

# Efecto del tratamiento con eritropoyetina recombinante humana sobre la coagulación y la fibrinólisis

A. Cases, J. C. Reverter \*, G. Escolar \*, J. Sorribes \*, J. López Pedret, Ll. Revert y A. Ordinas \*  
 Servicios de Nefrología y de Hemoterapia y Hemostasia \*. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

## RESUMEN

Es un hecho conocido que el tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) para la corrección de la anemia en los pacientes urémicos se asocia a un riesgo incrementado de trombosis. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se incrementa el riesgo trombótico no están totalmente esclarecidos. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto del tratamiento con rHuEPO sobre la coagulación y la fibrinólisis en 19 pacientes hemodializados. Los estudios se realizaron antes del tratamiento y después de que los pacientes alcanzaran un hematócrito  $>30\%$  con rHuEPO, incluyendo la determinación de tiempo de protrombina y de cefalina, niveles plasmáticos de fibrinógeno, factor VIII coagulante (FVIII:C), factor von Willebrand antigénico (FvW:Ag), factor von Willebrand cofactor ristocetina (FvW:RCo), proteína C, proteína S, antitrombina III (ATIII), plasminógeno, activador del plasminógeno tisular (t-PA) e inhibidor del activador de plasminógeno (PAI). Después del tratamiento no se observaron cambios en el tiempo de protrombina o de cefalina o en los niveles de fibrinógeno, FVIII:C, FvW:Ag, FvW:RCo, plasminógeno, t-PA o PAI. Se observaron descensos significativos de los tres reguladores naturales de la coagulación: proteína C ( $77,1 \pm 14\%$  vs  $99,5 \pm 18\%$ ,  $p < 0,05$ ), proteína S ( $78,4 \pm 14\%$  vs  $98,9 \pm 12\%$ ,  $p < 0,05$ ) y ATIII ( $77,1 \pm 13\%$  vs  $95,5 \pm 18\%$ ,  $p < 0,05$ ). Nuestros resultados indican que el tratamiento con rHuEPO no modifica la coagulación ni la fibrinólisis, aunque el descenso de los tres reguladores naturales de la coagulación podría favorecer, junto a otros factores, la aparición de trombosis en pacientes de riesgo.

Palabras clave: **Eritropoyetina. Coagulación. Fibrinólisis. Proteína C. Proteína S. Antitrombina III.**

## EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN TREATMENT ON COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN UREMIC PATIENTS

### SUMMARY

It is widely known that recombinant human erythropoietin treatment (rHuEPO) for the correction of renal anemia in uremic patients is associated with an increased risk

Recibido: 10-III-93.  
 En versión definitiva: 13-VII-93.  
 Aceptado: 13-VII-93.

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

*of thrombosis. However, the mechanisms of this increased risk under rHuEPO therapy are not fully elucidated. The aim of this study was to evaluate the effect of rHuEPO treatment on coagulation and fibrinolysis in 19 transfusion-dependent hemodialyzed patients. Studies were performed before treatment and when patients achieved an hematocrit >30 % with rHuEPO. The following parameters were evaluated: prothrombin time, activated partial thromboplastin time (APTT), and plasma levels of fibrinogen, factor VIII coagulant activity (FVIII:C), von Willebrand factor antigen (vWF:Ag), von Willebrand factor ristocetin cofactor (vWF:RCO), protein C, protein S, antithrombin III (ATIII), plasminogen, tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI). After treatment no changes in prothrombin time, APTT or plasma levels of fibrinogen, FVIII:C, vWF:Ag, vWF:RCO, plasminogen, t-PA or PAI were recorded. Changes in the plasma levels of the three endogenous inhibitors of coagulation were observed: protein C ( $77.1 \pm 14\%$  vs  $99.5 \pm 18\%$ ,  $p < 0.05$ ), protein S ( $78.4 \pm 14\%$  vs  $98.9 \pm 12\%$ ,  $p < 0.05$ ) and ATIII ( $77.1 \pm 73\%$  vs  $95.5 \pm 18\%$ ,  $p < 0.05$ ). These results indicate that rHuEPO treatment has no significant effect on coagulation and fibrinolysis systems, although the decrease of the three endogenous inhibitors of the coagulation may facilitate, in association with other factors, the appearance of thrombosis in patients at risk.*

Key words: **Erythropoietin. Coagulation. Fibrinolysis. Protein C. Protein S. Antithrombin III.**

## Introducción

La eficacia de la eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) en la corrección de la anemia de origen renal está ampliamente demostrada<sup>1,2</sup>. Sin embargo, uno de los efectos secundarios más frecuentemente descritos con este tratamiento es el riesgo incrementado de trombosis, especialmente a nivel del acceso vascular<sup>2</sup>, así como un aumento de los requerimientos de heparina para evitar la coagulación del circuito extracorpóreo durante la hemodiálisis<sup>3-5</sup>.

