



# *El medio urémico altera las propiedades hemostáticas de células endoteliales humanas en cultivo y aumenta la producción de factor von Willebrand*

M. Serradell, M. Díaz-Ricart, M. J. Zurbano, J. López-Pedret\*, A. Ordinas, G. Escolar y A. Cases\*

Servicios de Hemoterapia-Hemostasia y Nefrología\*. Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona.

## RESUMEN

*El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad del suero urémico de modificar las propiedades hemostáticas del endotelio. Para ello se analizó el efecto del medio urémico sobre la morfología y resistencia al flujo de las células endoteliales, así como la trombogenicidad de la matriz subendotelial generada por las células endoteliales.*

*La exposición de células endoteliales en cultivo a un suero urémico indujo alteraciones en su morfología y un crecimiento acelerado de las mismas. Cuando las células endoteliales en cultivo eran expuestas a sangre circulante el desprendimiento de las mismas era superior cuando fueron cultivadas en suero urémico (22% vs 13%). La adhesión de plaquetas y la formación de agregados eran superiores en las matrices subendoteliales generadas en presencia de medio urémico ( $40,23 \pm 6,43\%$  vs  $25,42 \pm 2,69\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ). Asimismo, se detectó un aumento en la expresión de antígeno del factor von Willebrand mediante métodos inmunocitoquímicos en las matrices subendoteliales urémicas ( $17,1 \pm 4,2\%$  vs  $13,57 \pm 3,98$ ,  $p < 0,05$ ) y la de la expresión de su ARNm en células endoteliales ( $213,24 \pm 6,13$  vs  $200,77 \pm 7,52$ ,  $p < 0,05$ ).*

*Estos resultados indican que el medio urémico altera la función endotelial in vitro y aumenta la trombogenicidad del subendotelio. Estos cambios podrían estar implicados en el aumento del riesgo cardiovascular y de sufrir fenómenos trombóticos que presentan los pacientes con insuficiencia renal crónica.*

**Palabras clave:** *Uremia. Células endoteliales. Factor von Willebrand. Plaquetas.*

Recibido: 8-III-2001.  
Revisión definitiva: 5-IX-2001.  
Aceptado: 25-IX-2001.

**Correspondencia:** Dr. Aleix Cases  
Servicio de Nefrología  
Hospital Clínic  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona  
E-mail: acases@medicina.ub.es

## URAEMIC MEDIUM ALTERS ENDOTHELIAL FUNCTION AND INCREASES THE THROMBOGENICITY AND VON WILLEBRAND FACTOR EXPRESSION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX

### SUMMARY

*We have investigated the ability of serum from uremic patients to modify the thrombogenic properties of the endothelium. The effect of the uremic media on the morphology of ECs, and their resistance to flow was analyzed. The reactivity of the extracellular matrix (ECM) generated by ECs towards normal platelets was evaluated in a parallel-plate perfusion chamber. Exposure of ECs to uremic media resulted in abnormal morphology and signs of accelerated growth. Detachment of ECs exposed to circulating blood was increased when cells had been grown with media supplemented with uremic serum (22% vs 13%). Platelet deposition and formation of aggregates were significantly elevated on ECMs generated in the presence of uremic media ( $40.23 \pm 6.43\%$  vs  $25.42 \pm 2.69\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). Immunocytochemical methods detected an enhanced expression of von Willebrand factor antigen on uremic ECMs (uremic  $17.1 \pm 4.2\%$  vs control  $13.57 \pm 3.98\%$ ,  $p < 0.05$ ) and its mRNA expression in endothelial cells (uremic  $213.24 \pm 6.13$  vs control  $200.77 \pm 7.52$ ,  $p < 0.05$ )*

*These results suggest that uremic medium alters endothelial function and impairs the antithrombotic functions of cultured endothelial cells. This effect may contribute to the increased cardiovascular and thrombotic risk reported in ESRD patients.*

Key words: **Uremia. Endothelial cells. Von Willebrand factor. Platelets.**

### INTRODUCCIÓN

Los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal en programa de diálisis presentan alteraciones complejas de la hemostasia. Estos pacientes presentan una diátesis hemorrágica, que se ha atribuido principalmente a una disfunción plaquetaria<sup>1</sup>. A pesar de la existencia de esta trombopatía, estos pacientes presentan una elevada prevalencia de complicaciones cardiovasculares y trombóticas<sup>2,3</sup>. El riesgo de muerte cardiovascular es de 10 a 20 veces superior a la de la población general de edad y sexo similares<sup>4</sup>. El incremento del riesgo cardiovascular en estos pacientes no puede ser explicado únicamente por la elevada prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos, tales como la hipertensión, hiperlipemia, diabetes, tabaquismo, hipertrofia ventricular izquierda; por lo que se ha invocado el papel contribuyente de otros factores de riesgo cardiovascular no clásicos, entre los cuales estaría la disfunción endotelial<sup>5,6</sup>.

