

Acción directa de la eritropoyetina humana recombinante (r-HuEPO) sobre el funcionalismo plaquetar en pacientes urémicos en hemodiálisis

J Martín Rivas, A. Pérez García, R. Möll y A. Cervero *

Servicio de Nefrología. Sección de Hemostasia *. Hospital General Universitario. Valencia.

RESUMEN

La eritropoyetina humana recombinante (r-HuEPO) aumenta el riesgo de complicaciones trombóticas del acceso vascular de hemodiálisis en pacientes con otros factores predisponentes. Esta tendencia protrombótica de la r-HuEPO refleja la mejora de la deficiente hemostasia primaria del paciente urémico que produce la hormona, relacionada con la corrección de la anemia durante el tratamiento.

El objetivo del estudio fue determinar si la r-HuEPO actúa directamente sobre las plaquetas, con independencia de la influencia que ejerce un mayor volumen de hematíes en la hemostasia primaria.

Se realizó un estudio de funcionalismo plaquetar en 50 pacientes en hemodiálisis y 25 sujetos sanos.

En el grupo I, constituido por 32 pacientes con anemia severa, el estudio se realizó antes de recibir eritropoyetina humana recombinante (r-HuEPO) y a las veinte semanas de tratamiento cuando la anemia se había corregido parcialmente. La r-HuEPO no modificó los niveles séricos de eritropoyetina, ni el recuento plaquetar acortó el tiempo de hemorragia (pre $17 \pm 6,7$ min; post $10 \pm 6,3$ min; $p < 0,01$), mejoró la adhesividad (pre $14,6 \pm 11,3$ %; post 53 ± 23 %; $p < 0,001$) y la agregación plaquetaria (pre $30,2 \pm 20,6$ %; post $48,6 \pm 22,1$ %; $p < 0,001$), y aumentó la generación plaquetaria de tromboxano A_2 , valorada por la cantidad de malonildialdehído (MDA) liberado por las plaquetas al ser estimuladas con 1,4 y 0,7 mM de ácido araquidónico (pre $15,4 \pm 10$ y $9,7 \pm 6,1$; post $22,5 \pm 15$ y $15,2 \pm 9,4$; $p < 0,05$ y $p < 0,01$), similar al grupo de sujetos sanos ($21,2 \pm 3$ y $12 \pm 1,8$).

El mismo estudio se realizó en el grupo II, constituido por 18 pacientes con anemia moderada que no recibieron r-HuEPO. No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de eritropoyetina, recuento plaquetario, tiempo de hemorragia, adhesividad y agregación plaquetarias entre los pacientes del grupo I después del tratamiento con r-HuEPO y los pacientes del grupo II no tratados, con un grado de anemia similar. La generación plaquetar de tromboxano A_2 , valorada por la cantidad de malonildialdehído (MDA) liberado por las plaquetas al ser estimuladas con 1,4 y 0,7 mM de ácido araquidónico, fue significativamente superior

Recibido: 4-IV-95
En versión definitiva: 13-X-95
Aceptado: 17-XI-95

Correspondencia: Dra. J Martín Rivas.
Sección Nefrología.
Hospital General de Eda.
Carretera Eda-Sax, s/n. Alicante.

en el grupo I tratado con r-HuEPO ($22,5 \pm 15$ y $15,2 \pm 9,4$) que en el grupo II no tratado ($15,6 \pm 7,9$ y $9,3 \pm 4,9$), $p < 0,01$ y $p < 0,05$. Se concluye que la r-HuEPO aumenta la generación de tromboxano A_2 por acción directa sobre las plaquetas, con independencia de la corrección de la anemia.

Palabras clave: **Eritropoyetina humana recombinante. Uremia. Hemodiálisis. Hemostasia. Funcionalismo plaquetar. Tromboxano.**

A DIRECT ACTION OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN (R-HuEPO) ON PLATELET FUNCTION IN UREMIC PATIENTS IN HEMODIALYSIS

SUMMARY

Patients treated with recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) have a relative increase in the frequency of clotted vascular access compared with uremic patients without r-HuEPO. The increased risk of thrombosis during r-HuEPO administration is the consequence of an improvement in the platelet dysfunction due to the uremic state, and seems to be associated with the correction of their anemia. The aim of this study was to clarify the mechanism of the hemostatic effect of r-HuEPO independent of the increase in the hematocrit.

