

# ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS ASSOCIADAS AO TRATAMENTO COM ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE (rHu Epo)

JOSÉ VINHAS, PEDRO ASSIS, CARLOS OLIVEIRA, FRANCISCO CRESPO, M. MARTINS PRATA

Serviços de Nefrologia do Hospital de Santa Cruz, Carnaxide e Hospital de Santa Maria, Lisboa. Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Cruz, Carnaxide.

## RESUMO

A insuficiência renal crónica terminal (IRC) está frequentemente associada a perturbações da função plaquetária com as consequentes alterações da hemostase. Foi descrito por alguns autores que a rHu Epo, utilizada no tratamento da anemia da IRC, é capaz de activar um largo espectro de células precursoras hematopoiéticas, podendo por isso aumentar o número de plaquetas e potencialmente melhorar a sua função. Com o objectivo de investigar as alterações da hemostase associada à terapêutica com rHu Epo estudaram-se 8 doentes em hemodiálise (HD), tendo-se determinado, antes e após 12 semanas de rHu Epo, os seguintes parâmetros: número de plaquetas, agregação plaquetária ao ADP, tempo de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial (aPTT), lise das euglobulinas e fibrinogénio plasmático. Constatou-se que a terapêutica com rHu Epo não alterou o número de plaquetas ( $187710 \pm 52690$  vs  $204430 \pm 68710$ ;  $p = \text{NS}$ ), mas parece ter melhorado a sua função (IM% de agregação ao ADP:  $46,3 \pm 4,4\%$  vs  $49,1 \pm 5,3\%$ ;  $p < 0,05$ ). Observou-se também uma melhoria significativa no TP (de  $79,0 \pm 3,0\%$  p/  $87,5 \pm 8,9\%$ ;  $p < 0,02$ ) e no aPTT (de  $33,3 \pm 5,9$  seg p/  $29,3 \pm 2,1$  seg;  $p < 0,05$ ) que sugerimos poder estar relacionada com uma melhoria na actividade coagulante plaquetária. Estes dados parecem pois mostrar que a terapêutica com rHu Epo (avaliada às 12 semanas) embora não altere o número de plaquetas é capaz de melhorar a função plaquetária.

## SUMMARY

### Hemostasis changes associated with recombinant human erythropoietin (rHu Epo) treatment

End-stage chronic renal failure (CRF) is often associated with platelet dysfunction and therefore with impaired hemostasis. Several investigators have reported that rHu Epo, used in the treatment of CRF anaemia, is able to activate a broad spectrum of hematopoietic stem cells, and therefore is able to increase the number of platelets and to induce correction of platelet dysfunction. In order to investigate hemostasis changes associated with rHu Epo we studied 8 dialysis patients before and 12 weeks after rHu Epo. rHu Epo did not induce any change in the number of platelets ( $187710 \pm 52690$  vs  $204430 \pm 68710$ ;  $p = \text{NS}$ ), but seemed to improve its function (MI% of aggregation with ADP:  $46.3 \pm 4.4\%$  vs  $49.1 \pm 5.3\%$ ;  $p < 0.05$ ). There was an improvement in PT ( $79.0 \pm 3.0\%$  vs  $87.5 \pm 8.9\%$ ;  $p < 0.02$ ) and aPTT ( $33.3 \pm 5.9$  vs  $29.3 \pm 2.1$ ;  $p < 0.05$ ) suggesting an improvement in platelet coagulant activities. These preliminary results indicate that rHu Epo does not increase the number of platelets but can induce a correction of platelet dysfunction.

## INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crónica terminal está frequentemente associada a alterações da hemostase. Estas alterações manifestam-se geralmente por manifestações hemorrágicas da pele e mucosas (hematomas subcutâneos, epistaxis, hemorragia gengival, etc.)<sup>1</sup> e, laboratorialmente por tempos de hemorragia e provas de adesão e agregação plaquetária anormais. O tempo de hemorragia é uma medida muito sensível da capacidade de formação do rolhão hemostático primário, que é influenciado pelo número de plaquetas e pela função plaquetária<sup>2,3</sup>. Vários estudos têm demonstrado que o número de glóbulos vermelhos também influencia decisivamente o valor do tempo de hemorragia<sup>4,5</sup>. A adesão plaquetária, frequentemente anormal na uremia<sup>6</sup>, é influenciada