Las células endoteliales juegan un papel fundamental en el mantenimiento del balance hemostático<sup>7</sup>; y recientemente se ha demostrado que la disfunción endotelial es el evento inicial fundamental en el proceso que culmina en la aterosclerosis<sup>8</sup>. En

los pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis se ha demostrado la existencia de una disfunción endotelial en estudios *in vivo*<sup>5,6</sup>. Asimismo, estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que el medio urémico altera las propiedades de las células endoteliales humanas en cultivo<sup>9</sup>. Cambios en el balance hemostático de estas células endoteliales podrían contribuir al desarrollo de aterosclerosis y trombosis, observados en los pacientes urémicos<sup>10-12</sup>.

El factor von Willebrand es una proteína derivada del endotelio implicada en la regulación de la hemostasia<sup>13</sup>. La elevación de los niveles circulantes de este péptido se asocia con daño endotelial y predice el desarrollo y progresión de la enfermedad cardiovascular en la población general<sup>14</sup>. Los niveles plasmáticos de factor von Willebrand, así como de otras proteínas de origen endotelial, están elevados en los pacientes en hemodiálisis<sup>15,16</sup>, sugiriendo la existencia de una lesión endotelial en estos pacientes, la cual se ha relacionado con la existencia de una aterosclerosis acelerada en la uremia<sup>10-12</sup>.

El presente estudio investigó el impacto del medio urémico sobre las propiedades hemostáticas de las células endoteliales. Con este objetivo, las células endoteliales fueron cultivadas en presencia de suero

urémico o suero control y se analizaron los cambios en la morfología celular, la trombogenicidad de las matrices extracelulares (equivalente al subendotelio vascular) generadas por estas células endoteliales y la expresión de factor von Willebrand en las mismas.

## MÉTODOS

Las células endoteliales fueron obtenidas a partir de venas de cordón umbilical humanas y cultivadas con medios de crecimiento específicos suplementados con un «pool» de suero de donantes sanos procedentes del Banco de Sangre del hospital (n = 10) o de pacientes con insuficiencia renal crónica terminal en programa de hemodiálisis en nuestra unidad (n = 10). Ningún paciente en hemodiálisis era diabético, fumador o hiperlipémico. Ni los sujetos sanos ni los pacientes tomaban fármacos que pudiesen afectar el funcionalismo plaquetario. Las muestras de sangre de los pacientes fueron obtenidas inmediatamente antes de iniciar la sesión de hemodiálisis.

Tras alcanzar la confluencia, se evaluó la morfología, la adhesividad de estas células endoteliales en condiciones de flujo y la trombogenicidad de la matriz extracelular generada y su perfil anticoagulante. Los estudios se realizaron en condiciones de flujo en una cámara de perfusión plana ( $800 \text{ s}^{-1}$  de estrés de cizalladura durante 5 minutos). También se analizó la presencia de factor von Willebrand en matrices subendoteliales mediante marcaje con oro coloidal y la expresión de ARm de este factor en células endoteliales.

### Cultivo de células endoteliales

El cultivo de células endoteliales se realizó siguiendo el método descrito por Jaffe y cols.<sup>17</sup> con algunas modificaciones<sup>18</sup>. Básicamente, las células endoteliales fueron extraídas a partir de cordones umbilicales por acción enzimática de la colagenasa (0,2% en PBS, 15 min a  $37^\circ \text{C}$ ), y mantenidas en medio de cultivo MEM199, suplementado con 100 U/ml penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  estreptomycin, glutamina 4 mM y una mezcla al 20% de suero humano. Las células fueron mantenidas en una estufa a  $37^\circ \text{C}$  y con un 5% de  $\text{CO}_2$ . El medio de cultivo fue renovado totalmente cada 48 horas, con la finalidad de eliminar restos celulares y aportar nuevos nutrientes a las células. Tras el segundo pase, las células endoteliales fueron subcultivadas sobre cubreobjetos de vidrio contenidos en placas de cultivo

para los estudios de perfusión, y para los estudios de marcaje con oro coloidal, o en frascos de Roux de  $50 \text{ cm}^2$  para extracción de RNA.

### Cultivo de células endoteliales con suero urémico

Para los experimentos con suero urémico, el medio de cultivo fue suplementado con 20% de suero del cual un 30% o un 50% eran suero urémico. El medio de cultivo fue suplementado con suero urémico o control desde el segundo pase y hasta su utilización en experimentos, aproximadamente 15 días.

### Estudios de perfusión

Para los estudios de perfusión, las células fueron sembradas en placas de cultivo con cubreobjetos de  $18 \times 18 \text{ mm}^2$ . La matriz extracelular generada por las células fue obtenida tratando las monocapas celulares con una solución de EGTA al 3% durante 60 minutos a  $37^\circ \text{C}$  y la monocapa obtenida fue utilizada para posteriores análisis.

Los cubreobjetos con células endoteliales (CEs) y matrix extracelular (MEC), fueron colocados en la cámara plana<sup>19,20</sup> y perfundidos con sangre anticoagulada con heparina de bajo peso molecular. Las muestras de sangre para los estudios de perfusión fueron obtenidas de voluntarios sanos (n = 5), los cuales no habían ingerido ningún fármaco que pudiera afectar al funcionalismo plaquetario en los últimos 10 días antes de la donación. La extracción fue realizada mediante punción de una vena antecubital y anticoagulada con heparina de bajo peso molecular (Fragmin<sup>®</sup>, 20 U/ml).

