

¿CÓMO EVITAR LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA GLUCOSA EN LOS LÍQUIDOS DE DIÁLISIS PERITONEAL?

Emma Martínez Martínez

Gambro

En esta presentación trataremos de explicar qué son los Productos de Degradación de la Glucosa. Nos referiremos a ellos como PDG's, que es la forma abreviada de llamarlos.

Explicaremos que tipo de impacto pueden tener, con especial enfoque en la toxicidad celular, la formación Productos Finales de la Glicosilación avanzada (PFGA) y las posibles consecuencias clínicas.

Finalmente mostraremos cómo es posible minimizar la exposición a PDG y cual es nuestra conclusión.

Introducción

Proceso de esterilización

Durante la esterilización por calor, las bolsas son introducidas en autoclaves a temperaturas de 120° C. Los autoclaves industriales son enormes y en consecuencia el tiempo para conseguir la temperatura adecuada es alto para alcanzar una buena esterilización de las bolsas de líquido peritoneal.

Durante el proceso, parte de la glucosa carameliza. El problema de la caramelización ha sido conocido después de largos años y ha sido solucionado disminuyendo el pH en los líquidos convencionales.

El bajo pH en los líquidos llevará a una baja descomposición de la glucosa. Sin embargo, observando la tolerancia del paciente, no es posible conseguir un pH por debajo de 5,5 con las bolsas convencionales. Ya que esto causaría daño celular y dolor a la infusión.

Al final de los 80 Enders Wieslander y su grupo de Gambro Investigación empezaron a ir más lejos analizando la toxicidad de los líquidos y en 1993 pudieron mostrar sustancias conocidas como Productos de Degradación de la Glucosa que se formaban durante el proceso de la esterilización por calor

PDG formados durante la esterilización por Calor

PDG formados durante la esterilización por calor.

Sustancias identificadas:

- acetaldehído
- formaldehído
- 5-HMF (5-Hidroximetilfuraldehído)
- metilglioxal
- glioxal
- 3-DG (3-Deoxiglucosa)

GAMBRO Ref: Nilsson-Thorell et al, PDI 1993 2001/RI

Los productos de degradación de la glucosa más comúnmente identificados en los líquidos de DP son:

- Acetaldehído
- formaldehído,
- 5- hidrometilfuraldehído,
- metilglioxal, glioxal
- 3deoxiglucosano (3DG)

La mayoría de estas sustancias pueden ser desconocidas para ustedes, pero si que están familiarizados con el formaldehído. Y sabiendo que hay gran cantidad de aldehídos en las bolsas convencionales que no son nada deseables, Wieslander y su grupo no solo identificaron los PDG's sino que ellos fueron capaces de cuantificar cuantos estaban presentes en las bolsas convencionales comercialmente disponibles y calcular la exposición anual de un paciente de diálisis peritoneal

Exposición de un paciente de DP a

Un paciente en DP está expuesto a:

Líquido DP	3 000-7 000 l
Glucosa	45-175 kg
↓ En 1 año	
Acetaldehído	30-70 g
Formaldehído	0.4-1.0 g
3-DG	60-150 g

GAMBRO 2001/RI

Anualmente un paciente, tipo, está expuesto de 3 a 7 toneladas de líquido dependiendo de el régimen seleccionado de DP. Esto significa que un paciente está expuesto de 45 a 175 Kg de glucosa. Con lo que observamos que se expone a 30-70 g de acetaldehído y de formaldehído a más de 1 g. La exposición a 3 DG está en el rango de 60-150 g. Pero Qué significa esto realmente para el paciente, ¿hay signos clínicos?

Efectos clínicos relacionado los PDG con el almacenamiento

Efectos clínicos del almacenaje del producto relacionado con la acumulación de PDG.

- Dolor a la infusión**
Henderson IS et al
in *Frontiers in Dialysis*
Field Rich, 1985
- Reducción del ultrafiltrado**
Henderson IS et al
in *Peritoneal Dialysis*,
Wichtig, 1986

Dolor en relación almacenaje del líquido de DP

almacenaje en meses

GAMBRO

A principio de los 80 como algunas publicaciones muestran, los líquidos antiguos, viejos, eran los que producían más dolor a la infusión. Aquí se vio la relación del almacenamiento con el dolor. Además el mismo autor mostró que el uso de líquidos con almacenamiento largo en el tiempo estaba acompañado de una reducción de la capacidad de UF.

Toxicidad de los PDG

Toxicidad de los PDG

Inhibición del crecimiento celular (L-929) por líquidos de DP.