pelo valor do hematócrito, volume da massa globular, número de plaquetas e níveis plasmáticos do factor de Von Willebrand<sup>7</sup>. Daqui resulta que uma subida no valor do hematócrito pode, potencialmente, corrigir as alterações clínicas e laboratoriais descritas. Este facto foi parcialmente confirmado pela melhoria no tempo de hemorragia observado após transfusão de sangue<sup>4</sup>. Estudos mais recentes têm confirmado estes dados após terapêutica com Eritropoietina Humana Recombinante (rHuEpo)<sup>6</sup>. Uma das hipóteses explicativas defende que a subida do número de glóbulos vermelhos causa um aumento no transporte radial de plaquetas do centro para a periferia do vaso, facilitando deste modo a adesão plaquetária<sup>6,8</sup>.

No entanto, outros autores descrevem que a terapêutica com rHuEpo provoca uma melhoria na agregação plaquetária

ria e atribuem a este facto a melhoria observada no tempo de hemorragia <sup>17</sup>.

O efeito da rHuEpo sobre a hemostase é, pois, um assunto controverso.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudámos oito doentes em hemodiálise que não apresentavam quaisquer manifestações hemorrágicas e que foram medicados com rHuEpo por terem valores de hemoglobina inferiores a 8 gr/dl. Os doentes encontravam-se em hemodiálise regular há mais de 6 meses, e estavam em situação clínica e bioquímica estável. Nenhum dos doentes estava medicado com drogas com interferência na hemostase. As características clínicas dos doentes estão representadas no Quadro 1. A eritropoietina (Eprex, Cilag) foi administrada em bolus, três vezes por semana, após cada sessão de hemodiálise. O objectivo era obter um hematócrito de 30% e/ou hemoglobina de 12 gr/dl. A dose de rHuEpo foi alterada ao fim de cada período de 4 semanas; primeiro período, 50 U/kg de peso/sessão; segundo período, 75 U/kg de peso/sessão; e terceiro período, 100 U/kg de peso/sessão. Sempre que em qualquer destes períodos se ultrapassaram os valores-alvo, a rHuEpo foi interrompido até estarem de novo abaixo desses valores, começando-se então com a dose do período imediatamente anterior.

Neste estudo a avaliação foi feita antes e após 12 semanas de terapêutica, e, constou do seguinte: determinação de hemoglobina e hematócrito; contagem de plaquetas; estudo da agregação plaquetária; determinação do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial (aPTT); avaliação da lise das euglobulinas; doseamento do fibrinogénio plasmático. Para além destas determinações foram feitas análises de bioquímica de rotina de 15 em 15 dias.

O teste de agregação plaquetária foi executado com agrogómetro Payton em plasma rico em plaquetas (PRP) acertadas a 250.000/mm<sup>3</sup>, utilizando como agente agregante a adenosina difosfato (ADP) na dose de 4,8 µg/ml de plasma. Para controlo utilizou-se um grupo de 6 indivíduos saudáveis.

A lise das euglobulinas foi determinada pela técnica das placas de fibrina.

As outras determinações foram feitas utilizando técnicas standard.

Para a avaliação estatística utilizou-se o teste de Wilcoxon.

QUADRO 1 - Características Clínicas dos Doentes

	Sexo	Idade	Tempo de HD (meses)	Etiologia I.R.
JJAS	M	23	6	Glomerulonefrite crónica
MCC	F	55	24	Nefroangiosclerose
MLCFC	F	63	49	Rins poliústicos
FCMS	F	49	58	Tuberculose renal
ASDL	M	48	17	Desconhecida
IMSFL	F	26	16	Glomerulonefrite crónica
ACS	M	56	17	Amiloidose
ASR	M	60	31	Desconhecida
Média		47,5	27,1	
DP		15,1	17,9	

## RESULTADOS

Durante a terapêutica com rHuEpo a hemoglobina subiu de 7,3 ± 0,4 gr/dl para 11,2 ± 1,6 gr/dl (p=0,007). Durante este período, não houve qualquer variação significativa no número de plaquetas (187.710 ± 52.690 vs 204.430 ± 68.710/mp = NS) (Fig. 1).

