

Efecto deletéreo de la hemodiálisis sobre la trombopatía urémica

Josep López Pedret, Aleix Cases Amenos, Ginés Escolar Albaladejo, Dolores Tassies Penella, Maribel Díaz Ricart, Josep Sorribes López, Antonio Ordinas Bouza

Resumen

A fin de valorar el posible efecto del tratamiento sustitutivo, y más concretamente el posible efecto deletéreo de la hemodiálisis sobre la trombopatía urémica, se realizaron dos estudios. 1) Se determinó la agregación plaquetaria y el contenido de ARN plaquetario en 15 pacientes hemodializados antes y inmediatamente después de la HD, en 11 pacientes en CAPD, en 8 pacientes con IRC preterminal y en 34 sujetos sanos. 2) Se evaluó el impacto del cambio de técnica de diálisis sobre el funcionalismo y citoesqueleto plaquetarios en 8 pacientes hemodializados que fueron transferidos a CAPD.

La agregación plaquetaria inducida por ADP ($p < 0.05$) y ristocetina ($p < 0.05$) era inferior en los pacientes hemodializados que en los controles, sin observarse diferencias entre los otros 3 grupos. El porcentaje y número absoluto de plaquetas reticuladas (con mayor contenido de ARN) era inferior en los pacientes hemodializados ($p < 0.05$) que en los otros 3 grupos. No existían diferencias entre los otros 3 grupos (CAPD, IRC y sujetos sanos) respecto al porcentaje y número de plaquetas reticuladas. Después de la HD se observó una disminución de la agregación plaquetaria ($p < 0.05$) y un descenso del número y porcentaje de plaquetas reticuladas ($p < 0.01$) respecto a la muestra basal.

En los pacientes que fueron transferidos de HD a CAPD se observó una mejoría de la agregación plaquetaria inducida por varios agonistas ($p < 0.05$) y de la interacción plaquetar-subendotelio ($p < 0.05$), así como de la incorporación de proteínas estructurales al citoesqueleto, alcanzando significación estadística para la actina y actin-binding protein ($p < 0.05$).

Estos resultados indican que la propia hemodiálisis induce un deterioro de la función plaquetaria, el cual parece ser debida al consumo preferente de plaquetas jóvenes y metabólicamente más activas, así como al agotamiento de las proteínas del citoesqueleto plaquetario por la continua polimerización y depolimerización de las mismas que ocurre con la repetida activación plaquetaria durante la HD.

PALABRAS CLAVE: Trombopatía urémica, Diálisis alta.

The damaging effect of haemodialysis on uraemic thrombopathy

In order to evaluate the possible influence of maintenance hemodialysis on uraemic thrombopathy two studies were performed. 1) Platelet aggregation and platelet RNA content were

measured in 15 hemodialyzed patients before and after HD, in 11 CAPD patients, in 8 CRF patients and in 34 normal subjects. 2) The impact of the change of dialysis technique on platelet function and cytoskeleton was measured in 8 hemodialyzed patients who were transferred to CAPD.

Platelet aggregation induced by ADP ($p < 0.05$) and ristocetin ($p < 0.05$) was lower in hemodialyzed patients than in controls, without differences between the other three groups. The percentage and absolute number of reticulated platelets (with high RNA contents) was lower in hemodialyzed patients ($p < 0.05$) than in the other three groups. There were no differences between the three groups (CAPD, CRF patients and normal subjects) with respect to the number and percentage of reticulated platelets. After hemodialysis there was an impairment of platelet aggregation ($p < 0.05$) and a decrease of the number and percentage of reticulated platelets ($p < 0.01$) with respect to the basal sample.

In hemodialyzed patients who were transferred to CAPD there was an improvement of platelet aggregation induced by several agonists ($p < 0.01$) and of platelet-subendothelium interaction ($p < 0.05$) in perfusion experiments. Furthermore, an improvement of the assembly of structural proteins to the cytoskeleton after platelet activation was also observed, reaching statistical significance for actin and actin-binding protein ($p < 0.05$).

These results indicate that hemodialysis has a deleterious effect on platelet function which may contribute to uraemic thrombopathy. This effect may be related to the preferential consumption of younger and metabolically more active platelets and to the exhaustion of structural proteins of the cytoskeleton secondary to the repeated polymerization and depolymerization that occurs with the repeated platelet activation during HD.

KEY WORDS: Uraemic thrombopathy, Haemodialysis.

Introducción

Los pacientes urémicos presentan una diátesis hemorrágica que se ha atribuido a una disfunción plaquetaria y que se manifiesta en una prolongación del tiempo de sangría (1-3). Sin embargo, los mecanismos patogénicos de esta trombopatía parecen ser complejos y no están totalmente esclarecidos en la actualidad.

El posible efecto del tratamiento sustitutivo sobre la trombopatía urémica ha sido escasamente evaluado. Mientras los primeros estudios parecían demostrar que

la disfunción plaquetaria mejoraba con la diálisis (4-6), trabajos posteriores demostraban que mientras el trasplante renal o la diálisis peritoneal mejoraban la agregación plaquetaria en los pacientes urémicos, la disfunción plaquetaria persistía en los pacientes en programa de hemodiálisis o en pacientes urémicos bajo tratamiento conservador (7, 8), indicando que la hemodiálisis no era capaz de corregir la trombopatía. Estos autores postularon que la mejoría de la trombopatía con la diálisis peritoneal, pero no con la hemodiálisis, sería debida al mayor aclaramiento de "moléculas medias" con la diálisis peritoneal (7). Sin embargo, la utilización de filtros biocompatibles, que presentan unos aclaramientos superiores de estas moléculas, parecen haber tenido un escaso efecto sobre la trombopatía. Por otro lado, otros autores observaron que la agregación plaquetaria empeoraba después de la hemodiálisis, efecto que no era atribuible a la heparina (9, 10).