Líquidos control

Líquidos esterilizados por calor

% inhibición del crec.celular

Líquido Control

Líquido esterilizado por calor

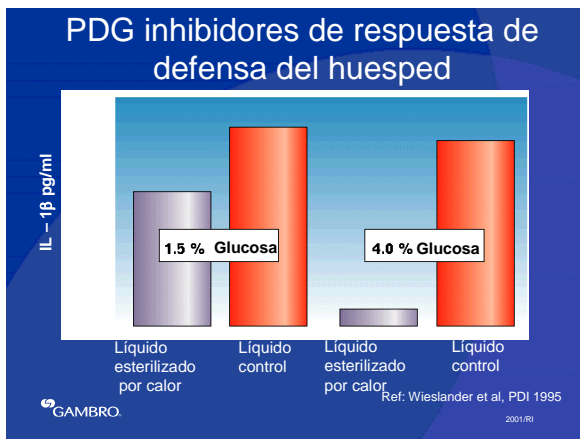
Ref: Wieslander et al, KI 1991

GAMBRO

Cuando observaron de cerca la toxicidad de los líquidos de DP Wieslander y su grupo usaron células de fibroblastos L929. Estas células, usadas comúnmente para ensayos in vitro, se usaban para examinar la toxicidad de los productos plásticos y los químicos. Fabricaron en el laboratorio un líquido esterilizado por Filtración como “control”, frente al esterilizado por calor. El pH del líquido se ajustó a 7.4 para excluir el impacto de un pH no fisiológico. La toxicidad de ambas soluciones fue determinada por la inhibición del crecimiento celular. Cuanto más alto es el grado de inhibición, más citotóxico es el líquido. Como puede ser observado en el diagrama de la derecha, la esterilización por calor causa un 76% de inhibición del crecimiento celular, mientras que si la esterilización es por filtración sólo supone una inhibición del 26%. Las fotos microscópicas muestran una clara diferencia de la viabilidad celular entre los líquidos.

4 bolsas convencionales de 4 empresas Gambro, Baxter y Fresenius fueron también testadas en el mismo estudio y se encontraron entre 53 y 75 % de inhibición del crecimiento celular. Estos hechos estimularon más allá la investigación

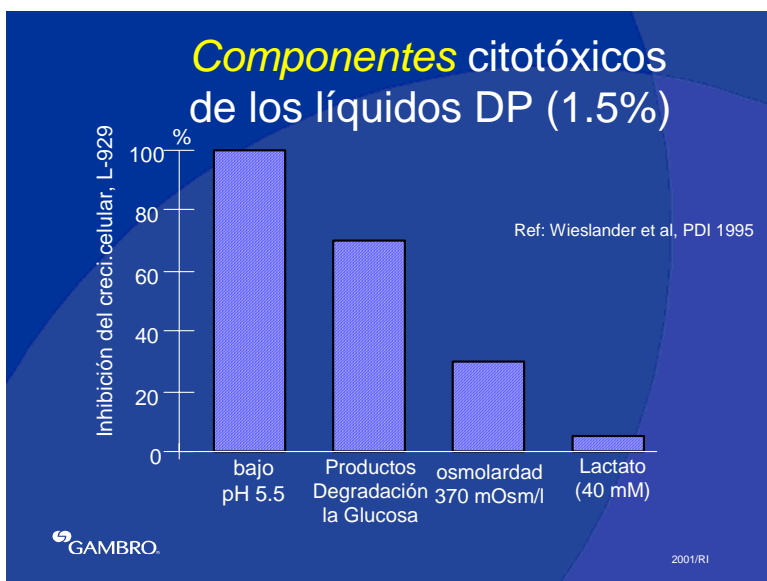
PDG: Inhibición de la respuesta de defensa del huésped.



En 1994 se mostró que la respuesta del huésped, que fue medida con liberación de la IL-1 β en la estimulación con endotoxinas (liposacáridos), era perjudicial cuando células periféricas estaban cultivadas en líquidos esterilizados por calor. Pero no disminuyó igual cuando se cultivó en líquido Filtrado. También se pudo observar que la alta concentración de glucosa del fluido es el más alto daño para a respuesta de defensa del huésped. Esto es debido al hecho de que el alto contenido de glucosa forma más PDG

El impacto clínico será reducir la respuesta inflamatoria y pudiera especularse con llevar a una alta incidencia de peritonitis en pacientes tratados con las bolsas convencionales.

Componentes citotóxicos de los líquidos de DP



La citotoxicidad, tiene obviamente, causas multifactoriales. Pero la pregunta es, ¿Cuáles de los distintos vectores no fisiológicos de los líquidos de DP tiene mayor impacto en la toxicidad? ¿Es la osmolaridad, el pH bajo, los PDG's o el lactato usado como buffer? Cuando testamos cada uno de estos vectores separadamente resulta que el pH de 5,5 causa el 100% de la inhibición del crecimiento celular. Los PDG's están en el ranking en el n° 2 causando más de el 70% de la inhibición. La osmolaridad sólo causa el 30% de la inhibición y el lactato no tiene ningún efecto significativo.

