

La eritropoyetina mejora la transducción de señales, vía tirosin-quinasas, en plaquetas de enfermos urémicos

Aleix Cases*, Eva Estebanell, Gemma Arderiu, Antonio Ordinas, Ginés Escolar, Maribel Díaz-Ricart.

Resumen

El tratamiento con eritropoyetina es efectivo en la profilaxis de episodios de sangrado en pacientes urémicos. Ha sido demostrado que el tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) mejora la adhesión plaquetaria en enfermos urémicos, incluso antes de producir un incremento en el hematocrito. En este trabajo hemos investigado el posible efecto de la rHuEPO en los procesos de señalización que ocurren en plaquetas. Para ello, fueron obtenidas suspensiones plaquetarias de enfermos urémicos, antes y al menos un mes después de iniciar tratamiento con 40 U/Kg de rHuEPO. Los estudios fueron realizados paralelamente en muestras de individuos sanos no tratados. Los patrones de fosforilación proteica a nivel de residuos tirosina fueron evaluados en muestras obtenidas de plaquetas antes y después de la activación con trombina. También fueron analizados cambios en la asociación de proteínas fosforiladas en residuos tirosina al citoesqueleto plaquetario. Las suspensiones plaquetarias obtenidas fueron activadas con 0.1U/mL de trombina durante 90 segundos. Alícuotas de plaquetas no activadas y activadas fueron solubilizadas con dodecilsulfato sódico (SDS) para obtener lisados plaquetarios o procesadas para la extracción con Tritón X-100 del citoesqueleto plaquetario. El contenido proteico de ambas muestras fue resuelto mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, seguida por transferencia proteica a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas presentes en las membranas fueron reveladas mediante la incubación con un anticuerpo específico conjugado con peroxidasa y la señal amplificada mediante quimioluminiscencia. Después de la activación con trombina, las proteínas p130, p110, p100, p85, p78, p75, pp62, pp60, p54 y p52, asociadas a la fracción insoluble del citoesqueleto plaquetario aparecieron fosforiladas en los perfiles control. La activación de plaquetas de pacientes urémicos no tratados con rHuEPO resultó en unos patrones de fosforilación muy débiles, comparados con los perfiles control. Sólo las proteínas pp62 y pp60 aparecieron claramente fosforiladas. Sin embargo, en plaquetas de los mismos pacientes cuando estaban en tratamiento con rHuEPO, la fosforilación inducida por trombina incrementó incluso por encima de los niveles controles, especialmente la banda de 54 KDa. Aunque está ampliamente aceptado que parte del efecto hemostático de la eritropoyetina es mediado por un incremento en el hematocrito, nuestro trabajo sugiere que la eritropoyetina mejora la señalización intraplaquetaria en enfermos urémicos. Ello podría explicar una respuesta plaquetaria a estímulos de la activación más efectiva antes incluso de que exista un aumento del hematocrito clínicamente detectable.

Summary

Erythropoietin has shown to be effective in the prophylaxis of bleeding episodes in uremic patients. We demonstrated that treatment with recombinant human erythropoietin (rHuEPO) improves platelet adhesion in uremic patients even before any increase in hematocrit could be noticed. We have investigated the possible effect of rHuEPO on the signaling processes occurring in platelets. Platelet suspensions were obtained from uremic patients before and one month after initiating treatment with 40U/KG rHuEPO. Tyrosine-phosphorylation patterns were evaluated in non-activated and thrombin-activated platelet lysates from uremic patients under rHuEPO treatment. Changes in the association of tyrosine-phosphorylated proteins to the cytoskeleton were also analyzed. Platelet suspensions were activated with 0 or 0.1U/mL of thrombin for 90 seconds. Aliquots of non-activated or activated platelets were solubilized with SDS to obtain platelet lysates or Triton-extracted to obtain platelet cytoskeleton. Samples were resolved by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western-blotting. Immunoblots were probed with a horseradish peroxidase-antiphosphotyrosine recombinant antibody. Platelet lysates from uremic patients showed weaker tyrosine-phosphorylated proteins when compared to control profiles. No differences were observed among profiles from rHuEPO non-treated or treated patients. On the contrary, marked differences were detected when analyzing tyrosine-phosphorylated proteins associated with the cytoskeleton. After thrombin activation, proteins p130, p110, p100, p85, p75, pp62, pp60, p54 and p52 associated with the Triton-insoluble cytoskeletal fraction appeared phosphorylated in control profiles. Thrombin activation of platelets from uremic patients before rHuEPO showed weak tyrosine-phosphorylation patterns when compared with control profiles. Only pp62 and pp60 appeared clearly and p54 was slightly phosphorylated. In contrast, in platelets from the same patients under rHuEPO treatment, thrombin-induced phosphorylation improved to levels even above those observed in control profiles. Particularly, the band at 54KDa was consistently more phosphorylated in all the patients under rHuEPO treatment. Although it is accepted that part of the hemostatic effect of erythropoietin is mediated by an increase in hematocrit, our study suggests that it enhances platelet signaling in uremic platelets which may explain the improvement of platelet response to activating stimulus before a detectable elevation of hematocrit.