Es conocido que durante la hemodiálisis existe una marcada activación plaquetaria (11,12), la cual se ha atribuido a diversos mecanismos: el stress mecánico secundario a la circulación de la sangre a través de circuitos mecánicos, la continua exposición de las plaquetas a superficies artificiales, la liberación de ADP por los eritrocitos inducido por mecanismos reológicos, el uso de heparina, o la generación local de trombina, entre otros (2). La repetida activación plaquetaria que sufren los pacientes en hemodiálisis periódica podría contribuir a la trombopatía urémica por diversos mecanismos: a) mediante un consumo predominante de aquellas plaquetas metabólicamente más activas, y b) la repetida activación de las plaquetas durante las sesiones de hemodiálisis conduciría a estados consecutivos de polimerización y despolimerización del citoesqueleto plaquetario, secundarios a la activación y desactivación de las plaquetas, con el consiguiente agotamiento de estos mecanismos, lo que conduciría a un estado de refractoriedad plaquetaria frente a los estímulos. En este sentido, recientemente se ha descrito que las plaquetas de los pacientes hemodializados presentan una alteración de su extensión (spreading) sobre una superficie artificial, la cual parece relacionada con la alteración de la asociación de las proteínas contráctiles al citoesqueleto plaquetario que ocurre durante la activación plaquetaria (13).

El contenido de ARN plaquetario se ha utilizado para identificar aquellas plaquetas que se han liberado recientemente a la circulación y como medida del "turn-over" plaquetario (14), ya que las plaquetas, al igual que los eritrocitos, al ser células anucleadas presentan una disminución del contenido de ARN a medida que envejecen (15).

El objetivo de este estudio fue dilucidar el posible papel patogénico de la hemodiálisis periódica en la trombopatía urémica y aclarar los posibles mecanismos de este efecto. Para ello se realizaron dos protocolos: En primer lugar, se analizó el contenido plaquetario de ARN

en pacientes urémicos bajo diversas modalidades de tratamiento (tratamiento médico, hemodiálisis y diálisis peritoneal continua ambulatoria (CAPD)). En segundo lugar, se evaluó el funcionalismo plaquetario y del citoesqueleto plaquetario en 8 pacientes hemodializados que fueron transferidos a CAPD por diversos motivos.

Pacientes y métodos

A. PROTOCOLO 1

Se incluyeron 34 pacientes urémicos y 34 sujetos controles sanos. Los pacientes urémicos se dividieron en tres grupos: Grupo I: 15 pacientes en programa de hemodiálisis (10 hombres y 5 mujeres, edad media 58.5+14.3 años, tiempo medio en HD: 33.1+33 meses, media+DS). Todos los pacientes eran dializados durante 4 horas 3 veces por semana con filtros capilares de acetato de celulosa de 1.1 a 1.5 m² (CA 110 o CA 150, Nissho Corp, Osaka, Japón) y un baño de bicarbonato. Grupo II: 11 pacientes en CAPD (6 hombres y 5 mujeres, edad media 60.7+14 años, tiempo medio en CAPD 12.9+11.5 meses). Todos los pacientes se hacían 4 recambios al día de 2 litros de líquido peritoneal (Dianeal 137, Baxter S.A, Valencia, España). Grupo III: 8 pacientes afectados de insuficiencia renal crónica preterminal bajo tratamiento médico (5 hombres y 3 mujeres, edad media 51.2+16.7 años, niveles medios de creatinina plasmática 8.7+1.5 mg/dl, intervalo 7.3-11.4 mg/dl). El grupo IV estaba constituido por 34 controles sanos, escogidos entre un grupo de donantes voluntarios de sangre (20 hombres y 14 mujeres, edad media 49.2+17.8 años).

El recuento plaquetario y los tests de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina activada y niveles de fibrinógeno) eran normales tanto en los pacientes como en los controles. Ninguno de los pacientes o controles habían tomado aspirina u otra medicación que afectara el funcionalismo plaquetario desde al menos 2 semanas antes del estudio. Ningún paciente había recibido transfusiones de sangre en los dos meses previos y ninguno recibía eritropoyetina recombinante humana cuando se realizó el estudio.

Obtención de muestras de sangre

Se obtuvo una muestra de sangre en todos los pacientes y controles para recuento celular, estudios de agregación plaquetaria "in vitro" y estudio del contenido de ARN plaquetario por citometría de flujo. Además a los pacientes hemodializados se les extrajo una segunda muestra al finalizar la sesión de hemodiálisis.

B. PROTOCOLO 2

Se estudiaron 8 pacientes urémicos en programa de hemodiálisis periódica (2 hombres y 6 mujeres, edad media 61.2+12 años, intervalo 42-74 años, tiempo medio en hemodiálisis 85+64 meses, intervalo 3-171 m) que fueron

transferidos a un programa de CAPD por causas diversas: falta de acceso vascular para hemodiálisis (6 pacientes), decisión del paciente (1) y cardiopatía isquémica (1). Ninguno de estos pacientes habían recibido aspirina u otra medicación que afectara el funcionalismo plaquetario desde al menos 2 semanas antes de los estudios. Ningún paciente había recibido transfusiones de sangre o derivados en los dos meses previos a los estudios.

