

Estudio del efecto de medio urémico sobre la función endotelial y sus posibles implicaciones en la diátesis hemorrágica y arteriosclerosis acelerada en la uremia

Aleix Cases, Gines Escolar, Maribel Díaz-Ricart, José Vicente Torregrosa, José López-Pedret

Resumen

La diátesis hemorrágica coexiste con una arteriosclerosis acelerada en los pacientes urémicos. Mientras la disfunción plaquetaria ha sido estudiada exhaustivamente, es menos conocido el estado del endotelio en la uremia y su posible papel tanto en la diátesis hemorrágica, como en la arteriosclerosis acelerada presentes en la uremia. Recientes estudios sugieren la existencia de una activación endotelial crónica en la uremia.

Investigamos el efecto de un medio urémico sobre la célula endotelial (CE) *in vitro*, así como la trombogenicidad de las matrices extracelulares (MEe) generadas por estas células. Para ello, se cultivaron CE en presencia de un pool de suero obtenido de pacientes urémicos o sujetos sanos y se evaluó: 1) la viabilidad celular, 2) niveles de factor von Willebrand (FvW) en los sobrenadantes o asociados a la MEC, 3) la trombogenicidad de las CE y MEC y 4) la morfología ultraestructural de las MEC.

Respecto al efecto del medio urémico sobre la célula endotelial *in vitro*, la viabilidad de las CE en cultivo en medio urémico era similar a la de las CE control. La interacción de las plaquetas con las MEC generadas por CE expuestas a un medio urémico estaba reducida. Ello era debido a una reducción de la adhesión plaquetaria (9.8:±1.9 vs 16.7:±1.8% en controles, $p < 0.02$). Los niveles de FvW en el sobrenadante o asociado con la MEC era similar a los controles. El análisis ultraestructural de la MEE generada por CE expuestas a un medio urémico demostró una matriz deficiente. Asimismo, se observó un aumento del desprendimiento de las CE de las MEC, cuando estas eran perfundidas con sangre citratada.

Estos resultados indican que el medio urémico induce cambios cuantitativos y cualitativos en el subendotelio vascular, caracterizados por una red de fibras más pobre, una adhesividad disminuida de las CE y una trombogenicidad reducida de las MEC. Estos cambios pueden representar otros mecanismos que contribuyan a las alteraciones de la hemostasia observada en pacientes urémicos.

PALABRAS CLAVE: célula endotelial - uremia - plaquetas.

Summary

The bleeding tendency in uremia coexists with an accelerated atherosclerosis. Although the pathophysiology of the uremic thrombopathy has been extensively investigated, the state of endothelium in uremia and its possible role on the bleeding diathesis and the accelerated atherosclerosis in chronic renal failure are already undefined. Recent studies suggest that a chronic activation of endothelium occurs in uremia.

We investigated the effect of a uremic milieu on endothelial cells (EC) *in vitro* and the reactivity of extracellular matrices (ECM) generated by these cells towards platelets. EC cultures were exposed to a pool of sera obtained either from uremic patients or from normal donors, and the following parameters were evaluated: 1) EC viability (trypan blue exclusion test); 2) von Willebrand factor (vWF) levels in supernatants and associated with ECM, 3) the reactivity of EC and endothelial derived ECM towards platelets, measured "ex vivo" under flow conditions (5 min, wall shear rate 800s⁻¹), and 4) the ultrastructure of the ECM.

The viability of EC cultured in the presence of uremic sera was similar to controls. Platelet interaction with ECM generated by EC exposed to uremic sera was significantly reduced ($p < 0.05$). The decrease was mainly related to a reduction in platelet adhesion (9.8:±1.9% vs 16.7:±1.8% in controls, $p < 0.02$). VWF levels in supernatants and associated with ECM were similar to controls. Ultrastructural analysis of the ECM generated by EC exposed to uremic sera revealed a deficient matrix. An increased removal of EC was observed in experiments in which EC cultured in the presence of uremic sera were perfused with citrated blood.

These results indicate that a uremic milieu induces quantitative and qualitative changes in the vascular subendothelium characterized by a less intricate network of fibrils, a decreased attachment of EC and reduced thrombogenicity to the ECM. These changes may represent another mechanism which can contribute to the hemostatic dysfunction observed in uremic patients.