Platelet function tests were performed in fifty uremic patients on hemodialysis and twenty five healthy subjects. Thirty two patients with severe anemia were treated with r-HuEPO. The study was made before and during twenty weeks of treatment when they had achieved target hematocrit. The r-HuEPO treatment shortened the prolonged uremic bleeding time (17 ± 6.7 ; 10 ± 6.3 ; $p < 0,01$), and increased values of platelet adhesiveness (14.6 ± 11.3 %; 53 ± 23 %; $p < 0,001$), aggregability ($30,2 \pm 20,6$; 48.6 ± 22.1 ; $p < 0,001$) and thromboxane generation determined by a malonyldialdehyde acid (MDA) in response to 1.4 and 0,7 mM arachidonic acid, was significantly higher in the treated group (before: 15.4 ± 10 and 9.7 ± 6.1 ; after: 22.5 ± 15 and 15.2 ± 9.4 , $p < 0,05$ and $p < 0,01$). No difference was observed in platelet generation of thromboxane A_2 between treated group and healthy subjects. Platelet count and serum erythropoietin titers did not significantly change with r-HuEPO. The study was made in eighteen uremic patients without r-HuEPO treatment, who had the same hematocrit of the r-HuEPO treated group. No difference was observed when comparing the platelet count, bleeding time, platelet adhesiveness and aggregability, between patients given r-HuEPO and no treatment. Platelet generation of thromboxane A_2 , determined by a malonyldialdehyde acid (MDA) in response to 1.4 and 0,7 mM arachidonic acid, was significantly higher in the treated group (22.5 ± 15 and 15.2 ± 9.4) than in not treated group (15.6 ± 7.9 and 9.3 ± 4.9), $p < 0,01$ and $p < 0,05$. In conclusion, the r-HuEPO therapy increases platelet generation of thromboxane A_2 , by a direct action independent of the correction of anemia.

Key words: **Recombinant human erythropoietin. Uremia. Hemodialysis. Hemostasis. Platelet function. Thromboxane.**

INTRODUCCION

La efectividad de la eritropoyetina humana recombinante (r-HuEPO) como tratamiento de la anemia asociada a insuficiencia renal y su excelente tolerancia han sido confirmadas por múltiples estudios du-

rante los últimos diez años. Los principales efectos secundarios observados durante el tratamiento con r-HuEPO son hipertensión arterial y fenómenos trombóticos^{1,2}. El 50 % de pacientes aumentan sus requerimientos anticoagulantes durante hemodiálisis^{3,4}. Se han producido trombosis del acceso vascular, princi-

palmente de catéteres centrales de larga permanencia y fístulas arteriovenosas internas estenóticas^{1,3}.

La r-HuEPO mejora la hemostasia primaria deficiente en el entorno urémico. Provoca un incremento moderado y transitorio del recuento periférico de plaquetas, que no justifica la mejoría de la hemostasia primaria observada durante el tratamiento⁴; reduce el tiempo de hemorragia y mejora la adhesividad y la agregación plaquetarias⁷⁻⁹. Estas modificaciones de la hemostasia primaria han sido relacionadas con el aumento en el volumen de hematíes^{3,5} producidos por la hormona. Se han observado trombosis vasculares durante las primeras semanas de tratamiento con r-HuEPO, sin variaciones significativas de hematócrito, probablemente por acción directa de la r-HuEPO sobre la agregación plaquetaria, que mejora desde fases muy precoces de tratamiento^{4,8}.

El objetivo del estudio fue analizar si la r-HuEPO ejerce una acción intrínseca sobre el funcionalismo plaquetar en la uremia, con independencia de la mejora que produce el incremento del volumen de hematíes durante el tratamiento.

PACIENTES Y METODOS

Se seleccionaron 50 pacientes con insuficiencia renal crónica en programa de hemodiálisis periódica que cumplieran las siguientes condiciones: edad inferior a 75 años. Situación clínica estable. Anemia secundaria a insuficiencia renal sin déficit de hierro, vitamina B₁₂ o ácido fólico, sin hiperparatiroidismo severo ni signos clínicos de intoxicación por aluminio. No habían recibido transfusiones de hematíes y/o plaquetas, ni derivados androgénicos, ni medicación antiagregante plaquetaria desde mes y medio antes del inicio del estudio. No habían sido tratados con r-HuEPO previamente ni padecían otro tipo de patología condicionante de déficit hemostático sobreañadido a la insuficiencia renal.

Los 50 pacientes fueron divididos en dos grupos según la severidad de la anemia:

El grupo I, constituido por 32 pacientes que presentaban anemia severa (Hb < 9g/dl; Hto < 25 %) y que fueron tratados con r-HuEPO al objeto de corregir la anemia hasta valores de Hb 9,5-12 g/dl o Hto 28-35 %. La r-HuEPO se administró por vía intravenosa posthemodiálisis. La dosis inicial fue de 50 UI/kg peso/3 veces semana, durante tres semanas consecutivas. Si a las tres semanas no se había alcanzado el objetivo terapéutico se aumentaba la dosis previa en 25 UI/kg peso, manteniéndose esta nueva dosis durante las tres semanas siguientes. Si el objetivo terapéutico era sobrepasado se suspendía la r-HuEPO hasta que se recuperaban los valores de Hb o Hto deseados, reanudándose el tratamiento con el 50

% de la última dosis. Una vez alcanzado el objetivo terapéutico la dosis se modificó, aumentando o reduciendo 25 UI/kg en cada revisión, para mantener el grado de anemia dentro del rango deseado.

El grupo II constaba de 18 pacientes con anemia moderada, que no recibieron r-HuEPO.

