

MODIFICAÇÕES DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E CITOCINAS IL1, IL8 E TNF α DURANTE A HEMODIÁLISE COM DIFERENTES MEMBRANAS

Rev Port Nefrol Hipert 1996; 10 (3):207-219

ARTIGO ORIGINAL

HELENA OLIVEIRA SÁ, ANABELA MOTA PINTO*, MARIA JOÃO ANJOS*, ANTONIO PATRÍCIO, HENRIQUE GOMES, MÁRIO CAMPOS, MANUEL SANTOS ROSA*, ADELINO MARQUES

Serviço de Nefrologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra

* Centro de Imunologia da Faculdade de Medicina de Coimbra

RESUMO

Estudámos as modificações da expressão de marcadores celulares dos leucócitos do sangue periférico e as variações das concentrações plasmáticas das citocinas IL1, IL8 e TNF α numa população de 30 doentes insuficientes renais em hemodiálise, durante uma sessão diálise com dialisadores de cuprofano/fibras capilares (n=10), cuprofano/placas (n=10) e polissulfona (n=10). As colheitas de sangue foram efectuadas na via eferente do dialisador, no início, aos 15min e no final da sessão de diálise (180min).

Procedeu-se à análise celular por citometria de fluxo através da utilização de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos (anti CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD45 e CD56). Estudou-se igualmente a variação da expressão da fracção α (CD11b) da molécula de adesividade Mac-1 ou CR3 à superfície das células granulocíticas através da dupla marcação CD15CD11b. Paralelamente foram efectuados os doseamentos das concentrações plasmáticas das citocinas IL1, IL8 e TNF α por método de enzimoimunoanálise.

Recebido em: 26/04/1995
Aceite em 23/01/1996

Os resultados coligidos permitiram identificar a ocorrência de importantes alterações qualitativas e quantitativas das células leucocitárias do sangue periférico. As membranas derivadas da celulose (cuprofano), condicionaram alterações incidindo essencialmente nos granulócitos: baixa significativa do seu número aos 15º minuto da sessão com recuperação no final da sessão (180º minuto); neste momento os granulócitos apresentavam aumento significativo da expressão da molécula de adesividade CD11b. Quanto às membranas sintéticas de polissulfona assistiu-se à diminuição progressiva do número total de linfócitos, atingindo o máximo ao 180º minuto, sem modificação das proporções relativas das diferentes subpopulações de linfócitos. Observou-se aumento significativo das concentrações plasmáticas de IL8 e TNF α no final da diálise com os dialisadores de cuprofano/placas, e de IL1 com os dialisadores de polissulfona.

Considera-se, em conclusão, que as modificações intradiáliticas apontadas podem constituir um factor aditivo do risco infeccioso na população de doentes insuficientes renais em hemodiálise.

Palavras-chave: Leucócitos; Hemodiálise; Cuprofano; Polissulfona.

SUMMARY

LEUCOCYTE AND IL1, IL8, TNF α CHANGES DURING HEMODIALYSIS WITH CUPROPHANE AND POLYSULPHONE DIALYSERS

We studied the leukocyte and cytokines IL1, IL8 and TNF α modifications in a population of 30 hemodialysis patients, during one session of dialysis with cuprophane/hollow fiber (n=10), cuprophane/plates (n=10) and polysulphone (n=10) dialysers. Blood samples were obtained at the beginning, after 15 minutes and at the end of the dialysis session.

After staining with specific fluorescent monoclonal antibodies (anti CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD 19, CD45 e CD56), flow cytometric analysis was performed to evaluate the different leukocyte subpopulations. We studied the hemodialysis-induced changes in the expression of CD11b molecule (α subunit of Mac-1 adhesion molecule or CR3 receptor) in granulocytes. Finally, we also measured the IL1, IL8 e TNF α blood concentrations at the beginning, after 15 minutes and at the end of the dialysis session by enzymimmunoanalysis (ELISA).

With cellulosic membranes such as cuprophane we observed significant modifications in granulocytes. After 15 min there was notable neutropenia but by the end of dialysis the number of cells was identical to the onset. At the end of dialysis there was an upregulation of CD 11b molecule. During dialysis with polysulphone dialysers we observed a progressive decrease of number of lymphocytes (maximum at 180min). At the end of dialysis there was no change in the different subpopulations percentages of lymphocytes.

We observed an increase in blood concentrations of IL8 and TNF α in patients dialysed with cuprophane/plates dialysers and of IL1 in those dialysed with polysulphone.

The qualitative and quantitative modifications of leukocytes during hemodialysis, no matter the dialyser used, could be an additional risk factor of infection in the dialysis population.

Key-words: Leukocytes; Hemodialysis; Cuprophane; Polysulphone.

INTRODUÇÃO

Os doentes insuficientes renais crónicos (IRC) em hemodiálise apresentam elevada morbidade e mortalidade de etiologia infecciosa. Diferentes estudos efectuados demonstram que 15-20 % das mortes na população de doentes IRC em hemodiálise são de etiologia infecciosa⁽¹⁻³⁾. O acesso vascular para hemodiálise, constituindo uma porta de entrada fácil para microorganismos, e o estado de imunodepressão característico da insuficiência renal e malnutrição associada, são os principais factores determinantes da elevada incidência de infecção nessa população. Ultimamente, surgiram evidências de que a escolha da membrana de diálise pode também ter influência na susceptibilidade à infecção⁽⁴⁻⁷⁾. Consoante o tipo de dialisador ou membrana de diálise utilizados, assim a função de células como os neutrófilos ou os leucócitos mononucleares poderá ser mais ou menos modificada. Essas modificações intradialíticas vêm adicionar-se aos défices imunitários atribuíveis à urémia *per se*. Assim, um dos factores importantes no tratamento do doente IRC em hemodiálise, é a escolha dos materiais mais biocompatíveis, ou seja com menor capacidade de interferir com os diferentes sistemas biológicos.

De acordo com os parâmetros de biocompatibilidade definidos pela CCB (Consensus Conference on Biocompatibility, Alemanha, 1993)⁽⁸⁾, propusemo-nos estudar as alterações qualitativas e quantitativas sofridas pelas células leucocitárias do sangue periférico (neutrófilos e leucócitos mononucleares) e o perfil de secreção das citocinas interleucina 1 α (IL1 α), interleucina 8 (IL8) e Factor de necrose tumoral α (TNF α), durante a hemodiálise com três tipos de dialisadores.