¿Cuáles son las consecuencias de exposición a los PDG's?

Consecuencias de exposición a PDG's

Consecuencias de PDG

Diariamente se usan líquidos de diálisis que contienen PDG.

↓

Formación de Productos Finales de la Glicosilación Avanzada (PFGA) con el irreversible daño de éstos a la membrana peritoneal

GAMBRO. 2001/RI

El uso diario de fluidos que contienen PDG's lleva a la formación de PFGA con irreversible daño a la membrana peritoneal. Antes de continuar deberíamos explicar como están relacionados los PDG con la formación de PFGA y también explicar brevemente sobre los PFGA.

Formación de PDG y su relación con los PFGA

Formación de PDG y su vínculo con los PFGA

Glucosa $\xrightarrow{T, t, pH}$ PDG

Aldehído
Metilglioxal
Glioxal
3-DG

Protein $-NH_2$ \rightarrow PFGA

GAMBRO. 2001/RI

Como mencionamos anteriormente la glucosa sufre una transformación química, en la cual influye el Tiempo, La Temperatura, y el pH. Esto nos lleva a la formación de PDG's y cuando éstos se ponen en contacto con el grupo amino de las proteínas ($-NH_2$) se formaran los PFGA. Es importante observar que los líquidos de DP no contienen PFGA. Estos no se pueden formar hasta que los PDG's se ponen en contacto con las proteínas. En otras palabras la formación de PFGA sólo se da cuando el líquido de DP ha sido infundido en la cavidad peritoneal.

Los PFGA

Productos Finales de la Glicosilación Avanzada..

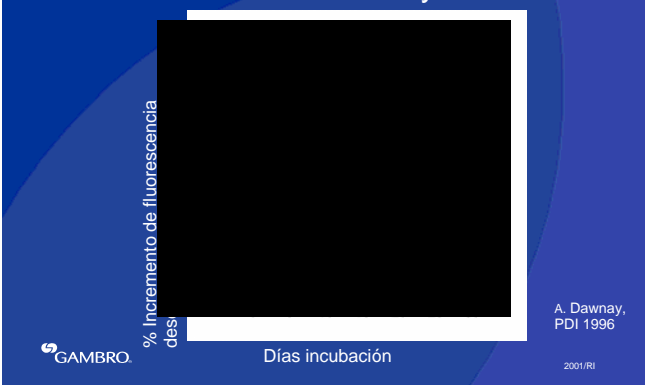
Características

● **Compuestos químicamente heterogeneos**

Los PFGA son químicamente compuestos heterogéneos con peso molecular entre 2 – 6000 daltons. Son los causantes del color dorado y se identifican por fluorescencia. El medir el grado de formación de de PFGA de la solución para ser testada es incubar la con albúmina humana y dejar que permanezca durante aproximadamente 30 días. En este periodo la actividad de la fluorescencia es observada a intervalos prefijados.

Los PFGA

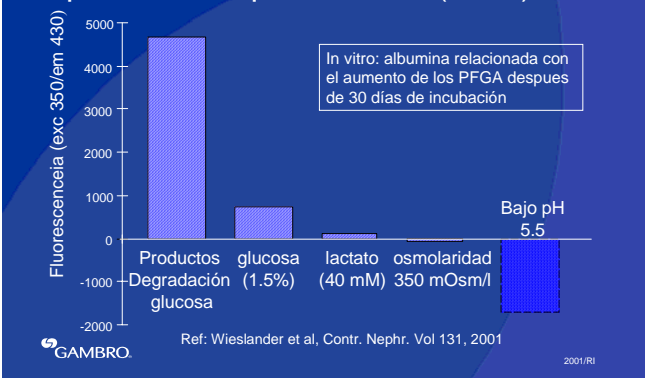
Formación de PFGA fluorescencia después de incubación con albúmina y PDG



En este estudio se incuban, con albúmina, líquidos esterilizados por calor y por filtración. Como podemos observar la esterilización por calor contiene PDG que causan un inmediato y significativo aumento de la actividad de la fluorescencia mientras que en el líquido esterilizado con filtración no hay un aumento de la actividad de la fluorescencia. La pregunta es si el rápido incremento de la fluorescencia se debe a los PDG o otros parámetros del líquido.