No existían diferencias entre los grupos respecto a edad, sexo ni tiempo de permanencia en hemodiálisis. Respecto a la enfermedad renal primaria, en el grupo II con anemia moderada sin r-HuEPO predomina la enfermedad poliquística del adulto (tabla I).

Tabla I. Características de los pacientes en hemodiálisis.

	Grupo I con r-HuEPO	Grupo II sin r-HuEPO
Edad	50 ± 15 años	58 ± 5 años
Sexo	16 V/16 M	14 V/4 M
Tiempo HD	43 ± 30 meses	39 ± 27 meses
Nefropatía:		
G. N. crónica.....	10 pacientes	4 pacientes
Nefritis intersticial	8 pacientes	4 pacientes
Nefroangiosclerosis	5 pacientes	1 pacientes
Nefropatía diabética	2 pacientes	0 pacientes
Poliquistosis.....	1 pacientes	6 pacientes
Sn filiar	6 pacientes	3 pacientes

Se constituyó un grupo control con 25 sujetos sanos: 15 varones y 10 mujeres, con edad media de 45 ± 7 años, que no habían recibido medicación antiagregante plaquetaria desde al menos quince días antes del estudio.

El estudio constó de las siguientes determinaciones: concentración sérica de eritropoyetina, hemoglobina, hematócrito, recuento periférico de plaquetas, tiempo de hemorragia, adhesividad plaquetaria, agregación plaquetaria y generación plaquetar de tromboxano A₂.

Las muestras de sangre se obtuvieron prehemodiálisis, y en los pacientes tratados con r-HuEPO entre 38 y 68 horas después de haber recibido la última dosis.

La concentración sérica de eritropoyetina se determinó por radioinmunoanálisis según una técnica «sandwich» que utiliza dos anticuerpos monoclonales antieritropoyetina¹⁰.

Los valores de hemoglobina, hematócrito y recuento de plaquetas se obtuvieron de una muestra de sangre recogida con EDTA que se procesó en un contador diferencial Coulter S.

El tiempo de hemorragia se determinó por el método de Ivy¹¹, midiendo la duración del sangrado por dos incisiones realizadas en antebrazo con un dispositivo estándar (Simplat-II).

La adhesividad plaquetaria se determinó por el método de Hellen modificado que mide la proporción de plaquetas que quedan retenidas dentro de

una columna de microesferas de vidrio que es atravesada por una muestra de sangre total ¹².

La agregación plaquetaria se determinó por el método turbidimétrico de Born que mide variaciones en la intensidad de luz transmitida a través de una muestra de plasma rico en plaquetas al que se añade un inductor de la agregación plaquetaria ¹³. Se utilizaron los siguientes inductores de agregación: 0,7 y 1,4 mM de ácido araquidónico (AA), 2,5 microg/ml de colágeno (COL), 2 y 4 microM de adenosindifosfato (ADP), 0,8 y 1,2 mg/ml de ristocetina (RIS).

La generación plaquetar de tromboxano se valoró por la cantidad de malonildialdehído (MDA) liberado de una muestra de plasma rico en plaquetas a la que se añadieron 0,7 y 1,4 mM de ácido araquidónico ¹⁴.

El estudio se realizó en los pacientes del grupo I antes de iniciar el tratamiento con r-HuEPO y a las veinte semanas del mismo, cuando la anemia se había corregido hasta el objetivo deseado y recibían dosis de r-HuEPO de mantenimiento (75 ± 25 UI/kg). Los resultados obtenidos a las veinte semanas de tratamiento se compararon con los del grupo de sujetos sanos. Las modificaciones del funcionalismo plaquetar producidas durante el tratamiento pueden derivar de la influencia del mayor volumen de hematíes en el torrente sanguíneo o de la acción directa de la r-HuEPO sobre las plaquetas.

El estudio se realizó en el grupo II con anemia moderada sin tratar con r-HuEPO, y se comparó con los resultados del grupo I que después del tratamiento presentaba un grado de anemia similar. Las diferencias observadas entre ambos grupos fueron resultado de la acción directa de la r-HuEPO sobre el funcionalismo plaquetar, con independencia del volumen de hematíes.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa R-Sigma. La estadística descriptiva en cada grupo se expresó como media y desviación estándar. El ajuste de la distribución de frecuencias de cada variable a la normal se realizó por el test de Kolmogorov-Smirnov. El estudio comparativo de me-

dias en el grupo I, antes y después del tratamiento con r-HuEPO, se realizó con el test t de Student para muestras apareadas. El estudio comparativo de medias entre los grupos I y II y entre cada uno de dichos grupos con el grupo control se realizó con el test t de Student para muestras independientes. Cuando las varianzas no fueron homogéneas se realizó la corrección de Welch. Se utilizó un nivel de significación de p inferior a 0,05.