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes mientras estaban en programa de hemodiálisis y al menos 1 mes después de incluirse en programa de CAPD. Se evaluaron la agregación plaquetaria "in vitro" frente a diversos agonistas, la interacción plaquetasubendotelio en estudios de perfusión "ex vivo" y la asociación de proteínas contráctiles al citoesqueleto plaquetario tras la estimulación con trombina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

C. TECNICAS UTILIZADAS

Los recuentos celulares se realizaron en un contador automático electrónico (Technicon H-1 System, Technicon Instruments Corp. Tarrytown, NY, USA).

Agregación plaquetaria "in vitro"

Las muestras de sangre para estudios de agregación plaquetaria "in vitro" se recogieron en tubos de polipropileno que contenían CCD (9:1, v:v) como anticoagulante (citrato sódico 0.1 M, ácido cítrico 7 mM, dextrosa 0.14 M, pH 6.5). Los estudios de agregación se realizaron dentro de las 2 primeras horas después de la extracción. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a 100 x g durante 20 minutos.

Los estudios de agregación se determinaron en PRP mediante un lumiagregómetro (Chrono-Log Corp, Havertown, PA, USA). Se utilizaron los siguientes agonistas: ADP (adenosina S difosfato) 2 μ M (Sigma, St Louis, MO, USA), epinefrina 10 μ M (Menarini Diagnóstica, Milán, Italia), colágeno S μ g/ml (Menarini Diagnostica), ácido araquidónico 1.4 mM (Menarini Diagnostica) y ristocetina 1 mg/ml (Lundbeck & Co, Copenhagen, Dinamarca). La amplitud máxima y mínima del agregómetro se ajustó con plasma pobre en plaquetas (100% de transmisión) y PRP (0% de transmisión), respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje de agregación máxima obtenida tras 5 minutos de estimulación.

Estudios de perfusión "ex vivo"

Los estudios de perfusión se realizaron con sangre total anticoagulada en cámaras de perfusión anulares, según el método de Baumgartner (16). Segmentos de aorta desendotelizados con a-quimotripsina fueron perfundidos con sangre total durante 10 minutos a 37°C. El flujo de sangre se obtuvo bombeándola mediante una bomba peristáltica (Renal Systems, Minneapolis, Minn, USA) a

unos 140 ml/min (coeficiente de cizallamiento 800 seg^{-1}). Los segmentos fueron posteriormente fijados, deshidratados con alcoholes, incluidos en JB-4 (Polysciences, Warrington, Penn, USA), cortados para microscopía óptica y teñidos con azul de toluidina.

La interacción de las plaquetas con el subendotelio vascular se evaluó morfométricamente, de acuerdo con los criterios de Baumgartner y Muggli (17), utilizando un sistema de análisis semiautomatizado (MOP-20, Kontron, Messegerate GmbH, Munich, Alemania) (18). La interacción de las plaquetas con el subendotelio se clasificó como: contacto (C) plaquetas unidas, pero no extendidas sobre el subendotelio; **adhesión** (A) plaquetas extendidas sobre el subendotelio o formando capas de menos de 5 μ M de altura; y **trombo** (T) agregados plaquetarios con una altura igual o superior a 5 μ m. Cada uno de estos parámetros se expresó como porcentaje sobre la superficie total del vaso analizado. Se consideró como **superficie vascular cubierta por plaquetas** la suma de todos los parámetros anteriores (C+A+T).

Citometría de flujo

La determinación del contenido de ARN plaquetario se realizó mediante una técnica de doble marcaje y citometría de flujo. Las muestras de sangre obtenidas en EDTA se fijaron con paraformaldehído al 1% y las plaquetas fueron lavadas con PBS pH 7.2 (Bio-Merieux, Marcy-l'Etoile, Francia) suplementado con 1% de albúmina bovina sérica (BSA) (Sigma, St Louis, MO, USA) y 1% de suero humano AB descomplementado. Las plaquetas lavadas y fijadas se incubaron en presencia de un anticuerpo monoclonal frente a la glicoproteína Ib (CD 42b) (Janssen Biochimica, Geel, Bélgica) durante 30 minutos a 22°C. Después de esta incubación, las plaquetas fueron lavadas por tres veces con PBS suplementado con BSA 1% y suero AB 1%. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo de cabra antiratón marcado con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) durante 30 minutos a 22°C. El anticuerpo secundario no fijado se eliminó mediante lavado. Las muestras se incubaron posteriormente con 1 ml de naranja de tiazol (Becton Dickinson, San José, CA, USA) durante 1 hora a 22°C. Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Se analizaron un mínimo de 5.000 plaquetas en cada muestra y se calculó el porcentaje y número absoluto de plaquetas con mayor contenido de ARN (plaquetas reticuladas).

Estudios del citoesqueleto plaquetario

El PRP de las muestras de sangre citratada se obtuvo mediante centrifugación a 100 x g durante 20 minutos. Las plaquetas se lavaron con CCD suplementado con adenosina 5 mM y teofilina 3 mM. El pellet final fue resuspendido en una solución de Hank.