Los PFGA fomentados por componentes de del líquido de DP (1,5%)

Los PFGA son potenciados por otros aspectos del líquido de DP (1.5%)

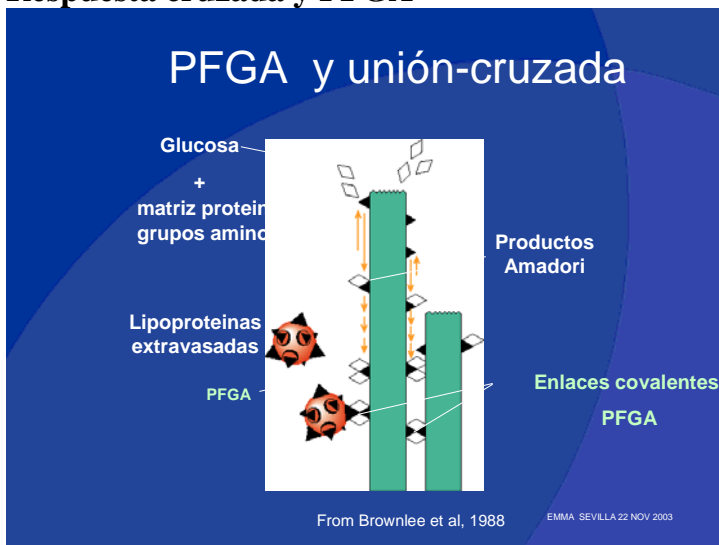


De nuevo cuando testamos los parámetros por separados resulta que los PDG son los más fuertemente promotores de la formación de la formación de PFGA, mientras que el bajo pH y la osmolaridad no tienen efectos en la formación de PFGA. La disminución en la formación de PFGA es por que hay un 85% de PDG más alto que por glucosa solo

PFGA

Otra característica de los PFGA es que dañan irreversiblemente los receptores proteínicos de la superficie celular, y causan una respuesta cruzada.

Respuesta cruzada y PFGA



Este esquemático dibujo muestra las principales respuestas cruzadas. Aquí vemos algunas proteínas de larga duración, p.e. colágeno, con grupos aminos en la superficie celular.

Cuando la glucosa o los PDG se ponen en contacto con estos grupos aminos forman lo que llamamos Productos de Amadori. Estos daños químicos son reversibles pero cuando otra transformación tiene lugar se formarán irreversiblemente los PFGA. Entonces estos pueden unirse a otros grupos aminos y tendrá lugar respuestas cruzadas.

Aquí vemos como el colágeno responde con lipoproteínas y otro colágeno. Estas respuestas cruzadas nos llevarán a una formación anormal del tejido.

PFGA- Cambios histológicos

Es creíble que la respuesta cruzada de las proteínas este relacionada con cambios histológicos en la membrana basal con consiguiente engrosamiento de la membrana

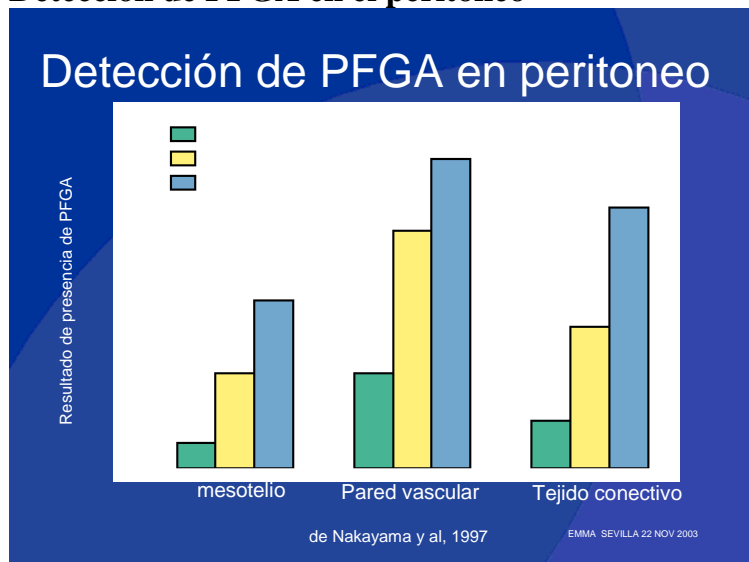
PFGA

Los **cambios de las membranas basales** han sido, previamente descritos en pacientes diabéticos y se cree que están relacionados en la patogénesis de las complicaciones diabéticas secundarias como la retinopatía y nefropatía. De hecho las concentraciones de PFGA encontrados en diabéticos son normalmente más altas de lo normal. En humanos sanos, normalmente, se eliminan los PFGA por vía renal pero cuando la Filtración glomerular decrece en el fallo renal la concentración de PFGA aumenta.

PFGA

PFGA se encuentran en pacientes con IRCT, tanto en pacientes en HD como en DP. Los pac. en DP son de más alto riesgo debido a la continua exposición de alta concentraciones de glucosa y PDG. La acumulación de PFGA parecen incrementarse con el tiempo en DP.