RESULTADOS

En los pacientes tratados con r-HuEPO mejoró la anemia (p < 0,01), se acortó el tiempo de hemorragia (p < 0,01) y se incrementaron la adhesividad (p < 0,01) y agregación plaquetarias de forma significativa pero parcial, ya que en ningún caso se alcanzaron los valores del grupo control. El recuento de plaquetas y los niveles séricos de eritropoyetina no variaron significativamente durante el tratamiento y fueron similares a los del grupo control (tablas II y III).

La r-HuEPO aumentó la generación plaquetar de tromboxano A₂ de los pacientes en hemodiálisis hasta alcanzar los valores del grupo control (tabla IV).

No se observaron diferencias significativas en niveles séricos de eritropoyetina, recuento plaquetario, tiempo de hemorragia, adhesividad y agregación plaquetarias entre pacientes con anemia moderada tratados y no tratados con rHuEPO (tablas II y III).

La generación plaquetar de tromboxano A₂ fue significativamente mayor en los pacientes tratados con r-HuEPO que en los no tratados, con igual grado de anemia (tabla IV).

DISCUSION

La r-HuEPO es actualmente el tratamiento mas eficaz de la anemia asociada a insuficiencia renal cuando se han descartado otros factores coadyuvantes:

Tabla II. Estudio de hemostasia primaria en pacientes urémicos antes y después de recibir r-HuEPO, sin r-HuEPO y en un grupo control de sujetos sanos.

	Grupo Ia Pre r-HuEPO	Grupo Ib Post r-HuEPO	Gr. Ia Gr. Ib	Grupo II Sin r-HuEPO	Gr. Ib Gr. II	Grupo control	Gr. Ib Gr. control	Gr. II Gr. control
Hb (g/dl).....	6,6 ± 0,8	10,1 ± 0,8	p < 0,001	10,4 ± 0,5	NS	13,3 ± 1,2	p < 0,01	p < 0,01
Hto (%).....	20,8 ± 2,8	30,2 ± 1,4	p < 0,001	31,3 ± 1,9	NS	43 ± 2,5	p < 0,01	p < 0,01
Nivel EPO (mUI/ml).....	4,1 ± 2,6	5,1 ± 3,4	NS	6,4 ± 4,5	NS	8,3 ± 5,5	NS	NS
Plaquetas (x 1.000/mm ³).....	238 ± 67	245 ± 69	NS	247 ± 66	NS	240 ± 62	NS	NS
Tiempo. hemorragia (min)	17 ± 6,7	10 ± 6,3	p < 0,01	9,1 ± 5,4	NS	6,5 ± 2	p < 0,01	p < 0,01
Adhesividad. plaquetar (%)	14,6 ± 11,3	53 ± 23	p < 0,001	57,8 ± 7	NS	89 ± 6,2	p < 0,01	p < 0,01

Grupo Ia: pacientes urémicos con anemia severa antes del tratamiento con r-HuEPO.
 Grupo Ib: pacientes urémicos con anemia moderada después del tratamiento con r-HuEPO.
 Grupo II: pacientes urémicos con anemia moderada sin haber sido tratados con r-HuEPO.

Tabla III. Estudio de agregación plaquetaria en pacientes urémicos antes y después de recibir r-HuEPO, sin r-HuEPO y en un grupo control de sujetos sanos.

Inductores Agregación	Grupo Ia Pre r-HuEPO	Grupo Ib Post r-HuEPO	Gr. Ia Gr. Ib	Grupo II Sin r-HuEPO	Gr. Ib Gr. II	Grupo control	Gr. Ib Gr. control	Gr. II Gr. control
1,4 mM ác. araquidónico .	30,2 ± 20,6	48,6 ± 22,1	p < 0,001	49,1 ± 10	NS	75 ± 192	p < 0,001	p < 0,001
0,7 mM ác. araquidónico .	32,1 ± 23,1	45,5 ± 23,1	p < 0,01	50 ± 18	NS	75 ± 7,6	p < 0,001	p < 0,001
2,5 µg/ml colágeno.....	29,1 ± 22,7	47,7 ± 22,1	p < 0,001	55 ± 18	NS	70 ± 15	p < 0,001	p < 0,001
2 µM ADP.....	25,5 ± 17,1	39,1 ± 18,4	0 < 0,01	42,6 ± 13	NS	64 ± 14	p < 0,001	p < 0,001
4 µM ADP.....	36,8 ± 19,6	53,5 ± 15,7	p < 0,001	58,7 ± 15,3	NS	61 ± 9,6	p < 0,01	NS
1,2 mg/ml ristocetina.....	35,6 ± 26	56,8 ± 20,1	p < 0,001	54,7 ± 10,5	NS	82 ± 6,1	p < 0,001	p < 0,001
0,8 mg/ml ristocetina.....	22,7 ± 23,1	44,4 ± 24,4	p < 0,001	49,4 ± 20,1	NS	52 ± 6,8	p < 0,01	NS

Grupo Ia: pacientes urémicos con anemia severa antes del tratamiento con r-HuEPO.
 Grupo Ib: pacientes urémicos con anemia moderada después del tratamiento con r-HuEPO.
 Grupo II: pacientes urémicos con anemia moderada sin haber sido tratados con r-HuEPO.

