

Efecto del crioprecipitado sobre la hemostasia primaria en la trombopatía urémica

A. Cases, G. Escolar *, M. Garrido *, T. Feliz, J. Monteagudo *, J. López-Pedret, R. Castillo * y Ll. Revert
Servicios de Nefrología y Hemoterapia y Hemostasia*. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

RESUMEN

Con el fin de estudiar el efecto hemostático del crioprecipitado en la trombopatía urémica, así como profundizar en el conocimiento de sus mecanismos de acción, a ocho pacientes hemodializados con trombopatía urémica se les extrajeron muestras de sangre para realizar estudios de perfusión in vitro. Se estudiaron: 1) El efecto de la adición in vitro de crioprecipitado sobre la hemostasia primaria; 2) El posible papel del incremento cuantitativo de factor Von Willebrand (FvW) y/o de factor VIII (FVIII) en la mejoría de la hemostasia inducida por el crioprecipitado. A fin de averiguar el posible papel hemostático que jugaban los fragmentos de membrana o vesículas plaquetarias presentes en el crioprecipitado se comparó el efecto sobre la interacción plaqueta-subendotelio del crioprecipitado filtrado con el crioprecipitado normal.

La adición de crioprecipitado mejoró los parámetros que cuantifican la interacción plaqueta-subendotelio (porcentaje de superficie cubierta: de $13,1 \pm 7,1$ % a $21,8 \pm 8,5$ %, $p < 0,01$, y porcentaje de trombo: de $3,2 \pm 2,6$ % a $8,4 \pm 4,3$ %, $p < 0,01$). La adición in vitro de 1 U/ml de FvW o de 1 U/ml de FVIII más 1 U/ml de FvW no mejoraron significativamente los parámetros anteriores. No se observaron diferencias significativas en la interacción plaqueta-subendotelio en los estudios de perfusión realizados con crioprecipitado normal o filtrado.

Nuestros resultados in vitro confirman que el crioprecipitado mejora la hemostasia primaria en la trombopatía urémica y que ello es debido a una mejoría del funcionalismo plaquetario. Esta mejoría no es atribuible al incremento de los niveles plasmáticos de FvW y/o de FVIII, ni tampoco a los fragmentos de membrana plaquetaria presentes en el crioprecipitado. Este efecto hemostático podría deberse a los multímeros de alto peso molecular del FvW y/o al efecto de otras proteínas adhesivas presentes en el crioprecipitado.

Palabras clave: **Crioprecipitado. Factor VIII. Factor Von Willebrand. Trombopatía urémica. Membrana plaquetaria.**

Recibido: 13-X-89.
En versión definitiva: 11-XII-89.
Aceptado: 11-XII-89.

Correspondencia: Dr. D. Aleix Cases.
Servicio de Nefrología.
Hospital Clínic i Provincial.
Villarroel, 170.
08036 Barcelona.

Este trabajo ha sido presentado en parte en el XXVth Congress of the EDTA-ERA. Goteborg, 1989.

EFFECT OF CRYOPRECIPITATE ON PRIMARY HAEMOSTASIS IN URAEMIC THROMBOPATHY

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effect of cryoprecipitate on primary hemostasis in uremic thrombopathy and to elucidate its possible mechanisms of action. Blood samples were obtained for perfusion experiments in vitro from 8 hemodialysis patients with uremic thrombopathy. We have studied: The effect of in vitro addition of cryoprecipitate on primary hemostasis. Moreover, we studied the role of the increase of plasma levels of von Willebrand factor (vWF) and/or Factor VIII (FVIII) on the hemostatic effect of cryoprecipitate. To elucidate the possible effect of platelet membrane fragments present in cryoprecipitate in its hemostatic effect we have compared the effect of filtered cryoprecipitate (in order to eliminate these platelet fragments) to normal cryoprecipitate on platelet-subendothelium interaction.

In vitro addition of cryoprecipitate improved platelet-subendothelium interaction (percentage of covered surface: from $13,1 \pm 7,1$ % to $21,8 \pm 8,5$ %, $p < 0,01$; and the percentage of thrombi from $3,2 \pm 2,6$ % to $8,4 \pm 4,3$ %, $p < 0,01$). In vitro addition of 1 U/ml of vWF or 1 U/ml of vWF plus 1 U/ml of FVIII did not improve platelet-subendothelium interaction. There were no differences in platelet-subendothelium interaction between perfusions performed with the addition of filtered and non-filtered cryoprecipitate.