Detección de PFGA en el peritoneo



Nakayama de Japón demostró la presencia de PFGA en pac en DP en 1997. Él encontró PFGA permaneciendo en el mesotelio, en la pared vascular y en el tejido conectivo. Y como podemos ver, las cantidades más grandes de PFGA se encuentran en pacientes que llevan más tiempo en DP.

Las consecuencias de PDG

Consecuencias de los PDG
Diariamente se usan líquidos en DP con PDG

- La formación de PFGA con su unión irreversible a la membrana peritoneal
- Daño de la membrana
- Aumento de la permeabilidad a los solutos
- Pérdida de ultrafiltración y diálisis inadecuada

EMMA SEVILLA 22 NOV 2003

Ahora volvemos atrás con las consecuencias clínicas de los PDG. La formación y la irreversible unión de los PFGA a la membrana peritoneal puede, realmente dañarla. El llegar a engrosarse, hará un incremento de la neovascularización y la permeabilidad de solutos consecuentemente aumentará. Esto podría ser beneficioso desde el punto de vista de la purificación, pero el transporte de la glucosa está también incrementado con la consiguiente pérdida de ultrafiltración. Y esto puede llevar a una diálisis inadecuada y la necesidad de pasar a HD.

La pregunta es ¿cómo minimizamos el contenido de PDG en los líquidos de DP y mejoramos la biocompatibilidad del líquido para reducir el riesgo de esas consecuencias clínicas negativas?

Como minimizar los PDG en los Líquidos de DP

Cómo reducir los PDG's en los líquidos de DP

- Esterilización por filtración
- Esterilización más corta
- Bajo pH
- Concentración alta de glucosa
- Separación de las sustancias catalizadoras (calcio, magnesio y lactato)

EMMA SEVILLA 22 NOV 2003

Podemos esterilizar los líquidos por filtración, pero la legislación no aprueba aun esta técnica. Podríamos acortar el proceso de esterilización usando autoclaves más pequeños pero esto incrementaría el coste de las bolsas, tanto como la técnica de filtración. Podríamos bajar el pH, subir la concentración de glucosa y separar las sustancias catalizadoras como son el calcio y el magnesio.

Como diseñar un producto con Bajo PDG y un pH cercano al neutro

¿Cómo diseñar un producto con bajo contenido en PGD y con un pH cercano al neutro?

2 ó 3 compartimentos con óptima composición y óptimo tiempo/temperatura durante la esterilización por calor

¡óptimas condiciones mantenidas durante el almacenaje!

glucosa 50 %
pH 3.2

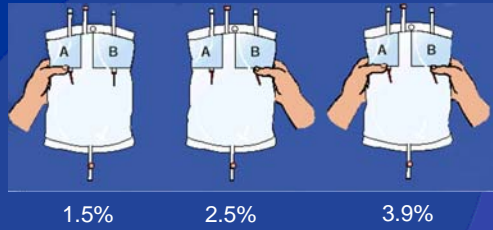
electrolitos
pH aprx. 6.6

EMMA SEVILLA 22 NOV 2003

La solución que Gambro da a este problema es muy inteligente: Separando físicamente la glucosa del resto de los electrolitos es posible reducir el pH en esos compartimentos a 3,2 y además aumentar la concentración de Glucosa al 50%. Esta es la forma óptima para evitar la formación de PDG. En el compartimiento grande el pH será lo suficientemente alto para que la mezcla de los dos, o tres, compartimentos justo en el momento del uso de un pH final más alto y más fisiológico que en comparación con los fluidos convencionales. Esta bolsa que inicialmente fue de 2 compartimentos y que llevo al desarrollo de la de 3 fue simplemente por el hecho de simplificar la logística para el paciente ya que este concepto ofrece la posibilidad de tener las 3 concentraciones de glucosa disponible en una sola bolsa. El concepto de óptimas condiciones es, sin embargo idéntico para ambos tipos de bolsa.

Con la simple rotura de un frangible del comprar, pequeño tiene la concentración 1.5%, si rompe el otro tiene glucosa al 2.5% y si rompe ambos tiene al 3,9%. Lo cual puede ser muy simple.

Utilización de Gambrosol trio



© SBO, 6 Avril 2001, Valenciennes

Los niveles de aldehídos en los líquidos de DP

Esta tabla muestra como las concentraciones de los aldehídos y 3 DG se reducen significativamente en la bolsa de 3 compartimentos comparándola con la bolsa convencional. Tanto los aldehídos como el 3DG se encuentran por debajo de los límites detectados