Los citoesqueletos plaquetarios se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento descrito previamente con pequeñas modificaciones (19). Las muestras de plaquetas resuspendidas se ajustaron a 1.2×10^6 plaquetas/III y divididas en tres alíquotas, una control y dos sujetas a la estimulación con trombina 0.01 y 0.1 μ /ml, respectivamente. Noventa segundos después de la activación todas las muestras se trataron con un tampón de lisis que contenía Triton X-100 2%, Tris HCL 100 mM, ácido etilenglicol bis (β -aminoetiler)-N,N,N',N'-tetraacético 10 mM y ácido etilendiaminotetraacético 4 mM, pH 7.4. Las proteínas del citoesqueleto se aislaron mediante centrifugación a $12000 \times g$ durante 4 minutos a 4°C en una microcentrífuga. El pellet insoluble se lavó por dos veces con el tampón de lavado a 4°C . Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se disolvió con tampón de lavado que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% y calentado a 100°C durante 5 minutos. Tras la solubilización, las muestras se congelaron a -40°C hasta realizar los estudios electroforéticos.

Las proteínas del citoesqueleto se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 7-12%, teñidas con azul de Coomassie y analizadas densitométricamente. El análisis densitométrico se realizó utilizando un analizador de imagen computerizado (Biocom 200, Les Ulis Cedex, Francia) y un programa específico de software Elphor II. Para facilitar las comparaciones entre geles, la cuantificación de las bandas de proteínas se realizó bajo condiciones estandarizadas.

Se calculó el área de cada pico proteico obtenido de plaquetas no estimuladas y se consideró como 100%. Después se analizaron las áreas de la misma banda proteica en las muestras de plaquetas estimuladas con trombina. La asociación de una proteína con el citoesqueleto tras la activación con trombina se expresa como porcentaje de aumento sobre la misma proteína obtenida en las muestras de plaquetas no activadas.

Estadística

Los resultados se expresan como media+DS. Para el análisis de los resultados se utilizaron los tests de Kruskal Wallis, la U de Mann Whitney o el test de Wilcoxon para datos pareados, según procediera. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

Resultados

A. PROTOCOLO 1

Recuento plaquetario

El recuento plaquetario medio era $229.5 \pm 61.5 \times 10^9/\text{L}$ en el grupo I, $266 \pm 90.4 \times 10^9/\text{L}$ en el grupo II, $264 \pm 75.2 \times 10^9/\text{L}$ en el grupo III y $252.9 \pm 60.1 \times 10^9/\text{L}$ en el grupo IV. Las diferencias entre los cuatro grupos no eran significativas. En el grupo I, el recuento plaquetario de la muestra obtenida después de la HD disminuyó (204 ± 65.3

$\times 10^9/\text{L}$), aunque de forma no significativa, respecto a la muestra basal.

Estudios de agregación plaquetaria "in vitro"

Los estudios de agregación demostraron una respuesta disminuida al ADP ($42.2 \pm 12.9\%$, $p < 0.05$) y a la ristocetina ($47.9 \pm 18.8\%$, $p < 0.05$), respecto a los controles. Los pacientes en CAPD (ADP $69.8 \pm 19.6\%$, ristocetina $69.7 \pm 21.7\%$) o bajo tratamiento conservador (ADP $72.2 \pm 18.9\%$, ristocetina $69.5 \pm 18.3\%$) mostraban una agregación plaquetaria inferior, aunque estadísticamente no significativa, respecto a los controles (ADP $85.3 \pm 17.9\%$, ristocetina $86.4 \pm 19.1\%$). No se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos en los valores de agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico, colágeno o epinefrina. Además, las muestras obtenidas después de la HD en los pacientes del grupo I mostraron una reducción significativa de la agregación inducida por ADP ($32.1 \pm 11.6\%$, $p < 0.05$) y ristocetina ($35.0 \pm 16.6\%$, $p < 0.05$), respecto a la muestra basal (Figura 1).

Determinación del contenido de ARN plaquetario

El porcentaje de plaquetas con mayor contenido de ARN (plaquetas reticuladas) en controles era de $9.05 \pm 3.53\%$ (intervalo $4.9-12.86\%$). El porcentaje de plaquetas reticuladas en los pacientes hemodializados $3.72 \pm 1.72\%$ (intervalo $1.28-6.62\%$) era significativamente inferior a los controles ($9.1 \pm 3.53\%$, intervalo $4.9-12.9\%$, $p < 0.01$), así como al de los pacientes en CAPD ($8.67 \pm 2.73\%$, intervalo $6.26-13.27\%$) ($p < 0.01$) y al de los pacientes en tratamiento conservador ($9.14 \pm 3.04\%$, intervalo $6.3-14.1\%$, $p < 0.01$). Por el contrario, no se observaron diferencias en el porcentaje de plaquetas reticuladas entre los grupos II, III y IV. Cuando se analizó el número absoluto de plaquetas reticuladas los resultados obtenidos fueron similares. El número de plaquetas reticuladas era inferior en el grupo I ($8.5 \pm 4.3 \times 10^9/\text{L}$, intervalo $2.0-21.5 \times 10^9/\text{L}$) respecto al grupo II ($23.2 \pm 7.8 \times 10^9/\text{L}$, intervalo $11.6-41.5 \times 10^9/\text{L}$, $p < 0.01$), grupo III ($24.0 \pm 8.4 \times 10^9/\text{L}$, intervalo $13.9-43.6 \times 10^9/\text{L}$, $p < 0.01$) y grupo IV ($21.7 \pm 10.3 \times 10^9/\text{L}$, intervalo $10.4-39.6 \times 10^9/\text{L}$, $p < 0.01$). Tampoco se observaron diferencias cuando se consideró el número de plaquetas con mayor contenido de ARN entre los grupos II, III y IV (Figura 2).

