

ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES DEL EFLUENTE PERITONEAL DE PACIENTES EN DPCA

V Martínez*, I. Galán** M. J. Tamarit- C. Latienda** O. Celadilla*,
I. ~luñoz* M. ;Castro* Y de ~usebio*, N. Rodrigo*,
Ú Fernández-'Castro** I R. Segas*

Centro Hospital "La Paz", Madrid

Servicio de Nefrología, Unidad de DPCA, ** Servicio de Hematología Analítica

INTRODUCCION

La diálisis peritoneal como técnica dialítica ha sido desarrollada en nuestra unidad a lo largo de 12 años, mejorando durante este tiempo distintos aspectos de la misma. En la actualidad con la técnica en fase de consolidación, hemos dedicado nuestra atención a otros aspectos importantes del peritoneo como membrana natural utilizada para la diálisis continuada, entre los que se cuentan los referidos a las distintas poblaciones celulares halladas en él.

El peritoneo, como todas las serosas, contiene en condiciones normales una poblaciones celulares determinadas con una función específica cada una de ellas.

La población más abundante es la de macrófagos, estado terminal de la línea monocítica y cuyas funciones principales son: fagocítica (de microorganismos y de células senescentes o deterioradas), inmunológica (procesado de antígenos para su presentación al sistema linfóide) y secretora (de factores de crecimiento, linfocinas y otros muchos) (1, 2).

Gira población estable y habitual del peritoneo es la linfóide, que junto a los macrófagos constituye la primera barrera defensiva ante las infecciones (3).

También se observan células mesoteliales procedentes de la descamación normal del mesotelio, el cual tapiza la cara interna de la serosa y se va a realizar a su través el intercambio de sustancias en la DPCA. La función peritoneal por tanto va depender entre otros factores, de la integridad del mesotelio. Otro aspecto importante de estas células es su capacidad para la secreción de factores de crecimiento (4).

En situación no inflamatoria los granulocitos están en mínimas cantidades, pero son capaces de acudir en cantidades enormes, sobre todo los neutrófilos, ante el reclamo de diversos productos quimiotácticos que se producen durante las infecciones.

En los pacientes sometidos a diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA), estas poblaciones adquieren especial importancia por varias razones: en primer lugar por la agresión que supone la diálisis para el peritoneo por el paso de al menos 6 litros diarios de dializado, en segundo lugar por el riesgo aumentado de peritonitis al que están sometidos y por último la relación que pueden tener estas poblaciones con el desarrollo de fibrosis peritoneal y su inutilización para la diálisis.

OBJETIVOS

1) Análisis de las distintas poblaciones celulares en número y tipo en el efluente peritoneal (EP) de pacientes sometidos a DPCA.

2) Su relación con los siguientes factores

tiempo en DPCA. incidencia de peritonitis.
función peritoneal. diagnóstico inicial.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes: se estudiaron 26 pacientes, 12 varones y 14 mujeres, con edades comprendidas entre 20 y 81 años (media de 53 años) en insuficiencia renal crónica y en tratamiento en DPCA con una duración entre 2 y 87 meses. Estos pacientes fueron clasificados según su índice acumulado de peritonitis (días de peritonitis/año) en: alta, media baja incidencia de peritonitis. Se clasificaron igualmente para la función peritoneal atendiendo a su coeficiente de transferencia de masas para la urea y la creatinina y su capacidad de ultrafiltración en los siguientes tipos: alto, normal alto, normal, normal bajo y bajo.

Se recogió la totalidad del efluente peritoneal nocturno (tiempo de permanencia de 8 horas en peritoneo) en pacientes libres de peritonitis. El cambio de bolsa fue realizado por la propia enfermera para no hacer el purgado antes de drenar sino después siguiendo la siguiente pauta: conectar al paciente según protocolo, poner bolsa de drenaje en el calentador, inyectar en la bolsa de drenaje EDTA (2,5 mM de concentración final) bamboleándola para impregnar bien las paredes y evitar la adhesión de los macrófagos a las superficies plásticas y, por último, abrir llave de paso y drenar.

Las células se recuperaron por centrifugación del volumen total (2500 rpm durante 9 minutos) resuspendiéndose a continuación en 5 ml de PBS.