Tabla IV. Generación de tromboxano A₂ (liberación de MDA en pacientes urémicos antes y después de recibir r-HuEPO, sin r-HuEPO y en un grupo control de sujetos sanos.

Inductores Agregación	Grupo Ia Pre r-HuEPO	Gr. Ia Gr. Ib	Grupo Ib Post r-HuEPO	Gr. Ib Gr. II	Grupo II Sin r-HuEPO	Grupo control	Gr. Ib Gr. control	Gr. II Gr. control
1,4 mM ác. araquidónico.....	15,4 ± 10	p < 0,05	22,5 ± 15	P < 0,01	15,6 ± 7,9	21,2 ± 3	NS	p < 0,001
0,7 mM ác. araquidónico.....	9,7 ± 6,1	p < 0,01	15,2 ± 9,4	P < 0,05	9,3 ± 4,9	12 ± 1,8	NS	p < 0,01

Grupo Ia: pacientes urémicos con anemia severa antes del tratamiento con r-HuEPO.
 Grupo Ib: pacientes urémicos con anemia moderada después del tratamiento con r-HuEPO.
 Grupo II: pacientes urémicos con anemia moderada sin haber sido tratados con r-HuEPO.

déficit de hierro, vitamina B₁₂ o ácido fólico, intoxicación por aluminio, o hiperparatiroidismo.

El objetivo terapéutico es la corrección parcial de la anemia (valores de hematocrito comprendidos entre 30 -35 %), que elimina las complicaciones clínicas y los requerimientos transfusionales¹⁵. La excesiva corrección de la anemia de forma rápida ha sido relacionada con aparición o agravamiento de hipertensión arterial y fenómenos trombóticos^{16,17}. La trombosis del acceso vascular parece más frecuente en pacientes tratados con r-HuEPO, aunque generalmente se asocian otros factores de riesgo trombogénico: catéteres de larga permanencia, prótesis o fistulas arteriovenosas autólogas con funcionamiento deficiente^{1,3}. El 50 % de pacientes tratados con r-HuEPO precisan mayores dosis de anticoagulantes durante la sesión de hemodiálisis que antes de iniciar el tratamiento^{3,4}.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que el tratamiento con r-HuEPO mejora la hemostasia primaria, la cual es deficiente en pacientes urémicos.

Se ha descrito que una reducción transitoria de las proteínas C y S de la fibrinólisis^{18,19}, del plasminógeno y la antitrombina III²⁰ durante el tratamiento con r-HuEPO podrían favorecer los episodios trombóticos. Otros estudios no han observado modificaciones

significativas de la coagulación y la fibrinólisis durante el tratamiento con r-HuEPO^{4,5,6}. El presente trabajo se centra en la acción de la r-HuEPO sobre la hemostasia primaria, sin investigar la coagulación ni la fibrinólisis.

El recuento periférico de plaquetas no se modificó después de 20 semanas de tratamiento con r-HuEPO, coincidiendo con estudios previos^{1,5}. Algunos trabajos han descrito incrementos leves del recuento plaquetario que no justifican la mejora de la hemostasia primaria producida por r-HuEPO^{7,21}. Este aumento parece ser transitorio, durante las primeras semanas de tratamiento, cuando se administran dosis elevadas de r-HuEPO^{4,22,23}.

El tiempo de hemorragia, muy alargado en los pacientes del estudio con anemia severa, disminuyó durante el tratamiento con r-HuEPO hasta niveles similares a los de pacientes con anemia moderada no tratados. De estos resultados se deduce que el aumento del volumen total de hematíes interviene en la mejora de la hemostasia primaria que produce la r-HuEPO, en concordancia con los estudios que relacionan la corrección de la anemia con la reducción del tiempo de sangrado y el aumento de la adhesividad plaquetaria con rHuEPO^{3,5,8}. En este trabajo, la r-HuEPO aumentó de forma significativa el hematocrito y la adhesividad plaquetaria; las transfusiones

de hematíes habían demostrado, antes de la introducción terapéutica de la r-HuEPO, que el aumento del volumen de hematíes mejoraba la hemostasia primaria deficiente de los pacientes urémicos al desplazar los hematíes a las plaquetas en el torrente sanguíneo hacia la periferia y favorecen su adhesión a las paredes vasculares^{24, 25}.

La aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina, reducida en los pacientes en hemodiálisis con anemia severa, mejoró de forma significativa durante el tratamiento con r-HuEPO. La mejoría funcional del factor Von Willebrand que participa en la adhesión de las plaquetas a la pared vascular contribuye al incremento de la adhesividad plaquetaria observado durante el tratamiento con r-HuEPO^{21, 22}.

Durante el tratamiento con r-HuEPO se produce un aumento en la agregación plaquetaria^{4, 6-9, 12, 26-28}, no confirmado por todos los autores^{22, 29, 30}, y cuyo mecanismo patogénico no ha sido determinado.