Los experimentos de perfusión se realizaron durante 5 minutos, a un índice de cizalladura de  $800 \text{ s}^{-1}$  y todo el sistema fue mantenido a  $37^\circ \text{C}$ . Después de la perfusión, los cubreobjetos fueron lavados con un tampón fosfato salino (PBS) y fijados con glutaraldehído al 0,5% durante 24 horas a  $4^\circ \text{C}$ . Después de ser fijados, los cubreobjetos fueron lavados y teñidos con una solución de azul de toluidina al 0,2%, en PBS, durante 5 minutos. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados para su posterior evaluación morfométrica en face.

### Evaluación morfométrica en face

El grado de deposición plaquetaria y el oro incorporado sobre las MEC fue evaluado morfométricamente mediante microscopía óptica «en face»,

con un sistema de análisis de imágenes computerizado<sup>21</sup>. Mediante una cámara de vídeo, las imágenes fueron transferidas a un ordenador personal provisto de una tarjeta gráfica y un programa informático (SigmaScan Pro, Jandel Scientific, Alemania) que permite analizar las imágenes una vez digitalizadas y grabadas de manera automática.

### Marcaje con oro coloidal del factor von Willebrand

Los cubreobjetos cubiertos con MECs fueron fijados por paraformaldehído al 4% en PBS 0,15 M, pH 7,4 (4° C, 10 minutos). Posteriormente, fueron lavados con PBS e incubados con un anticuerpo policlonal de conejo contra el factor de von Willebrand humano (DAKO Diagnósticos, S. A., Barcelona, España) (dilución 1: 750, 40 minutos, temperatura ambiente). Después de eliminar el exceso de anticuerpo mediante lavados sucesivos con PBS, los cubreobjetos fueron incubados con un segundo anticuerpo marcado con oro coloidal (IgG de cabra conjugado con oro contra IgG de conejo, Amersham Pharmacia Biotech) (dilución 1: 2.000, 40 minutos a temperatura ambiente)<sup>22</sup>. El exceso de anticuerpo fue eliminado mediante lavados sucesivos con PBS. Para poder visualizar las partículas de oro coloidal unidas al antígeno, las muestras fueron tratadas con un procedimiento de intensificación con plata (IntenSE Silver Enhancement reagent, Amersham Pharmacia Biotech)<sup>22</sup>.

### Determinación del ARNm para el factor de von Willebrand en células endoteliales en cultivo

La expresión del ARNm que codifica el factor von Willebrand fue analizada en las células endoteliales en presencia de suero normal y en presencia de suero de pacientes con insuficiencia renal crónica. Las muestras de ARN total fueron obtenidas a partir de  $4-5 \times 10^6$  células endoteliales con una solución de Tripure<sup>®23</sup>, siguiendo la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi<sup>24</sup>. La concentración de ARN fue medida por espectrofotometría a 260 nm. La cantidad relativa de ARNm para el factor de von Willebrand fue estimada por «Northern-Blot» después de electroforesis en geles de agarosa al 1%, preparada con TBE 1X. Después de la electroforesis, el ARNm fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con una sonda específica marcada con P<sup>32</sup>. La sonda específica para el factor de von Willebrand fue cedida por el Dr. P. Tjernberg y Dr. J. Eikenboom (Trombosis en Hemostase Research Centrum, Leiden, Netherlands).

### Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente usando el test de la *t* de Student para datos apareados. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

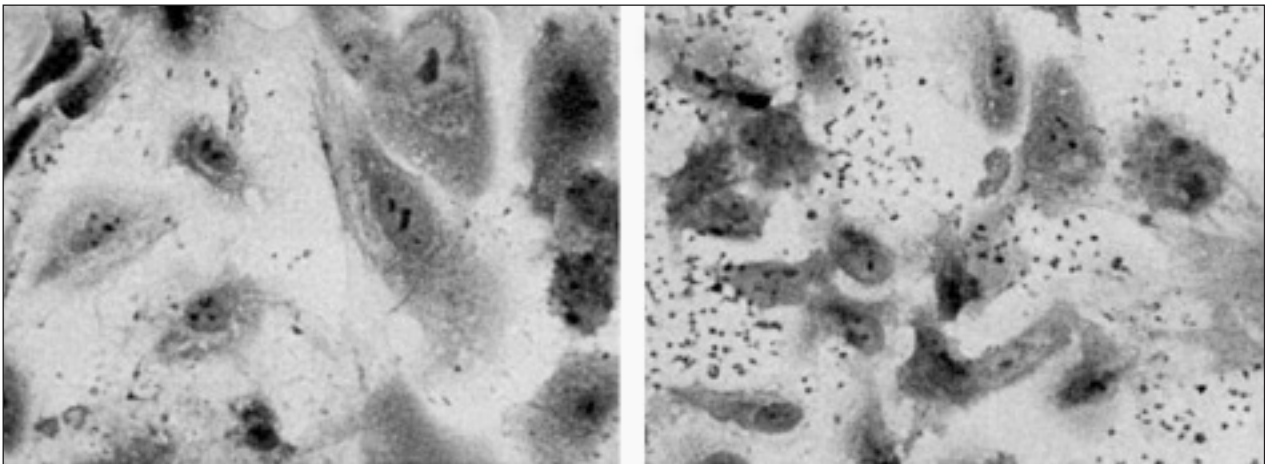


Fig. 1.—Micrografías (x320) correspondientes a células endoteliales cultivadas en presencia de suero control (A) y en presencia de suero urémico (B). Las monocapas de células endoteliales fueron perfundidas con muestras de sangre anticoaguladas con heparina de bajo peso molecular (HBPM) a un índice de cizalladura de  $800 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos. En la imagen B pueden apreciarse agregados plaquetarios en los espacios de matriz extracelular expuesta debido al desprendimiento de las células endoteliales frente al flujo sanguíneo.