Niveles de aldehídos en líquidos de DP

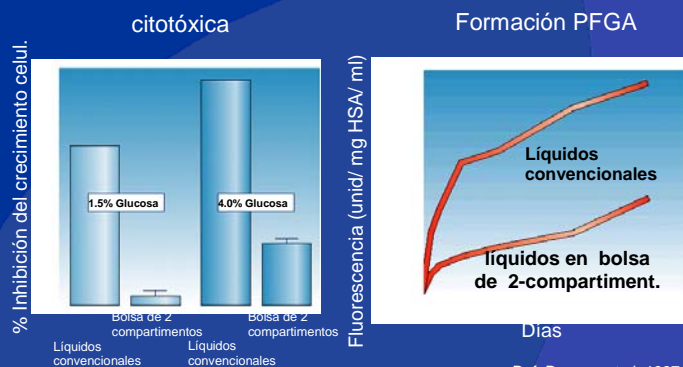
	Bolsa convencional	Bolsa 2Compartiment.
Acetaldehído	226.0 μM	< 1 μM
Formaldehído	4.6 μM	< 2 μM
Metilglioxal	22.7 μM	< 2 μM
3-DG	123.0 μM	< 13 μM

Ref: Wieslander et al, PDI 1995

EMMA SEVILLA 22 NOV 2003

Comparar la reactividad

Comparación de reactividad

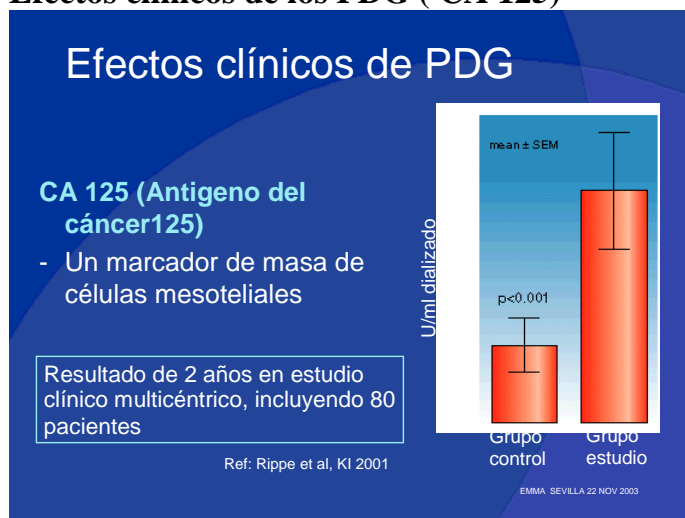


EMMA SEVILLA 22 NOV 2003

In vitro los estudios comparativos de los líquidos de 2 compartimentos con las bolsas convencionales muestran que las bolsas de 2 compartimentos tienen un efecto significativamente menos tóxico en el crecimiento celular que la bolsa tradicional.

Ann Dawnay además demostró que la formación de PDGA con la bolsa multicompartimental es significativamente menor que con la tradicional. La inclinación de la curva es idéntica para cada solución pero el inmediato y significativamente mayor incremento visto en la fluorescencia de las bolsas convencionales está claramente causado por el mayor incremento de PDG presente en esa bolsa.

Efectos clínicos de los PDG (CA 125)

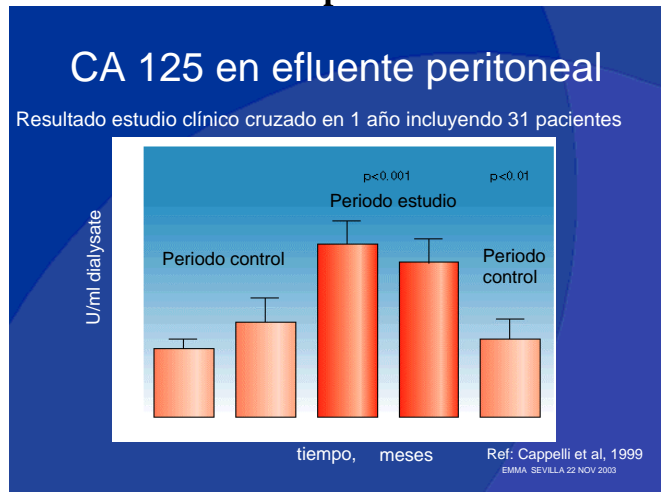


La bolsa de Gambro de 2 compartimentos, llamada Bio ha sido clínicamente probada en un estudio multicéntrico de 2 años de duración incluyendo a 80 pacientes. Los pacientes fueron divididos en 2 grupos, 40 en cada. Fue tratado con la bolsa de 2 compartimentos (grupo de estudio) y otro grupo (control) fue tratado con bolsas convencionales.

El CA 125 segregado por las células mesoteliales que revisten el peritoneo y el CA125 en el efluente peritoneal es hoy usado como marcador de la masa celular. La mayor cantidad de CA125 se cree que la mayoría de las células mesoteliales están presentes como protector de la capa de la membrana peritoneal.