Las transfusiones de hematíes no modifican significativamente la agregación plaquetaria en los pacientes urémicos²⁷. Los hematíes aumentan al hemolizarse la concentración sanguínea de ADP, que estimula a las plaquetas y favorece su degranulación durante el proceso de agregación plaquetaria. Sin embargo, la mayoría del ADP que estimula a las plaquetas procede de ellas mismas y la hemólisis ejerce una mínima influencia sobre la agregación plaquetaria^{6, 25}.

En el presente estudio, la agregación plaquetaria mejoró significativamente con r-HuEPO hasta valores similares a los del grupo de pacientes con anemia moderada no tratados con r-HuEPO, y sin alcanzar los valores del grupo de sujetos sanos. Estos resultados sugieren que la r-HuEPO influye sobre la agregación plaquetaria por la participación en la misma de un mayor volumen de hematíes, aunque no descarta una acción directa de la r-HuEPO sobre las plaquetas en alguna fase de la agregación plaquetaria.

La generación plaquetaria de tromboxano A_2 mejoró durante el tratamiento con r-HuEPO hasta alcanzar valores de normalidad similares a los sujetos sanos, difiriendo significativamente de los valores deficientes observados en pacientes urémicos con anemia moderada no tratados con r-HuEPO. Estos resultados concuerdan con estudios previos³¹; aunque no han sido confirmados por otros autores^{22, 32}, sugieren que la r-HuEPO actúa de forma directa sobre las plaquetas estimulando la generación de tromboxano A_2 sin la participación de los hematíes.

El tromboxano A_2 se genera a partir de ácido araquidónico procedente de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria. El ácido araquidónico se transforma en endoperóxidos intermedios por acción del enzima ciclooxigenasa, que libera de forma simultánea malondialdehído (MDA), y los endoperóxidos originan

tromboxano A_2 , por acción del enzima tromboxano sintetasa. La uremia altera el funcionalismo de las enzimas ciclooxigenasa y/o tromboxano-sintetasa, provocando una escasa generación plaquetaria de tromboxano y una agregación plaquetaria deficiente por la vía del ácido araquidónico^{32, 33}.

En las plaquetas no activadas, el calcio se acumula en el sistema tubular denso de la membrana plaquetaria. Durante la fase de activación, las plaquetas generan tromboxano A_2 , que transporta calcio desde la membrana hasta el citoplasma plaquetario. La concentración de calcio en el citoplasma de las plaquetas activadas depende de la cantidad de tromboxano A_2 que se ha generado durante la activación plaquetaria. Cuando la plaqueta estimulada contiene una adecuada concentración citoplasmática de calcio, se produce la contracción plaquetaria que permite la degranulación y posteriormente agregación plaquetaria.

Estudios previos han demostrado que la r-HuEPO aumenta el contenido intracelular de calcio y ejerce una acción contráctil directa sobre cultivos de células musculares lisas³⁴. Se ha sugerido que la r-HuEPO ejerce un efecto vasopresor directo³⁵. La r-HuEPO aumenta la concentración plaquetaria de calcio citoplasmático que favorece la contracción y posterior agregación plaquetarias²³.

El aumento de la generación de tromboxano A_2 , que se observa en el estudio durante el tratamiento con r-HuEPO concuerda con el incremento en la concentración citoplasmática de calcio durante la activación plaquetaria descrita por otros autores²³. La administración de ácido acetilsalicílico, que inhibe la acción de la ciclooxigenasa y la generación de tromboxano A_2 , reduce la hiperagregabilidad plaquetaria observada en pacientes tratados con r-HuEPO³⁶.

Los niveles séricos de eritropoyetina de todos los pacientes en hemodiálisis fueron similares a los del grupo control. Este resultado confirma la importancia patogénica de la deficiente producción renal de eritropoyetina, que, junto con la toxicidad del medio urémico, desencadena la anemia asociada a insuficiencia renal³⁷.

Los pacientes en hemodiálisis con anemia severa antes de iniciar el tratamiento con r-HuEPO presentaron niveles séricos de eritropoyetina menores que los pacientes con anemia moderada, aunque sin significación estadística. En el grupo con anemia moderada y niveles más altos de eritropoyetina predominó la poliquistosis como nefropatía de base, en concordancia con estudios previos y en relación con el estímulo de la producción renal de eritropoyetina provocado por la isquemia del parénquima renal adyacente a los quistes³⁸.

El tratamiento con r-HuEPO no modificó los niveles séricos de eritropoyetina medidos a partir de 38

horas de la administración de la última dosis, en concordancia con otros estudios³⁹. La r-HuEPO por vía intravenosa produce una elevación de la concentración sérica de eritropoyetina superior a 1.000 U/l, máxima entre los primeros 5 y 15 minutos siguientes a su administración, que posteriormente va disminuyendo, con una vida media de 6 a 10 horas⁴⁰.