Servicios Hemoterapia-Hemostasia y *Nefrología.
Hospital Clínic. • Villarroel 170 • 08036 Barcelona
Teléfono: 93 227 54 00 Ext: 2034 • Fax: 93 227 54 48
E-mail: mdiaz@medicina.ub.es

Introducción

La insuficiencia renal crónica está asociada frecuentemente a una producción disminuida de la eritropoyetina (1), principal regulador hormonal de la eritropoyesis, resultando en anemia. Este defecto coexiste con una alteración en la hemostasia primaria asociada en parte con una deficiencia en las propiedades adhesivas y cohesivas de las plaquetas de estos pacientes (2-4). El tratamiento con eritropoyetina ha mejorado considerablemente la calidad de vida de los pacientes urémicos (5, 6). Aunque está bien establecido que la eritropoyetina estimula la eritropoyesis, resultados obtenidos por distintos grupos indican que esta glicoproteína puede además afectar positivamente tanto la producción como la función plaquetaria (7-12).

El tratamiento con el eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) mejora la adhesión de plaquetas de pacientes urémicos sobre el subendotelio vascular, en condiciones reológicas, incluso antes de que se produzca un aumento en el hematocrito clínicamente detectable (13). Por otra parte, estudios realizados recientemente por Wolf y col (14) muestran que las plaquetas de animales tratados con eritropoyetina son hiperreactivas a la trombina, como han demostrado, mediante citometría de flujo, al detectar un aumento en la secreción de los gránulos plaquetarios.

Sabemos que uno de los mecanismos celulares para modular la función proteica es la fosfo/defosforilación. Este proceso es fundamental en determinados estadios de amplificación y respuesta celulares tras la estimulación por determinados agonistas. Errores en la transducción de señales implicarían alteraciones en el comportamiento celular. La eritropoyetina es capaz de inducir la fosforilación, a nivel de residuos tirosina, de ciertas proteínas y también de activar la fosfolipasa C- γ 1 (15), en líneas celulares eritroides. Además, resultados obtenidos por Witthuhn y col (16) apoyan la hipótesis de que la proteína-quinasa Jak2 coordina la unión de eritropoyetina a su receptor con la fosforilación de tirosinas en células eritroides. Por otro lado, cabe señalar en relación al papel de la trombopoyetina, principal regulador hormonal de la megacariopoyesis y la trombopoyesis juega un papel importante en la señalización intracelular por fosforilación a nivel de residuos tirosina (17). Por todo ello, para entender las bases moleculares por las cuales la eritropoyetina es capaz de mejorar la función plaquetaria, los eventos de transducción de señales que ocurren en las plaquetas de enfermos bajo tratamiento con eritropoyetina deben ser estudiados.

El principal objetivo de este trabajo fue el de estudiar el efecto de la eritropoyetina en los procesos de transducción de señales que ocurren por fosfo/defosforilación proteica a nivel de residuos tirosina. Para ello, analizamos los patrones de fosforilación de tirosinas en plaquetas de pacientes urémicos no tratados con rHEPO y de pacientes urémicos después de al menos un mes de iniciar el tratamiento con rHuEPO. Dado que ha ya sido demostrado previamente que los enfermos urémicos bajo hemodiálisis presentan una al-

teración en la organización del citoesqueleto plaquetario, también analizaremos la asociación de proteínas fosforiladas en tirosina a la fracción del citoesqueleto después de la activación plaquetaria con trombina.

Material y métodos

Sujetos

Los estudios fueron llevados a cabo en 11 pacientes afectados de insuficiencia renal crónica terminal en programa de hemodiálisis, 8 hombres y 3 mujeres, con una edad media de $68,6 \pm 9,92$ años y a un tiempo medio en HD de $73,7 \pm 23,6$ meses (media \pm ESM). La etiología de la insuficiencia renal era: nefropatía diabética (4 casos), glomerulonefritis (4), nefritis intersticial (1), poliquistosis renal (1) y nefropatía por analgésicos (1). Ninguno de los pacientes recibía aspirina ni fármacos que afectaran el funcionamiento plaquetario en las 4 semanas previas a las extracciones de sangre, ni ningún paciente había recibido transfusiones de sangre, ni derivados hemáticos en los 15 días previos. Todos los pacientes fueron sometidos a diálisis durante 4 horas, 3 veces por semana con filtros de acetato de celulosa (MN 140 ó 170, Althin Medical Inc, Miami Lakes, FL, USA) y baño de bicarbonato en máquinas de ultrafiltración controlada (Monitral S, Hospital). Los estudios fueron realizados inmediatamente antes de la sesión de hemodiálisis (48 horas después de la última sesión). El estudio fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos del centro y todos los sujetos dieron su consentimiento por escrito para participar en el mismo. Los pacientes que requerían tratamiento con eritropoyetina recibieron una dosis inicial de 40U/Kg de eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) vía endovenosa post-diálisis, tres veces por semana.