Se realizaron con la suspensión celular las siguientes técnicas:

- Recuento celular en cámara de Neubauer.
- Extensiones celulares con citocentrífuga y tinción de las mismas con May-Grünwald-Giemsa.
- Recuento diferencial de los subtipos celulares y valoración de la morfología celular.
- Cálculo del número total de los subtipos celulares.

Método estadístico: se analizó la relación del número total de células y el de los subtipos con el tiempo (en meses) en DPCA mediante regresión y análisis de la varianza. La relación con la función peritoneal y la incidencia de peritonitis se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Los valores obtenidos para el número total de células y los distintos subtipos se resumen en la tabla 1. La población más abundante fue la de macrófagos con una media de $4,461 \times 10^6$, seguida por los linfocitos con una media de $1,617 \times 10^6$, siendo el resto mucho más bajo.

El número de células disminuía de manera exponencial con el tiempo en DPCA ($p = 0,0022$) como se puede observar en la

figura 1 estabilizándose a los 15 meses aproximadamente. Esta disminución era debida a la disminución paralela de macrófagos ($p = 0,0025$), linfocitos ($p = 0,0036$) y células mesoteliales ($p = 0,0093$) mientras que la cifra de neutrófilos, eosinófilos y basófilos no variaba significativamente con el tiempo (figuras 2 y 3 respectivamente).

Existía una considerable variación en el número de células y de sus subtipos de unos pacientes a otros, incluso en el periodo de estabilización a partir de los 15 meses en DPCA (Figura 1).

Los macrófagos obtenidos del EP mostraban un tamaño mediano (Fotos 1, 2 y 3), vacuolización citoplasmática moderada (Fotos 2 y 3) y características celulares poco diferenciadas, mostrando ocasionalmente vacuolas fagocíticas con material de desecho o bacterias (Foto 2 y 3). Los linfocitos eran siempre de tamaño pequeño, escaso citoplasma y sin alteraciones morfológicas (Foto 2). Las células mesoteliales mostraban su morfología característica (Fotos 1 y 4), siendo frecuente la observación de pequeños grupos celulares en placas (Foto 4).

Dada la influencia del tiempo en DPCA sobre la cantidad de células del EP se obtuvieron los valores correspondientes al periodo en que se estabilizaba que se resumen en la Tabla II.

Por esta misma razón sólo se incluyeron los pacientes con más de 15 meses en DPCA para valorar los otros tres factores. No se encontró relación entre el número de células y la incidencia de peritonitis ni entre el número de células y la función peritoneal. Tampoco existía relación del número de células de cada subtipo con estos dos factores.

No se pudo relacionar tampoco la celularidad del EP con el diagnóstico inicial que produjo la insuficiencia renal.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el análisis de la celularidad del EP de pacientes en DPCA muestra una marcada variabilidad entre ellos. Esta variabilidad depende según nuestros datos del tiempo que lleva el paciente sometido a diálisis peritoneal disminuyendo rápidamente en los primeros meses hasta estabilizarse a los 15 meses aproximadamente. Estos datos son concordantes con los escasos trabajos que hay en la literatura, aunque dado que son grupos de pacientes y estudios distintos no son totalmente comparables.

Holmes y cols. (5) estudian un grupo de 8 pacientes todos ellos con más de 19 meses de tratamiento en DPCA y obtienen resultados parecidos a los nuestros en cuanto a la cantidad de células totales y sus subtipos exceptuando las mesoteliales que no mencionan, los valores máximos en su caso son un poco más elevados; no encuentran tampoco relación entre el número de células y la incidencia de peritonitis ni en valor absoluto relativo.

Lin y cols. (6) hacen a su vez un estudio seriado en el tiempo exclusivamente sobre macrófagos y encuentran también una disminución progresiva del número de ellos con el tiempo en DPCA con valores aproximados a los nuestros.

La disminución progresiva encontrada de macrófagos y linfocitos se puede deber a la deplección continuada que supone la diálisis peritoneal, con un lavado continuo de la cavidad peritoneal; estas células son repuestas desde sangre periférica en un principio con más o menos celeridad, pero a la larga supone una demanda excesivamente prolongada y decrece su reposición. Las células mesoteliales pueden tener una cinética parecida al ser arrastradas inicialmente las que están a punto de desprenderse, llegando un momento en que se estabiliza este fenómeno. Tanto los neutrófilos como los eosinófilos y basófilos tienen una cinética diferente acudiendo a los tejidos ante estímulos quimiotácticos, por lo que nuestros resultados estables son acordes con esta fisiología.