Esta mayor incidencia de fenómenos trombóticos durante el tratamiento con rHuEPO fue inicialmente atribuida al incremento de la viscosidad sanguínea asociado al número del hematócrito, aunque posteriormente se ha demostrado que otros factores podrían contribuir al mismo. Así, se ha observado que el tiempo de sangría, que se halla frecuentemente alargado en estos pacientes<sup>6</sup>, se acortaba e incluso se normalizaba en la mayoría de los pacientes tratados con rHuEPO<sup>7-11</sup>. Asimismo se ha descrito un incremento del recuento plaquetario<sup>3,5,8-10</sup> y de la agregabilidad plaquetaria espontánea<sup>12</sup> o inducida por agonistas<sup>5,8,10</sup>, así como de la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular en estudios de perfusión *in vitro*, antes de observarse aumentos significativos del hematócrito<sup>5</sup>; demostrando que el tratamiento con rHuEPO mejora también la alteración del funcionalismo plaquetario presente en la uremia.

Sin embargo, existen pocos estudios que hayan analizado el efecto del tratamiento con rHuEPO sobre la coagulación y la fibrinólisis, la mayoría de los cuales son limitados y discrepantes. El objetivo de este estudio

fue evaluar el efecto del tratamiento con rHuEPO para la corrección de la anemia renal sobre estos dos sistemas en un grupo de pacientes hemodializados.

## Pacientes y métodos

Se estudiaron de forma prospectiva 19 pacientes afectados de insuficiencia renal crónica terminal en programa de hemodiálisis (13 hombres y 6 mujeres, con una edad media de  $50,6 \pm 16$  años, intervalo 30-68 años; tiempo medio en hemodiálisis  $79 \pm 64$  meses, intervalo 12-194 meses; hematócrito promedio,  $21,7 \pm 2,4\%$ ) (media  $\pm$  DS). Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito y el trabajo fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos de nuestro centro. Las causas de insuficiencia renal de los pacientes eran: glomerulonefritis crónica (seis pacientes), poliquistosis renal (tres), nefroangiosclerosis (tres), nefropatía diabética (dos), síndrome hemolítico urémico (uno), uropatía obstructiva (uno) y desconocida (tres). Los pacientes se dializaban durante cuatro horas tres veces por semana a través de una fístula AV. Las hemodiálisis se realizaron con filtros capilares de acetato de celulosa (CA 150, Nissho Corp, Osaka, Japón) y con baño de bicarbonato en todos los pacientes.

La pauta de administración de rHuEPO (Erantín, Boehringer Mannheim, Alemania) fue una dosis inicial de 4 U/kg de peso por vía e.v. tres veces por semana al final de la sesión de hemodiálisis, la cual era incrementada en 40 U/kg de peso cada cuatro semanas si no se observaba un aumento significativo ( $>3\%$ ) o hasta alcanzar el hematócrito deseado.

Los estudios se realizaron antes de recibir rHuEPO y después de alcanzar un hematocrito igual o superior al 30 % e incluían: tiempo de protrombina, tiempo de cefalina, niveles de fibrinógeno, factor VIII coagulante (FVIII:C), factor von Willebrand antigénico (FvW:Ag), factor von Willebrand cofactor ristocetina (FvW:RCo), antitrombina III (ATIII), proteína C, proteína S, plasminógeno, activador del plasminógeno tisular (t-PA) e inhibidor de la activación del plasminógeno (PAI). Todos los estudios se realizaron antes de la sesión de hemodiálisis (al menos 48 horas después de la última administración de heparina).

Los recuentos de sangre total se realizaron en sangre anticoagulada con EDTA (4 mM concentración final), utilizando un contador automático (Technicon H-1™, Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, New York, USA). La determinación del tiempo de protrombina y tiempo de cefalina se realizaron mediante kits comerciales. La actividad FVIII:C se determinó por el método del tiempo parcial de tromboplastina activada en dos tiempos utilizando plasma deficitario en factor VIII (Baxter Healthcare Corporation, Miami, Florida). El FvW:Ag se determinó por ELISA con suero de conejo anti-FvW humano y el FvW:RCo se determinó por agregometría en plaquetas fijadas en formaldehído y 1 mg/ml de ristocetina<sup>13</sup>. El fibrinógeno se determinó según el método de Clauss modificado<sup>14</sup>. La proteína C se determinó por un método cromogénico<sup>15</sup> (Kabivitrin, Estocolmo, Suecia). La proteína S se determinó por ensayo inmunoenzimático<sup>16</sup> (Behringwerke, Marburg, Alemania) y la ATIII se determinó por un método cromogénico (Behringwerke). El plasminógeno (Kabivitrin)<sup>17</sup>, t-PA<sup>18</sup> (Kabivitrin) y PAI-1<sup>19</sup> (Kabivitrin) se determinaron por métodos cromogénicos.