DOENTES E MÉTODOS

Foram estudados 30 doentes IRC em programa

Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão

regular de hemodiálise com idade média $50,2 \pm 14,8$ anos de idade e tempo médio de diálise de 48 ± 42 meses. A etiologia da insuficiência renal era conhecida em 19 doentes (Doença poliquística AD: 2; Doença vascular hipertensiva: 4; Pielonefrite crónica: 8; Glomerulonefrite crónica: 2; D. Alport: 1; Nefropatia de refluxo: 2). Nos restantes 11 doentes a etiologia era indeterminada. À data do estudo os doentes encontravam-se clinicamente estáveis, sem sinais de doença infecciosa, neoplásica ou do sistema imunitário. Nenhum dos doentes fora submetido a transfusão sanguínea nos últimos 3 meses nem se encontrava sob terapêutica com corticosteróides, inibidores da enzima de conversão da angiotensina, α ou β bloqueantes. Todos os doentes foram previamente esclarecidos do objectivo do estudo, tendo anuído à sua realização através de consentimento assinado.

Constituíram-se três grupos; cada grupo ($n=10$) efectuou hemodiálise pelo menos durante 3 sessões com o mesmo tipo de dialisador e foi estudado posteriormente durante uma sessão com duração de três horas. Os dialisadores utilizados foram os seguintes: cuprofano/fibras capilares (CUP/F) (*Hemoflow E2, Fresenius, Suécia*), cuprofano/placas (CUP/P) (*Lundia Alpha 500, Gambro, Suécia*) e polissulfona/fibras capilares (Ps/F) (*Hemoflow F5, Fresenius, Suécia*). Cada sessão de diálise tinha 180min de duração, velocidade de fluxo de sangue 200-250 ml/min, bicarbonato como solução dialisante (500 ml/min) e heparinização intermitente (50 U/Kg inicial e 25 U/Kg à 2ª hora). As taxas de ultrafiltração variaram entre os 600 e 1000 ml/h. Foram colhidas amostras de sangue heparinizado (8 ml), na via eferente do dialisador, no início da diálise, aos 15 e 180 minutos.

Análise por citometria de fluxo

Cada amostra de sangue colhido foi analisada por citometria de fluxo através de um citómetro FacStar Plus (Becton - Dickinson, Mountain View, EUA). Procedeu-se à utilização de imunofluorescência directa para caracterização da expressão antigénica das diferen-

tes células leucocitárias. Para isso utilizaram-se anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, (anti CD3, anti CD4, anti CD8, anti CD14, anti CD15, anti CD19, anti CD45, anti CD56) cuja especificidade se resume no Quadro I. Para melhor individualização das diferentes populações leucocitárias utilizou-se a dupla marcação antiCD14/antiCD45 que permite uma boa separação dos granulócitos, monócitos e linfócitos.

QUADRO I

Especificidade dos anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais	Especificidade
anti CD3	linfócitos T
anti CD19	linfócitos B
anti CD4	linfócitos T helper
anti CD8	linfócitos T citotóxicos e supressores
anti CD14	monócitos
anti CD15	neutrófilos
anti CD45	leucócitos (antigénio comum)
anti CD56	células NK
anti CD11b	fracção α da $\beta 2$ integrina CD11bCD18 (Mac-1, Mo1)

Para além do estudo fenotípico das células leucocitárias com os anticorpos monoclonais referidos, estudou-se também a adesividade celular das células marcação antiCD 14/antiCD45 que permite uma boa separação dos granulócitos, monócitos e linfócitos.

Para além do estudo fenotípico das células leucocitárias com os anticorpos monoclonais referidos, estudou-se também a adesividade celular das células granulocíticas através da dupla marcação CD 15 CD 11b. A molécula CD 11b é a subunidade α da molécula de adesividade CD 11b CD 18 (Mac-1 ou Mo 1) que faz parte do grupo das $\beta 2$ integrinas. Essa molécula exprime-se à superfície dos neutrófilos e monóci-

tos e apresenta como ligandos principais a molécula ICAM-1 (células endoteliais, células epiteliais, linfócitos) e o produto de degradação do complemento C3bi.

Para cada análise procedeu-se à incubação de 100 µl de sangue com o painel de anticorpos monoclonais seleccionados durante 10min à temperatura ambiente. De seguida procedeu-se à lise eritrocitária durante 10min, com utilização de um reagente comercial (solução de lise hipotónica), a que se seguiu centrifugação durante 5min a 400 g (2000 rpm). Finalmente, efectuou-se lavagem em tampão salino e ressuspensão em 0,5 ml do mesmo tampão para análise final.

Doseamentos De Citocinas : IL1, IL8 e TNFα

Para cada amostra sanguínea foi efectuado o doseamento plasmático das citocinas IL1α, IL8 e TNFα, por método de enzimoimunoanálise (técnica ELISA com kits da *Immuntotech International*). As amostras foram conservadas em gelo até centrifugação e armazenadas a -80° até ao doseamento final, utilizando-se o mesmo kit para todas as amostras.

Apresentação de dados e análise estatística

Cada aquisição efectuada por citometria de fluxo compreendeu a análise de 10 000 células por segundo, sendo os valores expressos em termos de percentagem de células positivas para determinada marcação, relativamente ao número total de células analisadas. Para cada tipo de dialisador foram calculadas as médias (±s) aos 0, 15 e 180min e comparadas entre si (teste t de Student). Considerou-se como limite de significância um valor de $p \leq 0,05$.

Foram calculadas e comparadas entre si as médias (±s) das concentrações plasmáticas de citocinas respeitantes a cada grupo de doentes dialisados com o mesmo dialisador aos 0,15 e 180min (teste t de Student com diferença de médias significativa para $p \leq 0,05$). Comparou-se ainda a média das concentrações iniciais

de cada citocina com a média duma população controlo (60 indivíduos saudáveis de ambos os sexos; medições plasmáticas).

RESULTADOS

Variações quantitativas das células leucocitárias

Observou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da taxa de granulócitos aos 15min de diálise relativamente aos valores iniciais no grupo de doentes dialisados com dialisadores de CUP/F (Fig.1 e 2). Com os dialisadores de CUP/P observou-se

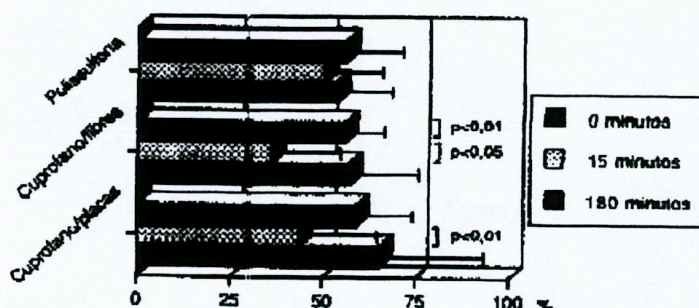


Fig. 1 - Variação do número de neutrófilos durante a diálise com dialisadores de CUP/F, CUP/P e PS/F, com colheitas de sangue na via eferente do dialisador e análise por citometria de fluxo. Salienta-se a neutropenia aos 15mn com os dialisadores de Cup (fibras: $p < 0,05$, placas: $p = 0,06$) e a recuperação do número de células aos 180mn.

também uma baixa assinalável dos granulócitos aos 15min que se encontrava no limiar da significância ($p = 0,06$). Relativamente ao grupo de doentes encontrava no limiar da significância ($p = 0,06$). Relativamente ao grupo de doentes dialisados com Ps/F, a variação dos granulócitos aos 15mn foi desprezível. No final da sessão de diálise (180min), assistiu-se à recuperação do número de granulócitos com as membranas de cuprofanofibra, que ultrapassou os valores iniciais (Fig.2).