Un paciente con insuficiencia renal crónica que fue reevaluado después de un mes en programa de HD también mostró un descenso del porcentaje (de 9.01 a 4.11%) y del número de plaquetas reticuladas (de 22.1 a $9.6 \times 10^9/\text{L}$) (Figura 3).

En los pacientes hemodializados tanto el porcentaje ($2.14 \pm 1.09\%$, intervalo $0.78-3.02\%$, $p < 0.01$), como el número de plaquetas reticuladas ($5.3 \pm 2.3 \times 10^9/\text{L}$, intervalo $1.1-9.7 \times 10^9/\text{L}$, $p < 0.01$) se redujo significativamente en la muestra obtenida después de la sesión de HD, respecto a la muestra basal.

Estudios de perfusión "ex vivo"

Cuando los pacientes estaban en hemodiálisis la adhesión plaquetaria, estimada a través del porcentaje de superficie vascular cubierta por plaquetas, era de 18.6+10.8 %. Cuando estaban en CAPD se observó un aumento significativo del porcentaje de superficie cubierta (24.6+7.9%, p<0.05). Asimismo, el porcentaje de trombo, un parámetro de la interacción plaqueta-plaqueta, aumentó después de un mes en CAPD (17.6+10% vs 12.3+8.1%, p<0.05).

Análisis de las proteínas del citoesqueleto

Como puede observarse en la figura 4, el contenido de proteínas observado en los citoesqueletos de plaquetas en reposo obtenidas del mismo paciente en HD y en CAPD eran prácticamente superponibles.

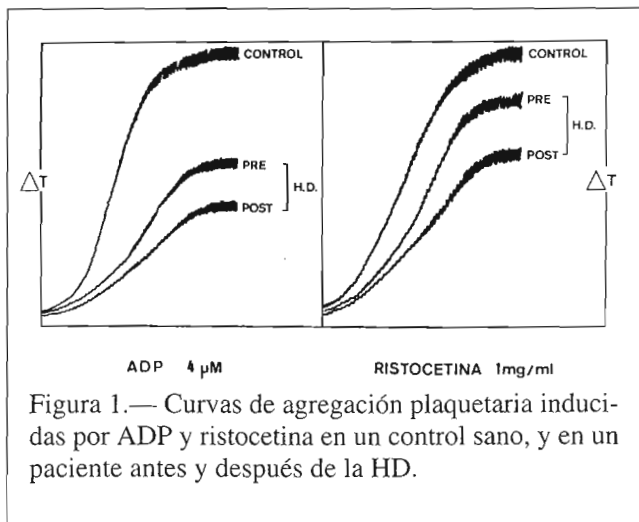


Figura 1.— Curvas de agregación plaquetaria inducidas por ADP y ristocetina en un control sano, y en un paciente antes y después de la HD.

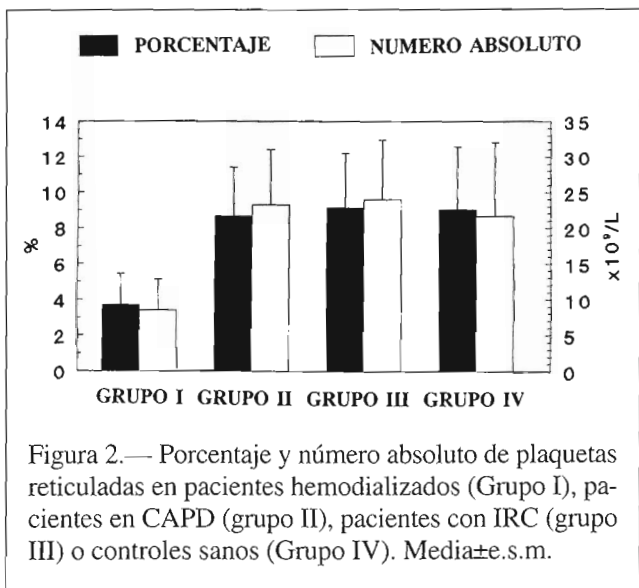


Figura 2.— Porcentaje y número absoluto de plaquetas reticuladas en pacientes hemodializados (Grupo I), pacientes en CAPD (grupo II), pacientes con IRC (grupo III) o controles sanos (Grupo IV). Media±e.s.m.