Nuestro grupo de enfermos es pequeño para extraer conclusiones firmes, sin embargo nos abre una vía de trabajo para la investigación de algunos aspectos:

- 1) Aumentar el número de enfermos y reforzar estas conclusiones.
- 2) Estudio del funcionalismo defensivo de los macrófagos en sus distintos aspectos: fagocitosis, emisión de citoquinas, etc.
- 3) Estudio de las subpoblaciones de macrófagos mediante la expresión de antígenos de membrana, contenido en enzimas lisosomales, capacidad de síntesis y secreción de linfoquinas y/o factores de crecimiento.
- 4) Posibilidad de utilización de estos conocimientos para manipular o modular la capacidad defensiva del peritoneo con sustancias como el GM-CSF y en última instancia prevenir consecuencias negativas como la peritonitis y la fibrosis peritoneal.

CONCLUSIONES

- 1) La celularidad de efluente peritoneal está constituido mayoritariamente por macrófagos y linfocitos, y en menor cantidad por células mesoteliales, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.
- 2) La cantidad total de células disminuye con el tiempo de tratamiento en DPCA, a expensas de la disminución de macrófagos, linfocitos y células mesoteliales, permaneciendo los granulocitos estables.
- 3) La cantidad total de células y cada subtipo no tiene relación con la incidencia de peritonitis, la función peritoneal ni con el diagnóstico inicial.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Johnston RB. Monocytes and macrophages. *N Eng, J Med* 1988; 318:747-752.
- 2) Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J. Clin invest* 1987; 79: 319-326.
- 3) Lamperi S. Immune defense mechanisms and peritonitis in peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis*, en Proc 3rd International Course on Peritoneal Dialysis, 1988 Vicenza, Italia.
- 4) Gerwin BI, Lechner JF, Reddel RR, Roberis AB, Robbins KC, Gabrielson EW, Harris CC. Comparison of production of transforming growth factor B and platelet derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines. *Cancer Res* 1987; 47: 6180-6184.
- 5) Holmes CJ, Lewis SL, Kubey WY, Van Epps DE. Comparison of peritoneal white blood cell parameters from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with a high or low incidence of peritonitis. *Am J Kidn Dis* 1990; 15: 258-264.
- 7) Lin CY, Ku WL, Huang TP. Serial peritoneal macrophage function studies in new and established continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol* 1990; 10: 368-373.

TABLA I
CELULAS EN EL EFLUENTE PERITONEAL

Tipo celular	Valor mínimo	Valor máximo	Media
--------------	--------------	--------------	-------

Células totales	0,300	22,500	6,959
Macrófagos	0,120	14,565	4,461
Linfocitos	0,098	8,910	1,617
Células mesoteliales	0	3,710	0,248
Neutrófilos	0	3,690	0,529
Eosinófilos	0	0,858	0,099
Basófilos	0	0,130	0,007

Todos los valores x 10⁶

TABLA II
CELULAS EN EL EFLUENTE PERITONEAL
Pacientes con más de 15 meses en DPIZA

<u>Tipo celular</u>	<u>Valor mínimo</u>	<u>Valor máximo</u>	<u>Media.</u>
Células totales	0,300	10,47	3,900
Macrófagos	0,120	8,480	2,550
Linfocitos	0,098	2,220	0,798
Células mesoteliales	0	0,182	0,047
Neutrófilos	0,001	3,690	0,399
Eosinófilos	0	0,858	0,101
Basófilos	0	0,058	0,004