KEY WORDS: endothelium - uremia - subendothelium - platelets

Introducción

La insuficiencia renal crónica se ha asociado clásicamente con una diátesis hemorrágica [1]. Sin embargo, es llamativo que en el enfermo urémico las manifestaciones hemorrágicas coexisten con signos evidentes de un estado protrombótico [2] y una arteriosclerosis acelerada [3]. Los principales mecanismos implicados en la diátesis hemorrágica del enfermo urémico han sido exhaustivamente revisados recientemente [2,4,5]. Actualmente se sabe que ésta es debida a una alteración de la hemostasia primaria de origen multactorial en la cual se han implicado la anemia [6,7], así como una alteración primaria del funcionamiento plaquetario [8-10]; aunque también se ha demostrado que factores plasmáticos que se acumulan en la insuficiencia renal agravan la trombopatía [8]. Estudios recientes han demostrado además una alteración de la reactividad de las plaquetas urémicas frente a superficies artificiales y sugieren que ésta sería debida a un trastorno en el ensamblaje de las proteínas del citoesqueleto de la plaqueta urémica cuando ésta es activada. Estas últimas alteraciones explicarían, al menos en parte, su interacción defectuosa con el subendotelio dañado [11].

Los mecanismos que subyacen en la tendencia trombótica de los pacientes urémicos son menos conocidos. Sin embargo, las estadísticas no dejan lugar a dudas. El riesgo de padecer accidentes coronarios o cerebrovasculares en los pacientes hemodializados es entre 5-20 veces superior a la de una población normal de edad similar [12,13]. Este mayor riesgo trombótico es difícilmente atribuible únicamente a la frecuente coexistencia en estos pacientes de otros factores de riesgo cardiovascular conocidos, tales como la hipertensión arterial, la hiperlipidemia o el tabaquismo [14]. De hecho, es posible que la anemia y la disfunción plaquetaria de los enfermos urémicos encubra o compense parcialmente esta tendencia protrombótica. La corrección de la anemia con eritropoyetina recombinante humana (rHIEPo) mejora de una forma global los problemas hemorrágicos de estos pacientes, acorta el tiempo de sangría [15], y mejora de forma parcial la anomalía funcional de las plaquetas [16]. Sin embargo, y paralelamente a la reducción de la incidencia de patología hemorrágica en el enfermo urémico, se ha observado que el tratamiento con r-HIEPo incrementa el riesgo de complicaciones trombóticas en estos pacientes [17], apoyando la hipótesis anteriormente expuesta.

Un aspecto escasamente estudiado hasta la fecha es el papel que el endotelio vascular pueda jugar en el trastorno hemorrágico-trombótico en la uremia. De hecho, el endotelio vascular juega un papel importante en la regulación de la hemostasia, y es un hecho ampliamente aceptado que la disfunción endotelial es esencial en el desarrollo de aterosclerosis [18]. Diversas evidencias indirectas indican la existencia de una disfunción endotelial en la uremia: 1) El aumento de los niveles plasmáticos de tres proteínas sintetizadas por el endotelio (factor von Willebrand, activador del plasminógeno tisular o el activador del plasminógeno tipo urokinasa en los pacientes urémicos [19,20]; y 2) la liberación disminuida de factor von Willebrand o del activador

del plasminógeno tisular tras la administración de desmopresina en estos pacientes [20]. Estos hallazgos sugieren la existencia de un estado de activación y lesión endotelial crónica que podrían estar implicados en la progresión de la arteriosclerosis en los pacientes urémicos.

