estos resultados se muestran en la tabla 1. Tampoco se observaron diferencias en la expresión de antígenos de activación plaquetaria (CD62P, CD63) o presencia de agregados leucoplaquetarios entre pacientes y sujetos sanos (Tablas 2 y 3).

TABLA 2

EXPRESION DE MARCADORES DE ACTIVACION PLAQUETARIA (CD62 Y CD63) EN PLAQUETAS EN CONTROLES Y PACIENTES UREMICOS

	CD62	CD63
Controles	13.2±4.9	15.2±3.9
Uremicos	14.7±5.2	13.0±3.8

La expresión de los marcadores de activación plaquetaria se expresa como fluorescencia media (en unidades arbitrarias) ± esm (n=10).

TABLA 3

PORCENTAJE DE LEUCOCITOS, PLAQUETAS Y AGREGADOS LEUCOPLAQUETARIOS EN CONTROLES Y PACIENTES UREMICOS

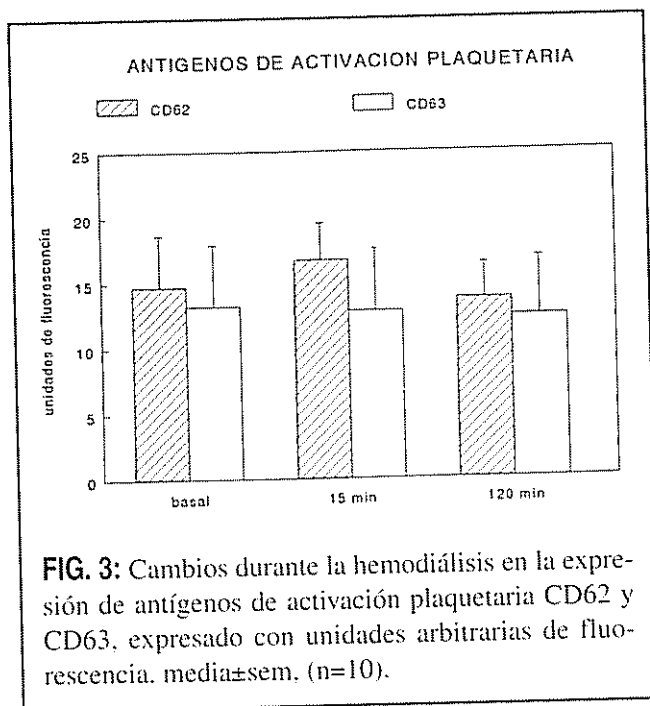
	% LEUCOCITOS	% PLAQUETAS	% AGREGADOS
Controles	4.0±0.5	82.3±2.7	13.7±2.5
Uremicos	5.2±1.6	80.3±3.9	14.5±2.4

Porcentaje de partículas que exhibían fluorescencia para CD11b (leucitos), CD41 (plaquetas) y doble fluorescencia (agregados leucoplaquetarios) (media±esm, n=10).

Se observó un aumento significativo en la tasa de fluorescencia para CD11b en leucocitos respecto al basal a los 15 minutos de la hemodiálisis (116.7±15.1 vs 72.5±6.8, $p < 0.05$). El incremento no alcanzó significación estadística a las 2 horas de hemodiálisis (Figura 1). Asimismo, el porcentaje de leucocitos que sobreexpresaban CD11b aumentó significativamente tanto a los 15 minutos, como a las 2 horas de hemodiálisis (17.2±5.1% y 21.3±6.6%, respectivamente; vs 1.9±0.2%, $p < 0.05$).

No se observaron cambios en la expresión de receptores plaquetarios CD36, CD41 y CD42b (Figura 2), ni la presencia de antígenos de activación plaquetaria durante la hemodiálisis (Figura 3).

Los agregados leucoplaquetarios, definidos como las partículas que expresaban doble fluorescencia, aumentaron significativamente durante la hemodiálisis. El porcentaje de agregados aumentó significativamente sobre el basal a los 15 minutos de hemodiálisis (28.4±4.3% vs 15.3±2.7%, $p < 0.05$), pero no alcanzó significación estadística a las 2 horas de hemodiálisis (Figura 4). Paralelamente, al incremento del porcentaje de partículas que mostraban doble fluorescencia a los 15 minutos de hemodiálisis se observó un descenso de partículas que ex-