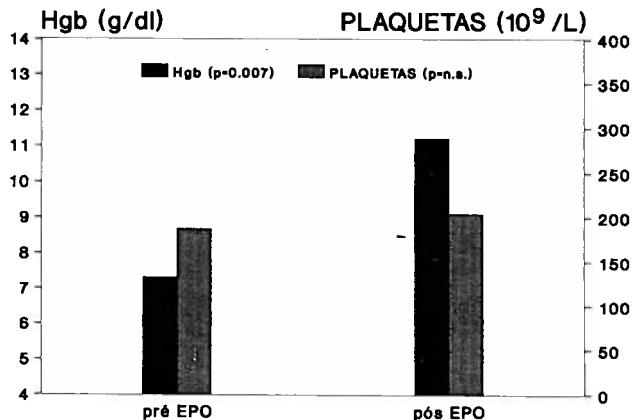


Fig. 1 — Evolução do valor da hemoglobina e do número de plaquetas (em milhares) com a rHuEpo.

Antes da rHuEpo, 3 doentes apresentavam uma agregação plaquetária ao ADP subnormal e, no seu conjunto, uma intensidade máxima (I.M.) inferior ao controlo (46,3 ± 4,4 vs 51,0 ± 2,1% p<0,05). Após 12 semanas de terapêutica observou-se uma elevação significativa da I.M. (p<0,05) a qual já não divergia do valor do grupo controlo (49,1 ± 5,3 vs 51,3 ± 0,5; p<NS) (Fig. 2).

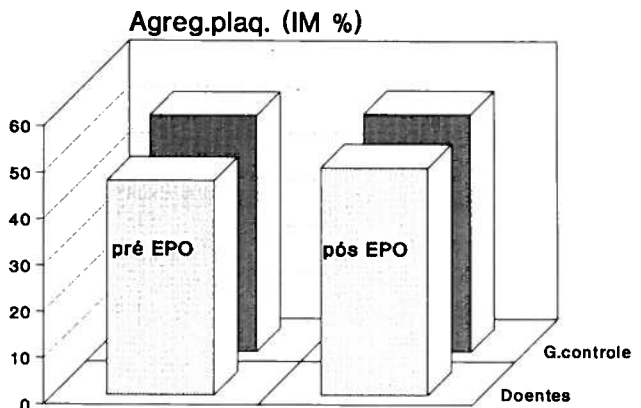


Fig. 2 — Agregação plaquetária ao ADP: verificou-se uma melhoria (p<0,05) associada à terapêutica com rHuEpo. Pós-Epo a intensidade máxima (IM%) já não difere do grupo controle.

Após a rHuEpo observou-se também uma melhoria significativa no tempo de protrombina (87,5 ± 8,9% vs 79,0 ± 3,0%; p<0,02) e no tempo de tromboplastina parcial (29,3 ± 2,1 seg. vs 33,3 ± 5,9 seg.; p<0,05). De referir que, no início, apenas dois doentes apresentavam aPTTs anormalmente elevados (Fig. 3).

A lise das euglobulinas (52,3 ± 6,2 mm<sup>2</sup> vs 48,3 ± 5,7 mm<sup>2</sup>; p=NS) e o fibrinogénio plasmático (256,1 ± 35,4 vs 259,4 ± 60,6 mg/dl; p=NS) apresentavam valores basais normais que não sofreram alterações com a eritropoietina.

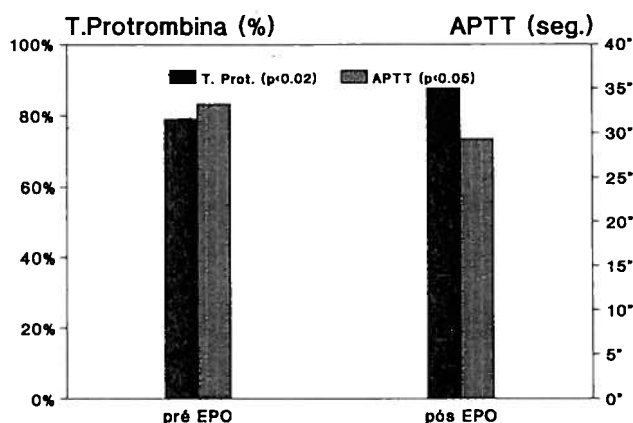


Fig. 3 — Variação do tempo de protrombina e do tempo de tromboplastina parcial activado, durante a terapêutica com eritropoietina.