Además de las causas reconocidas de arteriosclerosis en la población normal (hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión y tabaquismo), existen diversos factores que podrían potencialmente facilitar y acelerar el rápido desarrollo de arteriosclerosis en los pacientes urémicos. Así, la activación y lesión endoteliales, y la activación plaquetaria y leucocitaria que ocurren durante la hemodiálisis jugarían un papel importante a largo plazo en el desarrollo de arteriosclerosis [21,22]. Diversas evidencias [23] indican que el estado funcional de las plaquetas es mejor en los enfermos urémicos sometidos a diálisis peritoneal (sin stress mecánico ni exposición a superficies extrañeras, que en aquellos sometidos a hemodiálisis. Es lógico pensar que la activación plaquetaria repetida durante la hemodiálisis convencional acabe produciendo a largo plazo un estado refractario que contribuiría a la diátesis hemorrágica de estos pacientes [24]. Al mismo tiempo, esta activación celular contribuiría a que las moléculas de adhesión expresadas por las plaquetas y otros elementos sanguíneos activados o las choquinas liberadas al torrente circulatorio durante la hemodiálisis contribuyeran a la lesión endotelial y consecuentemente al desarrollo acelerado de arteriosclerosis y de las complicaciones trombóticas de los enfermos urémicos.

Con todos estos antecedentes nos propusimos investigar los efectos de un medio urémico sobre la célula endotelial (CE) *in vitro*,

Material y métodos

A fin de evaluar el efecto de un medio urémico sobre la proliferación y la viabilidad de las células endoteliales, así como sobre la trombogenicidad de estas CE y de las matrices extracelulares (subendotelio) generadas por estas células, cultivos de células endoteliales humanas fueron expuestos durante 72 horas a la presencia de un 20% de un pool de plasma procedente, a) de sujetos normales (n=10), b) de pacientes hemodializados (n=10),

B. Métodos

Cultivos de célula endotelial

Las CE se obtuvieron de venas de cordón umbilical mediante exposición a colagenasa (2% en PBS durante 15 minutos a 37°C). Posteriormente, se cultivaron en un medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con albumina 1 mM, HEPES 2 ml/l, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml y un 20% de un pool de suero humano a) de sujetos normales (n=10), b) de pacientes urémicos (n=10). El cultivo se realizó en un incubador humidificado

a 37°C con un 5% de CO₂. Las células endoteliales fueron subcultivadas durante el segundo pasaje en cubreobjetos de plástico previamente cubiertos con gelatina 1% (Thermanox, Miles Lab, Naperville, Il) para los estudios de perfusión de CE o de la matriz extracelular. Para la determinación del número y la viabilidad de las CE y cuantificación de niveles de factor von Willebrand en el sobrenadante se cultivaron en frascos de Roux de 25 cm². La viabilidad se determinó mediante la técnica de exclusión del azul de tripán [25]. El número de células se expresó como número de células/cm² de superficie de cultivo y la viabilidad como porcentaje de células viables.

Determinación de niveles de Factor von Willebrand

Los niveles de factor von Willebrand (FvW) antigénico en las matrices extracelulares o en sobrenadantes se determinaron por ELISA (26). Como fase sólida se utilizaron multipocillos (7 mm, Intermed, Nunc Corp, Dinamarca) cubiertos con anticuerpos policlonales de conejo monoespecíficos para el FvW (Dako, A082, Dinamarca). Se incubaron diluciones seriadas de plasma humano normal y de las muestras (matrices subendoteliales o sobrenadantes) por triplicado durante 2 horas a 20°C. Tras un lavado con PBS suplementado con albúmina al 1%, se añadió una dilución 1/1500 de anticuerpo policlonal de conejo antiFvW marcado con peroxidasa (Dako, P226, Dinamarca) y se dejó incubar durante 2 h. Se lavaron nuevamente los multipocillos con PBS suplementado con albúmina al 1%. Finalmente, la tinción de la peroxidasa se obtuvo mediante la adición de 0.4 mg/ml de ortofenildiamina y 0.25 µl/ml de H₂O₂ al 30% (300 µl por pocillo) durante 10 minutos a 20°C. Los standards se prepararon a partir del pool de plasma humano normal.

Exposición de las células endoteliales y preparación de las matrices extracelulares

Tras la incubación de las células endoteliales en los cubreobjetos, se seleccionaron unos cubreobjetos para los estudios de perfusión de CE con sangre normal. Los otros cubreobjetos se utilizaron para estudiar las matrices extracelulares generadas por las CE. Las matrices extracelulares fueron expuestas mediante tratamiento de las CE con EGTA al 2% en una solución de Hanks (HBSS, Flow Lab, Irving, Escocia) durante 1 hora a 37°C. Las matrices extracelulares se mantuvieron a 37°C en HBSS hasta realizar los estudios de perfusión.