Diseño experimental

Los estudios fueron llevados a cabo en plaquetas de pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis i) no sometidos a tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) y ii) después de al menos un mes de iniciar el tratamiento con eritropoyetina, y en muestras de sangre obtenidas de donantes sanos, como control de los experimentos. Los patrones de fosforilación a nivel de residuos tirosina en plaquetas antes y después de ser activadas con 0,1U/mL de trombina fueron analizados en suspensiones plaquetarias totales. Los cambios inducidos a nivel de citoesqueleto plaquetario fueron evaluados después de la activación con trombina. Además, las tirosin-proteínas asociadas a la fracción insoluble del citoesqueleto plaquetario fueron estudiadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% seguidos de transferencia proteica.

Obtención de las suspensiones plaquetarias

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de pacientes urémicos, siempre antes de la sesión de hemodiálisis, y anticoaguladas con citrato/fostato/dextrosa (CPD) a una concentración final de 19mM. El plasma rico en plaquetas

(PRP) fue obtenido por centrifugación de la sangre anticoagulada a 100xg durante 20 min. Seguidamente el PRP fue resuspendido a una proporción 1:1 con un tampón citrato-cítrico-dextrosa (93mM citrato sódico, 7 mM ácido cítrico y 14mM dextrosa), pH 6,5 en presencia de inhibidores de la activación plaquetaria como son la adenosina 5mM y teofilina 3mM (18). Tras la adición del tampón CCD, la suspensión plaquetaria fue sometida a una serie de centrifugaciones a 1800xg durante 20 min. Tras la última centrifugación, el sedimento de plaquetas fue resuspendido en una solución de Hanks (HBSS) y mantenidas durante 20 min a 37°C. Alícuotas de las suspensiones plaquetarias fueron activadas con 0 ó 0,1U/mL de trombina durante 90s a 37°C. La activación plaquetaria fue detenida añadiendo a las muestras un tampón que contenía: 125mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% glicerol y 0,003% de azul de bromofenol) más inhibidores como ortovanadato sódico (2mM) y 0,0625% N-etilmaleimida. Seguidamente las muestras obtenidas fueron calentadas a 90°C durante 5 min, y tras enfriamiento fueron congeladas a -40°C hasta su análisis electroforético. Alícuotas equivalentes de las suspensiones plaquetarias no-activadas y activadas con trombina fueron procesadas para obtener el citoesqueleto plaquetario.

Extracción del citoesqueleto plaquetario

Todas las suspensiones plaquetarias no-activadas y activadas fueron lisadas al añadir un tampón de lisis (19) que contenía 2% Tritón X-100, 10mM EGTA, 4mM EDTA y 100mM Tris-HCl, pH 7,4 a 4°C, más inhibidores de las proteasas como 2µg/mL leupeptina, 2mM benzamidina, 2mM PMSF, 2µg/mL pepstatina y 2mM ortovanadato sódico. Después de 30 min a 4°C, las muestras fueron centrifugadas a 15.600xg durante 4 min. Los sedimentos de la primera centrifugación, correspondientes a la matriz del citoesqueleto, fueron resuspendidos con un tampón que contenía tampón de lisis y tampón de lavado, en una proporción 1:1, donde el tampón de lavado contenía los mismos componentes que el tampón de lisis excepto el Tritón. Los residuos fueron solubilizados con tampón de Laemmli. Seguidamente las muestras obtenidas fueron calentadas a 90°C durante 5 min, y tras enfriamiento fueron congeladas a -40°C hasta posterior determinación de las proteínas asociadas al citoesqueleto mediante técnicas electroforéticas.

Análisis de las proteínas: electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia proteica

Las proteínas presentes en las suspensiones totales de plaquetas y en la fracción del citoesqueleto insoluble al detergente Tritón fueron analizadas en geles de poliacrilamida en gradiente de concentración del 7-12% o, al 8% (20). Los perfiles electroforéticos presentes en los geles fueron detectadas por tinción con Azul de Coomassie, y analizados densitométricamente, y por otro lado las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (21). Después de bloquear las uniones inespecíficas, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo recombinante contra fosfotirosinas conjugado con peroxidasa (HC20 de Transduction La-

boratories, Lexington, KY, USA). El exceso de anticuerpo fue eliminado mediante lavados exhaustivos de las membranas y fueron reveladas mediante un método de quimi-luminiscencia (ECL) (22), (Amersham Pharmacia Biotek, Essex, UK).

Cuantificación de las bandas proteicas

Las bandas proteicas tras la tinción de los geles fueron analizados densitométricamente (23). Para ello fue utilizado un procesador de imágenes conectado a un ordenador personal, con un programa específicamente diseñado para analizar imágenes de geles de electroforesis (Sigma Gel, Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Cuando comparamos la asociación de las proteínas contráctiles a la fracción insoluble del citoesqueleto, el área de cada proteína en los perfiles procedentes de plaquetas no activadas fue calculado y considerada como 100%. El área correspondiente a la misma proteína en los perfiles procedentes de plaquetas tras la activación con trombina también fue determinada. Los resultados fueron expresados como incrementos en la asociación de las diferentes proteínas a la fracción del citoesqueleto de plaquetas tras la activación con trombina con respecto al valor correspondiente de cada proteína con los perfiles de plaquetas no activadas. A fin de comparar la fosforilación de las diferentes bandas, fue estimada la intensidad de cada banda y representada por cruces en número creciente dependiendo del grado de fosforilación.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente usando el test de la t de Student para datos pareados. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Cambios inducidos por la activación con trombina en los patrones de fosforilación de residuos tirosina en plaquetas solubilizadas

Como se observa en la figura 1, los perfiles correspondientes a plaquetas de donantes sanos (columna 1) y de pacientes urémicos no tratados (columna 2) o tratados con rHEPO (columna 3) observados tras tinción con azul de Coomassie son indistinguibles.