Los resultados se expresan como media  $\pm$  DS. Los datos se analizaron mediante el test de t de Student para datos apareados. Se consideraron estadísticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Los pacientes alcanzaron el hematocrito objetivo tras  $9,1 \pm 3,5$  semanas (intervalo, 4-14 semanas) y tras una dosis media de rHuEPO de  $65 \pm 23$  U/kg (intervalo, 40-120 U/kg).

Se registraron dos problemas clínicos de tipo trombotico: una trombosis del acceso vascular en una paciente al cabo de una semana de recibir rHuEPO (tercera dosis) y un infarto agudo de miocardio mortal en un paciente portador de una cardiopatía isquémica, después de seis semanas de tratamiento y coincidiendo con un incremento de la dosis de rHuEPO (en este paciente no se pudo realizar el estudio post-rHuEPO). Siete de los 18 pacientes que acabaron el estudio requirieron un aumento de la dosis de heparina durante la hemodiálisis para evitar la coagulación del circuito y

las necesidades medias de heparina también aumentaron significativamente (de  $4.583 \pm 492$  UI a  $5.139 \pm 1.026$  UI,  $p < 0,05$ ). También se observó un aumento del recuento plaquetario después del tratamiento ( $p < 0,01$ ), aunque ningún paciente desarrolló trombocitosis ( $> 500.000$  plaquetas/ $\mu$ l) (tabla I).

No se observaron cambios en los valores de tiempo de protrombina, tiempo de cefalina o niveles de FVIII:C, FvW:Ag, FvW:RCo, fibrinógeno, plasminógeno, t-PA o PAI. Se registraron descensos significativos de los tres inhibidores naturales de la coagulación: ATIII, proteína C y proteína S ( $p < 0,05$ ) (tabla I). Además, la paciente que presentó trombosis de su FAVI fue uno de los dos pacientes que presentaron los descensos más marcados de proteína C y proteína S (hasta niveles de alrededor del 60 %).

## Discusión

Nuestros resultados confirman que el tratamiento con rHuEPO para la corrección de la anemia renal no modifica los parámetros de coagulación (tiempos de Quick y de cefalina), de acuerdo con lo observado en estudios previos<sup>3,7,20-23</sup>. Tampoco se observaron aumentos de los niveles plasmáticos de las proteínas adhesivas (fibrinógeno y FvW), confirmando resultados previos<sup>7,9,20</sup>, aunque algunos autores han descrito aumentos de los niveles de fibrinógeno<sup>3,23,24</sup> y de factor von Willebrand<sup>23</sup>, cuya significación clínica sería dudosa. Por otra parte, tampoco se han descrito cambios en la estructura multimérica del factor von Willebrand

**Tabla I. Cambios de los diferentes parámetros evaluados antes y después del tratamiento con rHuEPO**

	Pre-rHuEPO	Post-rHuEPO
Hematocrito (%)	21,7 $\pm$ 234	32,1 $\pm$ 2,5 **
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu$ l)	165 $\pm$ 63	197 $\pm$ 59 **
T. protrombina (%)	89,6 $\pm$ 12	90,5 $\pm$ 8,5
APTT (seg)	29,2 $\pm$ 3,4	28,5 $\pm$ 2,9
FVIII:C (%)	175 $\pm$ 46	181 $\pm$ 51
FvW:Ag (%)	226 $\pm$ 93	215 $\pm$ 89
FvW:RCo (%)	133 $\pm$ 40	145 $\pm$ 43
Fibrinógeno (g/l)	3,57 $\pm$ 0,9	3,58 $\pm$ 0,8
Antitrombina III (%)	95,5 $\pm$ 18	77,1 $\pm$ 13 *
Proteína C (%)	99,5 $\pm$ 18	77,1 $\pm$ 17 *
Proteína S (%)	98,9 $\pm$ 12	78,4 $\pm$ 14 *
Plasminógeno (%)	93,4 $\pm$ 23	89,7 $\pm$ 14
t-PA (U/ml)	2,3 $\pm$ 1,3	1,96 $\pm$ 0,6
PAI-1 (U/ml)	9,5 $\pm$ 5,2	9,9 $\pm$ 2,8

APTT: Tiempo parcial de tromboplastina activa. FvW:Ag: Factor von Willebrand antigénico. FvW:RCo: Factor von Willebrand cofactor ristocetina. t-PA: Activador del plasminógeno tisular PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno.  $x \pm$  DS.