Los cambios en la hemostasia primaria durante el tratamiento con r-HuEPO no se han relacionado directamente con la vía de administración⁴¹. Se desconoce cómo afecta a la función plaquetar la elevada concentración sérica de eritropoyetina alcanzada de forma inmediata a la administración intravenosa de r-HuEPO.

Como conclusión, y a la vista de los resultados obtenidos, se aprecia que la r-HuEPO actúa de forma directa sobre las plaquetas, aumentando la generación de tromboxano A₂, con independencia del hematocrito y sin provocar elevaciones mantenidas de la concentración sérica de eritropoyetina.

La mayor generación plaquetar de tromboxano A₂ que produce la r-HuEPO podría explicar la mejora de la agregación plaquetaria y los episodios trombóticos observados por otros autores durante las primeras semanas de tratamiento, antes de que el hematocrito aumente de forma significativa^{9,42}.

Bibliografía

1. Winearls CG, Pippard MJ, Downing MR, Oliver DO, Reid C y Cotes PM: Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* ii:1175-1178, 1986.
2. Bommer J, Kugel M, Schoeppe W, Brunkhorst R, Samtleben W, Bransiepe P y Scigalla P: Multicenter trial of Recombinant Human Erythropoietin: general results. Dose-related effects of Recombinant Human Erythropoietin on erythropoiesis. *Contrib Nephrol* 66:85-93, 1988.
3. Casati S, Passerini P, Moia M, Graziani G, Cesana B, Perisic M y Ponticelli C: Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having haemodialysis. *Br Med J* 295:1017-1020, 1987.
4. Cases A, Escolar G, Reverter JC, Garrido M, Ordinas A, López-Pedret J, Castillo L y Revert L: Efecto del tratamiento con eritropoyetina recombinante humana sobre la hemostasia primaria en pacientes urémicos. *Med Clin* 95:644-647, 1990.
5. Moia M, Vizzotto L, Cattaneo M, Mannucci PM, Casati S y Ponticelli C: Improvement in the hemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* i:1227-1229, 1987.
6. Huraib S, Al-Momen AK, Gader AMA, Mitwalli A, Sulimani E y Abu-Aisha H: Effect of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) on the hemostatic system in chronic haemodialysis patients. *Clin Nephrol* 36:252-257, 1991.
7. Bommer J, Muller-Bühlh, Ritz E y Efert J: Recombinant human erythropoietin in anaemic patients on hemodialysis. *Lancet* i:392, 1987.
8. Van Geet C, Hauglustaine D, Verresen L, Vanrusselt M y Vermynen J: Haemostatic effects of recombinant human erythropoietin in chronic hemodialysis patients. *Thromb Haemost* 61:117-121, 1989.
9. 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* 42:668-672, 1992.
10. Cotes PM: Immunoreactive erythropoietin in serum. Evidence for the validity of the assay method and the physiological relevance of estimates. *Br J Haematol* 50:427-438, 1986.
11. Ivy AC, Nelson D y Bucher G: The standardization of certain factors in the cutaneous venostasis bleeding time technique. *J Lab Clin Med* 26:1812-1822, 1941.
12. Hellen AJ: Platelet adhesiveness in Von Willebrand disease. A study with a new modification of the glass bead filter method. *Scand J Haematol* 7:374-382, 1970.
13. Born GVR y Cross MJ: The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 168:178-195, 1963.
14. Smith JB, Ingerman CM y Silver MJ: Malonaldehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelet. *J Lab Clin Med* 88:167-172, 1976.
15. Eschbach JW, Downing MR, Egrie JC, Browne JK y Adamson JW: USA Multicenter trial of Recombinant Human Erythropoietin. *Contrib Nephrol* 76:160-165, 1989.
16. Schaefer RM, Kuerner B, Zech M, Denninger C y Borneff C: Treatment of the anemia of hemodialysis patients with recombinant human erythropoietin. *Int J Artif Organs* 11:249-254, 1988.
17. Casati S, Passerini P, Moia M, Graziani G, Mannucci PM y Ponticelli C: Correction of coagulation disturbances in chronic haemodialysis patients treated with human recombinant erythropoietin (r-HuEPO). *Kidney Int* 33:622, 1988.
18. Macdougall IC, Davies ME, Hallet I, Cochlin DL, Hutton RD, Coles GA y Williams JD: Coagulation studies and fistula blood flow during erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transpl* 6:862-867, 1991.
19. Wirtz JJ, Van Esser JW, Hamulyak K, Leunissen KM y Van Hooff JP: The effects of recombinant human erythropoietin on hemostasis and fibrinolysis in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 38:277-282, 1992.
20. Tsao CJ, Kao RH, Cheng TY, Huang CC, Chang SL y Lee FN: The effect of recombinant erythropoietin on hemostatic status in chronic uremic patients. *Int J Hematol* 55:197-203, 1992.
21. Huraib S, Al-Momen AK, Gader AMA, Mitwalli A, Sulimani E y Abu-Aisha H: Effect of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) on the hemostatic system in chronic haemodialysis patients. *Clin Nephrol* 36:252-257, 1991.
22. Akizawa T, Kinugasa A, Kitaoka T y Koshihawa S: Effects of recombinant human erythropoietin and correction of anemia on platelet function in hemodialysis patients. *Nephron* 58:400-406, 1991.
23. Van Geet C, Van Damme-Lombaerts R, Vanrusselt M, De Mol A, Proesmans W y Vermynen J: Recombinant human erythropoietin increases blood pressure, platelet aggregability and platelet free calcium mobilisation in uraemic children: a possible link? *Thromb Haemost* 64:7-10, 1990.
24. Livio M, Marchesi D, Remuzzi G, Gotti E, Meca G y De Gaetano G: Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions. *Lancet* i:1013-1015, 1982.
25. Fernández F, Goudable C, Sie P, Ton-That H, Durand D, Suc JM y Boenu B: Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusion. *Br J Haematol* 59:139-148, 1985.
26. Zwaginga JJ, Ijsseldijk JW, Groot PG, Kooistra M, Vos J, Van Es A, Koomans HA, Struyvenberg A y Sijma JJ: Treatment of uremic anemia with recombinant erythropoietin also reduces the defects in platelet adhesion and aggregation caused by uremic plasma. *Thromb Haemost* 66:638-647, 1991.
27. Roger SD, Piper J, Tucker B, Raine AE, Baker LR y Kovacs IB: Enhanced platelet reactivity with erythropoietin but not following transfusion in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 8:213-217, 1993.