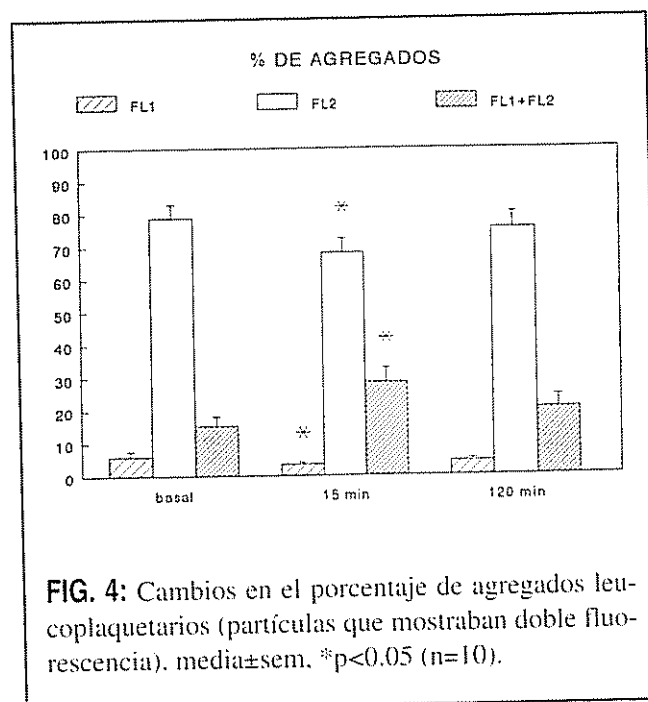


presaran CD41 (plaquetas, $65.5 \pm 4.6\%$ vs $78.7 \pm 4.3\%$, $p < 0.05$) y CD11b (leucocitos, $3.5 \pm 0.6\%$ vs $6.0 \pm 1.5\%$, $p < 0.05$).

Discusión

Nuestros resultados sugieren que la expresión basal de la glicoproteína Mac-1 (CD11b) en los leucocitos de los pacientes urémicos era similar a la de los sujetos sanos. Asimismo, la expresión de las glicoproteínas Ib (CD42b) y IIb-IIIa (CD41), receptores plaquetarios para el factor von Willebrand y el fibrinógeno, respectivamente, eran similares a los controles sanos. Estos hallazgos difieren de un estudio previo que demostraron una disminución de la expresión de GPIIb-IIIa y de la forma activada de este receptor en plaquetas urémicas [11], aunque otro estudio anterior en que se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas y cuantificación morfométrica con microscopía electrónica mostró una densidad conservada de estos receptores en plaquetas de pacientes urémicos [12]. En nuestro estudio, sólo la expresión de CD 36 (GPIV), el receptor plaquetario para el colágeno [13] estaba aumentado en las plaquetas de los pacientes urémicos. Asimismo, observamos que la presencia de agregados leucoplaquetarios en situación basal en los pacientes urémicos era similar a la observada en los controles sanos, también a diferencia de lo descrito por Gawaz et al que observaron una disminución de agregados leucoplaquetarios en los pacientes urémicos respecto a los controles sanos [11].

Durante la hemodiálisis se observó un aumento de la expresión de CD11b (up-regulation) en leucocitos, así como del porcentaje de leucocitos que sobreexpresaban este receptor, de acuerdo con lo descrito previamente en la literatura [8,14]. Estos hallazgos sugieren que el incre-



mento de la expresión de la molécula de adhesión Mac-1 (CD11b) durante la hemodiálisis media el aumento de adhesividad de granulocitos y monocitos, facilitando la leucoagregación y el ligado de estas células a la superficie del dializador y al endotelio vascular [8]. Por otro lado, en este estudio no pudimos confirmar el aumento de marcadores plaquetarios de activación (CD62P o CD63) durante la hemodiálisis, demostrado en estudios previos [15,16]. Estas discrepancias podrían deberse a diferencias metodológicas con los estudios anteriores. Así, los estudios que demostraron un aumento de la expresión de P-selectina en plaquetas durante la hemodiálisis se realizaron en plasma rico en plaquetas y en plaquetas fijadas en paraformaldehído, mientras que el presente estudio se realizó con sangre total. Dado que la P-selectina es un receptor para leucocitos [17] es factible que las plaquetas activadas que expresan P-selectina se ligan a los leucocitos formando los agregados leucoplaquetarios, y por ello no se detectaría un aumento de estos marcadores de activación plaquetaria cuando se analizan en sangre total.

La importancia biológica de estos agregados leucoplaquetarios reside en los múltiples mecanismos de *cross-talk*. En condiciones basales predomina un efecto inhibitorio entre estas células. Cuando leucocitos y plaquetas son activados, existe una activación recíproca que magnifica la respuesta [11]. Las plaquetas activadas, a través de la expresión de P-selectina parecen jugar un papel en la marginación transitoria de los leucocitos durante la hemodiálisis [6]. Estudios *in vitro* han demostrado que la incubación de leucocitos en presencia de plaquetas activadas induce la liberación de anión superóxido por monocitos y neutrófilos mediado por la interacción entre la P-selectina y su receptor leucocitario CD15s [18]. Las plaquetas pueden aportar colesterol libre a los monocitos, los cuales pueden formar las células espumosas de la pla-

ca arteriosclerótica y regulan la secreción de quimoquinas por estos últimos [19]. Los neutrófilos utilizan el ácido araquidónico para aumentar la síntesis de leucotrienos y otros eicosanoides [20]. Por su parte, la cathepsina G derivada de los neutrófilos puede inducir más activación y secreción plaquetarias [21]. Finalmente, las plaquetas y neutrófilos pueden cooperar en la formación de factor activador de las plaquetas (PAF), el cual actúa sobre ambos tipos de células, actuando como mecanismo amplificador de activación [22].