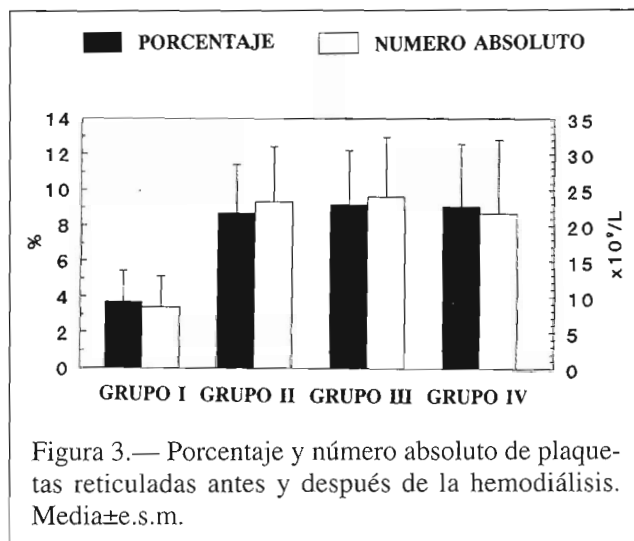


Figura 3.— Porcentaje y número absoluto de plaquetas reticuladas antes y después de la hemodiálisis. Media±e.s.m.

B. PROTOCOLO 2

Parámetros clínicos

No se observaron cambios en los valores de hemoglobina (91.1+13.5 vs 88.7+11.5 g/dl), hematocrito (29.4+5.4 vs 28.7+5.3%), recuento plaquetario (323+69 vs 309+54 x 10⁹/L) o niveles de BUN (78.1+14.6 vs 77.2+14.6 mg/dl) cuando los pacientes estaban en CAPD, respecto a los valores de estos pacientes cuando estaban en programa de hemodiálisis. Se observó un discreto aumento de los niveles séricos de creatinina al ser transferidos a CAPD (11.5+2.1 vs 10.1+2.1 mg/dl, p<0.05).

Estudios de agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria "in vitro" inducida por ácido araquidónico (78.8+16.8% vs 55.8+16.5%, p<0.05), colágeno (81.2+21% vs 60.2+19%, p<0.05), ADP (79.1+21% vs 56.2+23%, p<0.05), epinefrina (79.8+18 vs 49+21%, p<0.05) y ristocetina (89.1+19% vs 65.7+23, p<0.05) mejoró significativamente cuando los pacientes estaban en CAPD, respecto al período en hemodiálisis.

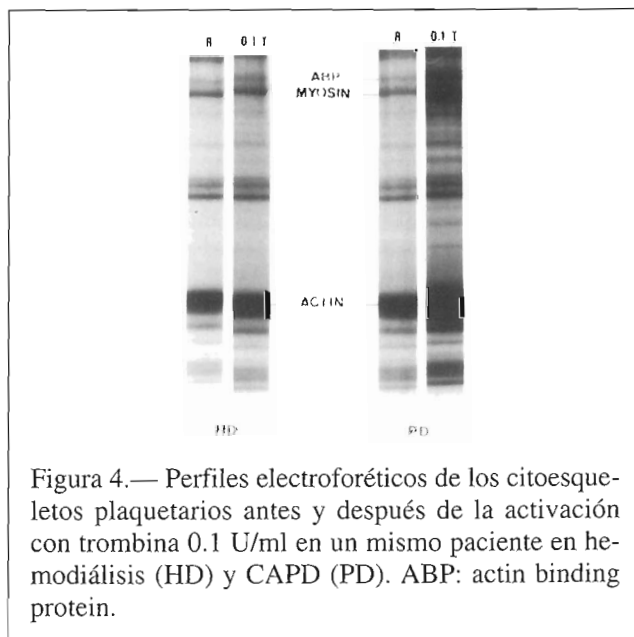


Figura 4.— Perfiles electroforéticos de los citoesqueletos plaquetarios antes y después de la activación con trombina 0.1 U/ml en un mismo paciente en hemodiálisis (HD) y CAPD (PD). ABP: actin binding protein.

Tras la estimulación con trombina se observaba una incorporación de proteínas contráctiles al citoesqueleto, que era mayor cuando los pacientes estaban en CAPD, que en plaquetas estimuladas de los mismos pacientes en HD (Figura 4). El aumento de la incorporación de proteínas contráctiles alcanzó significación estadística para la actina ($p < 0.05$) y actin-binding protein ($p < 0.05$).

Discusión

En nuestro estudio los pacientes hemodializados presentaban un recuento plaquetario ligeramente inferior a los otros grupos, aunque sin alcanzar significación estadística, de acuerdo con lo observado en estudios previos (20). De todas formas, es improbable que esta relativa trombopenia que presentan los pacientes hemodializados juegue algún papel en el defecto hemostático de la uremia. También es interesante la reducción del recuento plaquetario observada después de la hemodiálisis, hecho ya descrito previamente (11), el cual se atribuye al consumo de plaquetas durante la hemodiálisis.

Es un hecho ampliamente aceptado que durante la hemodiálisis existe una importante activación plaquetaria (11,12). Se han implicado diversas causas en la activación plaquetaria durante la hemodiálisis: la exposición a una superficie artificial de la membrana, la liberación de ADP por los hematíes por el efecto de las fuerzas de cizallamiento, la formación de trombina por la activación de la cascada de la coagulación o el uso de heparina (21). La activación plaquetaria conduce a la degranulación y liberación del contenido de los gránulos densos y gránulos alfa, y a la fragmentación y desaparición de las mismas de la circulación cuando la activación es muy potente. Aunque los efectos a largo plazo de la repetida activación plaquetaria son desconocidos, no sería de extrañar que la repetida activación plaquetaria que sufren los pacientes en programa de hemodiálisis pudiera inducir un cierto grado de refractoriedad plaquetaria que contribuyera a la disfunción plaquetaria descrita en la uremia. En este sentido, diversos estudios experimentales han demostrado que las plaquetas preactivadas y degranuladas pueden permanecer en la circulación, aunque su función está alterada (22). Por otro lado, la activación plaquetaria induce la liberación de proteínas contenidas en los gránulos alfa que poseen importantes propiedades procoagulantes, vasoactivas y mitogénicas, como el factor plaquetario 4, β -tromboglobulina o el *platelet-derived growth factor* (PDGF), favoreciendo la proliferación de la fibra muscular lisa vascular y el desarrollo de arteriosclerosis (23). Dada la elevada incidencia de patología arteriosclerótica en los pacientes hemodializados (24), es razonable hipotetizar que la repetida reinfusión durante la hemodiálisis de las citoquinas liberadas tras la activación y degranulación plaquetarias podría contribuir a la arteriosclerosis acelerada que presentan estos pacientes.