## RESULTADOS

### Cambios en la morfología de las células endoteliales y la trombogenicidad de la matriz extracelular generada inducidos por el suero urémico

El crecimiento de las células endoteliales en cultivo en presencia de suero control o urémico fue monitorizado mediante microscopía. Las células mantenidas con medio suplementado con suero procedente de paciente urémicos alcanzaron la confluencia celular más rápidamente que las células incubadas en presencia de suero normal. Normalmente, las CEs cultivadas en presencia de un medio urémico alcanzaban la confluencia en unos 7 días, mientras que las CEs control necesitaban unos 10 días para alcanzar niveles similares de confluencia. El patrón de mosaico regular característico de las CEs cultivadas con suero control no era tan evidente en CEs expuestas a suero urémico. Las células endoteliales crecidas en un medio urémico presentaban una morfología irregular y tamaños variables.

Las células mantenidas en cultivo en presencia de suero urémico presentaron una mayor labilidad a la exposición al flujo sanguíneo, desprendiéndose de la matriz con mayor facilidad (porcentaje de superficie cubierta expuesta tras la perfusión:  $22 \pm 9,4\%$  vs  $13 \pm 7,1\%$ ) (fig. 1b vs 1a, correspondiente a células control). Por otro lado, la deposición plaquetaria sobre la MECs (fig. 2a y 2b) fue evaluada morfométrica-

mente *en face* y los resultados obtenidos fueron expresados como porcentajes de superficie cubierta por plaquetas (% SC). La deposición plaquetaria sobre las matrices procedentes de células endoteliales mantenidas con suero urémico (30%) fue significativamente superior a la observada cuando las matrices procedían de las células cultivadas con suero control ( $40,23 \pm 6,43\%$  vs  $25,42 \pm 2,69\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ) (fig. 3). El incremento en la proporción de suero urémico añadido al medio de cultivo no modificó el % SC respecto a la concentración más baja ( $41,42 \pm 6,68\%$ ,  $p < 0,05$  respecto a los datos control,  $n = 5$ ).

### Detección del factor de von Willebrand en la matriz extracelular generada por células endoteliales mediante el marcaje con oro coloidal

La liberación y la unión del factor de von Willebrand a la matriz extracelular fue evaluada mediante marcaje con oro coloidal. Los cubreobjetos cubiertos con MECs fueron fijados e incubados con un anticuerpo contra el factor de von Willebrand. El anticuerpo incorporado a la matriz fue detectado mediante un segundo anticuerpo marcado con oro coloidal e intensificado con plata.

El cultivo de células endoteliales en presencia de un medio urémico aumentaba la expresión de factor de von Willebrand en la matriz extracelular respecto a las células endoteliales crecidas en suero control. El análisis morfométrico mostró un aumento significativo en el % SC de oro incorporado en las matri-

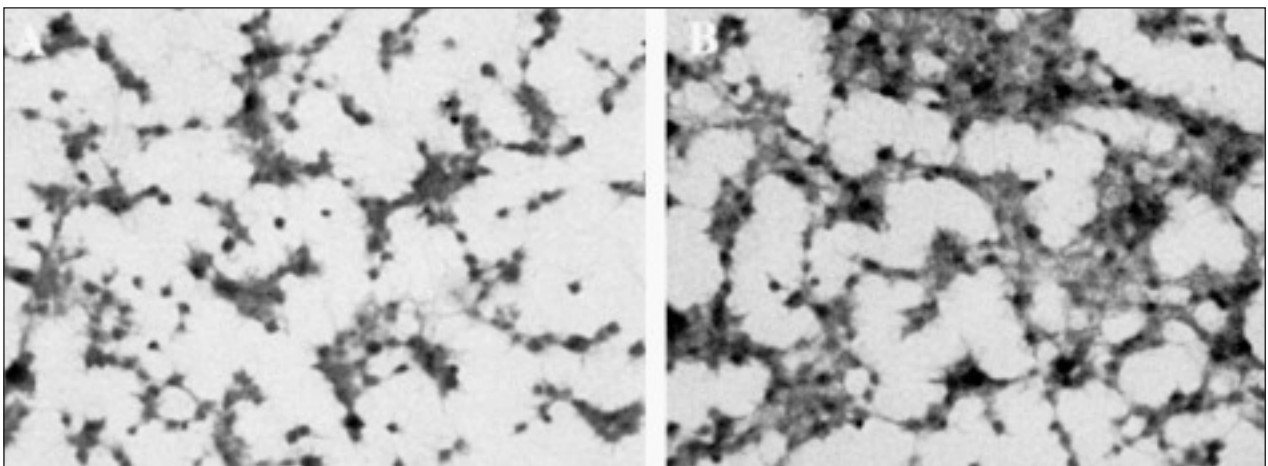


Fig. 2.—Micrografías (x800) correspondientes a cubreobjetos de matriz extracelular perfundida con muestras de sangre anticoagulada con heparina de bajo peso molecular (HBPM) a un índice de cizalladura de  $800 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos. La deposición de plaquetas fue superior en matrices extracelulares provenientes de células endoteliales cultivadas en presencia de suero urémico (B) que las matrices provenientes de células endoteliales cultivadas en presencia de suero control (A).