A taxa de monócitos diminuiu aos 15min de diálise, relativamente aos valores iniciais, em qualquer dos

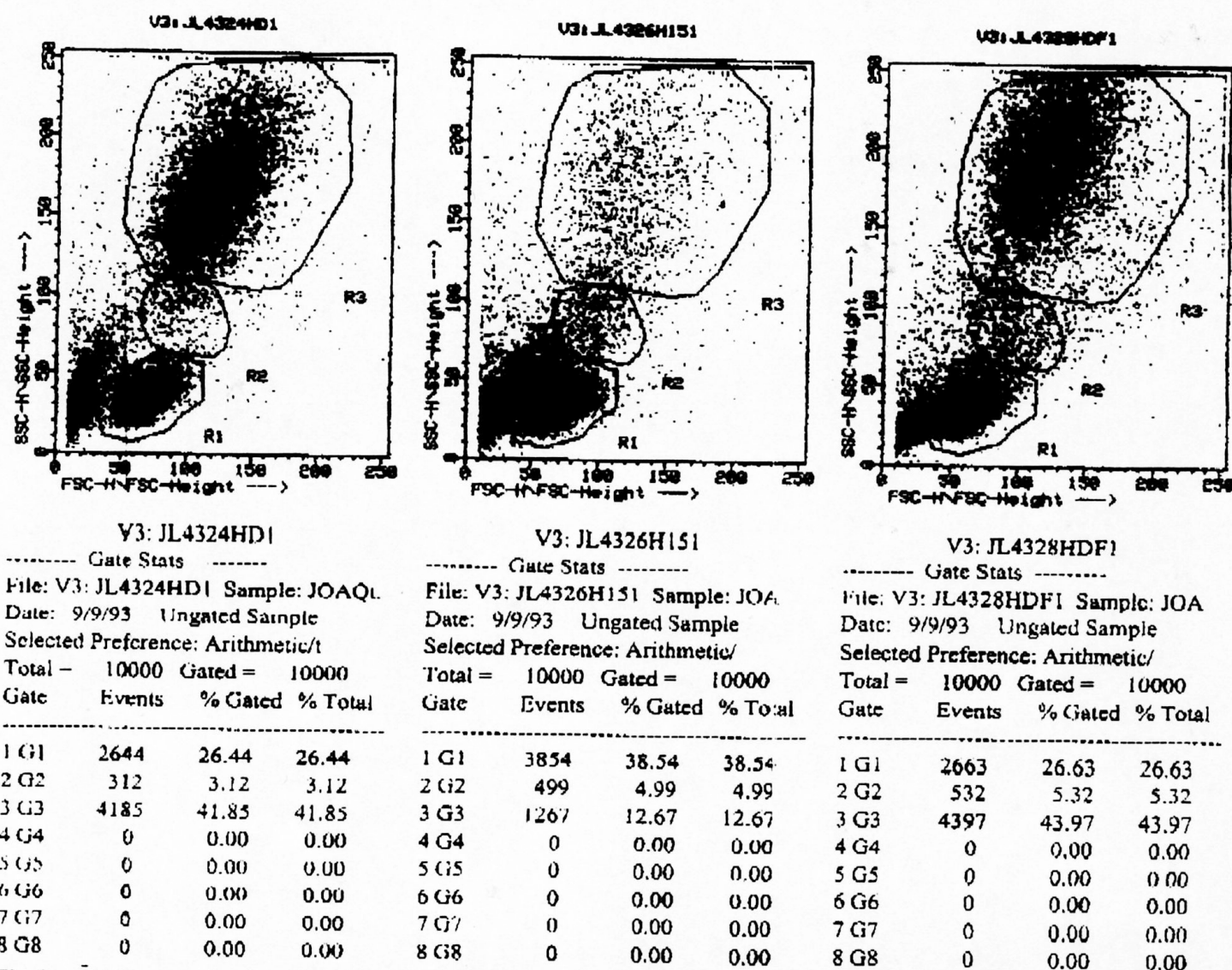


Fig. 2 - Neutropenia aos 15mn de diálise com membrana de CUP/F e recuperação do número de células aos 180mn. Os quadros à esquerda, centro e direita correspondem às imagens por citometria de fluxo das diferentes populações leucocitárias (linfócitos-R1, monócitos-R2, e neutrófilos-R3) aos 0, 15 e 180mn de diálise respectivamente.

grupos. Essa variação não foi estatisticamente significativa.

A taxa de linfócitos apresentou um aumento aos 15min e baixa aos 180min em ambos os grupos de doentes dialisados com membranas de cuprofan, relacionados com as variações absolutas, em sentido inverso, dos granulócitos. No grupo de doentes dialisados com dialisadores de Ps/F, observou-se uma baixa estatisticamente significativa da taxa de linfócitos no final da sessão de diálise em relação aos 0 e 15min (Fig. 3). Esta variação ocorreu apesar da ausência de modificação paralela do número de granulócitos.

Estudo das subpopulações linfocitárias

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas relativamente às médias das percentagens das diferentes subpopulações linfocitárias estudadas (linfócitos B, linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos, células NK) aos 0, 15 e 180min com qualquer tipo de dialisador, como se observa nas Figuras 4 e 5 respeitantes às subpopulações de linfócitos T helper (CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD8+) respectivamente.