Conclusiones

Los resultados de este estudio indican: 1) La expresión basal de CD11b por los leucocitos y de los receptores de membrana GPIb y GPIIb-IIIa en plaquetas es similar en pacientes urémicos y controles sanos; asimismo, la presencia de agregados leucoplaquetarios en sangre circulante era similar a la observada en los controles sanos. 2) La expresión del receptor plaquetario para el colágeno (CD36 o GPIV) estaba aumentado en los pacientes urémicos en situación basal. 3) Durante la hemodiálisis con membranas celulósicas se observó un aumento de la presencia de agregados leucoplaquetarios en sangre circulante, los cuáles podrían estar implicados en algunas complicaciones que presentan los pacientes urémicos, como la disfunción endotelial y la arteriosclerosis acelerada que presentan estos pacientes.

Bibliografía

- Gordge MP, Neild GH. Platelet function in uremia. *Platelets* 1991; 2: 115-123.
- Keane WF, Shapiro FL, Raij L. Incidence and type of infections occurring in 445 chronic hemodialysis patients. *Trans Am Soc Artif Organs* 1977; 23: 41-47.
- Gawaz M, Bogner C. Changes in platelet membrane glycoproteins and platelet-leukocyte interaction during hemodialysis. *Clin Invest* 1994; 72: 424-429.
- Craddock PR, Hammerschmidt DE, White JG, Dalmaso AP, Jacobs HS. Complement (C5a)-induced granulocyte aggregation in vitro: A possible mechanism for complement-mediated leukostasis and leukopenia. *J Clin Invest* 1977; 60: 260-264.
- Albelda SM, Smith CW, Ward P. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; 8: 504-512.
- Stuard S, Carreno MP, Poignet JL, Albertazzi A, Haefner-Cavaillon N. A major role for CD62P/CD15s in leukocyte margination during hemodialysis. *Kidney Int* 1995; 48: 93-102.
- Wright SD, LO SL, Detmers PA. Specificity and regulation of CD18-dependent adhesions. In *Leukocyte Adhesion Molecules: Structure, Function and Regulation*. Springer TA, Anderson DC, Rosenthal AS, and Rothlein R. eds. Springer-Verlag, New York 1990. pp 190-207.
- Larson RS, Springer TA. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 1990; 114: 181-217.
- Thylen P, Lundahl J, Femvik E, Hed J, Svenson SB, Jacobson SH. Mobilization of an intracellular glycoprotein (Mac-1) on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Am J Nephrol* 1992; 12: 393-400.
- Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-315.
- Gawaz MP, Mujais SK, Schmidt B, Gurland HJ. Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney Int* 1994; 46: 489-495.
- Escolar G, Monteagudo J, Castillo R, Cases A, Garrido M, Ordinas A. Ultrastructural immunolocalization and morphometric quantification of platelet membrane GPIb and GPIIbIIIa in uremic patients. En Jamieson GA, ed. *Platelet membrane receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology*. Alan R. Liss, New York 1988. pp 197-201.
- Parmentier S, Kaplan C, Catimel B, McGregor JL. New families of adhesion molecules play a vital role in platelet functions. *Immunol Today* 1990; 11: 225-227.
- Himmelfarb J, Zaoui P, Hakim R. Modulation of granulocyte LAM-1 and MAC-1 during dialysis-a prospective, randomized controlled trial. *Kidney Int* 1992; 41: 388-395.
- Reverter JC, Escolar G, Sanz C, et al. Platelet activation during hemodialysis measured through exposure of P-selectin: analysis by flow cytometric and ultrastructural techniques. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 79-85.
- Deguchi N, Ohigashi H, Tazaki H, Handa M, Ikeda Y. Hemodialysis and platelet activation. *Nephrol Dial Transplant* 1991; (suppl 2): 40-42.
- McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 1991; 45: 156-161.
- Nagata K, Tsuji T, Todoroki N et al. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin. *J Immunol* 151: 3.267-3.273; 1993.
- Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntire TM, Moore KL, Morrisey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes *J Clin Invest* 1996; 97: 1525-1534.
- Brady HR, Papayianni A, Serhan CN. Leukocyte adhesion promotes biosynthesis of lipooxygenase products by transcellular routes. *Kidney Int* 45 (supl 45): S90-S97; 1994.
- Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost* 1995; 74: 218-223.
- Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: Their significance. *Blood Rev* 1992; 6: 83-91.