These results in vitro confirm that cryoprecipitate improves primary hemostasis in uremic thrombopathy and that this is due to an enhancement of platelet function. This improvement cannot be ascribed to the quantitative increase of plasma levels of vWF and FVIII or to the presence of platelet membrane fragments. A role for high molecular weight multimers of vWF and/or the effect of other adhesive proteins present in cryoprecipitate might explain the hemostatic effect of cryoprecipitate in uremic thrombopathy.

Key words: Cryoprecipitate. Factor VIII. von Willebrand factor. Uremic thrombopathy. Platelet membrane.

Introducción

Cuando el plasma es congelado y posteriormente descongelado a 4° C se obtiene una fracción crioprecipitable. Este crioprecipitado es rico en factor VIII (FVIII), factor Von Willebrand (FvW), fibrinógeno y fibronectina, aunque también contiene pequeñas cantidades de todos los factores plasmáticos¹. Por ello se ha utilizado clásicamente en el tratamiento de la hemofilia A, la enfermedad de von Willebrand y la hipo o disfibrinogenemia¹.

Janson y cols. describieron que la administración de crioprecipitado acortaba el tiempo de sangría y mejoraba las complicaciones hemorrágicas en siete pacientes urémicos, aunque el efecto era pasajero, desapareciendo a las 24-36 horas de su administración². Aunque no se conoce su mecanismo de acción, se ha postulado que su efecto hemostático

podría ser debido al incremento de los niveles plasmáticos del complejo FVIII-FvW o a la presencia de multímeros de alto peso molecular de este último factor³. Recientemente se ha descrito la presencia de vesículas y fragmentos de membrana plaquetaria en el crioprecipitado, sugiriendo que podrían ser responsables del efecto hemostático del crioprecipitado⁴. En este sentido se ha demostrado en estudios experimentales que la administración de vesículas de membrana plaquetaria inducía un descenso del tiempo de sangría en conejos trombopénicos y que este efecto se debía a una acción directa de estas vesículas en la zona de sangrado⁵.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de la administración de crioprecipitado sobre la hemostasia primaria *in vitro* en la trombopatía urémica, así como investigar los posibles mecanismos de acción a través de los cuales actúa el crioprecipitado.

Pacientes y métodos

A) Pacientes

Se estudiaron ocho pacientes con insuficiencia renal crónica terminal en programa de hemodiálisis y trombopatía urémica, cinco hombres y tres mujeres, con una edad media de 52 ± 12 años (intervalo veintitrés y sesenta y tres años) y un tiempo de estancia en hemodiálisis de 61 ± 47 meses (intervalo 9-122 m). Todos los pacientes tenían historia clínica previa de diátesis hemorrágica y una alteración del funcionalismo plaquetario: tiempo de sangría prolongado y una agregación plaquetaria inducida por ristocetina disminuida. En todos los pacientes las pruebas habituales de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo de activación de tromboplastina, tiempo de trombina y fibrinógeno) eran normales y el recuento plaquetario era superior a $110 \times 10^9/l$.

B) Diseño experimental

A estos pacientes se les extrajo sangre para los experimentos de perfusión *in vitro* antes de iniciar la sesión de hemodiálisis. Ninguno de estos pacientes había recibido transfusión de sangre o derivados en los últimos dos meses ni fármacos que alteraran la función plaquetaria en los quince días previos a los estudios.

Se desarrollaron cuatro protocolos:

Protocolo I: Estudio de perfusión después de la adición *in vitro* de crioprecipitado (cantidad equivalente a 1 U/ml de factor Von Willebrand). Con el fin de investigar el papel que jugaba el aumento cuantitativo de los niveles plasmáticos de FvW y FVIII se llevaron a cabo otros dos protocolos experimentales. Protocolo II: Perfusión después de la adición *in vitro* de 1 U/ml de FvW altamente purificado. Protocolo III: Perfusión después de la adición *in vitro* de 1 U/ml de FvW más 1 U/ml de FVIII. Protocolo IV: Con el fin de averiguar el posible efecto hemostático de fragmentos de membrana o vesícula plaquetarias presentes en el crioprecipitado se realizaron estudios de perfusión tras la adición *in vitro* de crioprecipitado normal, y después de una filtración en un filtro de ésteres de celulosa con un poro de $0,22 \mu\text{m}$ (Millex GS, Millipore, Molshelm, Francia) y centrifugación a $12.000 \times g$, a fin de eliminar estos restos celulares.