Comparou-se a população total dos 30 doentes IRC

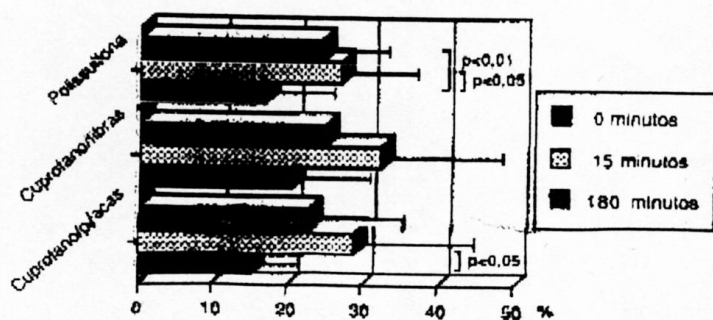


Fig. 3 - Variação do número de linfócitos durante a diálise com dialisadores de CUP/F, CUP/P e PS/F, com colheita de sangue na via eferente do dialisador e análise por citometria de fluxo. Com os dialisadores de CUP observa-se linfocitose e linfopenia relativas aos 15 e 180mn respectivamente, relacionadas com as variações inversas dos neutrófilos. Com os dialisadores de PS/F observa-se diminuição estatisticamente significativa do número de linfócitos no final da diálise relativamente aos 0 e 15mn ($p < 0.05$), sem variação paralela do número de granulócitos.

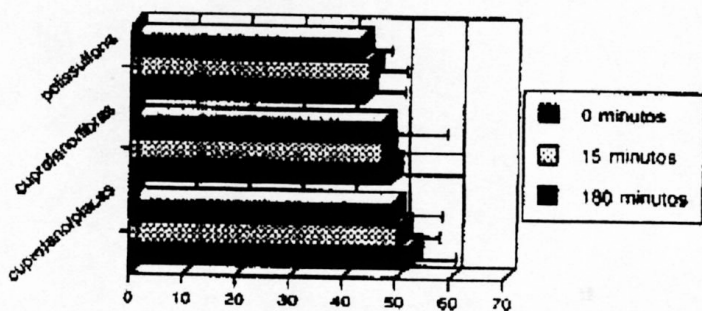


Fig. 4 - Sub-população linfocitária CD4+ (linfócitos T "helper") durante a diálise com dialisadores de CUP/F, CUP/P e PS/F ("gate" para linfócitos). Não se observa variação significativa do número de células no decurso da diálise com qualquer tipo de dialisador.

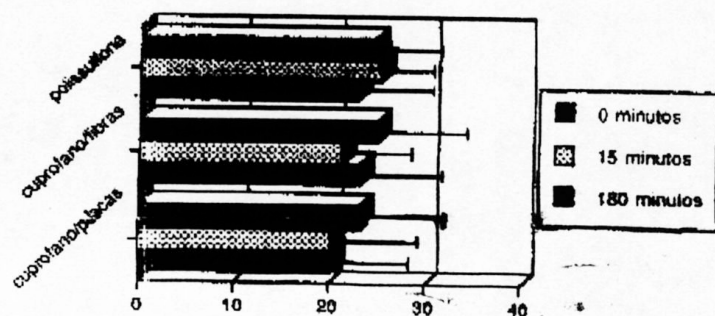


Fig. 5 - Sub-população linfocitária CD8+ (linfócitos T citotóxicos) durante a diálise com dialisadores de CUP/F, CUP/P e PS/F ("gate" para linfócitos). Não se observa variação significativa do número de células no decurso da diálise com qualquer tipo de dialisador.

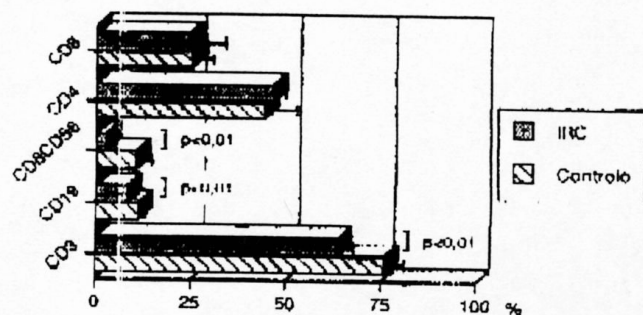


Fig. 6 - Sub-populações linfocitárias numa população controlo e no grupo de 30 doentes IRC estudados. As percentagens de linfócitos T totais, linfócitos B e células NK apresentam diferenças entre as duas populações ($p < 0.01$).

estudados com uma população de indivíduos normais (valores de referência nacionais), relativamente às médias das percentagens de linfócitos T totais, linfócitos B, linfócitos T helper (CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD8+) e células NK. Para o grupo de IRC considerou-se a média dos valores apresentados no início das sessões de diálise. Verificou-se existir um défice generalizado do número total de linfócitos na amostra de doentes IRC, que assumiu significado estatístico relativamente aos linfócitos T totais e células NK (Fig.6).

Expressão da molécula CD11b nas células CD15+

A diálise com dialisadores de CUP/F e P, caracterizou-se por um aumento estatisticamente significativo da expressão da molécula de adesividade CD11b nas células CD15+ (essencialmente granulócitos) aos 180min de duração da sessão de diálise relativamente aos 0 e 15min (Fig.7). Esta modificação torna-se mais relevante por ter ocorrido no mesmo grupo de doentes onde se observaram variações quantitativas significativas da série granulocítica no decorrer da sessão de diálise. Com os dialisadores de Ps/F não ocorreu modificação significativa da expressão da molécula de adesividade CD11b no mesmo tipo de células CD 15+.

MODIFICAÇÕES DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E CITOCINAS IL1, IL8 E TNF α DURANTE A HEMODIÁLISE COM DIFERENTES MEMBRANAS

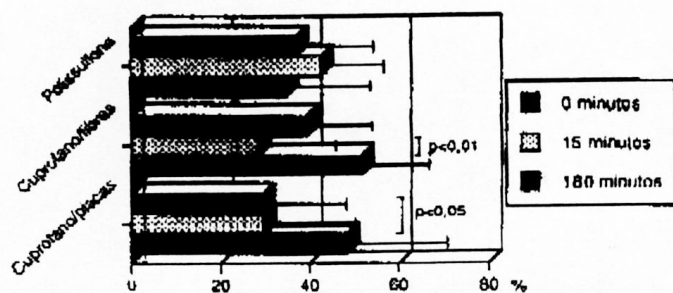


Fig. 7 - Expressão da molécula CD11b nas células CD15+ (granulócitos) durante a diálise com dialisadores de CUP/F, CUP/P e PS/F. Observa-se aumento da expressão da molécula CD11b aos 180mn de diálise com as membranas de cuprofanofibras.

Concentração plasmática da IL1 α , IL8 e TNF α

Os resultados dos dosamentos por ELISA das

citocinas IL1 α , IL8 e TNF α , no decurso da diálise com os diferentes dialisadores, estão representados no Quadro II em termos de médias ($\pm s$), indicando-se igualmente as médias dos valores plasmáticos para a população controlo.

As concentrações de IL1 α e de IL8 iniciais (0min) na população de doentes estudados não diferiram significativamente dos valores das médias respeitantes à população controlo. Relativamente ao TNF α , os valores de base no início da diálise eram significativamente mais elevados na população de IRC estudada relativamente à população controlo.