Alícuotas de las suspensiones plaquetarias obtenidas fueron mantenidas en reposo o activadas con 0,1U/ml de trombina durante 90 segundos. Seguidamente, las muestras fueron procesadas para el análisis de las fosfotirosinas presentes antes y después de la activación, mediante geles del 8%.

La activación de plaquetas controles con trombina produjo la fosforilación de diversas proteínas. Aunque las plaquetas de enfermos urémicos también respondieron a la activación, el grado de fosforilación a nivel de residuos tirosina fue significativamente inferior. Las proteínas p110,

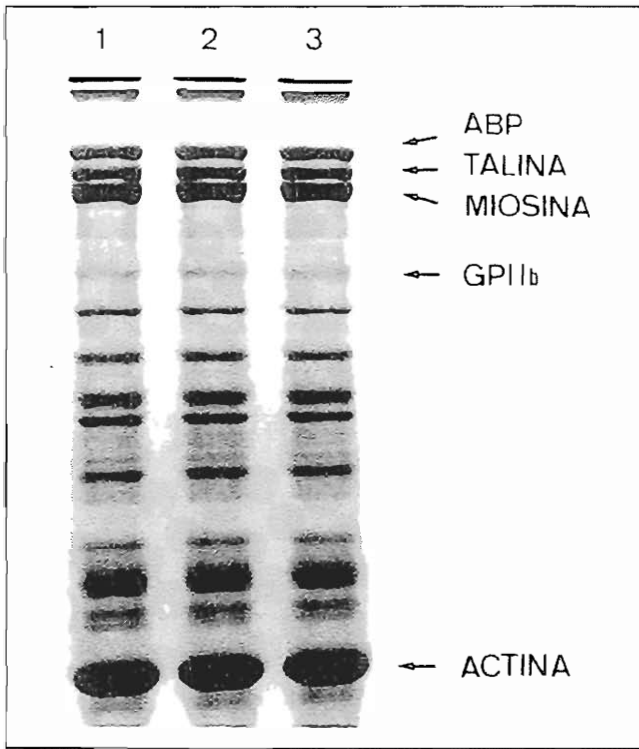


Figura 1: Perfiles electroforéticos (7-12%), tras tinción con azul de Coomassie, correspondientes a plaquetas solubilizadas con dodecilsulfato sódico (SDS). Las suspensiones plaquetarias fueron obtenidas de donantes sanos (columna 1), de pacientes urémicos no tratados (columna 2) y de pacientes urémicos después de al menos un mes de iniciar tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) (columna 3). ABP="actin-binding protein", GPIIb=glicoproteína IIb.

p95, p66, p52 y p35 estaban claramente ausentes en los perfiles correspondientes a plaquetas urémicas activadas con trombina. Además las proteínas p90 y p39 estaban visiblemente disminuidas. Estos resultados fueron extensibles no sólo a aquellos pacientes urémicos que no estaban sometidos a tratamiento con eritropoyetina sino también a aquellos bajo tratamiento con rHuEPO (Figura 2).

Organización del citoesqueleto plaquetario tras la activación con trombina

Los perfiles electroforéticos correspondientes a los residuos insolubles al Tritón X-100 obtenidos de plaquetas antes y después de ser activadas con trombina, provenientes de donantes control y de pacientes urémicos no tratados y bajo tratamiento con rHuEPO (Figura 3), fueron analizados por densitometría. El grado de asociación de las distintas proteínas al citoesqueleto fue expresado como porcentaje de incorporación de cada proteína en las muestras activadas con trombina frente a las no activadas.

No fueron observadas diferencias cualitativas entre los perfiles correspondientes a plaquetas en reposo de donantes sanos y los correspondientes a los pacientes urémicos incluidos en el estudio.

La activación con trombina de plaquetas control resultó en un incremento en la incorporación de las distintas prote-