Todos los valores x 10⁶

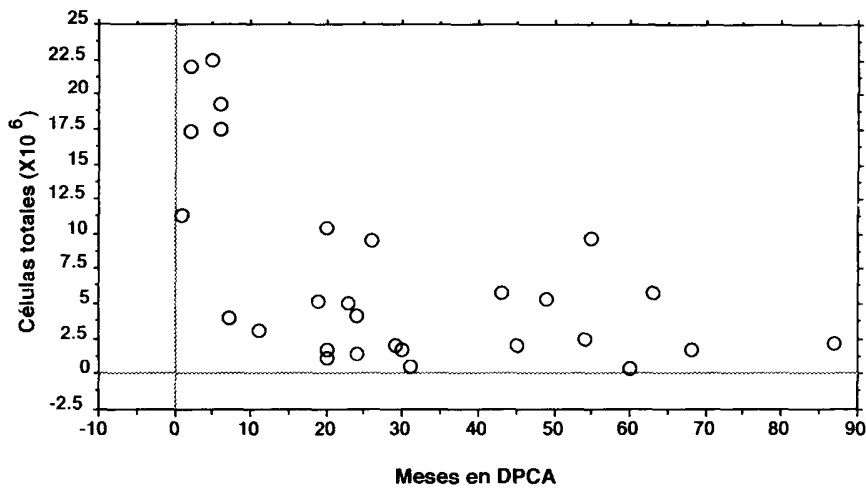


Figura 1: Relación entre el contenido total de células en el efluente peritoneal y el tiempo en DPCA. Existe una disminución progresiva del número de células que se estabiliza a los 15 meses aproximadamente.

FIGURA 2

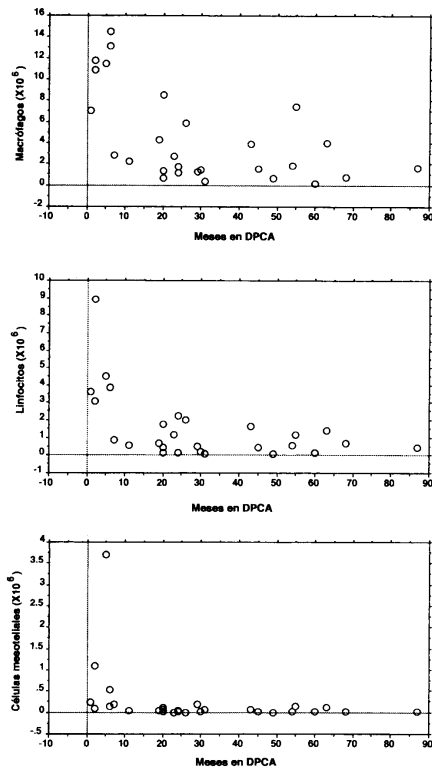


Figura 2: Relación entre el contenido total en macrófagos, linfocitos y células mesoteliales y el tiempo en DPCA. Existe una disminución progresiva de los tres tipos celulares.

FIGURA 3

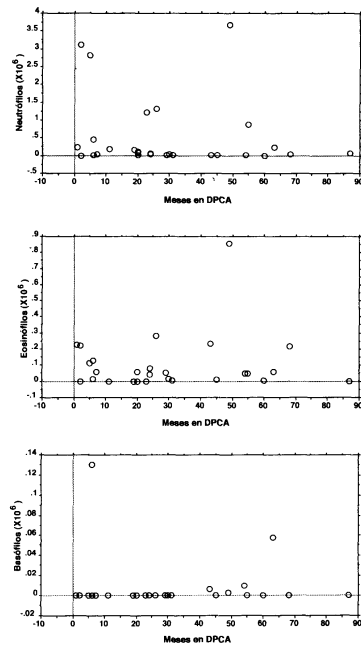


Figura 3: Relación entre el contenido total de neutrófilos eosinófilos y basófilos y el tiempo en DPCA. No se observa relación entre ellos.



Foto 1: Se observa una célula mesotelial binucleada junto a varios macrófagos poco diferenciados.



Foto 2: Se observan dos macrófagos con vacuolas fagocíticas bien constituidas con material de desecho En el centro un linfocito.

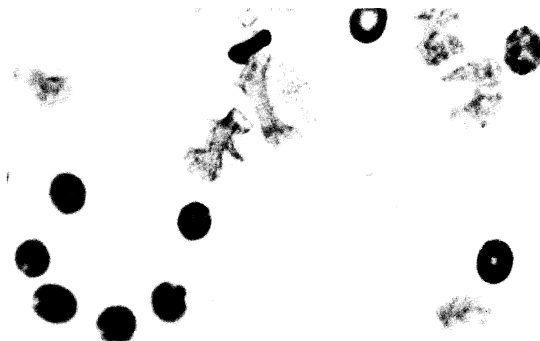


Foto 3: Se observan varios macrófagos, uno de ellos con abundantes bacterias fagocitadas.



Foto 4: Se observan 3 células mesoteliales formando una pequeña placa, junto a varios macrófagos y un linfocito.