## DISCUSSÃO

A hemostase normal é o resultado de uma sequência de fenómenos inter-relacionados que inclui a parede do vaso, as plaquetas e o sistema de coagulação. Após lesão da parede vascular as plaquetas aderem ao subendotélio por um processo chamado adesão. Este processo envolve a interacção de um componente plasmático (o factor VIII-Factor de von Willebrand) e uma glicoproteína específica da membrana na superfície da plaqueta (glicoproteína Ib). A adesão é seguida pelo recrutamento de outras plaquetas que vão aderir umas às outras por um processo chamado agregação, de modo a formar o rolhão hemostático primário.

Os doentes em hemodiálise apresentam em cerca de 60% dos casos<sup>13</sup> alterações da hemostase que por vezes se manifestam por hemorragias (epistaxis, etc). Resultam não só de alterações na interacção entre as plaquetas e a parede dos vasos, como também de um deficit na formação do rolhão hemostático primário, tendo como resultado tempos de hemorragia prolongados<sup>2,3</sup>. A hemorragia clínica em doentes urémicos correlaciona-se sobretudo com o tempo de hemorragia<sup>9</sup>. Várias substâncias podem corrigir temporariamente o tempo de hemorragia em alguns doentes urémicos: o crioprecipitado<sup>10</sup> e a DDAVP<sup>11,12</sup> provavelmente por aumento do antigénio do Factor von Willebrand (FvW) e aparecimento do FvW de alto peso molecular, os estrogénios (Premarin<sup>13</sup>), o Zeranol estimulante dos receptores estrogénicos<sup>21</sup> e a hemodiálise<sup>14</sup>.

No entanto, existe evidência de que uma anemia grave, independentemente da causa, pode estar associada com um tempo de hemorragia prolongado o qual pode ser corrigido por transfusão de eritrócitos<sup>4,15,16</sup>. Estes dados sugerem que os eritrócitos têm um papel importante nos mecanismos hemostáticos normais, mas não se pode excluir a possibilidade de a melhoria no tempo de hemorragia observada após transfusão estar relacionada com componentes hemostáticos eventualmente adsorvidos à membrana dos eritrócitos.

No entanto estudos mais recentes mostraram uma melhoria no tempo de hemorragia associada à subida do hematócrito com rHuEpo<sup>6,17,18</sup>.

As alterações da hemostase observadas durante o tratamento com rHuEpo têm apresentado alguns resultados controversos. No que diz respeito ao número de plaquetas, enquanto alguns autores descrevem um aumento significativo embora transitório<sup>17</sup>, outros referem que a terapêutica com rHuEpo não altera o número de plaquetas<sup>6,26</sup>. Neste estudo, o número de plaquetas observado às 12 semanas de tratamento não foi significativamente diferente do inicial.

Em relação à agregação plaquetária, os resultados obtidos com a rHuEpo pelos diferentes investigadores são também divergentes, tendo alguns descrito uma melhoria significativa<sup>17,19</sup> que não foi observada por outros autores<sup>20</sup>. Neste estudo, 3 doentes apresentavam pré-rHuEpo valores subnormais e, no seu conjunto, o grupo de doentes tinham uma agregação plaquetária inferior ao grupo controlo. Após 12 semanas de terapêutica assistiu-se a uma melhoria com a normalização da agregação plaquetária. Alguns estudos constataram no entanto que esta melhoria só se observa até às 12 semanas de terapêutica, voltando posteriormente a agregação plaquetária aos valores pré-rHuEpo<sup>17</sup>. Pensamos por isso repetir este estudo, com avaliação da função plaquetária após um período terapêutico mais prolongado.