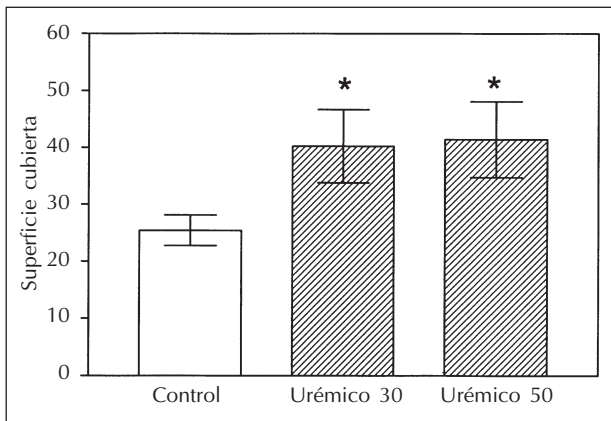


Fig. 3.—Evaluación morfométrica de la superficie de las matrices extracelulares cubierta por plaquetas tras los estudios de perfusión. Las matrices extracelulares fueron obtenidas a partir de células endoteliales cultivadas en presencia de suero control (Control), y un 30% (Urémico 30) o un 50% (Urémico 50) de suero urémico respecto al suero total. Las perfusiones fueron realizadas con muestras de sangre anticoagulada con heparina de bajo peso molecular (HBPM) a un índice de cizalladura de  $800 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos. Media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ).

ces urémicas respecto a las matrices control ( $17,06 \pm 4,2$  vs  $13,57 \pm 3,98$ ,  $p < 0,02$ ,  $n = 5$ ) (fig. 4).

#### Expresión de ARNm de factor de von Willebrand en células endoteliales

La expresión del ARNm para el factor de von Willebrand se halló incrementada en las muestras pro-

cedentes de las células endoteliales cultivadas en presencia de suero urémico. El análisis densitométrico de las muestras mostró un aumento de la intensidad en el ARNm procedente de células endoteliales cultivadas con suero urémico ( $213,24 \pm 6,13$  vs  $200,77 \pm 7,52$  en controles,  $p < 0,05$ ) (fig. 5).

#### DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que el medio urémico altera el funcionalismo de las células endoteliales cultivadas *in vitro*. Concretamente, las células endoteliales crecidas en un medio urémico mostraban un crecimiento más rápido, una morfología alterada, y una adhesividad al subendotelio disminuida en condiciones de flujo similares a las que se observan en el territorio arterial. Asimismo, la matriz subendotelial generada por estas células, el equivalente al subendotelio vascular, mostraba una trombogenicidad aumentada frente a las plaquetas.

El endotelio juega un papel esencial en el mantenimiento del balance hemostático<sup>7</sup> y es un hecho conocido que la disfunción endotelial es el evento inicial en el desarrollo de la lesión aterosclerótica<sup>8,25</sup>. La menor adhesividad de las células endoteliales urémicas a la matriz subendotelial en condiciones de flujo observada en nuestro estudio permitiría la adhesión, y consiguiente activación, de plaquetas al subendotelio que quedaría expuesto. Además, la matriz extracelular generada cuando las células son incubadas en presencia de un medio urémico es más trombogénica. Es conocido que las pla-