Estudios de perfusión "ex vivo"

Los estudios de perfusión de CE y de las matrices extracelulares se realizaron con sangre total anticoagulada con citrato de sujetos sanos en cámaras de perfusión planas [27]. Los cubreobjetos 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 cubreobjetos fueron posteriormente fijados, deshidratados con alcoholes, incluidos en JB-4 (Polysciences, Warrington, Penn, USA) y teñidos con azul de toluidina.

La interacción de las plaquetas con la matriz extracelular se evaluó morfométricamente, de acuerdo con los crite-

rios de Baumgartner y Muggli, utilizando un sistema de análisis semiautomatizado (MOP-20, Kontron, Messergerate GmB) [28]. 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 µm de altura; y **trombo** (T) agregados plaquetarios con una altura igual o superior a 5 µm. Cada uno de estos parámetros se expresaron como porcentaje sobre la superficie total analizada. Se consideró como **superficie cubierta por plaquetas** la suma de todos los parámetros anteriores (C+A+T).

C. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media ± e.s.m. Para la comparación de datos entre grupos se utilizó el test de la t de Student para datos independientes. Se consideraron significativos valores de p<0.05.

Resultados

Viabilidad de las células endoteliales.

No se observaron diferencias morfológicas entre CE expuestas a los distintos medios de cultivo. Además, tampoco se observaron diferencias respecto al número de células (7.3±6.5 x 10⁴ cels/cm²) y el porcentaje de células viables (81.8±6.5% vs 76.6±4.3%) entre las distintas condiciones de cultivo.

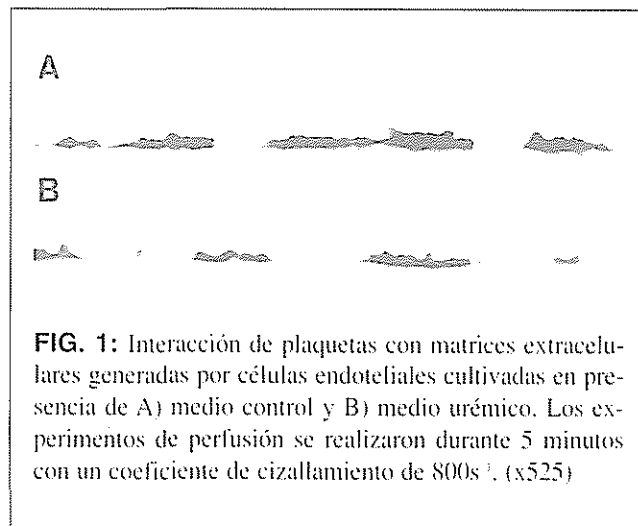


FIG. 1: Interacción de plaquetas con matrices extracelulares generadas por células endoteliales cultivadas en presencia de A) medio control y B) medio urémico. Los experimentos de perfusión se realizaron durante 5 minutos con un coeficiente de cizallamiento de 800s⁻¹. (x525)

Efecto del suero urémico sobre la interacción plaqueta-matriz extracelular (MEC).

Como se muestra en la figura 1, la deposición de plaquetas sobre MEC generadas por CE expuestas a un suero urémico (EC-URE) era significativamente menor (n=9). Esto se reflejaba en un menor porcentaje de superficie total

cubierta por plaquetas ($24.1 \pm 1.2\%$ en ECURE vs $30.2 \pm 2.4\%$ en EC-CON, $p < 0.05$) y en el porcentaje de plaquetas adheridas (9.8 ± 1.9 en EC-URE vs 16.7 ± 1.8 en EC-CON, $p < 0.02$). No se observaron diferencias en el porcentaje de contacto o agregados plaquetarios (Figura 2).