Compararam-se as concentrações das citocinas ($\pm s$) para cada dialisador aos 0, 15 e 180min para avaliar a modificação do perfil plasmático no decurso da diálise. Relativamente à IL1 α , apenas se encontrou diferença estatisticamente significativa no grupo de IRC dialisa-

QUADRO II

As concentrações plasmáticas ($\pm \sigma$) das citocinas IL1 α , IL8 e TNF α foram comparadas aos 0', 15' e 180' de duração da sessão de diálise para cada tipo de dialisador utilizando o teste -t Student (* p < 0.05; ⁽¹⁾ tempo de diálise utilizado na comparação das médias e para a qual a diferença foi significativa)

IL1 α (pg/ml) (μ plasma indivíduo normal: 5 pg/ml)	cuprofanofibras capilares		cuprofanoplacas		polissulfona	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ
0'	2.88	2.03	0.62	0.43	2.95	3.68
15'	2.53	1.33	0.58	0.44	3.28	3.45
180'	2.44	1.43	0.63	0.34	5.44 ⁽¹⁾	4.41
	μ	σ	μ	σ	μ	σ
IL8 (pg/ml) (μ plasma indivíduo normal: 859 pg/ml)						
0'	167.28	322.34	33.60	51.46	103.05	245.44
15'	165.81	324.74	32.79	30.73	103.05	187.04
180'	169.42	321.12	46.73 ⁽¹⁾	30.62	81.02	174.17
	μ	σ	μ	σ	μ	σ
TNF α (pg/ml) (μ plasma indivíduo normal: 5 pg/ml)						
0'	113.23	239.63	44.72	34.01	38.87	37.84
15'	81.24	147.64	49.75	35.59	47.13	49.77
180'	138.09	218.16	64.70 ⁽¹⁾	55.84	46.19	40.40

dos com polissulfona: aos 180min a concentração de IL1 era significativamente superior em relação aos 0 e 15min ($p < 0.05$). As concentrações de IL8 e TNF α apresentaram diferenças estatisticamente significativas no final da diálise no grupo de doentes dialisados com CUP/P, com aumento das concentrações de ambas as citocinas aos 120min em relação aos 15 e 0min respectivamente.

DISCUSSÃO

No estudo por nós efectuado observámos leucopenia à custa dos neutrófilos aos 15º minuto da sessão de diálise com os dialisadores de CUP/F e P ($p < 0.05$ para os dialisadores de fibras capilares) mas não com os dialisadores de PS/F (Fig.1). A neutropenia observada com os dialisadores de CUP tem duas explicações plausíveis segundo dados de diferentes estudos efectuados: a agregação dos neutrófilos circulantes entre si e ao endotélio vascular por aumento da expressão de receptores de adesividade celular (ex: CR3), com sequestração no território vascular mais acessível (microcirculação pulmonar) (12,14,15,24,25) e/ou a retenção de células na própria membrana de diálise por ligação aos produtos de activação e degradação do C3 (C3b,C3bi) aderentes à membrana (31). Os receptores celulares de adesividade e/ou ligação ao complemento são estimulados por fracções de activação do complemento solúveis como C5a (26-30). A activação do complemento com geração das anafilotoxinas C3a, C5a e seus derivados desarginados (C3adesArg, C5a desArg), após o contacto do sangue e membrana de diálise de natureza celulósica, para além de ser esperada pelo conhecimento da bioquímica do sistema, tem sido provada em diferentes estudos clínicos (9-14). Observa-se um máximo de activação do complemento aos 15º minuto da sessão de diálise (15-19), que reflecte o balanço entre a activação no circuito extracorporeal e a "clearance" dos produtos formados através de receptores celulares (20).

Para além do aumento da adesividade ao endotélio vascular e da agregação intercelular, os neutrófilos podem aderir à membrana de diálise através de "ligan-

dos" retidos à superfície (ex: C3b, C3bi) (Fig.8). Ch'ung e col. estudaram a aderência de células leucocitárias a membranas de cuprofano, tendo verificado que o tipo celular predominante eram os granulócitos e que a adesão à membrana podia ser inibida pela sua incubação prévia com anticorpos monoclonais específicos (ex: antiCR3) ou dos neutrófilos com anti CD11b(31).

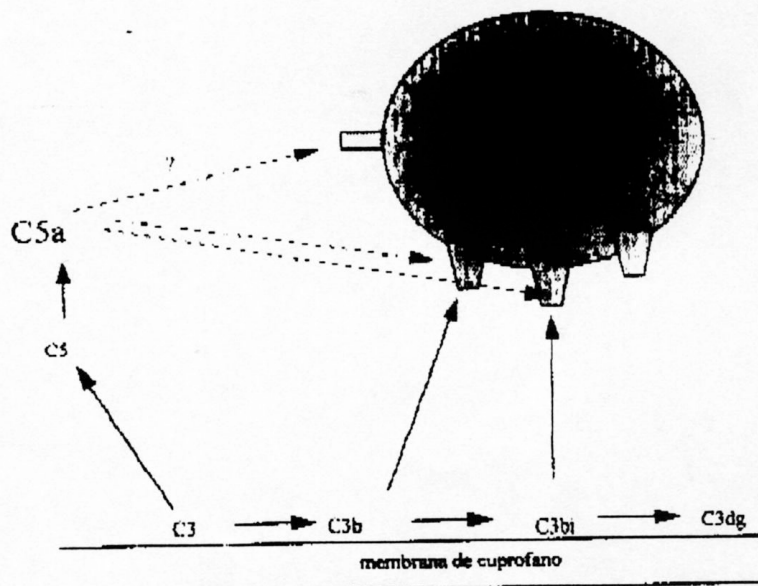


Fig. 8 — Activação do complemento e expressão de moléculas de adesividade após contacto com membranas de cuprofano.

Nos doentes submetidos a diálise com dialisadores de CUP observámos aumento estatisticamente significativo da expressão da molécula de adesividade celular CD11b nos granulócitos que deixavam o dialisador (via eferente) aos 180min de duração da sessão de diálise. O aumento da expressão da cadeia α (CD11b) da molécula de adesividade CR3 (CD11b/CD18) à superfície dos granulócitos no final da diálise, pode significar que essas células no decurso da diálise aderiram entre si ou à membrana de diálise e que esse processo culminou nas fases iniciais de activação celular (desgranulação). Após a adesão inicial ao endotélio vascular, estando ausentes factores estimulantes da migração transendotelial (ausência de mediadores quimiotácticos), ocorre uma modificação morfofuncional dos receptores de

adesividade celular. Esta modificação funcional dos receptores de adesividade celular tem como consequência final a libertação das células aderentes de novo para a circulação, permitindo descrever aquilo que alguns autores designaram de "fagocitose frustrada" (28,32). Em termos clínicos, o que é de valorizar neste fenómeno é que as células fagocitárias recuperadas apresentam défices funcionais graves e irreversíveis. Foi demonstrado em estudos *in vitro* que essas células apresentam diminuição da capacidade de aderência a culturas de células endoteliais (12), da quimiotaxia (33,34) e da capacidade de produção de radicais livres de oxigénio (35).