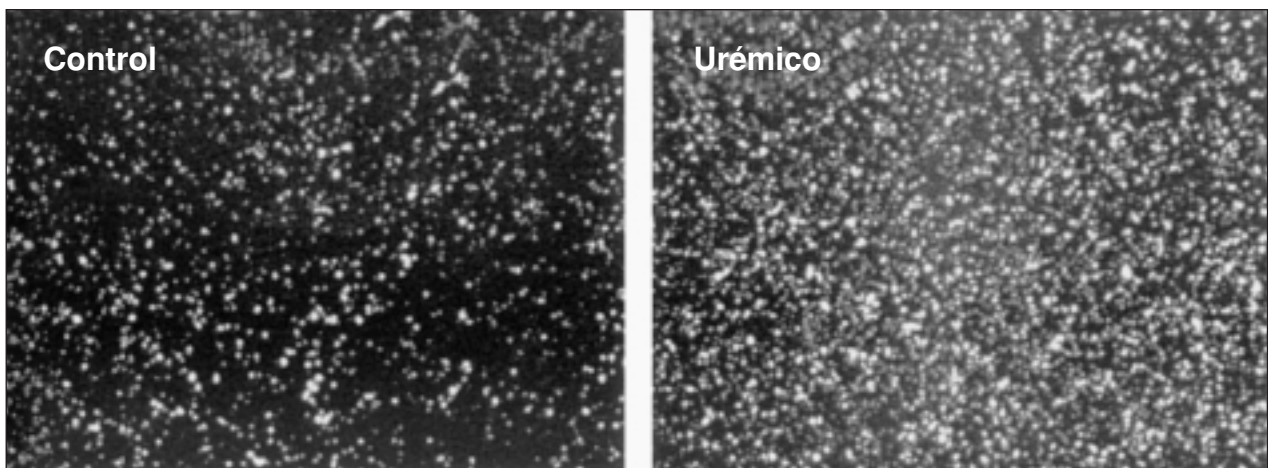


Fig. 4.—Micrografías ( $\times 320$ ) correspondientes a cubreobjetos con matriz extracelular. La presencia del factor de von Willebrand superior en las matrices procedentes de células endoteliales crecidas con suero urémico.

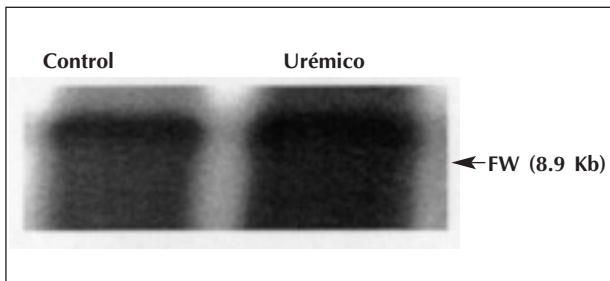


Fig. 5.—Efecto del medio urémico sobre la expresión de ARN mensajero en células endoteliales. CON: controles. URE: urémicas.

quetas activadas y los productos liberados por ellas contribuyen al desarrollo de aterosclerosis y trombosis<sup>25,26</sup>. Por ello, si estos cambios observados en células endoteliales *in vitro* también ocurrieran *in vivo*, podrían contribuir a la aterosclerosis acelerada y aumento de riesgo de trombosis descrito en estos pacientes<sup>10-12</sup>.

En un estudio previo, nuestro grupo describió que el medio urémico causaba alteraciones cuantitativas y cualitativas en la matriz subendotelial generada por células endoteliales en cultivo<sup>9</sup>. En aquel estudio, la deposición de plaquetas sobre la matriz subendotelial era menor cuando las células endoteliales eran expuestas a un medio urémico. Las discrepancias ente el estudio anterior y el presente pueden explicarse por el uso de anticoagulantes distintos en ambos estudios, citrato (en el primero) o heparina de bajo peso molecular (en el presente estudio). La heparina de bajo peso molecular permite la generación de trombina cuando la sangre es expuesta a vasos dañados o un subendotelio activado<sup>27-29</sup>, mientras que el citrato inhibe completamente la generación de trombina. La generación de trombina, en el presente estudio de perfusión en que se utilizó heparina de bajo peso molecular, sería la responsable de la mayor reactividad frente a las plaquetas de la matriz subendotelial urémica, y compensaría la menor trombogenicidad de las matrices subendoteliales urémicas observada en situaciones de ausencia de generación de trombina, como ocurrió en nuestro estudio anterior<sup>9</sup>.

Además en nuestro estudio objetivamos un aumento en la expresión de factor von Willebrand en la matriz subendotelial generada por células endoteliales urémicas. Esta proteína derivada del endotelio está implicada en la regulación de la hemostasia y favorece la adhesión de las plaquetas al subendotelio<sup>13</sup>. El aumento de la expresión de este factor no es atribuible al mayor crecimiento de las CEs expuestas al medio urémico, sino a un aumento de su

producción por estas, ya que la expresión de RNAm de este factor estaba aumentando en CEs cultivadas en un medio urémico. Sin embargo, el incremento de la expresión de factor von Willebrand en la matriz extracelular urémica difícilmente puede explicar su mayor trombogenicidad, ya que en el estudio previo, utilizando citrato como anticoagulante, observamos una menor trombogenicidad de la matriz subendotelial urémica, en contra de lo que cabría esperar si esta mayor expresión de factor von Willebrand tuviera un repercusión funcional. Es posible que esta síntesis aumentada de factor von Willebrand traduzca una disfunción endotelial, como ocurre con los niveles circulantes de este factor<sup>14</sup>. Diversos autores han sugerido que el propio medio urémico causaría una alteración estructural sobre el factor von Willebrand generado que disminuiría su capacidad adhesiva para las plaquetas<sup>30,31</sup>. En consecuencia, parece muy probable que la mayor trombogenicidad de las matrices subendoteliales generadas por células endoteliales urémicas sea debida a una mayor expresión de factor tisular, como recientemente ha demostrado nuestro grupo<sup>32</sup>.

Las alteraciones hemostáticas observadas en nuestro estudio en células endoteliales cultivadas en presencia de un medio urémico no son únicas. Un estudio previo describió que las células endoteliales incubadas en presencia de un medio urémico mostraban una secreción de inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) estimulada por citoquinas aumentada, mientras que la secreción de activador del plasminógeno tisular era similar a las células endoteliales control<sup>33</sup>. La alteración de la respuesta fibrinolítica endotelial asociado al estado de hipercoagulabilidad de la uremia podría favorecer el desarrollo de eventos cardiovasculares trombóticos en estos pacientes.