Los pacientes del grupo de estudio, tratado con líquidos Bio tuvo un significativo mayor nivel de CA125 comparado con el grupo control tratado con bolsas convencionales.

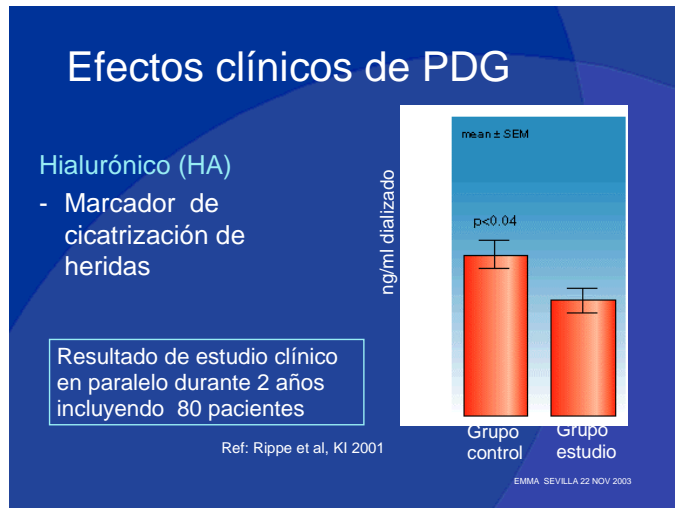
CA125 en el efluente peritoneal



Aquí hay otro resultado de un estudio multicéntrico en Italia que incluyó a 31 pac. Los pac fueron tratados inicialmente con las bolsas convencionales, después se les trató con bolsas Bio durante 3

meses. Como puede observarse los niveles de CA125 fueron bajos durante el 1^a periodo. Cuando se trataron con trio hubo un inmediato y significativo aumento del CA125. Cuando volvieron al líquido convencional las concentraciones de CA 125 bajaron significativamente de nuevo. Esto ilustra que es un fluido biocompatible que debe tener un importante impacto clínico en DP.

Efectos clínicos de los PDG's



Otro marcador de la integridad de la membrana peritoneal es el aci. Hialurónico. Es un marcador de cicatrización de heridas y formación de colágeno. Se cree que los niveles altos de hialurónico, lleva a la mayor grado de daño peritoneal.

Y de nuevo un grupo tratado con DP BIO muestra significativamente mejores resultados con baja concentración de hialurónico

Se debería apuntar que hay gran relación entre el CA125 y el aci. Hialurónico. Es, por tanto, importante seguir estos marcadores a través del tiempo para cada paciente y ver si hay algún cambio lo cual indicaría daño en la membrana peritoneal.

Con respecto al CA125 parece haber una disminución en la concentración con el tiempo en DP en relación inversa con lo que vemos con el aci. Hialurónico El paciente que más tiempo ha estado en DP parece ser el que posee la mayor concentración de hialurónico

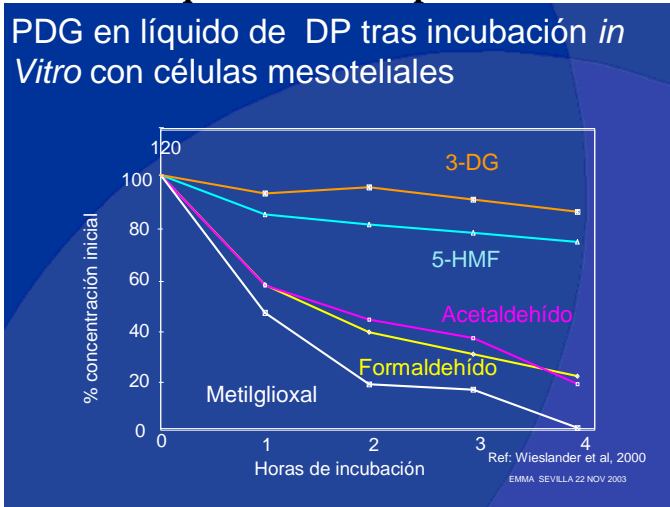
Crecimiento mesotelial Ex Vivo



Las células mesoteliales en mayor o menor modo afectadas por los diferentes fluidos de DP. Esta diapositiva muestra la viabilidad y crecimiento potencial de cel mesoteliales, las cuales han sido plantadas desde un efluente nocturno de pacientes tratados con bolsa de 3 compartimentos o con bolsas convencionales. Se necesitaron 10 días para llegar a alcanzar una confluencia de cel