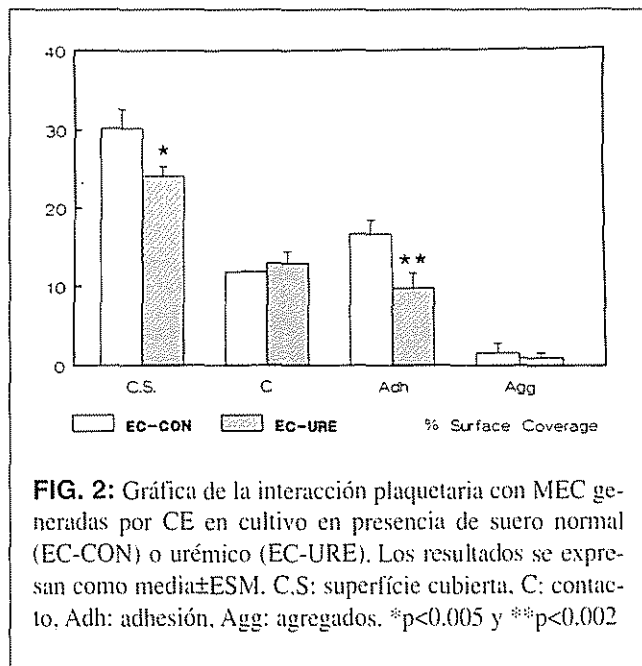


FIG. 2: Gráfica de la interacción plaquetaria con MEC generadas por CE en cultivo en presencia de suero normal (EC-CON) o urémico (EC-URE). Los resultados se expresan como media \pm ESM. C.S: superficie cubierta, C: contacto, Adh: adhesión, Agg: agregados. * $p < 0.005$ y ** $p < 0.002$

Efecto del medio urémico sobre la interacción plaqueta-célula endotelial.

La perfusión de CE en cultivo con sangre anticoagulada indujo patrones distintos dependiendo de las condiciones de cultivo. En los cubreobjetos expuestos al suero urémico las CE se desprendían más durante la perfusión de sangre (Figura 3). Las plaquetas reaccionaban con los espacios vacíos intercelulares, pero no con las CE ni en cultivos control ni en los expuestos al medio urémico.

Efecto del medio urémico sobre el factor von Willebrand

Los niveles de FvW medidos en los sobrenadantes o asociados con la MSE no mostraban diferencias entre CE cultivadas en presencia de suero urémico o normal (Tabla 1).

Tabla 1. Antígeno del factor von Willebrand expresado en la matriz extracelular (MEC) y secretado al medio de cultivo (sobrenadante) en cultivos de células endoteliales en presencia de un medio control (EC-CON) y medio urémico (EC-URE).

	Sobrenadante	Matriz extracelular
EC-CON	1205.0 \pm 209	150 \pm 3.2
EC-URE	965.1 \pm 233	160.1 \pm 10.1

Los resultados representan nanogramos por área ocupada por 10^6 células y se expresan como media \pm ESM de 5 experimentos diferentes para cada grupo de estudio.