El efecto deletéreo del medio urémico sobre las células endoteliales podría explicarse por distintos mecanismos. El medio urémico induce un estado de estrés oxidativo y de formación de productos avanzados de glicosilación (AGEs) y lipooxidación (ALEs)<sup>34-36</sup>, que inducen disfunción endotelial. El estado urémico se asocia con un estado proinflamatorio crónico con liberación de citoquinas que activan la célula endotelial<sup>37-38</sup>. Además, la técnica de hemodiálisis *per se* induce activación de células sanguíneas y la consiguiente libertación de citoquinas, lo que agrava el fenómeno inflamatorio<sup>39</sup>. Es un hecho conocido que el grado de inflamación en los pacientes urémicos, estimado mediante los niveles de proteína C reactiva, es un factor de riesgo de mortalidad cardiovascular en estos pacientes<sup>40</sup>. Aunque los resultados de este estudio no permiten profundizar sobre los mecanismos implicados en el

efecto tóxico del medio urémico sobre la célula endotelial, la observación preliminar de que estos efectos se reducen de forma dramática cuando el suero urémico es expuesto a procedimientos de inactivación por calor sugiere que posiblemente se deba al efecto de proteínas termolábiles, como las citoquinas<sup>41</sup>.

En los pacientes urémicos se ha descrito una mayor incidencia de complicaciones ateroscleróticas<sup>9</sup> y un riesgo trombótico aumentado. Los resultados del presente estudio y de estudios previos demuestran alteraciones del funcionalismo endotelial *in vitro* que favorecerían el desarrollo de complicaciones cardiovasculares y trombóticas en estos pacientes<sup>9,23,33</sup>. La cuestión de si las alteraciones endoteliales observadas en condiciones experimentales también ocurren *in vivo* no puede ser contestada, pero estudios recientes han demostrado la existencia de una disfunción endotelial *in vivo* en estos pacientes. Es imperativo profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la disfunción endotelial en la uremia a fin de desarrollar estrategias terapéuticas que prevengan o limiten la aterosclerosis acelerada que presentan estos pacientes. En este sentido, los estudios de células endoteliales en cultivo podrían ser de utilidad para ayudar a discernir el papel de los diferentes factores de riesgo cardiovascular descritos en los pacientes urémicos y el efecto de diferentes estrategias terapéuticas sobre esta disfunción endotelial.

## AGRADECIMIENTOS

La sonda para el factor de von Willebrand fue cedida por el Dr. P. Tjernberg y Dr. J. Eikenboom (trombose en Hemostase Research Centrum, Leiden, Netherlands). Este trabajo ha sido posible gracias a una Beca de Investigación de la Sociedad Española de Nefrología (PI 1/98) y becas del Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social FISS 01/1512 y FIS 00/0551.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lewis J, Zucker M, Ferguson J: Bleeding tendency in uremia. *Blood* 11: 1073-76, 1956.
2. Raine AEG, Margreiter R, Brunner FP y cols.: Report on management of renal failure in Europe, XXII, 1991. *Nephrol Dial Transplant* 7 (Supl. 2): 7-35, 1992.
3. Brunner FP, Brynner H, Chantler C, Donckerwolcke RA, Hathway RA, Jacobs C, Selwood NH, Wing AJ: Combined Report on Regular Dialysis and Transplantation in Europe, IX, 1978. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 16: 4-73, 1979.
4. Ritz E, Deppisch R, Stier E, Hansch G: Atherogenesis and cardiac death: are they related to dialysis procedure and bio-compatibility? *Nephrol Dial Transplant* 9 (Supl. 2): 165-72, 1994.
5. Van Guldener C, Lambert J, Janssen MJ, Donker AJ, Stehouwer CD: Endothelium-dependent vasodilatation and distensibility of large arteries in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 12 (Supl. 2): 14-8, 1997.
6. Passauer J, Büsemaker E, Range U, Plug M, Gross P: Evidence *in vivo* showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelin-dependent vasodilation in normotensive patients on chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 11: 1726-1734, 2000.
7. Pearson JD: Endothelial cell function and thrombosis. *Bailliere Clin Haem* 12: 329-41, 1999.
8. Mombouli JV, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31: 61-74, 1999.
9. Aznar-Salatti J, Escolar G, Cases A, Gómez-Ortiz G, Antón P, Castillo R, Revert L, Ordinas A: Uraemic medium causes endothelial cell dysfunction characterized by an alteration of the properties of its subendothelial matrix. *Nephrol Dial Transplant* 10: 2199-204, 1995.
10. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner DH: Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 290: 697-701, 1974.
11. Jungers P, Khoa TN, Massy ZA, Zingraff J, Labrunie M, Descamps-Latscha B, Man K: Incidence of atherosclerotic arterial occlusive accidents in predialysis and dialysis patients. A multicentric study in the Ile de France district. *Nephrol Dial Transplant* 14: 898-902, 1999.
12. Huysmans K, Lins RL, Daelemans R, Zachee P, De Broe ME: Hypertension and accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol* 11: 185-95, 1998.
13. Sadler JE: Von Willebrand factor. *J Biol Chem* 266: 22777-22780, 1991.
14. Meade TW, Cooper JA, Stirling Y y cols.: Factor VIII, ABO blood group and the incidence of ischemic heart disease. *Br J Haematol* 88: 601-607, 1994.
15. Takagi M, Wada H, Mukai K y cols.: Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2: 14-18, 1997.
16. Gris JC, Branger B, Vecina F, Al Sabadani B, Fourcade J, Schved JF: Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. *Kidney Int* 46: 807-813, 1994.
17. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 52: 2745-56, 1973.
18. Aznar-Salatti J, Díaz-Ricart M, Antón P, Bastida E, Escolar G, Ordinas A: Variations in the thrombogenic properties of the extracellular matrix produced by endothelial cells in consecutive passages. *Sangre* 35: 173-7, 1990.
19. Sakariassen KS, Aarts PA, De Groot PG, Houdijk WP, Sixma JJ: A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *J Lab Clin Med* 102: 522-35, 1983.
20. Muggli R, Baumgartner HR, Tschopp TB, Keller H: Automated microdensitometry and protein assays as a measure for platelet adhesion and aggregation on collagen-coated slides under controlled flow conditions. *J Lab Clin Med* 95: 195-207, 1980.
21. Díaz-Ricart M, Carretero M, Castillo R, Ordinas A, Escolar G: Digital image analysis of platelet-extracellular matrix interactions: studies in von Willebrand disease patients and aspirin-treated donors. *Haemostasis* 24: 219-29, 1994.
22. De Mey J, Moeremans M, Geuens G, Nuydens R, De Brabander M: High resolution light and electron microscopic lo-