Los resultados de este estudio demuestran que la función plaquetaria está disminuida en los pacientes hemodializados, respecto a pacientes urémicos tratados con otros métodos terapéuticos, confirmando estudios previos (8). Además, esta disfunción plaquetaria se agrava inmediatamente después de la hemodiálisis, a pesar de la mejoría del estado urémico. Estudios previos ya habían observado que la hemodiálisis "per se" empeoraba la agregación plaquetaria, efecto que no era debido a la heparina (9, 10). Estos resultados coinciden con el hallazgo de una menor población de plaquetas reticuladas en estos pacientes, la cual disminuye aún más después de la hemodiálisis. Estos resultados en su conjunto, son compatibles con que las plaquetas reticuladas, más jóvenes y metabólicamente más activas, serían más sensibles a la activación, degranulación y subsiguiente eliminación durante la hemodiálisis. Es decir, que durante la hemodiálisis existiría un consumo preferente de las plaquetas reticuladas, permaneciendo pues en la sangre las plaquetas más refractarias a la activación. La observación de que el contenido plaquetario de RNA en los pacientes urémicos en tratamiento conservador o CAPD es superponible al de los controles sanos indica que la disminución de la proporción de plaquetas reticuladas en los pacientes hemodializados no puede ser atribuida al estado urémico, sino secundario a la propia técnica de hemodiálisis.

Los cambios que aparecen tras la activación plaquetaria (liberación del contenido de los gránulos y los cambios morfológicos) dependen de una serie de procesos dependientes de receptor que inducen a la fosforilación de una serie de proteínas que conducen a la polimerización de la actina globular y conversión en actina filamentososa (25). El ensamblaje molecular de la actina y otras proteínas estructurales del citoesqueleto tienen un papel crítico en los cambios conformacionales y la contracción plaquetarias (26). En estudios previos se ha observado que la interacción de las plaquetas con el subendotelio en estudios de perfusión *ex vivo* está alterado en los pacientes hemodializados, a pesar de que la exposición de receptores de adhesión (GPIb) o de agregación (GPIIb-IIIa) es normal, sugiriendo que la alteración de la interacción plaqueta-subendotelio radicaría en algún punto distal a la activación del receptor (27). Estudios posteriores han demostrado que las plaquetas urémicas se extendían con dificultad sobre una superficie artificial y que ello estaba relacionado con una deficiente incorporación de actina y otras proteínas estructurales al citoesqueleto tras la activación plaquetaria (13). Los resultados de este estudio confirman la alteración bioquímica del citoesqueleto plaquetario en los pacientes hemodializados y demuestra una mejoría de la misma cuando estos pacientes son transferidos a diálisis peritoneal, a pesar de que no se observen cambios en el estado urémico, lo que indicaría que estas mejoras están relacionadas con el cambio de técnica. Además, la mejoría de la incorporación de proteínas estructurales al citoesqueleto durante la activación plaquetaria coincide con una mejora paralela del funciona-

lismo plaquetario, sugiriendo que existe una estrecha relación entre ambos fenómenos. Es razonable pensar que la alteración del citoesqueleto plaquetario en los pacientes hemodializados sea atribuible a la repetida secuencia de activación y desactivación de plaquetas, que conduciría a un consumo y agotamiento de las proteínas estructurales que se ensamblan con el citoesqueleto. El agotamiento de las proteínas del citoesqueleto y la degranulación de los gránulos alfa y densos por las repetidas activaciones podrían explicar el estado de storage-pool disease adquirido que se ha descrito en estos pacientes (28).

En conjunto estos resultados indican que la técnica de hemodiálisis, debido a la repetida activación plaquetaria inducida por este procedimiento, tendría un efecto deletéreo sobre el funcionalismo plaquetario, el cual podría jugar un papel en la trombopatía urémica.

Conclusiones

1. Los pacientes hemodializados presentan una disfunción plaquetaria superior a la que presentan otros pacientes urémicos bajo otras modalidades terapéuticas (tratamiento conservador o diálisis peritoneal), a pesar de que los valores de los parámetros de intoxicación urémica son superponibles.

2. Esta disfunción plaquetaria se agrava inmediatamente después de la HD, sugiriendo que la hemodiálisis periódica contribuye a la disfunción plaquetaria de los pacientes urémicos.

3. Los pacientes hemodializados presentan una disminución del número de plaquetas con mayor contenido de RNA, el cual disminuye aún más después de la HD, sugiriendo que ello es debido al consumo preferente durante la hemodiálisis de aquellas plaquetas más jóvenes y metabólicamente más activas.