Alguns autores referem que na insuficiência renal crónica existe um deficit na síntese de tromboxano<sup>22,23</sup> a qual seria responsável pela deficiente agregação plaquetária. Será pois interessante investigar se a melhoria na função plaquetária associada à terapêutica com rHuEpo estará eventualmente associada à normalização na síntese do tromboxano. Outros autores<sup>17,19</sup> defendem que a normalização da agregação plaquetária está associada a uma subida no número de plaquetas, sobretudo à custa de plaquetas de maiores dimensões, funcionalmente mais activas. Esta hipótese seria apoiada pelo facto de após as 12 semanas de rHuEpo a agregação plaquetária diminuir novamente para valores idênticos aos basais. Com o seu amadurecimento, as plaquetas tornar-se-iam funcionalmente idênticas às existentes antes da terapêutica com rHuEpo. Os dados observados no nosso estudo não apoiam esta hipótese uma vez que não se observou qualquer subida no número de plaquetas.

Após rHuEpo observámos uma melhoria no tempo de protrombina (TP) e no tempo de tromboplastina parcial (aPTT). O TP embora basalmente estivesse dentro dos valores normais, variando entre 74% e 84%, subiu em 7 doentes após o tratamento com rHuEpo, tendo em 2 casos atingido os 100%. Inicialmente, 2 doentes apresentavam aPTTs elevados que normalizaram após o tratamento com a rHuEpo. No seu conjunto, o aPTT após terapêutica, foi significativamente mais baixo que o aPTT basal. Estes dados não foram encontrados por outros autores<sup>20</sup> e é por isso importante confirmá-los em estudos mais alargados, em particular nos doentes com alterações mais pronunciadas da hemostase. Apesar de habitualmente se considerar que as plaquetas e o sistema de coagulação constituem dois sistemas separados envolvidos na hemostase, estes dois mecanismos estão de facto estreitamente interrelacionados<sup>24</sup>. As plaquetas contêm muitos dos factores de coagulação (fibrinogénio, Factores V, VIII, XI, quinogénios de alto peso molecular) e participam activamente a vários níveis, fornecendo a sua membrana a superfície na qual se desenvolvem as reacções de coagulação. Sabe-se que as plaquetas participam na activação proteolítica *Surface-mediated* dos Zimogénios da coagulação, incluindo a protrombina e os Factores X, XI e XII<sup>25</sup>. Por outro lado, demonstrou-se que o factor Va é o local de ligação à membrana do Factor Xa<sup>24</sup>. É, por isso, possível que a melhoria observada no TP e aPTT com a rHuEpo se deva a uma alteração na actividade coagulante plaquetária. Esta hipótese é, obviamente, meramente especulativa. Pensamos que é importante repetir este estudo num maior número de doentes avaliando simultaneamente a secreção plaquetária (FP<sub>4</sub>, B-Tromboglobulina), o metabolismo do ácido araquidónico plaquetário e, nomeadamente, a produção de tromboxano, e a evolução dos níveis do Factor von Willebrand.

## BIBLIOGRAFIA

1. RAO AK, HOLMSEN H.: Congenital Disorders of Platelet Function. *Seminars in Hematology* 1986; 23, n.º2: 102-118.
2. DEYKIN D.: Uremic bleeding. *Kidney Int* 1983; 24: 698-705.