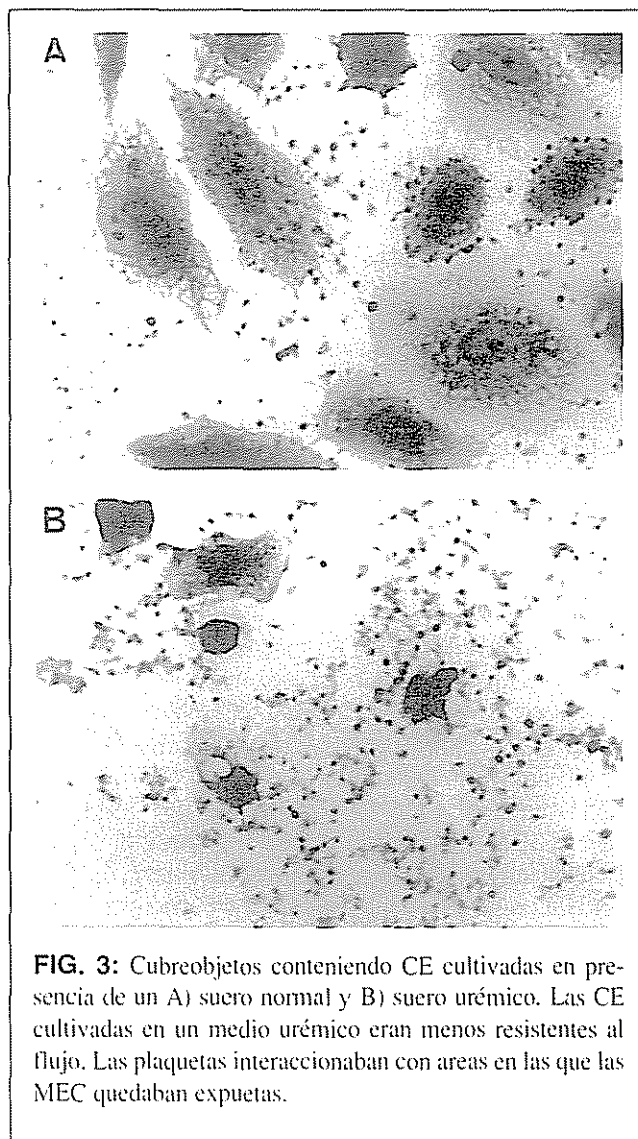


FIG. 3: Cubreobjetos conteniendo CE cultivadas en presencia de un A) suero normal y B) suero urémico. Las CE cultivadas en un medio urémico eran menos resistentes al flujo. Las plaquetas interactuaban con áreas en las que las MEC quedaban expuestas.

Morfología ultraestructural de las matrices extracelulares.

El análisis morfológico de las matrices extracelulares generadas por células endoteliales desarrolladas en presencia de suero urémico o control mostraban diferencias considerables. Las matrices generadas en presencia de suero control mostraba una red compacta de fibrillas con grados diversos de grosor enganchado a la superficie de los cubreobjetos. En cambio, las matrices extracelulares generadas por CE expuestas a un medio urémico estaban cuantitativamente disminuidas y más desorganizadas. Además el recubrimiento de la superficie del cubreobjetos por MEC era inferior en presencia de un medio urémico (Figura 4).

Discusión

El presente estudio, utilizando células endoteliales en cultivo en presencia de un medio urémico indican que la uremia induce una disfunción endotelial que conduce a una trombogenicidad del subendotelio disminuida y una adhesión de estas células a su matriz subendotelial más lábil. Sin embargo, no observamos alteraciones significativas en el crecimiento o la viabilidad de las células endoteliales culti-

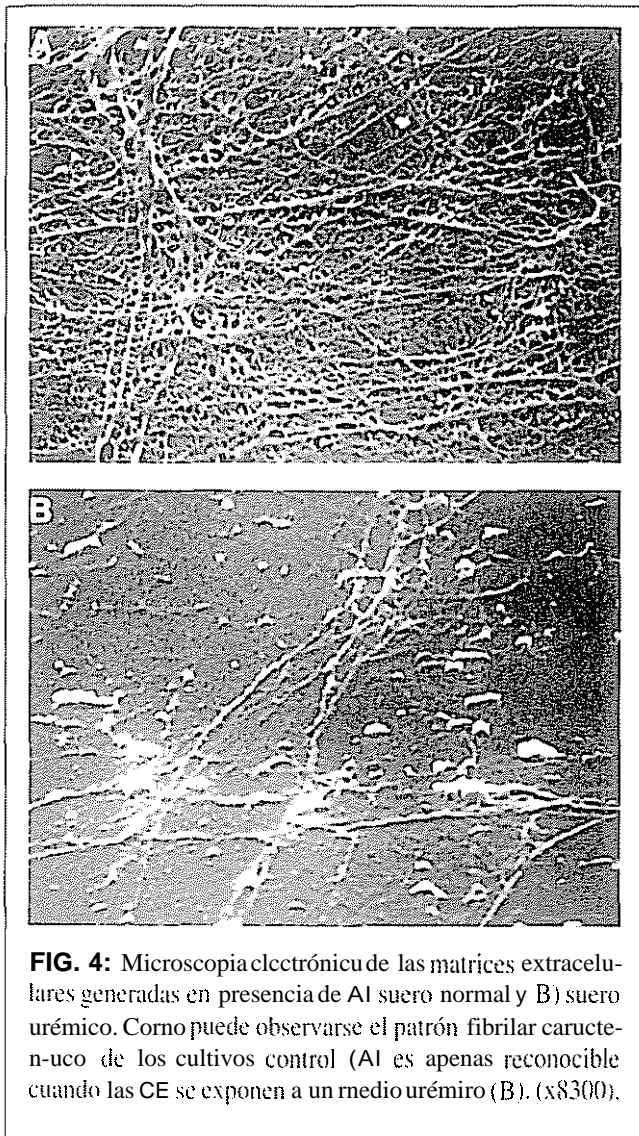


FIG. 4: Microscopia electrónica de las matrices extracelulares generadas en presencia de A) suero normal y B) suero urémico. Como puede observarse el patrón fibrilar característico de los cultivos control (A) es apenas reconocible cuando las CE se exponen a un medio urémico (B). (x8300).

vadas en presencia de un medio urémico. Asimismo no observamos diferencias respecto a la capacidad de sintetizar, almacenar o secretar FvV con respecto a los controles.