4. Los pacientes hemodializados presentan un defecto de incorporación de proteínas contráctiles al citoesqueleto plaquetario durante su activación, el cual mejora cuando son transferidos a diálisis peritoneal. Sugiriendo que la dificultad de adhesión de las plaquetas a superficies extrañas, observada en pacientes hemodializados se debería, al menos en parte, a esta anomalía del citoesqueleto, atribuida a la secuencia continuada de polimerización y despolimerización secundaria a la repetida activación plaquetaria durante la hemodiálisis.

Bibliografía

1. Remuzzi G. Bleeding in renal failure. *Lancet* 1: 1205-1208. 1988.
2. Gordge MP, Neild GH. Platelet function in uremia. *Platelets* 2: 115-121. 1991.
3. Castillo R, Lozano T, Escolar G, Revert L, Lopez J, Ordinas A. Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. *Blood* 68: 337-342. 1986.
4. Lindsay RM, Friesen M, Aronstam A, Andrus F, Clark WF, Linton AL. Improvement of platelet function by increased frequency of haemodialysis. *Clin Nephrol* 10: 67-71. 1978.
5. Remuzzi G, Livio M, Marchiaro G, Mecca G, DeGaetano G. Bleeding in renal failure. Altered platelet function in chronic uremia only partially corrected by haemodialysis. *Nephron* 22: 347-535. 1978.
6. Di Minno G, Martinez J, McKean ML, de la Rosa J, Burke JF, Murphy S. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *Am J Med* 79: 552-559. 1985.
7. Lindsay RM, Friesen M, Koens F, Lipton AL, Oreopoulos D, DeVeber G. Platelet function in patients on long-term peritoneal dialysis. *Clin Nephrol* 6: 335-339. 1976.
8. Nenci GG, Berretini M, Agnelli G, Parise P, Buoncrisiani U, Ballatori E. Effect of peritoneal dialysis, haemodialysis and kidney transplantation on blood platelet function. *Nephron* 23: 287-292. 1979.
9. Levin RD, Kwaan HC, Ivanovich P. Changes in platelet function during dialysis. *J Lab Clin Med* 92: 779-786. 1978.
10. Knudsen F, Nielsen AH, Kristensen SD. The effect of dialyzer membrane material on intradialytic changes in platelet count, platelet aggregation, circulating platelet aggregates and antithrombin III. *Scand J Urol Nephrol* 19: 227-323. 1985.
11. Hakim RM, Schater AI. Haemodialysis associated platelet activation and thrombocytopenia. *Am J Med* 78: 575- . 1985.
12. Cases A, Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Lopez-Pedret J, Revert L, Ordinas A. Platelet activation on hemodialysis: Influence of dialysis membranes. *Kidney Int* 43 (supl 41): S217-S220. 1993.
13. Escolar G, Diaz-Ricart M, Cases A, Castillo R, Ordinas A, White JG. Abnormal cytoskeletal assembly in platelets from uremic patients. *Am J Pathol* 143: 823-831. 1993.
14. Ault KA. Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *Ann NY Acad Sci* 677: 293-298. 1993.
15. Karpatkin S. Human platelet senescence. *Annu Rev Med* 23: 101-108. 1972.
16. Baumgartner HR. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Research* 5: 167-169. 1973.
17. Baumgartner HR y Mugli R. Adhesion and aggregation: morphological demonstration and quantitation "in vivo" and "in vitro". En Gordon JL (ed). *Platelet Biology and Pathology*. Elsevier. Amsterdam 1976. pp 23-60.
18. 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.
19. Kometani M, Sato T, Fujii T. Platelet cytoskeletal components involved in shape change and secretion. *Thromb Res* 41: 801-809. 1986.
20. Gafter U, Bessler H, Malachi T, Zevin D, Djaldetti M, Levi J. Platelet count and thrombopoietic activity in patients with chronic renal failure. *Nephron* 45: 207-210. 1987.

21. Notohamiprodjo M, Andrassy K, Bommer J, Ritz E. Dialysis membranes and coagulation system. *Blood Purification* 4: 130-141, 1986.
22. Cieslar P, Greenberg JP, Rand ML, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Separation of thrombin treated platelets by density gradient centrifugation. *Blood* 53: 867-877. 1979.
23. Hemmendinger S, Newmann MR, Beretz A, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Rich A, Schohn D, Jahn H. Mitogenic activity on human arterial smooth muscle cells is increased in the plasma of patients undergoing hemodialysis with cuprophane membranes. *Nephron* 53: 147-151, 1989.
24. Ibels LS, Stewart JH, Mahony JF, Neale FC, Sheil AGR. Occlusive arterial disease in uremic and hemodialysis patients and renal transplant recipients. *Quart J Med* 46: 197-214. 1977.
25. Jennings LK, Fox JEB, Edwards HH, Philips DR. Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *J Biol Chem* 256: 6927-6932, 1981.
26. Fox JEB, Philips DR. Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets. *J Biol Chem* 257: 4120-4126, 1987.
27. Escolar G, Cases A, Bastida E, Garrido M, López J, Revert L, Castillo R, Ordinas A. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb-IIIa. *Blood* 76: 1336-1339, 1990.
28. Soslau G, Brodsky I, Putatunda B, Parker J, Schwartz AB. Selective reduction of serotonin storage and ATP release in chronic renal failure patient platelets. *Am J Haematol* 35: 171-178, 1990.