La agregación plaquetaria frente al ADP, colágeno y ristocetina se determinó por el método fotométrico de Born⁶, en un lumiagregómetro Aggreocoder PA 3210 (DIC, Kyoto, Japón).

Para los experimentos de perfusión la sangre recién extraída fue vertida en tubos de polipropileno que contenían una solución CCD como anticoagulante (citrato 1 M, ácido cítrico 7mM, dextrosa 0,14 M, pH 6,5) (1:9, v:v). Los experimentos de perfusión se realizaron con sangre anticoagulada en cámaras de

plástico con un diámetro de 1,3 mm y una longitud de 7,2 cm, desarrollada por Baumgartner⁷, en cuyo eje se insertaron segmentos de aorta abdominal de conejo, previamente digeridos en α -quimotripsina, de unos 14 mm de longitud. El flujo de sangre se obtuvo bombeando la sangre a través de una bomba peristáltica (Renal Systems, Minneapolis, Minn, USA) a unos 140 ml/min (coeficiente de cizallamiento 800 seg^{-1}). Después de diez minutos de perfusión a 37°C los segmentos fueron lavados con tampón fosfato salino, fijados con glutaraldehído-formaldehído durante una hora, deshidratados en etanol e impregnados e incluidos en JB-4 (Polysciences, Warrington, Penn, USA). Posteriormente, los segmentos fueron cortados para microscopía óptica y teñidos con azul de toluidina.

La interacción plaqueta-subendotelio se cuantificó mediante evaluación morfométrica, según el método de Baumgartner⁸, utilizando un sistema de análisis semiautomatizado (MOP-20, Kontron, Messegerate GmbH, München, RFA)⁹. De los parámetros evaluados se consideraron el porcentaje de superficie vascular cubierta por plaquetas y el porcentaje de trombo (definido como agregados con una altura superior a $5 \mu\text{m}$). Estos parámetros se expresaron como porcentaje sobre la longitud total del vaso explorado.

Los datos se expresan como media \pm DS, salvo que se exprese lo contrario. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para datos apareados. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

Protocolo I: Con respecto al control, la adición *in vitro* de crioprecipitado mejoró significativamente los parámetros que cuantifican la interacción plaqueta-subendotelio *in vitro*: porcentaje de superficie cu-

Tabla I. Agregación plaquetaria *in vitro* e interacción plaqueta-subendotelio registrados con o sin adición de crioprecipitado

	Control	Crioprecipitado
Agregación plaquetaria:		
ADP (2 μM) (%)	24,6 \pm 14	33,8 \pm 11 *
Colágeno (5 $\mu\text{g/ml}$) (%)	34,8 \pm 13	46,2 \pm 15 *
Ristocetina (0,8 mg/ml) (%)	30,4 \pm 12	38,8 \pm 13 *
Interacción P-SE:		
Superficie cubierta (%)	13,1 \pm 7,1	21,8 \pm 8,5 **
Trombo (%)	3,2 \pm 2,6	8,4 \pm 4,3 **

P-SE: Plaqueta-subendotelio. Media \pm DS. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, respecto al control (n = 8).