Aos 180min de duração da sessão de diálise, com os dialisadores de CUP, assistiu-se à recuperação do número de granulócitos, observando-se inclusive um aumento do número de células em relação aos valores iniciais. Para além do provável retorno à circulação dos neutrófilos aderentes, o aumento do número de células no final da sessão de diálise em relação aos valores iniciais, é indicativo de que provavelmente ocorre libertação de células a partir da medula óssea (37). Dois estudos recentes demonstram que factores estimuladores como o C5a são capazes de deprimir a síntese de radicais livres de oxigénio do "pool" de neutrófilos da medula óssea (34,38). Assim, os neutrófilos libertados a partir da medula óssea apresentam, provavelmente défices funcionais que se adicionam aos défices adquiridos durante a diálise dos restantes neutrófilos maduros circulantes. Estes défices funcionais, nomeadamente o prejuízo da fagocitose, coincidem precisamente com o período de maior risco de infecção por microorganismos patogénicos (ex: *Staphylococcus*), devido às portas de entrada ligadas à presença do circuito extracorporeal para hemodiálise.

De acordo com os resultados por nós observados, os neutrófilos parecem não ser particularmente afectados durante a diálise com dialisadores de PS/F. Estes resultados são explicados pelo facto dessas membranas apresentarem propriedades hidrofóbicas e serem pouco activadoras do complemento. Os leucócitos que apresentaram maiores modificações quantitativas no decurso da diálise com dialisadores de PS/F foram os

linfócitos. No final da sessão de diálise essas células apresentaram diminuição do seu número em relação ao observado no início da diálise e aos 15min ($p < 0.05$). Tem-se descrito linfocitopenia com défice do número de linfócitos T e B em doentes IRC submetidos ou não a hemodiálise regular (39-41), observação também por nós confirmada no grupo de doentes estudado em comparação com um grupo controlo (Fig. 6). Alguns défices imunitários dos doentes IRC como o aumento da incidência de infecções e neoplasias, a anergia cutânea, o aumento da sobrevida de enxertos de pele, a diminuição da resposta a estímulos antigénicos e a diminuição da actividade das células NK, podem ser explicados pela linfocitopenia associada à insuficiência renal. A diminuição do número de linfócitos durante o procedimento dialítico assume importância relevante ao contribuir para o reforço dos défices imunitários associados à IRC. Castiglione et col. observaram um predomínio de linfócitos B no total de linfócitos retidos em dialisadores de polissulfona no final de uma sessão de diálise (42). No presente estudo não observámos variação na distribuição das diferentes subpopulações linfocitárias no decurso da diálise.

Em 1983, a IL1 foi proposta como a principal responsável por alguns sintomas frequentes nos doentes IRC durante a diálise (hipotensão, hipertermia) (43). Posteriormente, outros mediadores também do grupo das citocinas como TNF, IL6, IL8 têm sido reconhecidos como intervenientes nas modificações agudas intradialíticas (44,45).

As concentrações de IL1 α apenas se elevaram significativamente no final da sessão nos doentes submetidos a diálise com dialisadores de PS/F. A activação preferencial das células monocíticas produtoras de IL1 nesse grupo de doentes, poderá dever-se à presença de endotoxina na solução dialisante e passagem para a circulação sanguínea. Uma observação interessante por nós constatada foi a inexistência de concentrações elevadas de IL1 α na população de doentes estudados no início da diálise em relação à média dos valores observados numa população normal. Alguns estudos efectuados por outros autores utilizando membranas derivadas da celulose, levaram a concluir

que a hemodiálise por si só poderia ser responsável pela elevação crónica das concentrações de IL1 (46-48). Num desses estudos foi feita a comparação das concentrações de IL1 em doentes com IRC terminal e doentes IRC em hemodiálise tendo-se verificado que os doentes IRC em hemodiálise apresentavam valores significativamente mais elevados (47). Estes resultados não são consistentes já que outros estudos não evidenciam elevação das concentrações de citocinas como a IL1 no plasma de doentes IRC em hemodiálise em comparação com uma população controlo (49,50). A discrepância de resultados observados demonstram a vulnerabilidade dos doseamentos estáticos de citocinas como a IL1, que se relaciona com a existência de inibidores plasmáticos das citocinas (específicos e não específicos) e com a variação interindividual da sua produção em resposta a um estímulo. Esses factores podem explicar as diferenças interindividuais nas concentrações plasmáticas de IL1, IL8 e TNF por nós observadas no início da sessão de diálise na amostra de doentes estudados. Mais importante que o doseamento estático de citocinas como a IL1 é a sua medição dinâmica.

Relativamente ao TNF α - proteína não glicosilada com 17 Kda de peso molecular e sintetizada pelos monócitos, macrófagos e alguns linfócitos T observámos elevação das concentrações plasmáticas em todos os doentes estudados. Esta elevação apenas assumiu significado estatístico com os dialisadores de CUP/P ($p < 0.05$). As concentrações plasmáticas de TNF α numa população normal são em geral baixas (<5pg/ml) elevando-se abruptamente após injeção endovenosa de lipopolissacarídeo (LPS). Os níveis mais elevados desta citocina são observados na situação clínica de choque séptico (51,52) Na população de doentes IRC por nós estudada, observámos níveis de TNF α no início da diálise muito superiores aos valores esperados numa população normal (Quadro II), o que pode ser explicado por um estado de activação crónica das células produtoras ou por um défice de eliminação relacionado com a insuficiência renal.

A IL8 é um peptídeo activador dos neutrófilos, com propriedades quimiotácticas para este grupo de células. É secretada essencialmente por monócitos, mas também

por neutrófilos, linfócitos e células endoteliais, após estimulação por outras citocinas (IL1, TNF α , IL6) ou por estímulos como LPS (53). *In vitro* a IL8 é capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesividade como a Mac-1 à superfície dos neutrófilos promovendo a sua adesividade a células endoteliais que exprimem a molécula ICAM-1 (54) Sob influência desta citocina é possível observar-se um aumento da libertação de neutrófilos da medula óssea (55).