\*  $p < 0,05$ .

\*\*  $p < 0,01$  con respecto al basal.

durante el tratamiento con rHuEPO<sup>11</sup> que pudieran explicar el incremento del riesgo trombótico.

No se apreciaron variaciones en los niveles plasmáticos de los principales mediadores implicados en la fibrinólisis, confirmando que el tratamiento con rHuEPO tampoco parece inducir modificaciones en este sistema<sup>9,21</sup>, aunque un artículo reciente ha descrito descensos cíclicos de los niveles de inhibidor del activador del plasminógeno en pacientes tratados con rHuEPO, lo cual podría favorecer la aparición de fenómenos trombóticos<sup>24</sup>.

Sin embargo, observamos un descenso estadísticamente significativo de los tres inhibidores naturales de la coagulación. Aunque los descensos medios fueron moderados y de dudosa significación clínica si hubieran aparecido de forma aislada, se podría postular que el descenso conjunto de los tres sí podría tener consecuencias clínicas para el paciente de riesgo. Por otro lado, la paciente que presentó trombosis de su FAVI presentó un descenso de los niveles de proteína C y proteína S dentro de niveles considerados de riesgo de trombosis. La formación de trombina inicia la activación de la proteína C. La proteína C activada se une a la proteína S y este complejo cataliza la inactivación proteolítica de los factores Va y VIIIa. La antitrombina III, por su parte, forma un complejo con la trombina, inactivándola.

Nuestros resultados coinciden con los publicados por MacDougall y cols.<sup>20</sup>, que han demostrado descensos transitorios de los niveles de proteína C y proteína S, aunque otros autores no han observado cambios en los niveles de estos inhibidores de la coagulación<sup>21,25</sup>. Las discrepancias en los resultados podrían explicarse por diferencias metodológicas, así como por las diferentes vías de administración y dosis de rHuEPO utilizadas. En consonancia con estos resultados, se han descrito aumentos también transitorios del complejo trombina-antitrombina III (TAT) durante el tratamiento con rHuEPO<sup>26</sup>. Estos descensos parecen ser debidos a un efecto de la rHuEPO per se, ya que la corrección aguda de la anemia mediante transfusiones sanguíneas no inducía cambios en los niveles de estas proteínas<sup>20</sup> y porque el incremento de los niveles del complejo TAT era independiente del aumento de los niveles de hemoglobina<sup>26</sup>. La observación clínica de que los fenómenos trombóticos aparecen generalmente en las fases iniciales del tratamiento<sup>2,27</sup> podría ser debido a la coincidencia en el tiempo del incremento del número y la mejoría del funcionalismo plaquetarios<sup>5</sup> con el descenso de los niveles de los inhibidores endógenos de la coagulación. Se necesitan estudios posteriores para aclarar los mecanismos de la disminución de los inhibidores endógenos de la coagulación, su posible papel favorecedor de la aparición de trombosis y si estos cambios son transitorios o permanentes.

A raíz de todo lo anteriormente expuesto creemos

aconsejable la utilización de antiagregantes plaquetarios de forma profiláctica en las fases iniciales del tratamiento con rHuEPO en aquellos pacientes con riesgo elevado de trombosis.

## Agradecimientos

Agradecemos a Boehringer Mannheim su colaboración en la realización de este proyecto. Este proyecto ha sido parcialmente subvencionado con una beca del DGICYT-PM 89/104.