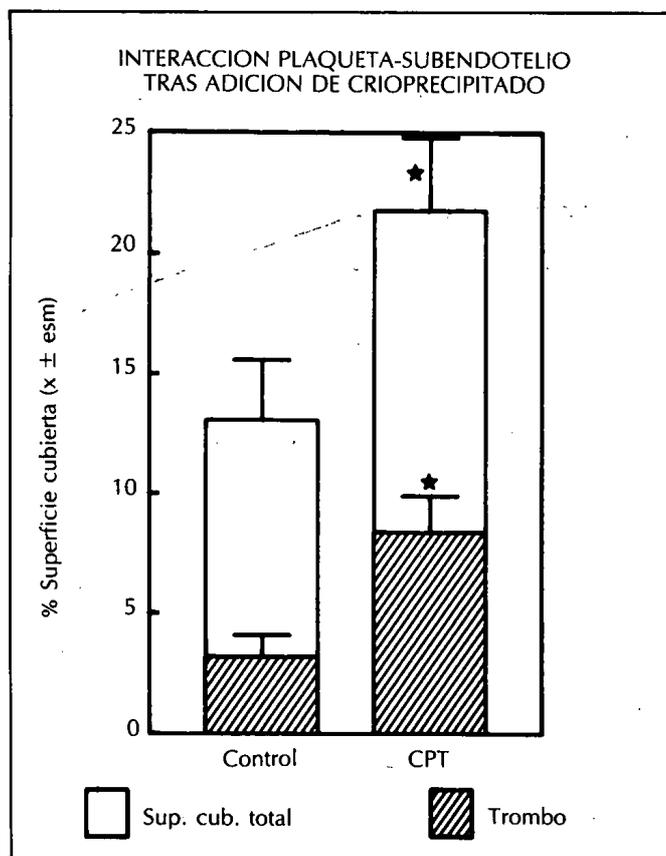


Fig. 1.—Interacción plaqueta-subendotelio tras la adición *in vitro* de crioprecipitado. CPT: Crioprecipitado. Sup. cub. total: Superficie cubierta total. * $p < 0,01$ ($n = 8$).

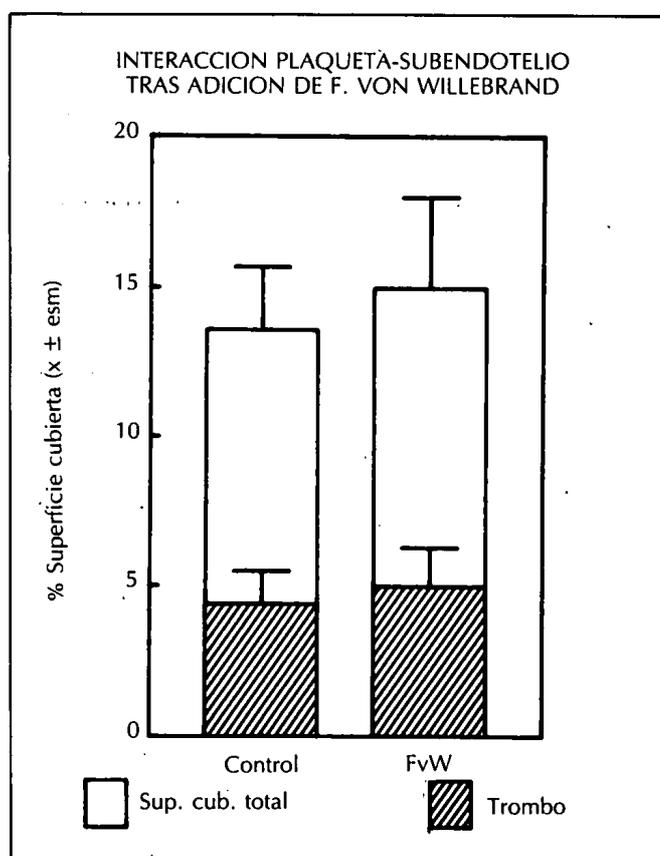


Fig. 2.—Interacción plaqueta-subendotelio tras la adición *in vitro* de 1 U/ml de factor Von Willebrand (FvW) ($n = 8$).

bierta por plaqueta ($p < 0,01$) y porcentaje de trombo ($p < 0,01$) (fig. 1). Asimismo mejoró la agregación plaquetaria *in vitro* frente al ADP ($p < 0,05$), colágeno ($p < 0,05$) y ristocetina ($p < 0,05$) (tabla I).

Protocolo II: La adición *in vitro* de 1 U/ml de factor Von Willebrand altamente purificado no mejoró significativamente la interacción plaqueta-subendotelio (porcentaje de superficie cubierta: $13,6 \pm 5\%$ vs $15 \pm 8,7\%$, $p = NS$, y trombo $4,4 \pm 3,1\%$ vs $5 \pm 3,7\%$, $p = NS$) (fig. 2).

Protocolo III: La adición *in vitro* de 1 U/ml de FvW más 1 U/ml de FVIII tampoco mejoró significativamente la interacción plaqueta-subendotelio (porcentaje de superficie cubierta: $14 \pm 7,9\%$ vs

$13,3 \pm 7,1\%$, $p = NS$, y trombo: $4 \pm 3,2\%$ vs $3,5 \pm 3,3\%$, $p = NS$) (fig. 3).

Protocolo IV: La adición *in vitro* de crioprecipitado normal y filtrado mejoraron la interacción plaqueta-subendotelio respecto al control, pero no se observaron diferencias significativas en esta interacción entre la adición de crioprecipitado normal y filtrado (tabla II, fig. 4).