28. El-Shahawy MA, Francis R, Akmal M y Massry SG: Recombinant human erythropoietin shortens the bleeding time and corrects the abnormal platelet aggregation in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 41:308-313, 1994.
29. Gordge MP, Leaker B, Patel A, Oviyasu E, Cameron JS y Neild GH: Recombinant human erythropoietin shortens the uraemic bleeding time without causing intravascular haemostatic activation. *Thromb Res* 57:171-182, 1990.
30. Stenver D, Jeppesen L, Nielsen B, Dalgaard-Nielsen J, Haedersdal C, Mehlsen Jy Winther K: The effect of erythropoietin function and fibrinolysis in chronic renal failure. *Int J Artif Organs* 17:141-145, 1994.
31. Fabris F: Effect of human recombinant erythropoietin on bleeding time, platelet number and function in children with end-stage renal-disease maintained by hemodialysis. *Pediatr Nephrol* 5:225-228, 1991.
32. Viganó G, Benigni A, Mendogni D, Mingardi G, Mecca y Remuzzi G: Recombinant human erythropoietin to correct uremic bleeding. *Am J Kidney Dis* 13:44-49, 1991.
33. Remuzzi G, Benigni A y Dodesini P: Reduced platelet thromboxane formation in uremia. Evidence for a functional cyclooxygenase defect. *J Clin Invest* 71:762-768, 1983.
34. Heindenreich S, Rahn KH y Zidek W: Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessel. *Kidney Int* 39:259-265, 1991.
35. Teruel JL, Pascual J, Liaño F, Marcén R, Gámez C, Serrano P y Ortuño J: Evolución de la tensión arterial en enfermos tratados con eritropoyetina. Datos clínicos a favor de un mecanismo presor intrínseco. *Nefrología* 12 (supl.1):8594, 1992.
36. Taylor JE, Henderson IS, Stewart WK y Belch JJ: Erythropoietin and spontaneous platelet aggregation in haemodialysis patients. *Lancet* 338:1361-1362, 1991.
37. Adamson JW: The erythropoietin/hematocrit relationship in normal and polycythemic man: Implications for marrow regulation. *Blood* 32:597-609, 1968.
38. Chandra M, Miller ME, García JF, Mossey RT y McVicar M: Serum immunoreactive erythropoietin levels in patients with polycystic kidney disease as compared with other hemodialysis patients. *Nephron* 39:26-29, 1985.
39. Akizawa T, Koshikawa S, Takaku F, Urabe A, Akiyama N, Mimura N, Otsubo O, Nihei H, Suzuki Y, Kawaguchi Y, Ota K, Kubo K, Mamuro F y Maeda T: Clinical effect of recombinant human erythropoietin on anemia associated with chronic renal failure. A multiinstitutional study in Japan. *Int J Artif Organs* 11:343-350, 1988.
40. Neumayer HH, Brockmoller J, Fritschka E, Roots I, Scigalla P y Wattenberg: Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after SC administration and in long-term IV treatment in patients on maintenance hemodialysis. *Contrib Nephrol* 76:131-142, 1989.
41. Taylor JE, Belch JJ, McLaren M, Henderson IS y Stewart WK: Effect of erythropoietin therapy and withdrawal on blood coagulation and fibrinolysis in hemodialysis patients. *Kidney Int* 44:182-190, 1993.
42. Malyszko J, Mazerska M, Malyszko J, Pawlak K, Azzadin A, Mysliwiec M y Buczek W: Serotonergic mechanisms are involved in the hemostatic action of erythropoietin in uremic patients. *Int J Clin Lab Res* 23:42-44, 1993.