Las plaquetas y los productos liberados por ellas durante su activación han sido implicados en el desarrollo de arteriosclerosis y complicaciones trombóticas (18). Posiblemente, un aumento en la deposición de plaquetas en áreas del vaso sin células endoteliales resultará en una arteriosclerosis acelerada. Nuestros resultados no permiten sostener la hipótesis de que la arteriosclerosis acelerada en la uremia es debida a un subendotelio más trombogénico. De hecho, el subendotelio generado por células endoteliales en presencia de un medio urémico es menos trombogénico, lo que podría contribuir a la diétesis hemorrágica descrita en la uremia.

A pesar de estos resultados la hipótesis de que las toxinas urémicas pudieran contribuir al daño vascular y a la arteriosclerosis acelerada descrita en estos pacientes no puede descartarse totalmente. En este sentido deben hacerse varias consideraciones previas. Primero, las propiedades pro y antitrombóticas de las células endoteliales no pueden refle-

jarse fielmente en los estudios de perfusión con sangre citratada realizados. Los activadores e inhibidores de la coagulación o de la fibrinólisis presentes en las células endoteliales intactas (19) no juegan un papel cuando las células endoteliales han sido eliminadas. Segundo, los estudios ultraestructurales revelaron que el medio urémico puede tener un efecto deletéreo sobre la generación de la matriz subendotelial por las células endoteliales. Ello sugiere que el medio urémico puede tener un efecto negativo sobre la síntesis de proteínas de la matriz subendotelial por la célula endotelial. Aunque la MSE generada en presencia de un medio urémico fue suficiente para soportar monocapas de células endoteliales en cultivo en situación estática, en condiciones de flujo (similares a lo que ocurre en la pared arterial *in vivo*) se demostró una adhesividad más débil de estas células endoteliales. Si ello es cierto, el mayor desprendimiento de las CE y la consiguiente exposición del subendotelio vascular favorecería la deposición de plaquetas y formación de placas de ateroma.

En conclusión, nuestros resultados indican que el medio urémico induce una alteración de las propiedades del subendotelio vascular. Ello se refleja en cambios morfológicos de la matriz subendotelial generada por células endoteliales, lo cual conlleva una disminución de sus propiedades trombogénicas y una adhesividad disminuida de las células endoteliales a su matriz. Estas alteraciones, ya presentes tras un corto periodo de incubación, probablemente reflejan otros cambios funcionales y metabólicos de las células endoteliales. Incluso es posible que las propiedades de la pared arterial se vean alteradas sucesivamente durante la exposición crónica a un medio urémico, como ocurre normalmente en estos pacientes.

Bibliografía

1. Remuzzi G: Bleeding in renal failure, *Lancet* 1:1205-1208, 1988.
2. Gordge MP, Neild GH. Platelet function in uremia. *Platelets* 2: 115-123, 1991.
3. Lindner A, Charra S, Sherrard OJ, Scribner SH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 290: 697-701, 1974.
4. Eberst M, Berkowitz LR. Hemostasis in renal disease. *Am J Med* 96: 168-179, 1994.
5. Rubclink FJ, Zwavinga JJ, Koomans HA, Sixma JJ. Thrombosis and hemostasis in renal disease. *Kidney Int* 46: 287-296, 1994.
6. Livio M, Gouli E, Marchesi D, RCHILIZZI G, Mecan G, de Gaetano G: Uremic bleeding: Role of anemia and beneficial effect of red cell transfusion. *Lancet* 2:1013-1015, 1982.
7. Fernandez F, Goudable C, Sie P, Ton-That H, Durand D, Suc JVI, Boneu B: Loe-bmatocrit and prolonged bleeding time in uremic patients: Effect of red cell transfusions. *Sr J Haematol* 59:139-148, 1985.