Tabla II. Interacción plaqueta-subendotelio tras la adición de crioprecipitado normal y crioprecipitado filtrado

Interacción P-SE	Control	CPT-N	CPT-F
Superficie cubierta (%)	$11,3 \pm 7,4$	$19,7 \pm 8$ *	$22,1 \pm 8,3$ *
Trombo (%)	$2,9 \pm 1,9$	$7,9 \pm 4$ *	$7,6 \pm 4,2$ *

P-SE: plaqueta-subendotelio. CPT-N: crioprecipitado normal. CPT-F: crioprecipitado filtrado. Media \pm DS. * $p < 0,01$ respecto al control ($n = 8$).

Discusión

Nuestros resultados *in vitro* demuestran que la administración de crioprecipitado mejora la hemostasia primaria en la trombopatía urémica, confirmando los hallazgos de Jason y cols. observados *in vivo*¹. Asimismo la mejoría de la interacción plaqueta-subendotelio y de la interacción plaqueta-plaqueta (trombo), así como de la agregación plaquetaria *in vitro* frente a diversos agonistas demuestran que este efecto es debido a una mejoría del funcionalismo plaquetario.

El mecanismo por el cual el crioprecipitado ejerce su acción hemostática en los pacientes urémicos no está aclarado. No se han descrito alteraciones de los

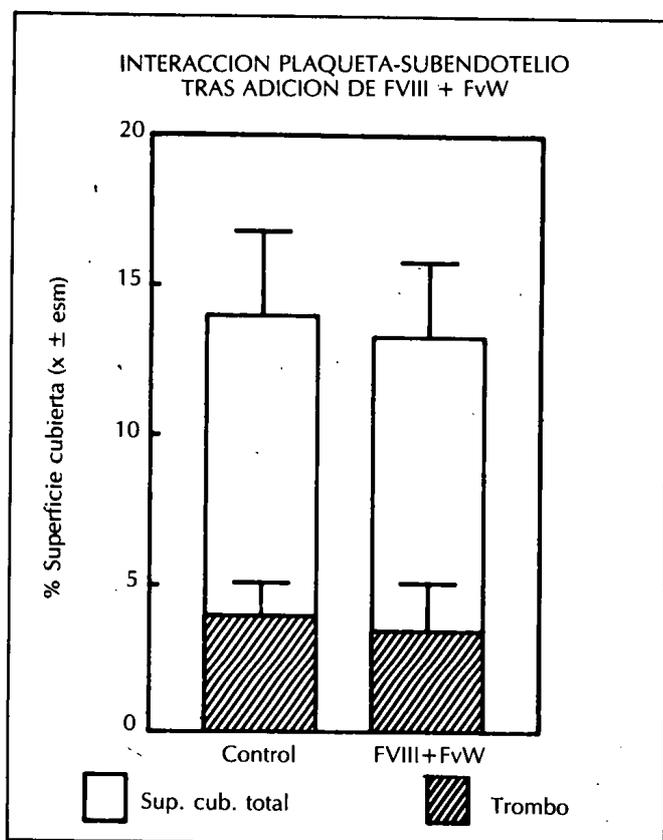


Fig. 3.—Interacción plaqueta-subendotelio tras la adición *in vitro* de 1 U/ml de factor VIII (FVIII) más 1 U/ml de factor Von Willebrand (FvW) (n = 8).

niveles de fibrinógeno, factor VIII o factor Von Willebrand en estos pacientes, así como tampoco alteraciones en la estructura multimérica en plasma de este último factor³. El hecho de que la adición *in vitro* de factor Von Willebrand y factor VIII no haya mejorado la interacción plaqueta-subendotelio en nuestro estu-

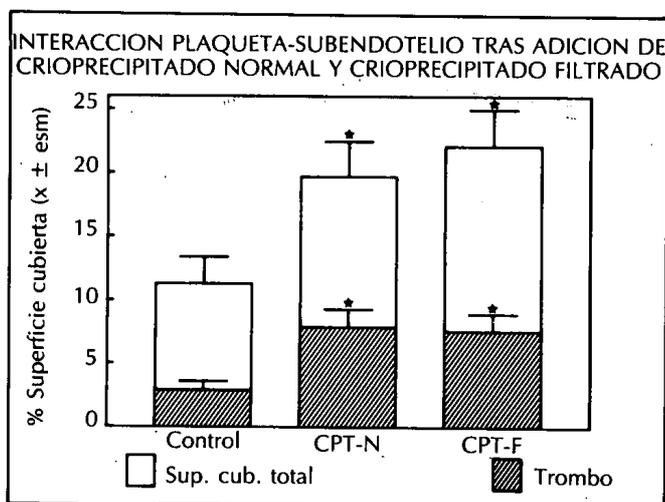


Fig. 4.—Interacción plaqueta-subendotelio tras la adición *in vitro* de crioprecipitado normal (CPT-N) y crioprecipitado filtrado (CPT-F). * $p < 0,01$ respecto al control (n = 8).