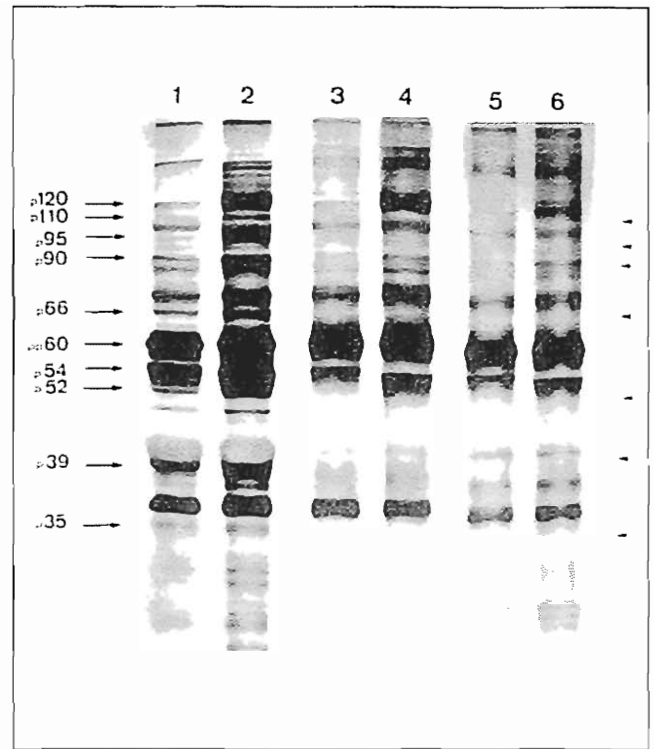


Figura 2: Perfiles electroforéticos (8%) que muestran patrones de fosforilación proteica a nivel de residuos tirosina. Las suspensiones plaquetarias fueron obtenidas de donantes sanos (columnas 1 y 2), plaquetas procedentes de pacientes urémicos no tratados (columnas 3 y 4) y plaquetas procedentes de pacientes después de al menos un mes de iniciar tratamiento con rHuEPO (columna 5 y 6). Las columnas 1, 3 y 5 corresponden a plaquetas no activadas y las columnas 2, 4 y 6 a plaquetas activadas con 0,1U/mL de trombina.

ínas contráctiles. La incorporación de ABP ("actinbinding protein"), miosina, α -actinina y actina a la fracción de baja velocidad del citoesqueleto plaquetario fue del $135\pm 10\%$, $48\pm 9\%$, $59,4\pm 5,9$ y $125\pm 4\%$, respectivamente en plaquetas control.

Las proteínas contráctiles asociadas a la fracción del citoesqueleto polimerizado, insoluble al Tritón X-100, obtenida a partir de plaquetas de los pacientes urémicos con insuficiencia renal crónica, antes de iniciar tratamiento con rHuEPO, fueron analizadas. Tras la activación con 0,1U/ml de trombina se observó una incorporación disminuida significativamente ($p < 0,01$, respecto datos control) de las proteínas contráctiles ABP, miosina, α -actinina y actina de $78\pm 4\%$, $42,0\pm 5\%$, $39\pm 4\%$ y $68\pm 5\%$, respectivamente.

Tras al menos un mes de iniciar tratamiento con 40U/Kg de rHuEPO se obtuvieron muestras de sangre de los mismos pacientes y el mismo diseño experimental fue aplicado. El análisis de los perfiles proteicos correspondientes al citoesqueleto plaquetario de estos pacientes indicó que la composición cuali y cuantitativa de las proteínas asociadas era comparable a la obtenida en plaquetas de donantes sanos, tanto en condiciones de reposo como tras la activación. Cuando las plaquetas de estos pacientes fueron activadas con trombina, la incorporación de las proteínas contráctiles mencionadas fue significativamente superior a la

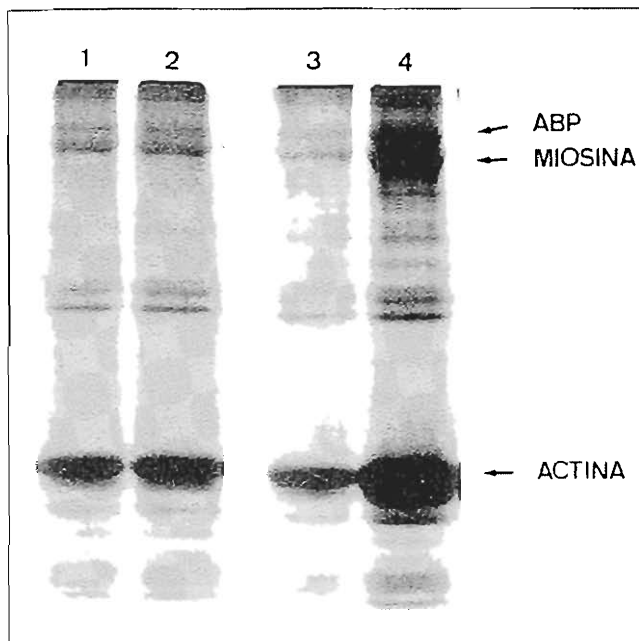


Figura 3: Perfiles electroforéticos (7-12%), tras tinción con azul Coomassie, correspondientes a 1 fracción del citoesqueleto insoluble al Tritón X-100 de plaquetas antes (columnas 1 y 3) y después de ser activadas con 0,1U/mL de trombina (columnas 2 y 4). Las muestras fueron obtenidas de plaquetas de pacientes urémicos no tratados (columna 1 y 2) y de pacientes urémicos después de al menos un mes de iniciar el tratamiento con eritropoyetina (columna 3 y 4). ABP="actin-binding protein".

encontrada en los pacientes no tratados con rHuEPO ($p < 0,01$ para todas las proteínas analizadas). Los resultados obtenidos expresados como incorporación de proteína fueron de $115 \pm 6\%$, $45,9 \pm 6\%$, $70,9 \pm 5\%$ y $100 \pm 8\%$ para ABP, miosina, α -actinina y actina, respectivamente.