No estudo por nós efectuado, observámos uma elevação estatisticamente significativa das concentrações plasmáticas de IL8 no final da sessão de diálise no grupo de doentes dialisados com dialisadores de CUP/P. Este grupo foi aquele em que se observou neutropenia mais acentuada aos 15º minuto, com recuperação do número de células no final da diálise. O aumento da expressão da fracção alfa (CD11b) da molécula de adesividade Mac-1 no final da sessão de diálise no grupo de doentes dialisados com dialisadores de CUP/P e F (Fig. 7), pode ser também determinado pela acção da IL8, potenciando a acção doutros factores como as fracções activas solúveis do complemento (C3a e C5a). As concentrações plasmáticas de IL8, no grupo de doentes IRC estudados, apresentaram valores médios mais baixos do que os observados numa população controlo, apesar da grande variação interindividual. Esta observação pode dever-se ao facto da IL8 ser uma proteína de baixo peso molecular dialisável, ou a um défice de produção e libertação para a circulação na população de doentes IRC estudados.

CONCLUSÕES

1. Durante uma sessão de hemodiálise, independentemente do dialisador e/ou membrana utilizados, observámos alterações qualitativas e quantitativas das células leucocitárias.

2. As membranas derivadas da celulose (cuprofano), caracterizaram-se essencialmente por conduzir a alterações dos granulócitos. Observou-se uma baixa significativa do número de células aos 15min de diálise com recuperação no final da sessão. Aos 180min as

células da linha granulocítica apresentaram um aumento significativo da expressão da molécula de adesividade CD11b, para o que podem contribuir a presença de estímulos como fracções de activação do complemento (ex:C5a) ou citocinas (ex: IL8). O aumento da expressão da molécula de adesividade CD11b no final da diálise sem que se verificasse neutropenia sugere a libertação dos granulócitos dos seus ligandos, provavelmente por falta dos estímulos necessários à saída da circulação. Essas células remanescentes em estado de preactivação ("primed") poderão apresentar défices funcionais que comprometem a função de defesa contra microorganismos e aumentam o risco infeccioso na população de doentes IRC em diálise.

3. A diálise com membrana sintética de polissulfona conduziu à baixa progressiva e significativa do número de linfócitos (máximo aos 180min). No final da sessão de diálise a distribuição equitativa das diferentes subpopulações linfocitárias não se alterou em relação à distribuição inicial.

4. Observaram-se diferenças no perfil estático das citocinas IL 1, IL8 e TNF na população de doentes IRC em hemodiálise relativamente a uma população controlo. Durante uma sessão de hemodiálise ocorreram modificações das suas concentrações, independentemente do dialisador. Todavia, a grande variação interindividual na produção de dada citocina perante um mesmo estímulo, as suas semi-vidas curtas, a possibilidade de haver activação da transcrição dos genes codificadores das diferentes citocinas sem ocorrer a sua libertação para o exterior das células e finalmente a presença de inibidores plasmáticos, determinam a vulnerabilidade das medições das concentrações plasmáticas de citocinas. Métodos baseados na medição intracelular do RNAm resultante da transcrição dos genes codificadores das citocinas (técnica de Northern blot ou após amplificação por PCR), poderão traduzir com mais rigor o grau de activação celular das células produtoras de citocinas.

Nota: Trabalho subsidiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde.

Correspondência:
Dra. Helena Oliveira Sá
Serviço de Nefrologia
Hospitais da Universidade de Coimbra
Av. Dr. Bissaya Barreto
3030 COIMBRA

REFERÊNCIAS

1. Keane WF, Maddy MM. Host defenses and infectious complications in maintenance hemodialysis patients. In: Maher JF, ed *Replacement of Renal function by dialysis*, 3rd ed. Kluwer Academic Publishing 1989; 865-80.
2. Himmelfarb J, Hakim RM. Biocompatibility and risk of infection in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 (suppl. 2):138-44.
3. Mailloux LU, Bellucci AG, Wilkes BM et al. Mortality in dialysis patients: analysis of the causes of death. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 326-35.
4. Vanholder R, Ringoir S, Dhondt A, Hakim RM. Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients: A prospective and cross sectional study. *Kidney Int* 1991; 39: 320-7.
5. Levin NS, Zasuwa G, Dumier F. Effect of membrana type on causes of death in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 335 (abs).
6. Roccatello D, Mazzucco G, Coppo R et al. Function changes of monocytes due to dialysis membranes. *Kidney Int* 1989; 35:622-31.
7. Lewis SL, Van Epps DE. Neutrophil and monocyte alterations in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1987; 9: 381-95.
8. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 (suppl. 2).
9. Colton CK, Ward RA, Shaldon S. Scientific basis for assessment of biocompatibility in extracorporeal blood treatment. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 (suppl.2): 11-7.
10. Chenoweth DE. Anaphylatoxin formation in extracorporeal circuits. *Complement* 1986; 3:152-65.
11. Descamps-Latscha B, Goldfarb B, Nguyen AT et al. Establishing the relationship between complement activation and stimulation of phagocyte oxidative metabolism in hemodialysed patients: a randomized prospective study. *Nephron* 1991; 59: 279-85.
12. Lewis SL, VanEpps DE, Chenoweth DE. Leucocyte C5a receptor modulation during hemodialysis. *Kidney Int* 1987; 31:112-20.
13. Himmelfarb J, Gerard NP, Hakim RM. Intradialytic modulation of granulocyte C5a receptors. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 520-26.
14. Hurl WH, Feinstein EI, Wanner C, Frischmuth N, Gosele A, Massry SG. Plasma levels of main granulocyte components during hemodialysis. *Am J Nephrol* 1990; 10: 53-7.