dio descarta, en principio, que el efecto hemostático del crioprecipitado sea debido al aumento cuantitativo de estos factores plasmáticos. Se ha sugerido que el efecto hemostático del crioprecipitado podría deberse a los multímeros de alto peso molecular del factor Von Willebrand presentes en el mismo³. Nosotros no podemos ni confirmar ni desmentir este aspecto, ya que el factor Von Willebrand purificado que se utilizó en los experimentos de perfusión no contenía estos multímeros de alto peso molecular, ya que éstos se pierden en el proceso de purificación¹⁰.

El hallazgo de vesículas y restos de membranas plaquetarias en el crioprecipitado⁴ y las evidencias experimentales de que éstas podrían jugar un papel hemostático en determinadas condiciones experimentales⁵ han llevado a sugerir que el efecto hemostático del crioprecipitado podría atribuirse a las mismas. Sin embargo, el hecho de que el crioprecipitado desprovisto de estos fragmentos mejore la interacción plaqueta-subendotelio de forma similar al crioprecipitado normal va en contra de esta hipótesis.

Recientemente se ha descrito una disminución de los niveles de fibronectina en la uremia¹¹. Dado que el crioprecipitado es rico en esta proteína adhesiva¹, es razonable considerar que el efecto hemostático del crioprecipitado en la uremia pueda deberse al aumento cuantitativo de la misma.

Por todo ello podemos concluir que la administración de crioprecipitado mejora la hemostasia primaria en la trombopatía urémica y que ello es debido a una mejoría del funcionalismo plaquetario. Este efecto hemostático no puede ser atribuido a un aumento cuantitativo de los niveles plasmáticos de factor VIII o factor Von Willebrand, ni tampoco a las vesículas o fragmentos de membrana plaquetaria presentes en el crioprecipitado. Ello podría explicarse por el efecto de los multímeros de alto peso molecular del factor Von Willebrand y/o al efecto de otras proteínas adhesivas presentes en el crioprecipitado, tales como la fibronectina.

Bibliografía

1. Johnson AJ, Aronson DL y Williams WJ: Preparation and clinical use of plasma and fractions. En *Hematology*. Williams WJ, Beutler E, Ersler J y Rundles RW (eds.). McGraw-Hill. 1561-1583. New York, 1977.
2. Janson PA, Jubelirer SJ, Weinstein MJ y Deykin D: Treatment of the bleeding tendency in uremia with cryoprecipitate. *N Engl Med* 303:1318-1322, 1980.
3. Deykin D: Uremic bleeding. *Kidney Int* 24:698-705, 1983.
4. George JN, Pickett EB y Heinz R: Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate. *Blood* 68:307-309, 1986.
5. McGill M, Fugman DA, Vittorio N y Darrow C: Platelet membrane vesicles reduced microvascular bleeding times in thrombocytopenic rabbits. *J Lab Clin Med* 109:127-133, 1987.

A. CASES y cols.

6. Born GVR: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927-929, 1962.
7. Baumgartner HR: The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 5:167-169, 1973.
8. Baumgartner HR y Mugli R: Adhesion and aggregation: morphological demonstration and quantitation «in vivo» and «in vitro». En Gordon JL (ed.). *Platelet in Biology and Pathology*. Elsevier. pp 23-60. Amsterdam, 1976.
9. Escolar G, Bastida E, Castillo E y Ordinas A: Development of a computer program to analyze the parameters of platelet-vessel wall interaction. *Hemostasis* 16:8-14, 1986.
10. Weinstein M y Deykin D: Comparison of factor VIII-related Von Willebrand factor proteins prepared from human cryoprecipitate and factor VIII concentrate. *Blood* 53:1095-1105, 1974.
11. DeGiorgio LA, Maffucci G, Toscano G, Gironi A, Vignoli S y Seghieri G: Plasma fibronectin in normolipidaemic and hyperlipidaemic uraemic patients treated with haemodialysis. *Clin Chim Acta* 168:281-286, 1987.