8. Caslillo R, Lozano T, Escolar G, Revert L, López J, Ordinas A: Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. *Blood* 68:337-42, 1986.
9. Gralnick IR, Mckcown LP, Williams SB, Shafer B: Plasma and platelet von Willebrand factor defects in uremia. *Am J Med* 85:806-810, 1989.
10. 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* 76:1336-1340, 1990.
11. Escolar G, Diaz-Ricón M, Cases A, Castillo R, Ordinas A, White JG: Abnormal cytoskeletal assembly in platelets from uremic patients. *American Journal of Pathology* 143:823-831, 1993.
12. Ruine AEG, Murgreiter R, Brunner FP et al. Reperfusion on management of end-organ failure in Europe XXII 1991. *Nephrol Dial Transplant* 7 (sup12): 5-48, 1992.
13. Brown JH, Hum LP, Viresni S, Short CD, Gokal R, Mallick NP. Comparative mortality from cardiovascular disease in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 9: 1136-1142, 1994.
14. Ritz E, Deppisch R, Stier E, Hansch G, Athrogeneisis and cardiac death: are they related to dialysis procedure and biocompatibility". *Nephrol Dial Transplant* 9 (supl 2): 165-172, 1994.
15. Moiu M, Manuacci P, Vizzouo L, Casari S, Cattaneo M, Pomicelli C: Improvement in the haemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* ii: 1227-1229, 1987.
16. Cases A, Escolar G, Reverter JC, Ordinas A, Lopez-Pedret J, Revert L, Castillo R. Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients. *Kidney Int* 42: 668-672, 1992.
17. Canadian Erythropoietin Study Group: Association between recombinant human erythropoietin and quality of life and exercise capacity of patients receiving haemodialysis. *Brit Med J* 300:573-578, 1990. 18. Ross R. The pathogenesis of arteriosclerosis: An update. *N Engl Med J* 314: 488-500, 1986.
19. Sngripumj A, Cupisti A, Buicchi U, Ferdeghini M, Morcelli E, Bursouj G, Plusmn parunciers of the prothrombotic state in chronic uremia. *Nephron* 63: 273-278, 1993.
20. Gris JE, Branger B, Vecina F, Al Subaclani B, Fourcade J, Schved JF. *Kidney Int* 46: 87-813, 1994.
21. Hemmendinger S, Neumann MR, Beretz A, Kleinsoyler C, Cuzenue JP, Rich A, Schohn D, Jahn H. Mitogenic activity on human arterial smooth muscle cell is increased in the plasma of patients undergoing hemodialysis with cuprophane membranes. *Nephron* 53: 147-151, 1989.
22. Roxs R: The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med* 314:488-500, 1986.
23. Díaz-Ricón M, Escolar G, Cases A, Carretero M, Ordinas A: Hemodialysis can contribute to the hemostatic defect in uremia. *Thrombosis and Haemostasis* 69:963(A), 1993.
24. Tissot D, Reverter JC, Cases A, Escolar G, Ordinas A, Vitlumor N, Lopez Pedret J, Castillo R: Platelet RNA contents in uremic patients, Effect of hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Thromb Haemostasis* 69: 1143(A), 1993.
25. Aznar-Salán J, Bastida E, Escolar G, Almirall L, Diaz-Ricón M, Anton P, Castillo R, Ordinas A. Dipyrimole induces changes in the thrombogenic properties of extracellular matrices produced by endothelial cells in culture. *Thromb Res* 64: 341-353, 1991.
26. Reinders JH, De Groot per, Conslves J, Zandbergen J, Van Mourik JA. Isolation of a storage and secretory organelle containing von willebrand protein from cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Acta* 804:361-369, 1986.
27. Sakariassen KS, Aarts PA, de Groot PG, Houdijk WP, Sixma JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrices, and purified components. *J Lab Clin Med* 102: 522-535, 1983.
28. Escolar G, Bastida E, Castillo R, Ordinas A. Development of a computer program to analyze parameters of platelet-vessel wall interaction. *Haemostasis* 16: 8-14, 1986.