Análisis de las proteínas fosforiladas en residuos tirosina asociadas al citoesqueleto plaquetario. Cambios inducidos por trombina

Dado que las observaciones anteriores indicaron que en las plaquetas de los enfermos tratados con rHuEPO se produce una mejor organización del citoesqueleto plaquetario tras la activación, fueron realizados experimentos para determinar si la eritropoyetina pudiera tener un efecto sobre la distribución de las fosfo-tirosin proteínas a la fracción polimerizada del citoesqueleto plaquetario (Figura 4).

En plaquetas no activadas procedentes de donantes sanos y de enfermos urémicos, apenas fueron detectadas proteínas fosforiladas. Cuando plaquetas de donantes sanos fueron activadas con 0,1U/ml de trombina durante 90 segundos, las proteínas p130, p 110, p100, p85, p78, p75, pp62, pp60, p54 y p52, asociadas a la fracción insoluble del citoesqueleto plaquetario aparecieron claramente fosforiladas. La activación de plaquetas de pacientes urémicos no tratados con rHuEPO resultó en unos patrones de fosforilación muy débiles, comparados con los perfiles control. Sólo las proteínas pp62 y pp60 aparecieron claramente fosforiladas. Sin embargo, en plaquetas de los mismos pacientes cuando estaban en tratamiento con rHuEPO, la fosforila-

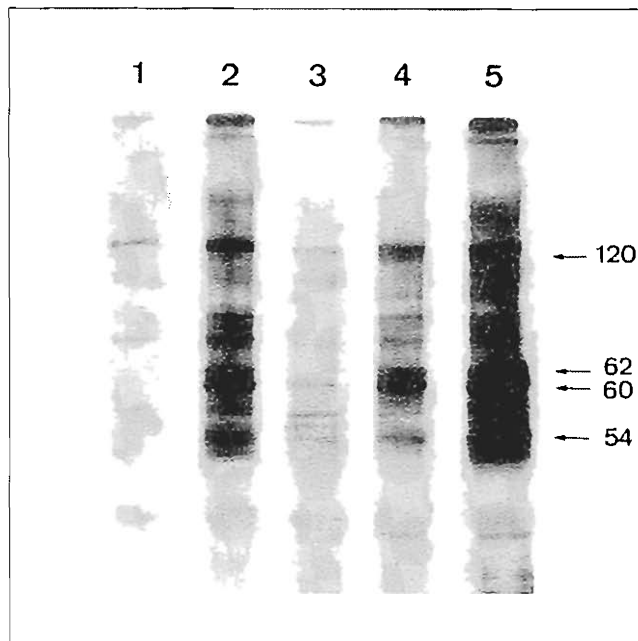


Figura 4: Perfiles electroforéticos (8%) correspondientes a las proteínas fosforiladas a nivel de residuos tirosina asociadas a la fracción del citoesqueleto insoluble al Tritón x-100. Las muestras fueron obtenidas a partir de plaquetas de donantes sanos (columnas 1 y 2), de pacientes urémicos antes (columnas 3 y 4) y después de al menos un mes de iniciar el tratamiento con eritropoyetina (columnas 5 y 6). Las columnas 1, 3 y 5 corresponden a plaquetas no activadas y las columnas 2, 4 y 6 a plaquetas activadas con 0,1U/mL de trombina.

ción inducida por trombina incrementó en todas las proteínas incluso por encima de los niveles controles, especialmente la banda de 54 KDa.

En la tabla I se muestran los incrementos en los niveles de fosforilación de las proteínas asociadas al citoesqueleto tras la activación de plaquetas con trombina. A fin de comparar la fosforilación de las diferentes bandas, la intensidad de cada una de ellas fue estimada y representada por un sistema de cruces en número creciente dependiendo del grado de fosforilación.

Tabla I

	CONTROL	PRE-rHuEPO	POST-rHuEPO
p130	++++	++	+++
p110	+	-	++
p100	+++	++	+++
p85	++	++	++
p78	++	+	++
p75	++	+	++
pp62	+++	++	++++
pp60	++++	++	+++++
p54	+++	+	+++++
p52	+	-	++
p35	-	-	+

Tabla I: Proteínas fosforiladas a nivel de residuos tirosina, presentes tras la activación plaquetaria con 0,1U/ml de trombina, asociadas a la fracción del citoesqueleto citoplasmático. Las muestras fueron obtenidas de donantes sanos (CONTROL), de pacientes urémicos antes (PRE-rHuEPO) y después de al menos un mes de iniciar el tratamiento con eritropoyetina (POST-rHuEPO).

Discusión

Los resultados del presente trabajo indican que el efecto beneficioso de la eritropoyetina en la hemostasia primaria y específicamente sobre la función plaquetaria de los enfermos urémicos pudiera ser debido no sólo a un incremento en el hematocrito sino al efecto potenciador directo de esta citocina sobre los procesos de transducción de señales en las plaquetas de estos enfermos.