## Bibliografía

1. Eschbach JW, Downing MR, Egrie JC, Browne JK y Adamson JW: USA Multicenter Clinical Trial with recombinant human erythropoietin (Amgen). Results in hemodialysis patients. *Contrib Nephrol* 76:160-165, 1989.
2. Canadian Erythropoietin Study Group: Association between recombinant human erythropoietin and quality of life and exercise capacity of patients receiving hemodialysis. *Br Med J* 300:573-578, 1990.
3. Grützmacher P, Bergman M, Weinreich T, Natterman U, Reimers E y Pollok M: Beneficial and adverse effects of correction of anemia by recombinant human erythropoietin in patients on maintenance hemodialysis. *Contrib Nephrol* 66:104-113, 1988.
4. Spinowitz BS, Arslanian J, Charytan C, Colden RA, Rascoff J y Galler M: Impact of epoetin beta on dialyzer clearance and heparin requirements. *Am J Kidney Dis* 18:668-673, 1991.
5. Cases A, Escolar G, Reverter JC, Ordinas A, López-Pedret J, Revert L y Castillo R: Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients. *Kidney Int* 42:1668-672, 1992.
6. Steiner RW, Coggins C y Carvalho ACA: Bleeding time in uremia: A useful test to assess clinical bleeding. *Am J Haematol* 7:101-117, 1979.
7. Moia M, Mannuci PM, Vizzotto L, Casati S, Cattaneo M y Ponticelli C: Improvement in the hemostatic defect of uremia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* II:1227-1229, 1987.
8. Van Ceet C, Hauglustaine D, Verresen L, Vanrusselt M y Vermeylen J: Haemostatic effects of recombinant human erythropoietin in chronic haemodialysis patients. *Thromb Haemost* 61:117-121, 1989.
9. Gordge MP, Leaker B, Patel A, Cameron JS y Neild JH: Recombinant human erythropoietin shortens the uraemic bleeding time without causing intravascular haemostatic activation. *Thromb Res* 57:171-182, 1990.
10. Fabris F, Cordiano I y Randi ML: Effect of recombinant human erythropoietin on bleeding time, platelet number and function in children with end-stage renal disease maintained by haemodialysis. *Pediatr Nephrol* 5:225-228, 1991.
11. Akizawa T, Kinugasa E, Kitaoka T y Koshikawa S: Effect of recombinant human erythropoietin and correction of anemia on platelet function in hemodialysis patients. *Nephron* 58:400-406, 1991.
12. Taylor JE, Stewart WK, Henderson LS y Belch JJJ: Erythropoietin and spontaneous platelet aggregation in haemodialysis patients. *Lancet* 338:1361-1362, 1991.
13. Monteagudo J, Pereira A, Roig S, Reverter JC, Ordinas A y Castillo R: Investigation of circulating von Willebrand factor and plasma platelet aggregating activity in mitomycin C-related hemolytic uremic syndrome. *Am J Haematol* 33:46-49, 1990.
14. Claus A: Gerinnung physiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. *Acta Haematol* 17:237-241, 1957.

15. Vinazzer H y Pangrar V: Protein C: Comparison of different assays in normal and abnormal plasma samples. *Thromb Res* 46:1-8, 1987.
16. Amiral J, Albert B y Adam M: Application of enzyme immunoassays to coagulation testings. *Clin Chem* 30:1512-1514, 1984.
17. Friberger P: Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay factors in the fibrinolytic and plasma kallikrein-kinin systems. *Scand J Clin Lab Invest* 42(supl. 162):49-54, 1982.
18. Nilsson K, Rosen S y Friberger P: A new kit for the determination of tissue plasminogen activator and its inhibitor in blood. *Fibrinolysis* 1:163-168, 1987.
19. Steif TW, Lenz P, Becker V y Heimbürger N: Determination of plasminogen activator inhibitor (PAI) capacity of human plasma in presence oxidants: a novel principle. *Thromb Res* 50:559-573, 1988.
20. MacDougall IC, Davies ME, Hallett I, Cochlin DL, Hutton RD, Coles GA y Williams ID: Coagulation studies and fistula blood flow during erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 6:862-867, 1991.
21. Johnson WJ, McCarthy JT, Yanagihara T, Osmundson PJ, Ilstrup DM, Jenson BM y Bowie EJW: Effects of recombinant human erythropoietin on cerebral and cutaneous blood flow and on blood coagulability. *Kidney Int* 38:919-924, 1990.
22. Vigano C, Benigni A y Mendogni D: Recombinant human erythropoietin to correct uremic bleeding. *Am J Kidney Dis* 18:44-49, 1991.
23. Huraib S, Al-Momen AK, Cader AMA, Mitwalli A, Sulimani F y Abu-Aisha H: Effect of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) on the hemostatic system in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 36:252-257, 1991.
24. Aunsholt NA, Ahlbomb G, Steffensen G y Glud T: Fibrinolytic capacity in hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nephron* 62:284-288, 1992.
25. Lai KN, Yin JA, Li PKT, Yuen PMP y Lui SF: Effect of subcutaneous administration of recombinant human erythropoietin on plasma protein C, protein S and antithrombin III levels in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Int J Artif Organs* 15:264-268, 1992.
26. Taylor JE, McLaren M, Henderson IS, Belch JFF y Stewart WK: Prothrombotic effect of erythropoietin in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 7:235-239, 1992.
27. Sundal E y Kaeser U: Correction of anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin: safety and efficacy of one year's treatment in a European multicentre study of 150 haemodialysis-dependent patients. *Nephrol Dial Transplant* 4:979-987, 1989.