3. LIVIO M., BENIGNI A., REMUZZI G.: Coagulation abnormalities in uremia. *Semin Nephrol* 1985; 5: 82-90.
4. LIVIO M., GOTTI E., MARCHESI D., et al.: Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red-cell transfusions. *Lancet* 1982; 11: 1013-1015.
5. EDITORIAL: The bleeding time and the haematocrit. *Lancet* 1984; i: 997-998.
6. MOIA M., VIZZOTTO L., CATTANEO M., et al.: Improvement in the haemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* 1987; i: 1227-1229.
7. SIXMA J.J. Platelet adhesion in health and disease. In: VERTREATE M., VERMYLEN J., LINJNEN H.R., AMOUR J., eds.: *Thrombosis and haemostasis* 1987. Leuven: International Society on Thrombosis and Hemostasis and Leuven University Press 1987: 127-146 (ext. ref. 24).
8. TURITTO V.T., BAUMGARTNER H.R.: Platelet Interaction with subendothelium in a perfusion system: physical role of red blood cells. *Microvasc Res* 1975; 9: 335-344.
9. STEINER R.W., COGGINS C., CARVALHO A.C.A.: Bleeding time in uremia: A useful test to assess clinical bleeding. *Am J Hematol* 1979; 7: 107-112.
10. JANSON P.A., JUBELIRER S.J., WENSTEEN M.J., et al.: Treatment of the bleeding tendency in uremia with cryoprecipitate. *N Engl J Med* 1980; 309: 1318-1320.
11. MANNUCCI P.M., REMUZZI G., RUSINERI F., et al.: Deamino-8-D-arginine vasopressin shortens the bleeding time in uremia. *N Engl J Med* 1983; 308: 8-12.
12. WATSON A.J., KEOGH J.A.: Effect of 1-Deamino-8-D-arginine vasopressin on the prolonged bleeding time in chronic renal failure. *Nephron* 1982; 32 (1): 47-52.
13. ELNOUR M., ABUELO J.G., CHAZAN J.A., et al.: Bleeding time (BT) in dialyzed and nondialyzed patients (pts) with chronic renal failure and corrective effect of oral conjugated estrogens (Premarin). *Kidney Int* 1990; 37: 294 (abstract).
14. VOSBURGH E., BERNARD D.B., WEINSTEIN M.J.: Shortening of the bleeding time by hemodialysis does not correlate with an increase in the high molecular weight von Willebrand Factor (HMW v WF). *Kidney Int* 1990; 37: 322 (abstract).
15. HELLEN A.J., BORCHGREVINK C.F., AMES S.F.: The role of red cells in hemostasis: the relationship between hematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Haematol* 1961; 76: 42-50.
16. FERNANDEZ F., GUNDABLE C., SIE P., et al.: Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusion. *Br J Haematol* 1985; 59: 139-148.
17. VAN GEET C., HAUGLUSTAINE D., VERRESEN L., et al.: Haemostatic effects of recombinant human erythropoietin in chronic haemodialysis patients. *Thromb Haemost* 1989 Feb 28; 61 (1): 117-121.
18. JOHNSON W.J., Mc CARTHY J.T., YANAGIHARA T., et al.: Effects of Recombinant Human Erythropoietin (Epo) on cerebral and cutaneous blood flow and coagulability of blood. *Kidney Int* 1990; 37: 303 (abstract).
19. TOMURA S., TACHIBANA K., NAKANURA Y., et al.: Enhanced platelet function and coagulability during treatment undergoing hemodialysis. *Kidney Int* 1990; 37: 321 (abstract).
20. WILLIAMS J.D., MACDOUGALL I.C., DAVIES M.E., et al.: Recombinant erythropoietin (Epo) treatment is accompanied by a reduction on protein C and S levels. *Kidney Int* 1990; 37: 381 (abstract).
21. VIGANO G., ZOJA C., CORNA D., et al.: A single oral administration of zeranol shortens the prolonged bleeding time (BT) of uremic rats: long lasting effect mediated by a receptor mechanism. *Kidney Int* 1990; 37: 523 (abstract).
22. REMUZZI G., BENIGNI A., DODESINI P., et al.: Reduce platelet Thromboxane formation in uremia. *J Clin Invest* 1983; 71: 762-768.
23. SMITH M.C., DUNN M.: Impaired thromboxane production in renal failure. *Nephron* 1981; 29: 133-137.
24. DAY H.J., RAO A.K.: Evaluation of Platelet Function. *Seminars in Hematol* 1986; 23, n.º 2: 89-101.
25. GREENGARD J.S., GRIFFIN J.H.: Platelet coagulant activity, in HARKER L.A., ZIMMERMAN T.S. (eds): *Methods in Hematology, Vol 8. Measurements of Platelet Function*. New York, Churchill Livingstone 1983, pp 144-157 (ext. ref. 24).
26. MARTINS PRATA M., TEIXEIRA DE SOUSA F., VIEIRA BARBAS J., et al.: Tratamento da anemia dos insuficientes renais crônicos em hemodiálise com eritropoietina. *Acta Med Port* 1990; vol 3, n.º 3: 149-153.

Pedido de Separatas:  
 José Vinha  
 Av. General Humberto Delgado, 13 A-r/c  
 2560 Torres Vedras



Hospital de Santa Cruz. Carnaxide.