Los enfermos con insuficiencia renal crónica presentan una tendencia hemorrágica (24, 25). Esta disfunción parece tener un origen multifactorial y ha sido asociada a alteraciones en la función plaquetaria. Ha sido demostrado que pacientes urémicos con historia clínica de sangrado muestran una adhesión plaquetaria defectuosa sobre el subendotelio vascular, en experimentos realizados bajo condiciones de flujo (3). El tratamiento con eritropoyetina parece mejorar la capacidad adhesiva y agregante de las plaquetas de enfermos urémicos. Esta mejoría sería en parte atribuible a un efecto beneficioso sobre la reología sanguínea debido a un aumento en el hematocrito de los enfermos tratados. A pesar de que este efecto ha sido ampliamente demostrado, estudios realizados para comprobar el efecto de la eritropoyetina sobre la función plaquetaria en distintas fases del tratamiento indican el efecto directo de este fármaco sobre las plaquetas (9). De hecho, trabajos realizados por otros grupos coinciden en encontrar una hiperreactividad de las plaquetas de individuos tratados con eritropoyetina (14) a diversos agonistas.

Por otra parte, trabajos recientes sugieren que la eritropoyetina pueda tener un efecto sobre la producción de plaquetas (7-12). Sin embargo, se ha podido detectar un efecto protrombótico en algunos pacientes en estadios iniciales del tratamiento, incluso antes de que fuera esperado un efecto sobre la producción de plaquetas o de glóbulos rojos (9).

La fosforilación de proteínas a nivel de residuos tirosina juega un papel fundamental en la transducción de señales que ocurre en las células tras la recepción de estímulos y que condicionará la respuesta celular. La estimulación de los receptores de la membrana plaquetaria inicia una cascada de señales que darán lugar al cambio de forma de las plaquetas condicionando la secreción del contenido de los gránulos intraplaquetarios, resultando en la agregación plaquetaria. Durante este proceso, se producen incrementos dramáticos en los niveles de fosforilación de múltiples proteínas intracelulares (26). En ambos eventos, el citoesqueleto plaquetario parece intervenir activamente. Por un lado, el ensamblaje de actina en una malla de filamentos y la asociación de otras proteínas estructurales al citoesqueleto es de crítica importancia para el cambio de forma y la contracción interna de las plaquetas (27-28). Las proteínas que constituyen tanto el citoesqueleto de la membrana como el citoplasmático que constituyen tanto el citoesqueleto de la membrana como el citoplasmático se reorganizan mediante procesos de poli y despolimeración. Además, ha sido demostrado que muchas de las proteínas susceptibles de ser fosforiladas en residuos tirosina están asociadas al citoesqueleto (29). Por ello, sería lógico pensar que el citoesque-

leto pudiera regular la localización de estas proteínas durante el proceso de activación.

Estudios previos realizados en pacientes urémicos, sometidos a hemodiálisis y con historia de sangrado, mostraron un defecto en la interacción de las plaquetas con el subendotelio vascular (3, 30) y superficies artificiales (23). Además, la evaluación bioquímica mediante técnicas electroforéticas del citoesqueleto plaquetario de estos pacientes mostró una incorporación defectuosa de las proteínas contráctiles cuando fue comparada con la observada en plaquetas de donantes sanos. Estos estudios surgieron alteraciones funcionales y bioquímicas del citoesqueleto plaquetario en la uremia que pudieran comprometer la función plaquetaria observada en los pacientes urémicos bajo hemodiálisis. De hecho, cuando en el presente trabajo analizamos el efecto de activar con trombina plaquetas de enfermos urémicos antes y después del tratamiento con rHuEPO, no observamos cambios notables en los patrones de fosforilación en los lisados plaquetarios. Sin embargo, al analizar los cambios inducidos por la trombina en la asociación del citoesqueleto plaquetario, pudimos detectar una mejor reorganización de las proteínas contráctiles al citoesqueleto citoplasmático. Además, la presencia de proteínas fosforiladas a nivel de residuos tirosina, defectuosa en plaquetas de enfermos urémicos antes del tratamiento con rHuEPO, mejoró incluso por encima de los valores encontrados en las plaquetas de donantes sanos. Estos resultados indican que si bien las plaquetas de enfermos urémicos bajo tratamiento con rHuEPO aún presentan alteraciones asociadas a la patología urémica, la eritropoyetina mejora la eficacia de estas plaquetas a amplificar su respuesta frente a estímulos de activación.

La mayoría de los receptores celulares para los factores de crecimiento hematopoyéticos pertenecen a una familia de receptores para citocinas con unas características comunes (31, 32). Se caracterizan por contener cuatro cisteínas en una posición conservada y el motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) en el dominio extracelular del receptor. Parece ser que el efecto de la rHuEPO regulando la proliferación y diferenciación de las células eritroides sería independiente de la unión a su receptor específico, presente en estas células (33). Las similitudes estructurales que presentan los receptores para las distintas citocinas reforzarían la hipótesis de que la eritropoyetina pudiera ser reconocida por otro receptor de la misma familia, como podría ser el receptor de la trombopoyetina en los megacariocitos.

Se ha demostrado que la eritropoyetina es capaz de inducir la fosforilación de proteínas en residuos tirosina en células de la serie roja, aunque se desconocen las quinasas involucradas (16). Este efecto parece jugar un papel esencial en la actividad biológica de la eritropoyetina. Nuestros resultados indican que la rHuEPO mejora la localización de proteínas señalizadoras dentro de las plaquetas, garantizando una respuesta plaquetaria más eficaz. Quedaría por determinar si la rHuEPO ejerce un efecto directo sobre los mecanismos de transducción de señales en la serie megacariocítica y a qué nivel ocurre a lo largo de la diferenciación de esta serie celular.