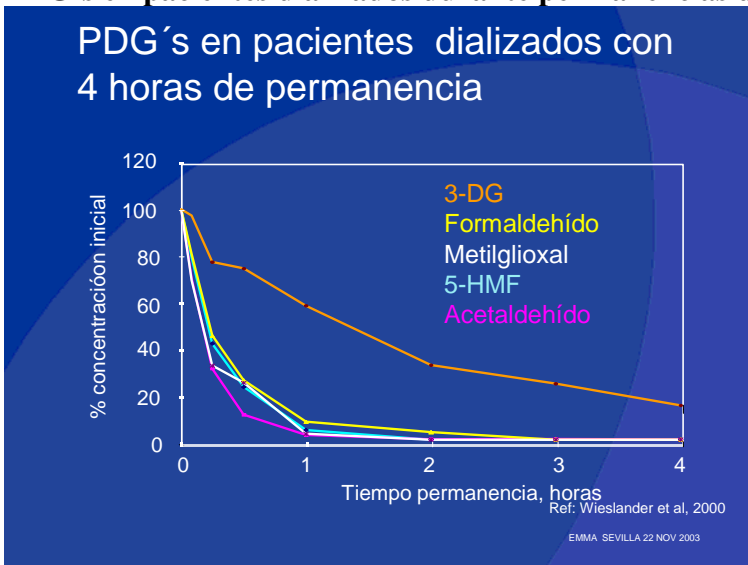
normales de la bolsa de 3 compartimentos mientras que llevó 17 días para conseguir celu del líquido convencional . Estas fotos se tomaron en el día 10.

PDG's en líquido de DP después de incubación In Vitro con cel mesoteliales.



Otro estudio con líquidos de DP y cel, mesoteliales muestra que la concentración de formalaldehídos y metilglioxal en los líquidos disminuye durante la permanencia de 3-4 horas. Estos significa que hay un transporte hacia el interior de las células. Por otro lado el 3 DG se considera un fuerte promotor de la formación de PFGA se queda igual

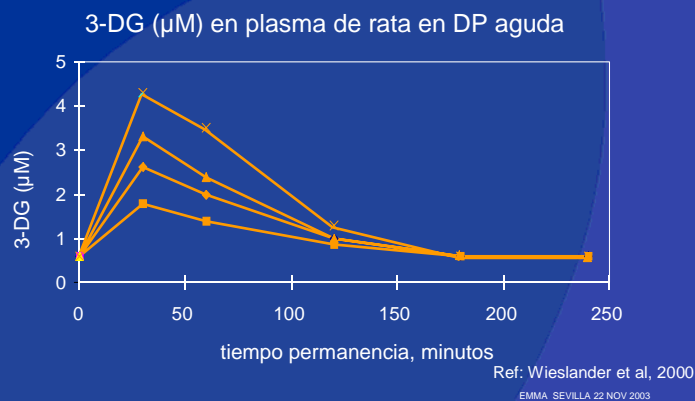
PDG's en pacientes dializados durante permanencias de 4 horas



Cuando medimos la concentración de aldehídos y 3 DG en pacientes que usan líquidos convencionales de DP se puede demostrar que los aldehídos desaparecen desde el dializado en la 1ª hora de permanencia. Más del 60% de el 3-DG ha desaparecido a las 2 horas y más del 80 % al final de 4 horas de permanencia.
¿pero que ocurre con el 3-DG si no es trasportado al interior de las células?

PDG's en plasma durante permanencias de 4 horas

3-DG en plasma con permanencias de 4-horas



Estudios en animales han mostrado que el 3DG en plasma incrementa entre los 30 primeros minutos de permanencia y luego disminuye de nuevo al valor de inicio a las 2 horas aproximadamente. Eso significa que el 3-DG entra en el torrente sanguíneo del mismo modo que la glucosa.

Resumen

Para resumir esta exposición sobre los PDG's diremos

- se forman durante la esterilización por calor de los líquidos de diálisis
- son compuestos reactivos y parecen reaccionar con las células de la membrana peritoneal
- son transportados al torrente circulatorio.
- son citotóxicos y su efecto en la función de las células basales que son comunes a todo tipo de las células de nuestro cuerpo.
- Son grandes promotores de la formación de PFGA local y sistemáticamente y tiene una influencia negativa en la duración de la membrana peritoneal

Conclusión

Si sabemos que los Productos de Degradación de la Glucosa (PDG's):

- Poseen probados efectos adversos
- NO aportan mejoras terapéuticas
- NO son beneficiosos para el paciente

Es hora de parar la infusión de PDG's a la cavidad peritoneal - especialmente desde que disponemos otras soluciones técnicas asequibles. y siempre utilizar todos los recursos disponibles para conseguir un máximo rendimiento en DP

Disponibilidad de Bolsas biocompatibles Gambrosol trio



- Gambrosol trio 10 Ca 1,75
 - Gambrosol trio 40 Ca 1,35
- } 2000ml, 2.500ml
5000ml.

EMMA SEVILLA 22 NOV 2003

Máximo rendimiento en DP



EMMA SEVILLA 22 NOV 2003