- calization of tubulin with the IGS (immuno gold staining) method. *Cell Biol Int Rep* 5: 889-99, 1981.
23. Hu Y, Oscarson M, Johansson I, Yue QY, Dahl ML, Tabone M, Arinco S, Albano E, Ingelman-Sundberg M: Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles. *Mol Pharmacol* 51: 370-76, 1997.
  24. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-59, 1987.
  25. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 262: 801-809, 1993.
  26. Harker LA: Platelets and vascular thrombosis. *N Engl J Med* 330: 1006-7, 1994.
  27. Zwavinga JJ, De Boer HC, Ijsseldijk MJ, Kerkhof A, Muller-Berghaus G, Gruhlichhenn J, Sixma JJ, De Groot PG: Thrombogenicity of vascular cells. Comparison between endothelial cells isolated from different sources and smooth muscle cells and fibroblasts. *Arteriosclerosis* 10: 437-48, 1990.
  28. Zwavinga JJ, Ijsseldijk MJ, Beeser-Viser N, De Groot PG, Vos J, Sixma JJ: High von Willebrand factor concentration compensates a relative adhesion defect in uremic blood. *Blood* 75: 1498-508, 1990.
  29. Lozano M, Bos A, Degroot PG, Vanwilligen G, Meuleman DG, Ordinas A, Sixma JJ: Suitability of low-molecular-weight heparin(oid)s and a pentasaccharide for an *in vitro* human thrombosis model. *Arterioscler Thromb* 14: 1215-22, 1994.
  30. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, Aznar-Salatti J, López-Pedret J, Ordinas A, Escolar G: Uremic medium disturbs the hemostatic balance of cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost* 86, 2001 (en prensa).
  31. Gralnick HR, Mckeown LP, Williams SB, Shafer B: Plasma and platelet von Willebrand factor defects in uremia. *Am J Med* 85: 806-810, 1989.
  32. Zwavinga JJ, Ijsseldijk MJ, De Groot PG, Vos J, De Boer HC, Sixma JJ: Defects in platelet adhesion and aggregation in uremic bleeding disorders can be attributed to factors in plasma. *Arterioscler Thromb* 11: 733-744, 1991.
  33. Sagripanti A, Morganti M, Carpi A, Cupisti A, Nicolini A, Barsotti M, Camici M, Mittermayer C, Barsotti G: Uremic medium increases cytokine-induced PAI-1 secretion by cultured endothelial cells. *Biomed Pharmacother* 52: 298-302, 1998.
  34. Morena M, Cristol JP, Canaud B: Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct to pro/antioxidant imbalance. *Blood Purif* 18: 191-9, 2000.
  35. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT y cols.: Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161: 2524-2532, 1998.
  36. Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, Maeda K, Kurosaka K, van Ypersele: Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int* 51: 1170-81, 1997.
  37. Nguyen-Khoa T, Masy ZA, De Brandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Drüeke TB, Lacour B, Thevenin M: Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 16: 335-340, 2001.
  38. Schömig M, Eisendhardt A, Ritz E: The microinflammatory state of uremia. *Blood Purif* 18: 327-332, 2000.
  39. Haubitz M, Schulze M, Koch KM: Increase of C-reactive protein serum values following haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 5: 500-3, 1990.
  40. Zimmerman J, Herlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C: Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 55: 648-58, 1999.
  41. Estebanell E, Rendu F, Cases A, Serradell M, Aznar-Salatti J, Escolar G, Ordinas A, Díaz-Ricart M: Uremic media alters the hemostatic balance of cultured human endothelial cells [abstract]. *Thromb Haemost* (Supl.): 148, 1999.