15. Craddock PR, Fehr J, Dalwasso AP, Brigham KL, Jacob HS. Hemodialysis leukopenia. pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyser cellophane membranes. *J Clin Invest* 1977; 59: 879-88.
16. Chenoweth DE, Cheung AK, Henderson LW. Anaphylatoxin formation during hemodialysis: Effects of different dialyser membranes. *Kidney Int* 1983; 24: 764-69.
17. Hakim RM, Fearon DT, Lazarus JM. Biocompatibility of dialysis membranes: Effects of chronic complement activation. *Kidney Int* 1984; 26: 194-200.
18. Cheung AK, Parker CJ, Janatova J. Analysis of complement C3 fragments associated with hemodialysis membranes. *Kidney Int* 1989; 35: 576-88.
19. Cheung AK, Parker CJ, Janatova J, Wilcox L, Janatova J. Activation of the alternative pathway of complement by hemodialysis membranes. *Kidney Int* 1989; 36: 257-65.
20. Schulman G, Hakim RM. Recent advances in the biocompatibility of hemodialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 1991; suppl.2:10-3.
21. Klemptner MS, Gallini JJ, Balow JE, Van Kammer DP. The effect of hemodialysis and C5a desarg on neutrophil subpopulations. *Blood* 1980; 55: 777-83.
22. Hakim RM, Lowrie EG. Hemodialysis-associated neutropenia and hypoxemia: the effect of dialyser membrane materials. *Nephron* 1982; 32:32-9.
23. DeBacker WA, Verpoetenn GA, Borgonjow DJ, Vermeire PA, Lins RR, De Broe ME. Hypoxemia during hemodialysis: effects of different membranes and dialysate compositions. *Kidney Int* 1983; 23: 738-43.
24. Jacobs AA, Ward RA, Wellhausen SR, McLeish KR. Polymorphonuclear leukocyte function during hemodialysis: relationship to complement activation. *Nephron* 1989; 52: 119-24.
25. Alvarez V, Pulido R, Campanero MR, Paraiso V, de Landázuri MO, Sánchez Madrid F. Differentially regulated cell surface expression of leukocyte adhesion receptors on neutrophils. *Kidney Int* 1991; 40: 899-905.
26. Lee J, Hakim RM, Fearon DT. Increased expression of the C3b receptor by neutrophils and complement activation during hemodialysis. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 205-14.
27. Himmelfarb J, Zadni P, Hakim RM, Holbrook D. modulation of granulocyte Lam-1 and Mac-1 during dialysis - a prospective randomized controlled trial. *Kidney Int* 1992; 41: 388-95.
28. Cheung AK, Parker CJ, Hohnholt M. $\beta 2$ integrins are required for neutrophil degranulation induced by hemodialysis membranes. *Kidney Int* 1993; 43: 649-60.
29. Arnaout MA, Hakim RM, Todd RF, Dana N, Colten HR. Increased expression of an adhesion promoting surface glycoprotein in the granulocytopenia of hemodialysis. *N Engl J Med* 1985; 312: 457-62.
30. Thylén P, Lundahl J, Fernvik E, Hed J, Svensson SB, Jacobson SH. Mobilization of an intracellular glycoprotein (Mac-1) on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Am J Nephrol* 1992; 12: 393-400.
31. Cheung AK, Hohnholt M, Gilson J. Adherence of neutrophils to hemodialysis membranes: Role of complement receptors. *Kidney Int* 1991; 40: 1123-33.
32. Henson PM. Interaction of cells with immune complexes: Adherence, release of constituents and tissue injury. *J Exp Med* 1971; 134: 114s-135s.
33. Skubitz KM, Craddock PR. Reversal of hemodialysis granulocytopenia and pulmonary leukostasis. A clinical manifestation of selective down-regulation of granulocyte responses to C5adesarg. *J Clin Invest* 1981; 67: 1383-91.
34. Cohen MS, Elliot DM, Chaplinski T, Pike MM, Nidel JE. A defect in the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes that remain in circulation early in hemodialysis. *Blood* 1982; 6 (vol.60):1283-89.
35. Himmerfarb J, Lazarus JM, Hakim R. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 271-6.
36. Kolb G, Fischer W, Schoenemann H et al. effect of Cuprophane, Hemophan and polysulfone membranes on the oxidative metabolism, degranulation reaction, enzyme release and pulmonary sequestration of granulocytes. *Contrib Nephrol* 1989; 74:10-21.
37. Brubaker HL, Nolph KD. Mechanisms of recovery from neutropenia induced by hemodialysis. *Blood* 1971; 5 (vol.38): 623-31.
38. Lewis SJ, Van Epps DE, Chenoweth DE. C5a receptor modulation on neutrophils and monocytes from chronic hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Clin Nephrol* 1986; 26: 37-44.
39. Crowley JP, Valeri CR, Metzger JB, Pono L, Chazan JA. Lymphocyte subpopulations in long term dialysis patients: a case-controlled study of the effects of blood transfusion. *Transfusion* 1990; 30 (7): 644-47.
40. Revillard JP. Immune deficits in hemodialysis patients. *Rev Prat* 1990; 40 (7): 609-12.
41. Ramirez G, Wener D, Murtha DG, Brueggemeyer CD, Rowlands DT. Mononuclear cell phenotyping in a hemodialysis population. *Int J Artif Organs* 1988; 11 (5): 361-5.
42. Castiglione A, Paglioro P, Romagnoni M, Beccari M et al. flow cytometric analysis of leukocytes eluted from hemodialysers. *Nephrol Dial Transplant* 1991; suppl.2: 31-5.
43. Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S. Hemodialysis hypotension: the interleukin-1 hypothesis. *Blood Purif* 1983; 1: 3-8.

44. Stefani S, Nanni Costa A, Buscaroli A, Coli L, Feliciangeli G. Cellular immunology in regular dialysis: a biological model for biocompatibility evaluation. *Nephrol Dial Transplant* 1991; suppl.2: 4-9.
45. Pereira BJJ, Dinarello CA. Production of cytokines and cytokine inhibitory proteins in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 (suppl.2): 60-71.
46. Bingel M, Lonnemann G, Koch KM, Dinarello SA, Shaldon S. Plasma interleukin-1 activity during hemodialysis. The influence of dialysis membranes. *Nephron* 1988; 50: 273-76.
47. Herbelin A, Nguyen AT, Zingraff J, Urena P, Descamps-Latscha B. Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Kidney Int* 1990; 37:116-25.
48. Lonnemann G, Bingel M, Koch KM, Shaldon S, Dinarello CA. Plasma interleukin-1 activity in humans undergoing hemodialysis with regenerated cellulose membranes. *Lymphokine Res* 1987; 6: 63-70.
49. Holmes C, Evans R, Ross D, Frankamp P. plasma IL-1 and TNF levels during high flux hemodialysis with cellulose triacetate membranes. *Kidney Int* 1990; 37: 301 (abs).
50. Powell AC, Bland I., Oettiger CW et al. Lack of elevation of plasma interleukin 1 β or tumor necrosis factor α during unfavorable hemodialysis conditions. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:1007-13.
51. Damas F, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M. Tumor necrosis factor and interleukin 1 serum levels during severe sepsis in humans. *Critical Care Med* 1989;;17: 975-8.
52. Leeper Woodford SK, Carey PD, Byrne K, Jenkins JK, Fisher BJ. Tumor necrosis factor: α and β subtypes appear in circulation during onset of sepsis induced lung injury. *Am Rev Respi Dis* 1991;143 :1076-82.
53. Martich GD, Danner RI., Caska M, Suffredini AF. detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: The effect of antiinflammatory agents. *JExp Med* 1991;173:1021-24.
54. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz R, Baggiolini M, Cohn Z. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD 11b/CD 18 on human neutrophils. *J Exp Med* 1990; 173:1155-62.
55. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCP-1: novel inflammatory cytokines inducible by IL1 and TNF. *Cytokine* 1989;1:2-13.