Bibliografía

1. Eschbach JW, Adamson JW. Anemia of end-stage renal disease. *Kidney Int* 28:1, 1985.
2. Remuzzi G. Bleeding in renal failure. *Lancet* I:1205, 1988.
3. Castillo R, Lozano T, Escolar G, Revert L, López J, Ordinas A. Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. *Blood* 68:337, 1986.
4. Moia M, Manucci PM, Vizzotto L, Casati S, Cattaneo M, Ponticelli C. Improvement in the haemostatic defect of uremia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* II:1227, 1987.
5. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: results of a combined phase Y and II clinical trial. *N Engl J Med* 316:73, 1987.
6. Erslev AJ. Erythropoietin. *N Engl J Med* 324:1339, 1991.
7. Van Geet C, Hauglustaine D, Verresen L, Vanrusselt M, Verylen J. Haemostatic effects of recombinant human erythropoietin in chronic haemodialysis patients. *Tromb Haemost* 61:117, 1989.
8. Akizawa T, Kinugasa E, Kitaoka T, Koshikawa S. effects of recombinant human erythropoietin and correction of anemia on platelet function in hemodialysis patients. *Nephron* 58:400, 1991.
9. Cases A, Escolar G, Revert L, Ordinas A, López-Pedret J, Revert L, Castillo R. Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients. *Kidney Int* 42:668, 1992.
10. Eschbach JW, Abdulhadi MH, Browne JK, Delano BG, Downing MR, Egrie JC, Evans RW, Fiedman EA, Graber SE, Haley NR, Kobert S, Krantz SB, Lundin AP, Nissenson AR, Ogden DA, Paganini EP, Rader B, Rutsky EA, Stivelman J, Stone WJ, Teschan P, Van Stone JC, Van Wyck DB, Zuckerman K, Adamson JW. Recombinant human erythropoietin in anemia patients with end-stage renal disease: Results of a phase III multicenter clinical trial. *Ann Intern Med* 111:992, 1989.
11. Berridge MV, Fraser JK, Carter JM, Lin FK. Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on platelet production in the rat. *Blood* 72:970, 1988.
12. McDonald TP, Cottrell MB, Clift RE, Cullen WC, Lin FK. High doses of recombinant human erythropoietin stimulate platelet production in mice. *Exp Hematol* 15:719, 1987.
13. Kaupke CJ, Butler GC, Vaziri ND. Effect of recombinant human erythropoietin on platelet production in dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol* 3:1672, 1993.
14. Wolf RE, Peng J, Fiesse P, Gilmore LS, Burstein SA, Dale GL. Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs. *Tromb Haemost* 78:1505, 1997.
15. Ren HY, Komatsu N, Shimizu R, Okada K, Miura Y. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C- α 1 in a human erythropoietin-dependent cell line. *J Biol Chem* 269:19633, 1994.
16. Witthuhn BC, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. Jak2 associates with the erythropoietin. *Cell* 74:227, 1993.
17. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, Kato T, Miyazaki H, Handa M, Ikeda Y. Recombinant thrombopoietin induces rapid protein tyrosine phosphorylation of Janus kinase 2 and Src in human blood platelets. *Blood* 86:23, 1995.
18. Rao GH, Escolar G, White JG. Epinephrine reverses the inhibitory influence of aspirin on platelet-vessel wall interactions. *Thromb Res* 44:65, 1986.
19. Jennings LK, Fox JEB, Edwards HH, Phillips DR. Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *J Biol Chem* 256:6927, 1981.
20. Laemmli UK. cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227:680, 1970.
21. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350, 1979.
22. Cielowski K, McCormick E, Brugge JS. p21rasGAP association with Fyn, Lyn and Yes in thrombin-activated platelets. *J Biol Chem* 267:55025, 1992.
23. Escolar G, Díaz-Ricart M, Cases A, Castillo R, Ordinas A, White JG. Abnormal cytoskeletal assembly in platelets from uremic patients. *Am J Pathol* 143:823, 1993.
24. Di minno G, Martinez J, McKean ML, Delarosa J, Bruke JF, Murphy S. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *Am J Med* 79:552, 1985.
25. Godge MP, Neild GH. Platelet function in uraemia. *Platelets* 2:115, 1991.
26. Ferrell JE, Martin GS. Platelet tyrosine specific protein phosphorylation is regulated by thrombin. *Mol Cell Biol* 8:3603, 1988.
27. Gerrard JM, Schollmeyer JV, White JG. The role of contractile proteins in the function of the platelet surface membrane. Post G, Nicholson GL, eds. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, amsterdam pp 217-51, 1981.
28. Hartwing JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol* 118:1421, 1992.
29. Fox JEB, Lipfert L, Clark EA, Reynolds CC, Austin CD, Brugge JS. On the role of the membrane skeleton in mediating signal transduction. *J Biol Chem* 268:25973, 1993.
30. 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, 1990.
31. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony stimulating factors. *Science* 236:1229, 1987.
32. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haematopoietic cells. *Nature* 339:27, 1989.
33. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 77:419, 1991.